

(11) Número de Publicação: **PT 1319183 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/50 (2007.10) **C12Q 1/25** (2007.10)
A61P 35/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.09.12	(73) Titular(es): MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY 77 MASSACHUSETTS AVENUE CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139 US
(30) Prioridade(s): 2000.09.12 US 231994 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.06.18	
(45) Data e BPI da concessão: 2009.03.31 123/2009	(72) Inventor(es): MALLIKARJUM SUNDARAM US GANESH VENKATARAMAN US ZACHARY SHRIVER US DONGFANG LIU US YI WEI QI US
	(74) Mandatário: GONÇALO DA CUNHA FERREIRA AV. ENG. DUARTE PACHECO, TORRE 1 - 3º 1070-101 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E PRODUTOS RELACIONADOS A HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

MÉTODOS E PRODUTOS RELACIONADOS A HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A coagulação é uma via fisiológica envolvida em manter a hemostase sanguínea normal nos mamíferos. Em condições em que ocorre uma lesão vascular, a via da coagulação é estimulada para formar um coágulo sanguíneo para evitar a perda de sangue. Imediatamente após a ocorrência da lesão vascular, as plaquetas do sangue começam a agregar-se no local da lesão formando um tampão físico para parar a perda. Além disso, o vaso lesionado sofre vasoconstricção para reduzir o fluxo do sangue para a área e a fibrina começa a agregar-se formando uma rede insolúvel ou coágulo que cobre a área rompida. Quando um desequilíbrio na via da coagulação muda para uma coagulação excessiva, o resultado é o desenvolvimento de tendências trombóticas, que são manifestadas, muitas vezes como ataques cardíacos, derrames, trombose de veia profunda e enfartes do miocárdio. As terapêuticas actuais para tratar distúrbios associados com desequilíbrios na via da coagulação envolvem muitos riscos e têm de ser cuidadosamente controladas.

A heparina, um glicosaminoglicano semelhante a heparina altamente sulfatado (HLGAG) produzido pelos mastócitos é um anticoagulante clínico amplamente utilizado e é um dos primeiros fármacos biopoliméricos e um dos poucos fármacos de hidrato de carbono. A heparina, primariamente, suscita os seus efeitos através de dois mecanismos, ambos os quais envolvem a ligação da

antitrombina III (AT-III) a uma sequência de pentassacárido específica $H_{NAC/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ contida no polímero. Em primeiro lugar, a ligação da AT-III ao pentassacárido induz uma mudança conformacional na proteína que media a sua inibição de factor Xa. Em segundo lugar, a trombina (factor IIa) também se liga à heparina num sítio próximo ao sítio de ligação do pentassacárido à AT-III. A formação de um complexo ternário entre AT-III, trombina e heparina resulta na desactivação da trombina. Ao contrário da sua actividade anti-Xa que requer apenas o sítio de ligação da AT-III ao pentassacárido, a actividade anti-IIa da heparina é dependente do tamanho, requerendo pelo menos 18 unidades de sacáridos para a formação eficaz de um complexo ternário AT-III, trombina e heparina.

Para além das propriedades anticoagulantes da heparina, a sua complexidade e ampla distribuição em mamíferos levaram à sugestão de que pode também estar envolvida numa ampla variedade de actividades biológicas adicionais. Os glicosaminoglicanos semelhantes à heparina (HLGAGs), presentes tanto na superfície da célula como na matriz extracelular, são um grupo de polissacáridos complexos que são variáveis em comprimento, consistindo numa unidade de repetição de dissacárido composta de glucosamina e um ácido urónico (ácido idurónico ou ácido glucurónico). O alto grau de complexidade para HLGAGs procede não apenas da sua polidispersividade e a possibilidade de dois componentes de ácido urónico, mas também da modificação diferencial em quatro posições da unidade dissacárida. Três posições, a saber, C2 do ácido urónico e as posições C3 e C6 da glucosamina podem ser O-sulfatadas. Além disso, a C2 da glucosamida pode ser N-acetilada ou N-sulfatada. Juntas, estas modificações poderiam, teoricamente, levar a 32 possíveis unidades dissacáridas, tornando os HLGAGs potencialmente mais densos com informações do que o ADN (4 bases) ou as proteínas (20 aminoácidos). Esta enormidade de possíveis variações

estruturais permite que os HLGAGs estejam envolvidos num grande número de processos biológicos diversos, incluindo a angiogênese (Sasisekharan, R., Moses, M. A., Nugent, M. A., Cooney, C. L. & Langer, R. (1994) *Proc Natl Acad Sci EUA* **91**, 1524-8.), a embriogênese (Binari, R. C., Staveley, B. E., Johnson, W. A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. & Manoukian, A. S. (1997) *Development* **124**, 2623-32; Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L. & Selleck, S. B. (1999) *Nature* **400**, 276-80.; e Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. & Michelson, A. M. (1999) *Development* **126**, 3715-23.) e a formação de β -fibrilas na doença de Alzheimer (McLaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. & Fraser, P. E. (1999) *Eur J Biochem* **266**, 1101-10. E Lindahl, B., Westling, C., Gimenez-Gallego, G., Lindahl, U. & Salmivirta, M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 30631-5).

Embora a heparina seja altamente eficaz numa variedade de situações clínicas e tenha o potencial de ser utilizada em muitas outras, os efeitos secundários associados à terapêutica com heparina são muitos e variados. Os efeitos secundários tais como a trombocitopenia induzida por heparina (HIT) são primariamente associados com a cadeia longa de heparina não fraccionada (UFH) que proporciona domínios de ligação para várias proteínas. Isto levou à explosão na geração e utilização da heparina de baixo peso molecular (LMWH) como uma eficaz alternativa à UFH. Embora se tenha focalizado a atenção em LMWH como substitutas da heparina devido à sua acção farmacológica mais previsível, efeitos secundários reduzidos, actividade antitrombótica sustentada e melhor biodisponibilidade, há, no momento, uma capacidade limitada em padronizar o processo de fabrico da LMWH. Pelo facto das LMWH serem derivadas de heparinas e, em consequência, serem polidispersas e micro-heterogéneas, com estrutura indefinida, as mesmas possuem variabilidade inerente, que actualmente impedem um processo eficaz

para o seu fabrico. Seria de importância tanto do ponto de vista médico como científico ter um método consistente, com controlo de qualidade, rápido, independente de concentração e altamente reproduzível para produzir heparina e outros glicosaminoglicanos.

Numa tentativa de caracterizar as variações moleculares, estruturais e de actividade da heparina, foram investigadas várias técnicas para a análise das preparações de heparina. Técnicas de electroforese em gel de poliacrilamida gradiente (PAGE) e HPLC em colunas de troca iónica forte (SAX) foram utilizadas para a análise qualitativa e quantitativa de preparações de heparina. Embora o método PAGE gradiente possa ser útil para determinar o peso molecular, o mesmo sofre da falta de resolução, particularmente a falta de resolução de oligossacáridos diferentes com tamanho idêntico. SAX-HPLC, que conta com a detecção por absorbância ultravioleta, é muitas vezes insuficientemente sensível para detectar pequenas quantidades de oligossacáridos derivados de heparina estruturalmente importantes. As tecnologias actuais para a purificação e análise de heparinas e outros glicoaminoglicanos são insuficientes. Há uma grande necessidade clínica e científica de métodos melhorados de isolamento e análise.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se em alguns aspectos a métodos para caracterizar preparações de polissacáridos. Como resultado das complexas estruturas de sacáridos, tem sido difícil, senão impossível, caracterizar a pureza e/ou a actividade das preparações de polissacáridos. Ao contrário das amostras de ácido nucléico e proteína as preparações de polissacáridos são geralmente caracterizadas com base na sua capacidade de produzir um certo nível de actividade numa amostra biológica. Estes ensaios não obtêm

o nível de precisão que pode ser obtido por caracterização estrutural directa. De acordo com alguns aspectos da invenção é proporcionado um método para analisar e caracterizar uma amostra de polissacárido. O método envolve aplicar uma restrição experimental a um polissacárido numa amostra para produzir um polissacárido modificado tendo um componente assinatura, que detecta a presença do componente assinatura na amostra como uma indicação de que o polissacárido está presente na amostra e determina a presença ou ausência do componente assinatura para analisar a amostra. Em algumas formas de realização o componente assinatura tem uma actividade biológica conhecida e em outras formas de realização o componente assinatura é biologicamente inactivo.

A restrição experimental aplicada à amostra é qualquer tipo de manipulação que resulta na identificação da presença ou ausência do componente assinatura. A restrição experimental pode ser, por exemplo, qualquer um dos seguintes tipos de restrições experimentais, sós ou combinação: electroforese capilar, cromatografia líquida de alta pressão, cromatografia por permeação em gel, ressonância magnética nuclear, modificação com uma enzima tal como digestão com uma exoenzima ou uma endoenzima, digestão química ou modificação química.

O componente assinatura pode ser utilizado para proporcionar informações a cerca da amostra. Algumas destas utilizações dependem se o componente assinatura é um componente biológico activo ou inactivo. Por exemplo, em alguns casos quando o componente assinatura é um componente biológico activo e a amostra é um lote de polissacárido, o componente assinatura pode ser utilizado para monitorizar a pureza do lote determinando a quantidade de componente assinatura no lote. Em outras formas de realização o método de análise é um método para monitorizar a presença de componentes activos na amostra, em que a presença do componente

assinatura na amostra é indicativa de um componente activo na amostra. Em outras formas de realização o método de análise é um método para determinar a quantidade de componentes activos na amostra determinando a quantidade de componente assinatura na amostra. O método também pode ser realizado em pelo menos duas amostras de tal modo que são determinadas as quantidades relativas de componente assinatura em cada uma das pelo menos duas amostras, e o nível relativo mais alto do componente assinatura é indicativo da amostra mais activa.

Em alguns casos quando o componente assinatura é um componente biológico inactivo, o método de análise pode ser um método para monitorizar a presença de componentes activos na amostra, em que a presença do componente assinatura na amostra é indicativo de uma amostra sem um componente activo.

Os métodos são também úteis em algumas formas de realização para a identificação de moléculas biologicamente activas. Por exemplo, o componente assinatura pode ser utilizado para rastrear uma biblioteca.

Deste modo, em algumas formas de realização o componente assinatura é uma porção biologicamente activa de um polissacárido. As porções biologicamente activas de polissacáridos incluem, mas não se limitam a um tetrassacárido no domínio de ligação AT-III da heparina, um tetrassacárido do domínio de ligação ao FGF da heparina, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; e $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

Em algumas formas de realização o polissacárido é um glicosaminoglicano, tal como uma heparina de baixo peso molecular (LMWH); heparina, uma heparina biotecnologicamente preparada, uma

heparina quimicamente modificada, uma heparina sintética e um heparan sulfato.

Numa outra forma de realização o polissacárido na amostra é comparado a uma base de dados de referência de polissacáridos de tamanho idêntico ao polissacárido, em que os polissacáridos da base de dados de referência também foram submetidos às mesmas restrições experimentais que o polissacárido na amostra, em que a comparação proporciona uma análise composicional do polissacárido da amostra.

Em algumas formas de realização preferidas a amostra é um produto farmacêutico. Em outras formas de realização a amostra é uma amostra biológica, tal como uma amostra de sangue.

Um método para avaliar a qualidade de uma amostra de polissacárido é proporcionado de acordo com outros aspectos da invenção. O método envolve identificar um componente na amostra de polissacárido, determinar um valor quantitativo da quantidade de componente, em que o valor quantitativo do componente é indicativo da qualidade da amostra de polissacárido. Numa forma de realização o método envolve identificar pelo menos dois componentes na amostra de polissacárido e determinar um valor quantitativo da quantidade de cada um dos pelo menos dois componentes para avaliar a qualidade da amostra de polissacárido.

O valor quantitativo pode ser calculado por meio de uma variedade de métodos diferentes, dependendo de como a amostra é processada para identificar o componente. Por exemplo, o valor quantitativo pode ser calculado como a área sob a curva quando a amostra é processada por electroforese capilar, como o factor de resposta ou como a percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra.

Numa forma de realização o passo de calcular a percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra é determinado de acordo com a equação adiante:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

em que

PRA = percentagem da quantidade relativa de cada fracção

RF = factor de resposta

AUC_{%R} = percentagem relativa AUC [(100 x AUC_C)/AUC_T]

AUC_C = Área sob a curva para um componente

AUC_T = a soma da Área sob a curva para todos os componentes.

Numa outra forma de realização de um método implementado por computador para gerar uma estrutura de dados, tangivelmente incorporado num meio legível por computador, representando um valor quantitativo de um componente de um polissacárido, o método compreendendo um acto de realizar o cálculo acima mencionado.

Numa forma de realização o componente é o componente assinatura $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$ ou $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

Em algumas formas de realização o método de degradação química é seleccionado do grupo que inclui despolimerização oxidativa com H₂O₂ ou CU⁺ e H₂O₂, clivagem desaminativa com nitrito de isoamil ou ácido nitroso, clivagem β-eliminativa com éster benzílico de heparina por tratamento alcalino ou por heparinase.

Em outras formas de realização o glicosaminoglicano é seleccionado do grupo que consiste em heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina quimicamente modificada ou heparina sintética.

Os métodos da presente invenção podem ser utilizados para analisar ou avaliar uma amostra em que a amostra é uma preparação de LMWH.

Em alguns aspectos a preparação de LMWH pode ter pelo menos 15% de dissacáridos dissulfatados, menos de 75% de dissacáridos trissulfatados, 3-5% de dissacáridos monossulfatados e pelo menos 2% de 4-7 tetrassacárido.

Em algumas formas de realização a preparação de LMWH inclui pelo menos 3,5%, 4,0% ou 5,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; ou $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

A preparação de LMWH pode incluir pelo menos 3,5%, 4,0% ou 5,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; ou $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

Cada uma das limitações da invenção pode abranger várias formas de realização da invenção. É, portanto, previsto, que cada uma das limitações da invenção que envolve qualquer um elemento ou combinações de elementos pode ser incluída em cada aspecto da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um espectro de massa MALDI do complexo protonado de AT-10 com $(\text{RG})_{19}\text{R}$.

A Figura 2 representa o tratamento de AT-10 com Heparinase. (A) Tratamento de AT-10 com heparinase I incompleta. Nas condições utilizadas neste estudo, a heparinase I cliva uma ligação glicosídica contendo uma I_{2S}. (B) Espectro de massa MALDI de fragmentos AT-10 a partir de digestão exaustiva com heparinase I. (C) Espectro de massa MALDI de AT-10 marcada tratada com heparinase I apresenta cinco fragmentos: um com massa molecular de 576,7 Da (atribuível a ±D), dois tetrassacáridos com massa molecular de 1037,9 (*) e 1154,0 Da, e um hexassacárido de massa marcada com uma massa molecular de 1671,4 (massa de 1615,3 mais a massa do marcador de 56,1). Uma vez que a eficiência de acoplamento foi de ~90%, é também visto hexassacárido não marcado (massa de 1615,1).

A Figura 3 representa a degradação exaustiva de AT-10 com ácido nitroso. O ácido nitroso cliva nos resíduos H_{NS}, deixando para trás uma anidromanose ($\Delta = 97,1$ Da). Ilustrado na inserção está o espectro de massa do perfil de degradação quando a amostra foi tratada com iduronidase (em cima), glucosamina 6-O sulfatase (no meio) e glucuronidase (em baixo), nesta ordem.

A Figura 4 é um espectro de massa MALDI que apresenta degradação parcial com ácido nitroso de AT-10.

A Figura 5 ilustra as estruturas dos três compostos de modelo de oligossacáridos utilizados neste estudo. (A) O pentassacárido 1 (Penta 1) tem a sequência H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}, contém um sítio de ligação AT-III totalmente intacto e tem uma massa molecular calculada de 1508,2. As duas ligações glicosídicas potencialmente susceptíveis à clivagem por heparinase I, II ou III são marcadas A.1 e A.2. (B) O pentassacárido (Penta 2), com a sequência H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe} e uma massa molecular calculada de 1428,1, é estruturalmente idêntico ao Penta 1, menos um 3-O-sulfato na glucosamina interna, deste modo, não contém um sítio AT-III total.

Como no Penta 1 as ligações potencialmente susceptíveis à clivagem por heparinase são marcadas B.1 e B.2. (C) Um hexassacárido derivado de heparinase (Hexa 1), com a sequência $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, foi também utilizado neste estudo. O Hexa 1 (massa molecular calculada de 1614,3) contém apenas um sítio de ligação de AT-III parcialmente intacto; similar à AT-10 falta a unidade dissacárida da extremidade redutora $1_{2S}H_{NS,6S}$. Como com Penta 1 e Penta 2, os sítios de potencial clivagem são marcados C.1, C.2.

A Figura 6 são espectros de massa MALDI de produtos de digestão de (A) heparinase I, (B) heparinase II e (C) heparinase III de Penta 1. Tanto a heparinase I como II prendem Penta 1 na ligação $G_{NS,3S,6S} \downarrow I_{2S}H_{NS,6S}$ (sítio A.2) para dar um produto trissacárido pentassulfatado e um produto dissacárido trissulfatado. O Penta 1 não é clivável por heparinase III.

A Figura 7 são espectros de massa MALDI de produtos de digestão de (A) heparinase I, (B) heparinase II e (C) heparinase III de Penta 2 complexado com $(RG)_{19}R$.

A Figura 8 são espectros de massa MALDI de produtos de digestão de (A) heparinase I, (B) heparinase II e (C) heparinase III de Hexa 1 complexado com $(RG)_{19}R$.

A Figura 9 apresenta titulação de fluorescência de AT-III com heparina de comprimento total (●) ou AT-10 (◆) ao pH 6,0 $I=0,025$. Os dados são plotados como a proporção da fluorescência de AT-III mediante a introdução de sacáridos à fluorescência inicial de AT-III (I/I_0) vs. concentração de sacárido adicionado. Os dados foram ajustados por regressão linear e o valor de K_D foi determinado. Para heparina o valor medido de K_d foi de 10 nM, ao passo que para AT-10 este valor foi de 800 nM. A inserção ilustra a ligação da heparina à AT-111 ao pH 7,4 $I=0,15$. O valor medido de K_D de 36 nM

concorda favoravelmente com outras determinações da afinidade da heparina por AT-III.

A Figura 10 ilustra a análise Funcional do decassacárido AT-10 e comparação à ligação do pentassacárido a AT-III. A actividade anticoagulante *in vitro* do decassacárido AT-10 (▲) foi comparada com o pentassacárido sintético (▣) ou enoxaparina (☒), uma heparina de baixo peso molecular gerada através da clivagem química da heparina. As actividades dos três compostos foram avaliadas medindo (A) a actividade anti-IIa, (B) a actividade anti-Xa, (C) a actividade anti-Xa utilizando factor Xa purificado ou (D) por meio de HepTest. Foram também medidos o tempo de tromboplastina parcial activada (APTT) e o tempo de protrombina (PT) em que nenhum dos compostos apresentou actividade significativa, consistente com a sua alta proporção de actividade anti-Xa:anti-IIa.

As Figuras 11A e 11B apresentam gráficos de análise composicional de UFH derivada de mucosa intestinal porcina. A UFH foi digerida com Heparinase I, II e III e submetida a Electroforese Capilar (CE). O pico 1 (Figura 9A) foi então confirmado como o dissacárido trissulfatado $\Delta U_{2S}H_{NS6S}$. Os picos 2, 3 e 4 são dissacáridos dissulfatados e 5, 6 e 7 são dissacáridos monossulfatados. O pico 8 é o tetrassacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Para além destes, há uma pequena quantidade de dissacáridos não sulfatados que migram muito mais lentamente do que os sacáridos sulfatados, conforme apresentado na Figura 9B.

A Figura 12 apresenta o resíduo por CE da digestão exaustiva do pentassacárido AT-10 $\Delta U_{2S}H_{N,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $IH_{NAC,6S}$ $GH_{NS,3S,6S}$. O tetrassacárido do pico 8 na digestão exaustiva da heparina tem a mesma massa e o tempo de migração que $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

A Figura 13 é um gráfico da actividade do anti-factor Xa para diferentes fracções de UFH como uma função do seu teor de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$. Um gráfico da actividade do anti-factor Xa como uma função da % de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ dá uma linha recta com $r = 0,91$.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

A invenção envolve várias descobertas que levaram a novos avanços no campo da biologia dos polissacáridos. Um dos principais problemas na caracterização dos polissacáridos resulta da sua diversidade estrutural. Esta diversidade estrutural é um dos factores que dificultou o estudo dos relacionamentos sequência-função para os polissacáridos. A síntese química de oligossacáridos definidos foi utilizada no estudo da contribuição relativa às actividades biológicas, tais como a alta afinidade de ligação de AT-III de modificações específicas na sequência de pentassacáridos da heparina (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. & Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). No entanto, estes métodos sintéticos são complexos e não foram amplamente aplicados ao estudo de outras sequências biológicas. Uma abordagem alternativa envolvendo o fraccionamento da afinidade do polissacárido com proteínas de interesse e subsequente caracterização proporcionou alguma informação genérica relativa a padrões de sulfatação de polissacáridos que determinam a afinidade (Parthasarathy, N., Gotow, L. F., Bottoms, J. D., Kute, T. E., Wagner, W. D. & Mulloy, B. (1998) *J Biol Chem* 273, 21111-4.; Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E. & Timpl, R (1999) *Embo J* 18, 6240-8.; e Kreuger, J., Prydz, K., Pettersson, R. F., Lindahl, U. & Salmivirta, M. (1999) *Glycobiology* 9, 723-9).

Num aspecto, a invenção tem por base num novo método para caracterizar amostras de polissacáridos: Constatou-se que as sequências de polissacáridos podem ser rápida e precisamente sequenciadas para identificar um componente assinatura do polissacárido. O componente assinatura pode ser utilizado para caracterizar a amostra de polissacárido de maneiras que não eram possíveis anteriormente. A análise de polissacáridos de grau farmacêutico é governada pela United States Pharmacopia (USP) e outras farmacopeias nacionais. De um modo geral, os tipos de análises exigidos para os polissacáridos são ensaios funcionais e, em alguns casos, ensaios estruturais muito genéricos. Os ensaios que estão a ser utilizados actualmente para determinar a actividade/pureza de uma preparação de heparina disponível comercialmente são um ensaio de coagulação *in vitro* e um teste para endotoxinas bacterianas. A quantidade de heparina é determinada como sendo a quantidade que fará com que 1 mL de plasma ovino fique meio-coagulado quando mantido durante 1 hora a 20 °C comparado com um padrão de referência USP (definido como unidades/mL) ou o Quinto Padrão Internacional para Heparina Não-Fraccionada (WHO-5) (definido como Unidades Internacionais/mL). (Linhardt, R. J. & Gunay, N. S. (1999) *Semin Thromb Hemost* 25, 5-16). Em comparação com rígidas exigências reguladoras para outros fármacos (não-polissacáridos) estes padrões de caracterização estão desactualizados.

Os métodos da invenção proporcionam uma maneira muito mais precisa para caracterizar estas amostras. Os métodos envolvem a manipulação de uma amostra contendo polissacárido para identificar a presença ou a ausência de um componente assinatura. Pode-se determinar a quantidade do componente assinatura presente na amostra. A quantidade do componente assinatura dá uma caracterização precisa da amostra.

Deste modo, em alguns aspectos, a invenção é um método para analisar uma amostra por meio da aplicação de uma restrição experimental a um polissacárido numa amostra, para produzir um polissacárido modificado, tendo um componente assinatura, detectar a presença do componente assinatura na amostra como uma indicação de que o polissacárido está presente na amostra e determinar a presença ou a ausência do componente assinatura para analisar a amostra.

Um "polissacárido" é um polímero composto de monossacáridos ligados uns aos outros. Em muitos polissacáridos o bloco de construção básico do polissacárido e, de facto, uma unidade dissacárida que pode ser repetitiva ou não-repetitiva. Deste modo, quando uma unidade é utilizada em relação a um polissacárido refere-se a um bloco de construção básico de um polissacárido e pode incluir um bloco de construção monomérico (monossacárido) ou um bloco de construção dimérico (dissacárido).

Os métodos para caracterizar as amostras de polissacáridos foram desenvolvidos com base em análise experimental de glicosaminoglicanos semelhantes à heparina (HLGAGs) mas as propriedades aqui ensinadas podem estender-se a outros polissacáridos. Os métodos da invenção serão discutidos em relação a HLGAGs como um exemplo, mas os métodos não são limitados a HLGAGs. Deste modo, numa forma de realização a amostra de polissacárido a ser analisada inclui HLGAGs ou glicosaminoglicanos. Conforme aqui utilizado os termos "HLGAG" e "glicosaminoglicanos" são utilizados de forma intercambiável para referirem-se a uma família de moléculas que têm estruturas e propriedades semelhantes à heparina. Estas moléculas incluem, mas não se limitam a heparina de baixo peso molecular (LMWH), heparina, heparina biotecnologicamente preparada, heparina quimicamente modificada, heparina sintética e heparan sulfato. O termo "heparina

biotecnológica" abrange a heparina que é preparada a partir de fontes naturais de polissacáridos que foram quimicamente modificados e é descrita em Razi *et al.*, *Bioche. J.* 15 de Julho de 1995; 309 (Pt 2): 465-72. A heparina quimicamente modificada é descrita em Yates *et al.*, *Carbohydrate Res* (1996) 20 de Nov.; 294:15-27, e é conhecida dos especialistas na técnica. A heparina sintética é conhecida dos especialistas na técnica e é descrita em Petitou, M. *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett.* (1999) 19 de Abril; 9(8):1161-6.

Conforme ilustrado nos Exemplos adiante a sequência de um decassacárido fraccionado AT-III (AT-10), que pode ser utilizada como um componente assinatura de HLGAGs, foi identificada utilizando um esquema de nomenclatura de propriedade codificada/espectrometria de massa (PEN-MALDI), uma metodologia de sequenciação descrita nos Pedidos de Patente U.S. Série Nos. 09/557.997 e 09/558.137 depositados em 24 de Abril de 2000, em co-invenção, e Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42. Sequenciação Integral de Glicano (IGS) (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. & Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci EUA* 96, 2698-703.) e análise de ressonância magnética nuclear protónica (RMN de ¹H) do decassacárido são consistentes com os resultados de PEN-MALDI. A flexibilidade desta estratégia de sequenciação é também demonstrada pelo facto de podermos derivar informações de sequência para oligossacáridos contaminantes, se presentes. A sequenciação de um sacárido fraccionado AT-III quimicamente complexo (incluindo a rara 3-O-sulfatação de glucosamina) estabeleceu uma metodologia que pode ser estendida para a análise de outros oligossacáridos HLGAG de interesse, por exemplos aqueles HLGAGs com propriedades de ligação ao factor de crescimento. Uma metodologia de sequenciação directa para estes tipos de sequência permitir estudos da estrutura-função desta importante classe de moléculas.

Os HLGAGs e outros polissacáridos todos têm componentes assinatura. Um "componente assinatura" é um oligossacárido que está presente e é característico de um polissacárido em particular. As propriedades da assinatura seleccionada pode depender do tipo de polissacárido a ser estudado e o tipo de restrição experimental aplicada ao polissacárido. A assinatura é um elemento reproduzível de um polissacárido em particular sendo manipulado com uma restrição experimental em particular. Por exemplo, algumas assinaturas dos HLGAGs que foram identificadas e demonstram serem úteis são $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; ou $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,S3}$. Quando uma amostra contendo HLGAG é submetida à electroforese capilar a seguir ao tratamento com heparinase esta assinatura será identificada e é pode ser quantificada.

O componente assinatura pode ser biologicamente activo ou inactivo. Importantes informações podem ser derivadas do componente assinatura seja ele um componente activo ou um componente inactivo. Uma assinatura que tem actividade biológica é um oligossacárido que é conhecido por produzir uma função biológica específica. Por exemplo, os tetrassacáridos $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; ou $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ de HLGAGs são conhecidos como sendo parte das sequências que possuem actividade anti-coagulante resultando na inibição do factor Xa. Deste modo, a presença deste componente numa amostra é directamente indicativa da actividade anti-coagulante do HLGAG.

As assinaturas que têm actividade biológica podem ser utilizadas para uma variedade de fins. Por exemplo, estes tipos de assinaturas são úteis para monitorizar a variabilidade de uma preparação de polissacárido de lote para lote. A pureza de cada lote pode ser determinada pela determinação da quantidade de componente assinatura activo no lote. Estas assinaturas são também úteis para monitorizar a presença de componentes activos na

amostra, quando a presença do componente assinatura na amostra é indicativa de um componente activo na amostra. Por exemplo, o componente assinatura pode ser utilizado para seguir o componente activo através de um procedimento de processamento. Ao utilizar este método, pode-se testar os produtos depois de cada passo de separação para determinar qual fracção contém o componente biologicamente activo. A quantidade de componentes activos na amostra também pode ser quantificada por meio da determinação da quantidade de componente assinatura na amostra.

Os métodos também podem ser realizados em pelo menos duas amostras para determinar qual amostra tem mais actividade ou, então, para comparar a pureza das amostras. Neste caso, são determinadas as quantidades relativas de componente assinatura em cada uma das pelo menos duas amostras. O nível relativo mais elevado de componente assinatura é indicativo da amostra mais activa.

Além disso, a assinatura activa pode ser utilizada para identificar moléculas biologicamente activas por meio do rastreio de compostos ou bibliotecas de compostos. As bibliotecas incluem, por exemplo bibliotecas de apresentação de fagos, bibliotecas combinatórias, bibliotecas de peptóides e unidades sintéticas não-peptídicas. A apresentação de fagos pode ser particularmente eficaz na identificação de péptidos que interagem com os componentes assinatura, incluindo anticorpos humanos. Em resumo, prepara-se uma biblioteca de fagos (utilizando, por exemplo, o fago ml3, fd, ou lambda) apresentando inserções de 4 a cerca de 80 resíduos de aminoácidos utilizando procedimentos convencionais. As inserções podem representar, por exemplo, uma série completamente degenerada ou corrompida. Pode-se, então, seleccionar inserções portadoras de fagos que se ligam ao componente assinatura. Este processo pode ser repetido por vários ciclos de re-selecção de fagos que se ligam ao

componente assinatura. Ciclos repetidos levam ao enriquecimento dos fagos portadores de sequências em particular. Pode ser conduzida análise da sequência de ADN para identificar as sequências dos polipéptidos expressos. Pode ser determinada a porção linear mínima da sequência que se liga ao componente assinatura. Pode-se repetir o procedimento utilizando uma biblioteca corrompida contendo inserções que contêm uma parte ou toda a porção linear mínima mais um ou mais resíduos degenerados adicionais a montante ou a jusante da mesma. Métodos de rastreio de duas leveduras híbridas também podem ser utilizados para identificar os polipéptidos que se ligam ao componente assinatura. Bibliotecas de péptidos e não-péptidos que têm por base um componente assinatura conhecido podem facilmente ser geradas por um especialista na técnica. Entidades comerciais, tais como a ArQule (Woburn, MA) preparam bibliotecas sob encomenda para a geração de compostos miméticos.

Exemplos de porções biologicamente activas de um polissacárido incluem, mas não se limitam a um tetrassacárido do domínio de ligação à AT-III da heparina, um tetrassacárido do domínio de ligação ao FGF da heparina, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$, ou $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

As assinaturas que são biologicamente inactivas são oligossacáridos que não estão associados a uma função biológica específica. Estes oligossacáridos podem ter alguma função biológica, mas não a função específica a ser analisada. Por exemplo, o oligossacárido, pode, de facto, causar a inibição do crescimento de uma célula tumoral, mas não ter qualquer efeito sobre a cascata da coagulação. Se a amostra de polissacárido estiver a ser avaliada com a finalidade de identificar a presença ou a quantidade de polissacáridos que são úteis para fins de coagulação, o oligossacárido detectado é considerado como sendo uma assinatura biologicamente inactiva. Se, por outro lado, a amostra

de polissacárido estiver a ser avaliada com a finalidade de identificar a presença ou a quantidade de polissacáridos que são úteis para evitar a proliferação de células tumorais, o oligossacárido detectado é considerado como sendo uma assinatura biologicamente activa.

As assinaturas que são biologicamente inactivas podem ser utilizadas para algumas das mesmas finalidades que as assinaturas biologicamente activas, bem como para outras finalidades. Assinaturas biologicamente inactivas também podem ser utilizadas para monitorizar a variabilidade de uma preparação de polissacárido de lote para lote. Uma vez que dois lotes estão a ser comparados um ao outro, pode-se utilizar tanto a assinatura inactiva como a activa. Os componentes assinatura inactivos também podem ser utilizados para monitorizar a presença de componentes activos na amostra quando a presença do componente assinatura na amostra for indicativa de uma amostra que não tem uma actividade específica ou que tem baixos níveis desta actividade. Deste modo, se a presença de um componente assinatura inactivo for inversamente proporcional à presença de um componente activo, então a presença do componente inactivo pode proporcionar informações importantes a respeito da actividade da amostra. Por exemplo, se o componente assinatura inactivo for um produto de degradação de um componente activo de um polissacárido, então a presença do componente activo indica que uma parte do componente activo foi decomposta e, deste modo, a amostra é menos activa do que o seria se o componente inactivo não estivesse presente.

Uma “restrição experimental” conforme aqui utilizado é um processo bioquímico realizado numa amostra de polissacárido que resulta numa modificação da amostra para permitir que a assinatura seja detectada. As restrições experimentais incluem, mas não se limitam a métodos de separação, por exemplo, espectrometria de

massa, electroforese capilar, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cromatografia por permeação em gel, ressonância magnética nuclear; digestão enzimática, por exemplo, com uma exoenzima, uma endoenzima; digestão química; modificação química; esfoliação química (isto é, remoção de uma unidade monossacárida); e modificação enzimática, por exemplo, sulfatação numa posição em particular com uma heparan sulfato sulfotransferase.

A assinatura pode ser identificada por qualquer meio que seja consistente com a restrição experimental utilizada. O peso molecular de um componente assinatura, por exemplo, pode ser determinado por vários métodos incluindo espectrometria de massa. A utilização de espectrometria de massa para determinar o peso molecular de polissacáridos é conhecida na técnica. A Espectrometria de Massa tem sido utilizada como um poderoso instrumento para caracterizar polissacáridos por causa da sua precisão (± 1 Dalton) em registar as massas de fragmentos gerados (por exemplo por clivagem enzimática) e também porque são necessárias apenas concentrações de amostras de pM. Por exemplo, a espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser, foi descrita por identificar o peso molecular de fragmentos de polissacáridos em publicações tais como Rhomberg, A. J. *et al*, *PNAS*, EUA, v. 95, p. 4176-4181 (1998); Rhomberg, A. J. *et al*, *PNAS*, EUA, v. 95, p. 12232-12237 (1998); e Ernst, S. *et. al.*, *PNAS*, EUA, v. 95, p. 4182-4187 (1998). Outros tipos de espectrometria de massa conhecidos na técnica, tais como, espectrometria de massa por electrospray-MS, espectrometria de massa por bombardeamento com átomos rápidos (FAB-MS) e espectrometria de massa por dissociação activada por colisão (CAD) também podem ser utilizados para identificar o peso dos fragmentos de polissacáridos.

Os dados da espectrometria de massa podem ser um instrumento valioso para verificar informações a cerca do componente assinatura do polissacárido só ou depois do polissacárido ter sofrido degradação com enzimas ou químicos. Depois do peso molecular de um polissacárido ser identificado, o mesmo pode ser comparado aos pesos moleculares de outros polissacáridos conhecidos (por exemplo, utilizando os métodos dos Pedidos de Patente U.S. Série Nos. 09/557.997 e 09/558.137 depositados em 24 de Abril de 2000). Conforme apresentado nestes pedidos de patente, uma técnica para comparar pesos moleculares é gerar uma linha de massa e comparar o peso molecular do polissacárido desconhecido com a linha de massa para determinar uma sub-população de polissacáridos com o mesmo peso molecular. Uma "linha de massa" é uma base dados de informação, de preferência na forma de um gráfico ou diagrama que armazena informações para cada tipo possível de polissacárido que tenha uma sequência específica com base no peso molecular do polissacárido. Pelo facto dos dados de espectrometria de massa indicarem a massa de um fragmento até 1 Da de precisão, um comprimento pode ser atribuído especificamente a um fragmento consultando uma massa na linha de massa. Além disso, pode-se determinar pela linha de massa que, num fragmento de um comprimento em particular superior a um dissacárido, há um mínimo de 4,02 Da de diferença em massas indicando que dois grupos acetato (84,08 Da) substituíram um grupo sulfato (80,06 Da). Deste modo, o número de sulfatos e acetatos de um fragmento de polissacárido pode ser determinado a partir da massa dos dados de espectrometria de massa e este número pode ser atribuído ao fragmento de polissacárido.

Para além do peso molecular, podem ser determinadas outras propriedades de um componente assinatura. As proporções composicionais de substituintes ou unidades químicas (quantidade e tipo de substituintes ou unidades químicas totais) podem ser determinadas utilizando metodologia conhecida na técnica, tal como

electroforese capilar. Um polissacárido pode ser submetido a uma primeira restrição experimental, tal como degradação enzimática ou química para separar o polissacárido em fragmentos mais pequenos. Estes fragmentos, então, podem ser submetidos a uma segunda restrição experimental, isto é, os mesmos podem ser separados utilizando electroforese capilar para determinar a quantidade e tipo de substituintes ou unidades químicas presentes no polissacárido. Alternativamente, o polissacárido pode ser submetido a uma única restrição experimental, tal como electroforese capilar, sem degradação enzimática prévia.

No método de electroforese capilar em gel, as amostras de reacção podem ser analisadas em capilares de pequeno diâmetro, cheios com gel. O pequeno diâmetro dos capilares (50 μm) permite a eficaz dissipação do calor gerado durante a electroforese. Deste modo, resistências de campo alto podem ser utilizadas sem excessivo aquecimento Joule (400 V/m), reduzindo o tempo de separação para cerca de 20 minutos por ciclo de reacção, deste modo aumentando a resolução em relação à electroforese em gel convencional. Além disso, muitos capilares podem ser analisados em paralelo, permitindo a ampliação da informação gerada pelo polissacárido.

Outros métodos para avaliar o componente assinatura também podem ser utilizados. Por exemplo, outros métodos incluem métodos que recorrem a parâmetros tais como a viscosidade (Jandik, K. A., Gu, K. e Linhardt, R. J.; (1994), *Glicobiology*, 4:284-296) ou a absorbância UV total (Ernst, S. et al., (1996), *Biochem. J.*, 315:589-597).

Fragmentos de HLGAG podem ser degradados utilizando enzimas tais como enzimas heparina liase (heparinases) ou ácido nitroso e também podem ser modificados utilizando enzimas diferentes que transferem grupos sulfato para as posições mencionadas

anteriormente ou removem os grupos sulfato destas posições. As enzimas modificadoras são exolíticas e de não-deslizamento o que significa que apenas actuam uma vez na extremidade não redutora e soltarão a cadeia de heparina sem modificação sequencial do resto da cadeia. Para cada uma das posições modificáveis na unidade dissacárida existe uma enzima modificadora. Uma enzima que acrescenta um grupo sulfato é chamada uma sulfotransferase e uma enzima que remove um grupo sulfato é chamada uma sulfatase. As enzimas modificadoras incluem 2-O sulfatase/sulfotransferase, 3-O sulfatase/sulfotransferase, 6-O sulfatase/sulfotransferase e N-deacetilase-N-sulfotransferase. A função destas enzimas é evidente pelos seus nomes, por exemplo, uma 2-O sulfotransferase transfere um grupo sulfato para a posição 2-O de um ácido idurónico (ácido glucurónico 2-O sulfatado é uma ocorrência rara nas cadeias HLGAG) e uma 2-O sulfatase remove o grupo sulfato da posição 2-O de um ácido idurónico.

As enzimas degradativas de HLGAG incluem mas não se limitam a heparinase-I, heparinase-II, heparinase-III, D-glucuronidase e L-iduronidase, versões modificadas de heparinases, fragmentos variantes e funcionalmente activos das mesmas. As três heparinases de *Flavobacterium heparinum* são instrumentos enzimáticos que foram utilizados para a geração de LMWH (5.000–8.000 Da) e heparina de peso molecular ultra-baixo (□3.000 Da). A heparinase I cliva regiões altamente sulfatadas de HLGAGs em ácidos urónicos 2-O sulfatados, ao passo que a heparinase II tem uma especificidade de substrato mais ampla e cliva ligações glicosídicas contendo ácido urónico 2-O sulfatado e não-sulfatado (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. & Sasisekharan, R. (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 387–444). A heparinase III, em contraste com a heparinase I, cliva primariamente as regiões sub-sulfatadas dos HLGAGs, a saber, ligações glicosídicas contendo um ácido urónico não-sulfatado (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. & Sasisekharan, R. (1995)

Crit Rev Biochem Mol Biol 30, 387-444). Muitas investigações sobre a especificidade do substrato das heparinases aumentaram a sua utilidade como instrumentos para desenvolver relacionamentos de estrutura-função para os HLGAGs. Várias patentes e pedidos de patentes descrevem modificações e variantes úteis e fragmentos de heparinase, incluindo a Patente U.S. 6.217.863 B1 e os pedidos pendentes 09/384,959 e 09/802,285. Outras modificações e variantes são também úteis. Uma compreensão mais pormenorizada é necessária para maximizar a sua utilidade como geradoras de LMWH farmacológica. As descobertas da invenção proporcionam um pouco mais destes pormenores (conforme descrito adiante).

A glucuronidase e a iduronidase, como seus nomes sugerem, clivam na ligação glicosídica depois de um ácido glucurónico e ácido idurónico, respectivamente. O ácido nitroso prende-se aleatoriamente nas ligações glicosídicas depois de uma hexosamina N-sulfatada e converte o anel hexosamina de seis membros num anel anidromanitol de 5 membros.

Os métodos para analisar polissacáridos pela identificação da presença de um componente assinatura podem ser utilizados para proporcionar uma avaliação qualitativa do polissacárido (por exemplo, se o componente assinatura está presente ou ausente) ou uma avaliação quantitativa (por exemplo, a quantidade de componente assinatura presente para indicar a qualidade da amostra tal como actividade, pureza ou simplesmente para comparar amostras diferentes). Em alguns aspectos, o método é realizado pela identificação de um componente na amostra de polissacárido e pela determinação de um valor quantitativo da quantidade de componente. Em algumas formas de realização o método envolve identificar e quantificar pelo menos dois componentes.

O valor quantitativo pode ser calculado por qualquer meio, tal como, pela determinação da área sob a curva (AUC) quando a amostra é processada por electroforese capilar, o factor de resposta (RF) ou a percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra. O método para fazer estes tipos de cálculos estão descritos adiante em pormenor na secção dos Exemplos. Em resumo, a AUC pode ser calculada directamente a partir de um espectro CE. O factor de resposta é aquela quantidade de assinatura que dá a mesma resposta que um oligossacárido de controlo. O RF pode ser calculado, por exemplo, em termos de absorbância e comparado com a absorbância de uma amostra de controlo. A percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra pode ser determinada de acordo com a seguinte equação:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

em que

PRA = percentagem da quantidade relativa de cada fracção

RF = factor de resposta

AUC_{%R} = percentagem relativa AUC[(100 x AUC_C)/AUC_T]

AUC_C = Área sob a curva para um componente

AUC_T = a soma da Área sob a curva para todos os componentes.

Os dados podem ser processados individualmente ou por computador. Por exemplo, um método implementado por computador para gerar uma estrutura de dados, tangivelmente incorporado num meio legível por computador, representando um valor quantitativo de um componente de um polissacárido pode ser realizado de acordo com a invenção. A determinação quantitativa é feita realizando o cálculo acima.

Um sistema de computador que pode implementar o acima mencionado como um programa de computador tipicamente pode incluir uma unidade principal conectada a um dispositivo de saída que apresenta a informação a um utilizador e um dispositivo de entrada que recebe informação de um utilizador. De um modo geral, a unidade principal inclui um processador conectado a um sistema de memória por meio de um mecanismo de interconexão. O dispositivo de entrada e o dispositivo de saída também podem estar conectados ao processador e sistema de memória por meio do mecanismo de interconexão.

Um ou mais dispositivos de saída podem estar conectados ao sistema de computador. Exemplos de dispositivos de saída incluem um monitor de tubo de raio catódicos (CTR), monitores de cristal líquido (LCD), impressoras, dispositivos de comunicação, como por exemplo um modem e saída de áudio. Um ou mais dispositivos de entrada também podem estar conectados ao sistema de computador. Exemplos de dispositivos de entrada incluem um teclado, teclado numérico, esfera de tracção, rato, caneta e mesa gráfica, dispositivo de comunicação e dispositivos de entrada de dados tais como sensores. O tema aqui revelado não está limitado aos dispositivos de entrada ou de saída em particular utilizados em combinação com o sistema de computador ou àqueles aqui descritos.

O sistema de computador pode ser um sistema de computador com fins genéricos que seja programável utilizando uma linguagem de programação de computador, tal como C++, Java, ou outra linguagem, tal como uma linguagem de script ou linguagem de montagem. O sistema de computador também pode incluir hardware com finalidade especial, especialmente programado tal como, por exemplo, um Circuito Integrado de Aplicação Específica (ASIC). Num sistema de computador de finalidade genérica, tipicamente, o processador é um processador comercialmente disponível, em que são exemplos a série

de processadores x86, Celeron e Pentium, disponíveis da Intel e dispositivos semelhantes da AMD e Cyrix, os microprocessadores série 680X0 disponíveis da Motorola, o microprocessador PowerPC da IBM e os processadores série Alpha da Digital Equipment Corporation. Encontram-se disponíveis muitos outros processadores. Tais microprocessadores executam um programa chamado sistema operativo, dos quais são exemplos Windows NT, Linux, UNIX, DOS, VMS e OS8, que controla a execução de outros programas de computador e proporciona escalonamento, correcção de erros, controlo de entrada/saída, cálculo, compilação, atribuição de armazenamento, gestão de dados e gestão de memória e controlo de comunicação e serviços relacionados. O processador e o sistema operativo definem a plataforma de um computador para o qual podem ser escritos programas de aplicação em linguagens de programação de alto nível.

Um sistema de memória, tipicamente, inclui um meio de gravação não-volátil que pode ser lido e escrito num computador, exemplos dos quais são disco magnético, memória flash e fita. O disco pode ser removível, tal como uma "disquete" ou permanente, conhecido como um disco rígido. Um disco tem várias pistas (*tracks*) nas quais os sinais são armazenados, tipicamente na forma binária, isto é, uma forma interpretada como uma sequência que utiliza os dígitos um e zero. Estes sinais podem definir um programa de aplicação a ser executado pelo microprocessador, ou informação armazenada no disco a ser processada pelo programa de aplicação. Tipicamente, em funcionamento, o processador faz com que os dados sejam lidos do meio de gravação não-volátil para um elemento de memória de circuito integrado que é, tipicamente uma memória de acesso aleatório, volátil, tal como uma memória de acesso aleatório dinâmico (DRAM) ou memória estática (SRAM). O elemento de memória de circuito integrado tipicamente permite um acesso mais rápido à informação pelo processador do que o disco. De um modo geral, o processador manipula os dados na memória de circuito integrado e

depois copia os dados no disco depois que o processamento está completo. São conhecidos inúmeros mecanismos para gerir os movimentos dos dados entre o disco e o elemento de memória de circuito integrado e o assunto do texto aqui revelado não é limitado a estes mecanismos. Além disso, o assunto do texto aqui revelado não é limitado a um sistema de memória em particular.

O assunto do texto aqui revelado não está limitado a uma plataforma de computador em particular, processador em particular ou linguagem de programação de alto nível em particular. Além disso, o sistema de computador pode ser um sistema de computador multiprocessador ou pode incluir computadores múltiplos conectados numa rede de computadores. Deve ser entendido que cada módulo (por exemplo, 110, 120) na FIG. 1 pode ser um módulo separado de um programa de computador ou podem ser programas de computador separados. Estes módulos podem ser operáveis em computadores separados. Os dados (por exemplo, 104, 106, 110, 114 e 116) podem ser armazenados num sistema de memória ou transmitidos entre sistemas de computador. O assunto do texto aqui revelado não é limitado a qualquer implementação em particular utilizando software ou hardware ou firmware ou qualquer combinação destes. Os vários elementos do sistema, seja individualmente ou em combinação, podem ser implementados como um produto de programa de computador tangivelmente incorporado num dispositivo de armazenamento legível por máquina para execução por um processador de computador. Vários passos do processo podem ser realizados por um processador de computador que executa um programa tangivelmente incorporado num meio legível por computador para realizar funções que funcionam com base na entrada e geram a saída. As linguagens de programação de computador adequadas para implementação deste sistema incluem linguagens de programação por procedimento, linguagens de programação orientadas para objectos e combinações de ambas.

Uma amostra contendo glicosaminoglicano é uma amostra na qual pelo menos uma fracção da mesma é composta de glicosaminoglicanos ou HLGAGs. Conforme discutido acima os termos glicosaminoglicano ou HLGAG incluem mas não se limitam a heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina quimicamente modificada ou heparina sintética.

O termo heparinase é utilizado de forma genérica para abranger variantes funcionalmente activas e seus fragmentos para além das heparinases nativas. Várias patentes e pedidos de patentes descrevem modificações e variantes e fragmentos úteis de heparinase, incluindo a Patente U.S. 6.217.863 B1 e os pedidos pendentes 09/384.959 e 09/802.285. A heparinase III provoca a despolimerização da heparina. Dependendo da concentração de heparinase III utilizada, e do período durante o qual é utilizada (digestão parcial vs exaustiva), obtém-se heparina de peso molecular e/ou carga específicos. Por exemplo, embora sem pretender ser limitativo, uma digestão parcial de heparina com 1 molar equivalente de heparinase III resultaria numa fracção de peso molar mais alto e/ou carga mais alta do que uma reacção com um tempo de digestão mais prolongado. Além disso, o aumento da equivalência molar da heparinase III resultará numa fracção com peso molecular mais baixo e/ou carga mais baixa do que se uma equivalência molar mais baixa de heparinase for utilizada. Em algumas formas de realização, concentrações de Heparinase III e período de digestão podem ser utilizados em combinação com sal, temperatura e composição de solvente, conforme aqui descrito, para obter-se heparina de peso molecular, carga e/ou actividade biológica específicos.

Em uma forma de realização a amostra a ser analisada ou avaliada é degradada quimicamente utilizando um método seleccionado do grupo que inclui mas não se limita a: despolimerização oxidativa

com H_2O_2 ou CU^+ e H_2O_2 , clivagem desaminativa com nitrito de isoamil ou ácido nitroso, clivagem β -eliminativa com éster benzílico de heparina por tratamento alcalino ou por heparinase.

Uma composição de LMWH é uma mistura de moléculas de vários pesos moleculares. Conforme descrito acima, a mistura homogénea contém fragmentos que podem variar em peso molecular mas têm um peso molecular médio inferior a 8.000 D. Uma composição de LMWH de compostos com uma gama de pesos moleculares de 4.000-6.000 Daltons, por exemplo, é uma mistura de várias LMWH em que o tamanho médio varia de 4.000 a 6.000 Da. Em algumas formas de realização, a percentagem de LMWH que é de 4.000 a 6.000 Da na amostra é 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% dos componentes na amostra.

As preparações de LMWH são preparadas a partir de fontes de HLGAG. Conforme aqui utilizado, uma "fonte de HLGAG", refere-se a uma composição de glicosaminoglicano semelhante à heparina que pode ser manipulada para produzir LMWH utilizando tecnologia convencional, incluindo degradação enzimática, etc. Conforme descrito acima, HLGAGs incluem mas não se limitam a heparina isolada, heparina quimicamente modificada, heparina preparada por biotecnologia, heparina sintética, heparan sulfato e LMWH. Deste modo os HLGAGs podem ser isolados de fontes naturais, preparados por síntese directa, mutagênese, etc. Em algumas formas de realização os HLGAGs podem ser substancialmente puros. Conforme aqui utilizado, o termo "substancialmente puro" significa que os polissacáridos são essencialmente livres de outras substâncias até um ponto prático e apropriado para a sua utilização pretendida. Em particular, os polissacáridos são suficientemente puros e são suficientemente livres de outros constituintes biológicos dos ambientes dos seus hospedeiros de modo a serem úteis, por exemplo, na produção de preparações farmacêuticas.

Conforme aqui utilizado, preparações de LMWH são sais de GAGs sulfatados tendo um peso molecular (MW) médio inferior a 8000 Da e para as quais pelo menos 60% de todas as moléculas têm um MW inferior a 8000 Da. Por definição as preparações de LMWH são produzidas a partir de uma amostra de HLGAG. O termo LMWHs abrange polissacáridos que são sintetizados directamente como LMWHs, tais como SR90107A. O SR90107A é um polissacárido sintético que tem um peso molecular de aproximadamente 1500 Da. Estes tipos de compostos, que são preparados directamente como compostos de baixo peso molecular em vez de serem preparados de uma fonte de HLGAGs não são considerados como incluídos na classe de LMWH. No entanto, o termo LMWH inclui HLGAGs sintéticos que são processados para produzir LMWHs.

Vários métodos diferentes foram utilizados para a preparação comercial de LMWHs. O fraccionamento de tamanho directo foi utilizado para preparar LMWH (Fraxiparina) numa escala experimental, mas o seu pouco rendimento, de uma maneira geral, refutou a sua utilização numa escala industrial. Com a finalidade de produção industrial, foram utilizados vários processos químicos ou enzimáticos. Os processos químicos tiram proveito de uma ampla gama de reacções, tais como despolimerização parcial do ácido nitroso (Fragmin), clivagem oxidativa com H₂O₂ (Normiflo e Fluxum), clivagem oxidativa com Cu⁺⁺ e H₂O₂, ou por benzilação seguida por β-eliminação e hidrólise alcalina (Enoxaparina). Foram também descritos métodos enzimáticos para gerar LMWH utilizando despolimerização β-eliminativa parcial por heparinase I (Logiparina).

A capacidade de identificar a percentagem da região de ligação à AT não clivada, tal como o decassacárido com a estrutura $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, ou um dos tetrassacáridos $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; ou $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ (ou

compostos relacionados) numa amostra permite que sejam formuladas composições com quantidades específicas da região de ligação à AT não clivada, intacta. Esta capacidade de preparar LMWH com percentagens conhecidas de região intacta de ligação à AT proporciona um método para quantificar a actividade das composições terapêuticas de LMWH. Deste modo, os métodos da invenção permitem que um especialista na técnica prepare ou identifique uma composição apropriada de LMWH, dependendo do indivíduo e da doença a ser tratada.

Conforme aqui utilizado, o termo "intacto" significa não clivado e completo. O termo "regiões de ligação à AT" refere-se a uma região do HLGAG que especificamente interage com a AT-III. A região de ligação à AT, inclui o composto decassacárido com a estrutura: $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ e os tetrassacáridos $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{N,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; e $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$. Em algumas formas de realização, a preparação de LMWH é uma composição em que pelo menos 20% da sequência de polissacáridos na composição é a região intacta de ligação a AT. Em outras formas de realização pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou 55% da sequência de polissacáridos na composição é a região intacta de ligação à AT. Conforme discutido acima, a percentagem óptima de AT-10 intacta numa composição para tratamento irá variar dependendo do estado clínico a ser tratado. Um nível de actividade mais alto pode ser desejável para doentes em perigo de formação de coágulo sanguíneo do que em doentes em tratamento do cancro, em que a actividade anticoagulante não é desejável.

Em outros aspectos a preparação de LMWH pode ter > 15% de dissacáridos dissulfatados, < de 75% de dissacáridos trissulfatados, 3-5% de dissacáridos monossulfatados, > de 2% de 4-7 tetrassacáridos.

A quantidade da região de ligação à AT nas preparações de LMWH pode ser manipulada por uma variedade de parâmetros experimentais. Os métodos da invenção possibilitam o controlo das quantidades da região de ligação à AT numa preparação LMWH permitindo o controlo de qualidade das preparações de LMWH utilizando o componente assinatura, proporcionando um procedimento de isolamento melhorado que resulta no isolamento de uma preparação rica em LMWH e proporcionando novas regras para as especificidades de clivagem das heparinases. As duas primeiras destas propriedades são discutidas em pormenor acima.

O papel das heparinases na preparação de LMWHs com regiões intactas de ligação à AT foi descrito no estado da técnica anterior. Especificamente, uma sequência publicada que continha um sítio intacto de ligação à AT-III foi descrita como sendo $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. & Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). Além disso, foi demonstrado no estado da técnica anterior que os tetrassacáridos contendo 3-O sulfato não são cliváveis por nenhuma das heparinases (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M, Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. & Dell, A. (1993) *J Biol Chem* 268, 4780-7.), sugerindo que as ligações com uma glucosamina 3-O-sulfatada são resistentes à clivagem. Surpreendentemente, constatou-se que estes ensinamentos do estado da técnica anterior eram incorrectos. Nos Exemplos, demonstramos, conclusivamente, através de uma variedade de técnicas físico-químicas que a estrutura verdadeira da AT-10 é $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ e, portanto, não contém um sítio intacto de ligação à AT-III. Devido à reinterpretação da estrutura da AT-10, tentamos reexaminar a acção das heparinases I-III em relação à ligação à AT, oligossacáridos contendo 3-O-sulfato. Dado que a AT-10 (ultra-LMWH, MW = 2769,3 Da) é derivada da clivagem controlada de heparina por heparinase I, tentamos também examinar

as consequências funcionais de um oligossacárido, utilizando técnicas bioanalíticas estabelecidas. Esta percepção da acção da heparinase e consequências funcionais é necessária para a geração óptima, eficiente de LMWH para utilização clínica.

Deste modo, conforme apresentado nos Exemplos, constatou-se que a heparinase I e II de facto clivam a região de ligação à AT dos HLGAGs resultando na perda da região intacta de ligação à AT, ao passo que a heparinase III não cliva. Além disso, constatou-se que a 3-O-sulfatação da glucosamida na extremidade redutora de uma ligação glicosídica confere resistência à clivagem por heparinase I, II e III. O exame das consequências biológicas e farmacológicas de um oligossacárido heparina que contém apenas um sítio de ligação à AT-III parcial demonstra que este oligossacárido tem significativa actividade anti-Xa mas não tem alguns dos atributos funcionais do glicosaminoglicano semelhante à heparina contendo um sítio intacto de AT-III.

Estes métodos são também verdadeiros para uma classe mais ampla de compostos. Os ensinamentos da invenção podem ser utilizados para desenvolver produtos terapêuticos de polissacáridos especializados a partir de uma variedade de materiais de partida de polissacáridos. Assim que um componente activo é identificado num polissacárido, aquele componente activo pode ser utilizado como uma assinatura para o controlo de qualidade da amostra e pode ser utilizado para gerar e identificar composições terapêuticas que são melhoradas para uma actividade terapêutica em particular e que tiveram removidas as regiões que são responsáveis pelos efeitos secundários.

As composições podem ser administradas terapêuticamente a um indivíduo. Conforme aqui utilizado, um indivíduo é um ser humano,

primata não-humano, vaca, cavalo, porco, ovelha, cabra, cão, gato ou roedor.

HLGAGs e LMWHs em particular têm muitas utilidades terapêuticas. As composições de LMWH da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de qualquer tipo de doença em que a terapêutica com LMWH tenha sido identificada como uma terapêutica útil. Deste modo, a invenção é útil numa variedade de métodos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* em que terapêuticas com LMWH são úteis. Por exemplo, sabe-se que as composições de LMWH são úteis para evitar a coagulação, inibir o crescimento de células de câncer e metástases, evitar a angiogênese, evitar a neovascularização, evitar a psoríase. As composições de LMWH também podem ser utilizadas em ensaios *in vivo*, como por exemplo uma amostra de controlo de qualidade.

Todas estas doenças são bem conhecidas na técnica e estão descritas, por exemplo em *Harrison's Principles of Internal Medicine* (McGraw Hill, Inc., Nova Iorque).

A descrição de experiências realizadas a seguir é e exemplificativa e não-limitativa do âmbito da invenção reivindicada.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Sequenciação de decassacáridos contendo 3-O sulfato com um sítio parcial de ligação à antitrombina

Introdução:

A heparina e os glicosaminoglicanos de heparan sulfato representam uma importante classe de moléculas que interagem e modulam a actividade de factores do crescimento enzimas e

morfogénios. Das muitas funções biológicas desta classe de moléculas, uma das suas funções mais importantes é a sua interacção com a antitrombina III (AT-III). A ligação da AT-III a uma sequência específica de pentassacáridos de heparina, contendo um raro 3-O sulfato numa glucosamina N-sulfatada, 6-O sulfatada aumenta em 1000 vezes a capacidade da AT-III de inibir proteases específicas na cascata da coagulação. Deste modo, os glicosaminoglicanos semelhantes à heparina (HLGAGs) desempenham um importante papel biológico e farmacológico na modulação da coagulação do sangue. Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia de sequenciação (Pedidos de Patente U.S. Série Nos. 09/557.997 e 09/558.137 depositados em 24 de Abril de 2000, em co-invenção e Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42.) para promover os relacionamentos estrutura-função desta importante classe de moléculas. Esta metodologia combina um esquema de nomenclatura de propriedade codificada (PEN) para lidar com o grande teor de informação (propriedades) dos HLGAGs, com espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-MS) e degradação enzimática e química como restrições experimentais para sequenciar rapidamente quantidades picomole de oligossacáridos HLGAG. Utilizando a abordagem MALDI-MS acima, constatamos que a sequência de decassacáridos utilizada neste estudo é $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ($\pm DDD4-7$). Confirmamos nossos resultados utilizando Sequenciação Integral de Glicano e uma ressonância magnética nuclear protónica dimensional. Além disso, demonstramos que esta abordagem é flexível e é capaz de derivar informações de sequências de uma mistura de oligossacáridos. Deste modo, esta metodologia possibilita a análise de outras sequências raras em polissacáridos tais como heparina/heparan sulfato com importantes actividades biológicas bem como proporciona a base para a análise estrutural deste farmacologicamente importante grupo de heparinas/heparan sulfatos.

Métodos

Abreviaturas: HLGAG, glicosaminoglicanos semelhantes à heparina; AT-III, antitrombina III; AT-10, decassacárido fraccionado de AT-III isolado da digestão parcial de heparina; IGS, Sequenciação Integral de Glicano; PEN, nomenclatura de propriedade codificada; MALDI-MS, espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser; CE, electroforese capilar; abreviaturas da sequência de HLGAG com a seguir, I, ácido α -L-idurónico; G, ácido β -D-glucurónico; Δ U, um ácido $\Delta^{4,5}$ urónico; 2S, 3S, e 6S, 2-O, 3-O, ou 6-O sulfatação, respectivamente; NS e NAc, N-sulfatação e N-acetilação da glucosamina.

Materiais. O decassacárido AT-10 é o mesmo sacárido utilizado em estudos anteriores (Rhomberg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95,12232-7 e Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4182-7). Os oligossacáridos foram dissolvidos em água desionizada com uma concentração de 10-35 μ M. Heparinase I-III de *Flavobacterium heparinum* foram purificadas conforme descrito anteriormente. As exoenzimas α -L-iduronato 2-O sulfatase, α -L-iduronidase, β -D-glucuronidase e N-acetilglucosamina-6-sulfatase foram adquiridas da Oxford Glicosciences. Uma solução aquosa 40% de nitrito de sódio foi obtida da Aldrich Chemical. Padrões de dissacáridos para análise da composição foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análise de Composição. A análise da composição dos oligossacáridos foi completada por digestão exaustiva de uma amostra de 30 μ M de AT-10 seguida por electroforese capilar (CE) conforme descrito anteriormente (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95,

4176-81). Em resumo, a 1 nmol de oligossacárido foram adicionados 200 nM de heparinases I, II, e III em acetato de sódio 25 mM, NaCl 100 mM, tampão acetato de cálcio 5 mM, pH 7,0. Deixou-se a reacção prosseguir a 30 °C de um dia para o outro e depois a mesma foi analisada por CE em polaridade reversa com um tampão contínuo de tris/fosfato 50 mM, sulfato de dextrano 10 µM, pH 2,5.

Digestões. As digestões da Heparinase I foram classificadas como curtas ou exaustivas. Para a digestão curta, heparinase I 50 nM foi incubada com o substrato durante 10 minutos antes da análise. As digestões exaustivas foram completadas com enzima 200 nM de um dia para o outro. As reacções da enzima foram realizadas pela adição de 1 µL de um tampão contendo ovalbumina 10 µM, sulfato de dextrano 1 µM, acetato de cálcio 5 mM e tampão etilenodiamina 10 mM ao pH 7,0 a 4 µL de solução aquosa de substrato; deixou-se a digestão prosseguir à temperatura ambiente conforme descrito anteriormente (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42 e Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4176-81). A clivagem parcial com ácido nitroso foi completada utilizando uma modificação de procedimentos publicados (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. & Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci EUA* 96, 2698-703). As digestões da exoenzima foram completadas simultaneamente ou sequencialmente. As concentrações finais da enzima foram na gama de 20-40 miliunidades/mL e a digestão foi realizada a 37 °C.

Espectrometria de Massa. As análises espectrais de massa foram realizadas num instrumento PerSeptive Biosystems Voyager Elite por tempo de voo com reflectron no modo linear com extracção retardada. As amostras das digestões foram preparadas pela remoção de 0,5 µL da mistura de reacção e adição desta quantidade a 4,5 µL da solução matriz (12 mg/mL de ácido caféico em acetonitrilo 30%) que continha duas vezes um excesso molar do péptido básico (RG)₁₉R (massa

calculada do ião $(M+H)^+ = 4226,8$). A adição do péptido básico para especificamente quelar os oligossacáridos HLGAG e parâmetros de recolha de espectro de massa permitem a análise directa da amostra sem necessidade de repurificação da amostra (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4176-81). As amostras foram identificadas no alvo e espectros de massa foram colhidos utilizando os parâmetros indicados anteriormente (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95,4176-81). Observados em cada espectro de massa estão os iões $(M+H)^+$ do péptido básico e o ião $(M+H)^+$ de um complexo 1:1 de péptido:sacárido e a massa do sacárido é determinada subtraindo o valor m/z medido do ião $(M+H)^+$ do péptido do complexo 1:1 (Juhasz, P. & Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47). Todos os espectros numa placa foram calibrados externamente utilizando um padrão de $(RG)_{19}R$ e seu complexo com um hexassacárido derivado de ácido nitroso da sequência $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$ (massa calculada de 1655,4) com parâmetros instrumentais idênticos. Esta metodologia exige sulfatação suficiente do sacárido para assegurar uma complexação eficaz. Deste modo, sacáridos pequenos sub-sulfatados (isto é, mono e dissacáridos) não são observados com esta metodologia (Juhasz, P. & Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47).

Sequenciação Integral de Glicano. A sequenciação integral de glicano (IGS) utilizando separação electroforética foi realizada conforme descrito (Tumbull, J. E., Hopwood, J. J. & Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci EUA* 96, 2698-703). As condições de clivagem parcial com ácido nitroso foram modificadas utilizando HCl 25 mM e nitrito de sódio 2,5 mM e pontos de tempo de espera de 5, 10, 20, 30, 120 e 240 minutos.

Espectroscopia de 1H por RMN. A espectroscopia de 1H por RMN foi realizada utilizando as condições descritas anteriormente (Nadkarni, V. D., Toida, T., Van Gorp, C. L., Schubert, R. L.,

Weiler, J. M., Hansen, K. P., Caldwell, E. E. & Linhardt, R. J. (1996) *Carbohydr Res* 290, 87-96). A AT-10 foi submetida a cromatografia de troca iônica para remover impurezas paramagnéticas. Uma coluna (1 cm x 10 cm) de AG 50W-X8 (Bio-Rad Japão, Tóquio) foi convertida à forma de sódio por tratamento com 5 mL de NaOH 0,1 M e lavada com água durante 12 horas antes da utilização. A amostra para as experiências por RMN foi aplicada à coluna, eluída com 20 mL de água e liofilizada. A amostra (□1 mg) foi então liofilizada três vezes de D₂O 99,8% (Merck, Alemanha) e dissolvida em 0,5 mL de D₂O 100% (Aldrich Japão, Tóquio) para espectroscopia por RMN num tubo de 5 mm. A espectroscopia 1D de ¹H por RMN de AT-10 foi realizada num espectrómetro JEOL GSX 500A equipado com uma sonda ajustável com gradiente de campo de 5 mm a 298 K.

Resultados

Introdução à Metodologia de Sequenciação

Recentemente foi desenvolvida uma técnica de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-MS) que permite a determinação da massa dos oligossacáridos do complexo HLGAG (de di- a decassacáridos) a uma precisão superior a ±1 Da (Juhasz, P. & Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47 e Juhasz, P. & Biemann, K. (1994) *Proc Natl Acad Sci EUA* 91, 4333-7). Devido à precisão da medição da massa molecular resultante dos HLGAGs individuais, é possível uma atribuição tanto do comprimento de um fragmento como do número de tipo de substituintes, especialmente se o oligossacárido for um tetradecassacárido ou menor (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42). Além disso, a técnica MALDI-MS pode detectar fragmentos de oligossacáridos mediante a degradação enzimática ou química de um oligossacárido (Rhomberg, A. J.,

Shriver, Z., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 12232-7; Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4182-7; e Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4176-81). Finalmente, a sensibilidade da técnica MALDI-MS é tal que até uma quantidade tão pequena quanto 100 femtomoles de material pode ser prontamente detectada.

Para além da técnica experimental MALDI-MS, foi desenvolvida uma nomenclatura de propriedade codificada (PEN) para representar as 32 unidades de dissacáridos utilizando um sistema de codificação hexadecimal (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R & Sasisekharan, R (1999) *Science* 286, 537-42). O desenvolvimento da PEN é necessário para lidar com o grande teor de informações (propriedade) dos HLGAGs. Cada um dos números hexadecimais é derivado com base numa lógica externa que se manifesta em termos da distribuição de sulfatos numa unidade de blocos de construção em particular e não é atribuída aleatoriamente simplesmente para identificar cada unidade de dissacárido. Este sistema é importante para os HLGAGs uma vez que permite a rápida manipulação de sequências utilizando operações matemáticas ou binárias simples, proporcionando, deste modo, um identificador no grande teor de informações de polissacáridos complexos. Além disso, a diversidade estrutural inerente em HLGAGs necessariamente procede das diferenças de propriedades (localização de sulfato carregado e grupos acetato) tornando, deste modo, uma PEN um esquema de atribuição natural para HLGAGs. Isto está em contraste directo com os códigos alfabéticos utilizados para representar os nucleótidos de ADN e aminoácidos e proteínas que servem como meros identificadores e não codificam quaisquer informações (propriedades) e não capturam a heterogeneidade destes biopolímeros.

O sistema de codificação hexadecimal compreende os alfanúmeros 0-9 e A-F. Uma vez que a unidade dissacárida tem 4 posições, a saber, 2-O, N-, 3-O e 6-O que podem ser modificadas, é simples atribuir cada uma das quatro posições digitais binárias do código hexadecimal a uma destas posições químicas. Além disso, uma vez que há apenas duas modificações possíveis em cada posição (as posições 2-O, 3-O e 6-O podem ser sulfatadas ou livres e a posição N- pode ser sulfatada ou acetilada*), a utilização de um sistema binário captura estas modificações como simples estados ligados ou desligados. Por exemplo, se, numa dada unidade dissacárida, a posição 2-O é sulfatada, então é atribuído o valor binário de 1. Inversamente, se a posição 2-O num dado dissacárido for não-sulfatada, então é atribuído o valor binário de 0.

□

Para identificar um dissacárido com um sinal alfanumérico, as 4 posições binárias foram atribuídas da seguinte maneira: a posição 2-O foi atribuída a posição binária da extremidade esquerda seguida pela posição 6-O, 3-O e N- nesta ordem. Em cada caso, conforme indicado acima, o código binário 1 foi utilizado para representar posições sulfatadas e 0 foi utilizado para representar posições não-sulfatadas no caso de 2-O, 6-O e 3-O e acetilação no caso da posição N.

Para codificar para o estado isomérico do ácido urónico (isto é, ácido idurónico vs. glucurónico), designamos as unidades dissacáridas como +/- . Desta maneira é possível atribuir os códigos hexagonais positivos para unidades contendo ácido idurónico e os códigos hexadecimais negativos

* Há algumas raras sequências HLGAG com a posição N não-substituída que podem ser registadas no sistema PEN pela adição de bits extra. No entanto, nos nossos estudos, as experiências iniciais incluindo a análise de composição (ver adiante) não mostrou a presença de dissacáridos contendo amina livre.

para unidades contendo ácido glucurónico. Deste modo, as unidades dissacáridas com o mesmo código hexadecimal mas com sinais opostos possuem o mesmo padrão de sulfatação, diferindo apenas no estado isomérico do ácido urónico. A **Tabela 1** indica a utilização de PEN para as unidades dissacáridas presentes neste estudo.

Tabela 1: Derivação de PEN para Unidades Dissacáridas Utilizadas neste Estudo

I/G	2X	6X	3X	NX	HEX	DISSAC	MASSA
0	0	1	0	0	4	I-H _{NAC,6S}	459,4
0	0	1	0	1	5	I-H _{NS,6S}	497,4
0	1	1	0	1	D	I _{2S} -H _{NS,6S}	577,5
1	0	1	0	1	-5	G-H _{NS,6S}	497,4
1	0	1	1	1	-7	G-H _{NS,2S,6S}	577,4

O código hexadecimal derivado para as unidades dissacáridas que ocorrem em AT-10 estão apresentadas na Tabela 1. A coluna 1 é a posição binária que codifica para o estado isomérico do ácido urónico. As colunas 2 até 5 codificam para as modificações nas posições 2-O, 6-O, 3-O e N da unidade dissacárida. A coluna 6 apresenta os códigos hexadecimais representados pelos dígitos binários nas colunas 2 até 5. A coluna 7 apresenta a unidade dissacárida representada pelo código na coluna 6. A coluna 8 apresenta as massas teóricas calculadas da unidade dissacárida presente internamente numa sequência. Para modificações químicas ou enzimáticas a estes dissacáridos, é utilizada a seguinte nomenclatura: ácido urónico com uma ligação Δ^{4-5} insaturada (ΔU) = \pm ; unidade dissacárida da extremidade redutora com um marcador de massa = t ; unidade dissacárida com um anel anidromanose de 5 membros = 1 .

Deste modo, a estratégia para a atribuição da sequência dos oligossacáridos HLGAG por PEN-MALDI essencialmente envolve os seguintes passos. Primeiro, a MALDI-MS do oligossacárido intacto é utilizada para atribuir o comprimento bem como o número total de

sulfatos e acetatos presentes no oligossacárido. Utiliza-se, então, a análise de composição para determinar o número e o tipo de blocos de construção dos dissacáridos. Com esta informação é construída uma lista mestra de todas as sequências possíveis que contêm estas unidades dissacáridas. Desta maneira, nenhuma sequência é excluída da análise, não importa quão rara uma dada sequência possa ser. As massas dos fragmentos de oligossacáridos geradas da digestão enzimática ou degradação química são aplicadas como restrições experimentais e as sequências que não satisfazem estas restrições são eliminadas. De uma forma repetitiva, partindo das restrições experimentais para a lista mestra de possíveis sequências, sempre em diminuição, pode-se rapidamente chegar a uma solução de sequência única utilizando um mínimo de material. Significativamente, podem ser utilizadas vias múltiplas, utilizando restrições experimentais separadas, para centralizar numa sequência, assegurando a precisão da atribuição.

Análise da AT-10

A AT-10 e todos os oligossacáridos derivados da mesma mediante tratamento enzimático ou químico são detectados com MALDI-MS como complexos não-covalentes com o péptido básico (RG)₁₉R (Rhombert, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4176-81 e Juhasz, P. & Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47). Utilizando esta tecnologia, são observadas duas espécies, um íon (M+H)⁺ de (RG)₁₉R e um íon (M+H)⁺ para o complexo péptido:sacárido. A massa molecular de um oligossacárido é obtida subtraindo o valor (M+H)⁺ do péptido do valor (M+H)⁺ do complexo 1:1 sacárido:péptido. A Tabela 2 lista todos os fragmentos observados neste estudo, seus valores de massa calculados e experimentalmente derivados e a estrutura deduzida dos fragmentos depois da atribuição da sequência de AT-10. A Figura 1 mostra que o componente principal de AT-10 tem um valor *m/z* de

6999,3. Quando o valor m/z do péptido protonado é subtraído, constata-se que o valor experimental para a massa deste oligossacárido é 2770,2 que pode ser atribuído unicamente a um decassacárido com 13 sulfatos e um grupo acetato. O espectro de massa de AT-10 indica a presença de outra espécie (daqui por diante referida como o contaminante) de massa 2690,1 (depois da subtração da contribuição do péptido), correspondendo a um oligossacárido com 12 sulfatos e 1 grupo acetato.

Tabela 2: valores m/z para os picos nos espectros de massa e suas estruturas deduzidas

Complexo (M+H) ⁺	Sacárido (Observado)	Estrutura Deduzida	Massa (Calculada)
6999,3	2770,2	AU ₂₅ H _{NS} [RS1], _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig.1)	2769,3
6919,2	2690,1	ΔU ₂₅ H _{NS} [RS2], _{6S} I/GH _{NS} , _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig. 1)	2689,2
6899,6	2673,0	AU ₂₅ H _{NS} [RS3], _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GMan _{3S} , _{6S} (Fig. 4)	2672,2
6435,8	2209,2	I ₂₅ H _{NS} [RS4], _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig. 4)	2209,8
6419,7	2192,2	ΔU ₂₅ H _{NS} [RS5], _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig. 2a)	2191,8
6339,8	2113,2	I ₂₅ H _{NS} [RS6], _{6S} I ₂₅ H _{NS} , _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GMan _{3S} , _{6S} (Fig. 4)	2112,7
5899,9	1571,4	AU ₂₅ H _{NS} [RS7], _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} d* (massa marcada, Fig. 2c)	1670,4
5859,8	1633,2	I ₂₅ H _{NS} [RS8], _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig. 4)	1632,3
5842,1, 5842,2, 5843,6	1614,6, 1614,4, 1615,1	AU ₂₅ H _{NS} [RS9], _{6S} IH _{NAC} , _{6S} GH _{NS} , _{3S} , _{6S} (Fig. 2a, b, c)	1614,3
5383,1, 5382,5	1155,6, 1154,0	AU ₂₅ H _{NS} [RS10], _{6S} , _{6S} (Fig. 2a, c)	1154,9
5301,7	1073,9	AU ₂₅ H _{NS} [RS11], _{6S} I/GH _{NS} , _{6S} (Fig. 2b)	1074,9
5284,5	1057,9	AU ₂₅ H _{NS} [RS12], _{6S} I ₂₅ Man _{6S} (Fig. 4)	1057,8
5241,5	1013,8	IH _{NAC} , _{6S} GMan _{3S} , _{6S} d (mass tagged, Fig. 3)	1013,9
5186,5	958,8	IH _{NAC} , _{6S} GMan _{3S} , _{6S} (Fig. 3)	957,8
5007,8	780,8	H _{NAC} , _{6S} GMan _{3S} , _{6S} (Fig. 3)	780,7
4805,2, 4805,3, 4805,2	577,7, 577,5 576,7	ΔU ₂₅ H _{NS} [RS13], _{6S} (Fig. 2a, b, c)	577,5

*d - representa o marcador de massa semicarbazida ($\Delta=56,1$ Daltons).

Apresentado na coluna 1 está o valor m/z do complexo 1:1 protonado do sacárido e o péptido básico (RG)₁₉R. A coluna 2 apresenta a massa observada do sacárido obtido pela subtração do

valor do péptido protonado observado no espectro do complexo 1:1 protonado. As estruturas químicas deduzidas dos sacáridos para os picos correspondentes nos espectros de massa estão apresentados na coluna 3. Na coluna 4 estão apresentadas as massas teóricas calculadas para as estruturas deduzidas. Deve ser assinalado que a massa observada (coluna 2) está sempre em ± 1 Dalton da massa calculada (coluna 4).

A análise de composição utilizando CE indica a presença de quatro blocos de construção de dissacáridos, correspondendo a $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4), $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5) e $\Delta U-H_{NS,3S,6S}$ (± 7), na proporção relativa de 2,90:1,00:1,05:0,15 respectivamente. Deste modo, a análise da composição desta amostra confirmou que há duas espécies, uma principal ($\square 85\%$) e outra menos importante ($\square 15\%$). A AT-10 tem de ser um decassacárido feito dos blocos de construção $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4) e $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 7) numa proporção de 3:1:1. Em conjunto, foram utilizados dados de CE e MALDI-MS para construir uma lista mestra de sequências possíveis para AT-10. Constatamos que 320 sequências podem ser responsáveis pelos dados de CE e MS (Tabela 2). Estas 320 sequências constituem a lista mestra da qual foram eliminadas sequências com base em restrições experimentais até a convergência numa solução única.

Além disso, a análise da composição confirmou que há um contaminante presente que era estruturalmente similar à AT-10, excepto pela presença de $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5). Pelos dados de CE, a composição do contaminante foi determinada como sendo $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4), $\Delta U-H_{NS,3S,6S}$ (± 7) e $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5) na proporção relativa de 2:1:1:1 a partir de subtracção sucessiva.

Tendo construído a lista mestra de possibilidades de sequências, foi utilizada uma combinação de PEN-MALDI, IGS (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. & Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci EUA* 96, 2698-703) e análise por RMN para sequenciar a AT-10 e depois analisar a sequência do contaminante.

Sequenciação de AT-10 por MALDI-MS

A partir da lista de 320 sequências possíveis geradas a partir dos dados de composição, utilizamos uma série de restrições experimentais, incluindo a utilização de heparinase I e ácido nítrico, respectivamente, para atribuir a sequência de AT-10.

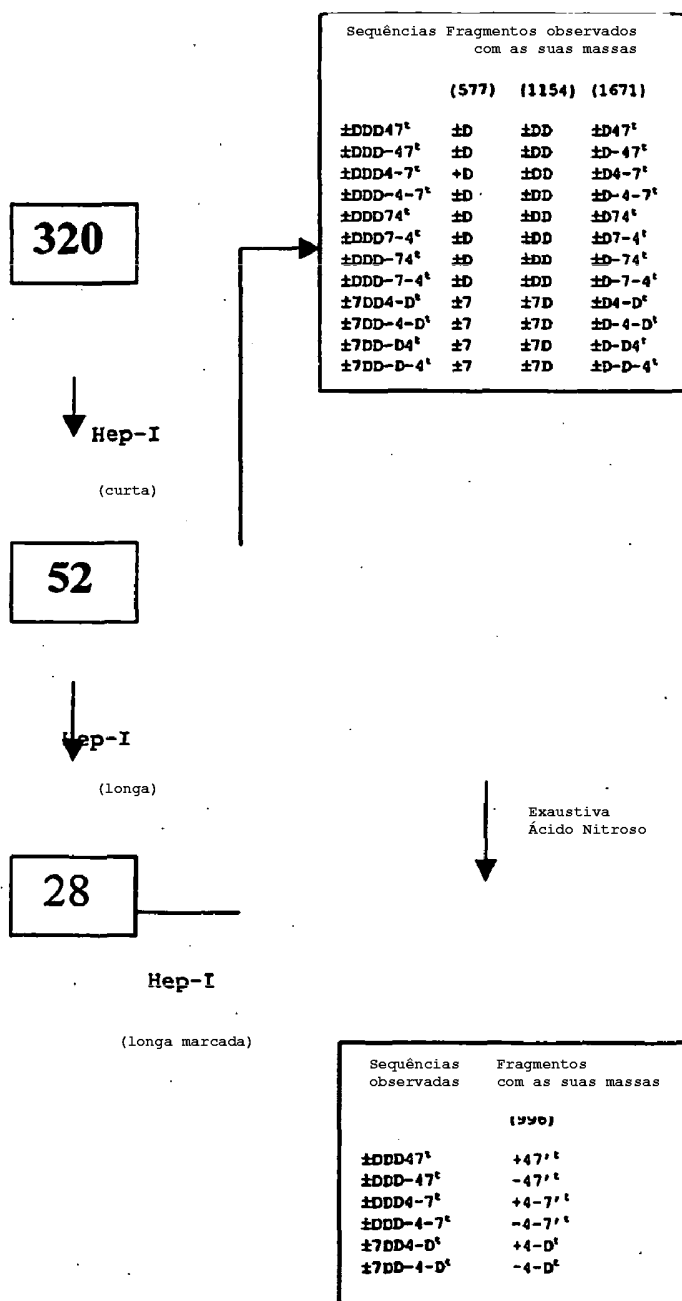
A digestão curta (incompleta) de AT-10 com heparinase I resulta em cinco fragmentos de massa molecular 577,7, 1073,9, 1155,6, 1614,6 e 2192,2 (**Figura 2a**). O fragmento com massa de 577,7 corresponde a $\pm D$. O fragmento 1155,6 corresponde a um tetrassacárido hexassulfatado que tem de ter uma das seguintes estruturas: $\pm DD$, $\pm D-D$, $\pm D7$, $\pm D-7$, $\pm 7D$ ou $\pm 7-D$. O fragmento com 1614,6 corresponde a um hexassacárido monoacetilado heptassulfatado e o fragmento com 2192,2 corresponde a um octassacárido monoacetilado decassulfatado. O último pico, em 1073,9 foi atribuído de forma inequívoca ao contaminante (ver adiante para análise). Quando a lista de 320 sequências foi rastreada quanto a estes fragmentos formados por digestão simulada de heparinase I, a lista foi reduzida para 52 sequências (Tabela 2).

A taxa de clivagem de substrato pela heparinase I é dependente do tamanho (Linhardt, R. J., Turnbull, J. E., Wang, H. M., Loganathan, D. & Gallagher, J. T. (1990) *Biochemistry* 29, 2611-7). Para identificar todas as ligações contendo iduronato 2-O sulfatado em AT-10, a mesma foi tratada com heparinase I em condições que resultaram na clivagem completa de todas as ligações

susceptíveis. Nestas condições, o hexassacárido e tetrassacárido do contaminante permaneceram intactos (Figura 2b). No entanto, o tetrassacárido hexassulfatado (massa de 1155,6 da Figura 2a) foi clivado. Deste modo, este sacárido tem a sequência $\pm DD$. Das atribuições de 52 sequências possíveis para AT-10, apenas 28 podem satisfazer os dados de digestão exaustiva por heparinase I.

A seguir, a AT-10 foi tratada com semicarbazida para dar uma semicarbazona na posição anomérica. Deste modo, um marcador de massa ($\Delta = 56,1$) foi introduzido para diferenciar fragmentos da extremidade redutora em contraste com a extremidade não-redutora. O tratamento da AT-10 marcada com heparinase I deu cinco fragmentos (Figura 2c). De uma comparação de AT-10 não derivatizada tratada com heparinase I (Figure 2a), o hexassacárido monoacetilado heptassulfatado parece marcado e, deste modo, tem de ser derivado da extremidade redutora de AT-10. A aplicação desta restrição às 28 sequências restantes elimina todas as sequências, com exceção de 12 (Tabela 3).

Tabela 3: Convergência da sequência de AT-10



A estratégia progressiva utilizada para sequenciar a amostra de decassacárido está apresentada na Tabela 3. A aplicação de restrições experimentais para eliminar as sequências da lista mestra de 320* sequências foi utilizada para convergir para a sequência final. Nas caixas à esquerda está apresentado o número de sequências que satisfizeram as restrições experimentais. As caixas à direita apresentam as sequências que satisfazem as restrições experimentais juntamente com os possíveis fragmentos formados para as massas apresentadas em parêntesis na parte superior da tabela.

Uma inspecção das 12 sequências restantes na Tabela 3 indica que a diferença principal está na identidade do hexassacárido da extremidade redutora. Deste modo, através da degradação de AT-10 com ácido nitroso e utilização criteriosa de exoenzimas, foi determinada a sequência do hexassacárido da extremidade redutora. Primeiro, AT-10 marcada foi exaustivamente tratada com ácido nitroso e duas espécies puderam ser prontamente detectadas (Figura 3). A primeira, com uma massa de 1013,8, corresponde a um tetrassacárido anidromanose marcado com quatro sulfatos e um acetato. A outra

*Para obter todos os decassacáridos possíveis com a composição de 3 ±Ds, um ±4 e um ±7 foram necessários para dispor as unidades dissacáridas acima mencionadas de todas as maneiras possíveis, para formar um decassacárido. Além disso, cada unidade dissacárida pode ser um + ou um - correspondente a iduronato ou glucuronato. O número possível de sequências = 5C_3 (dispõe 3Ds em 5 posições) * 2C_1 (dispõe os 4 nas duas posições restantes) * 2^4 (para ser responsável pelo + ou - em todas as posições excepto a extremidade não redutora, uma vez que o sacárido é derivado de heparinase) = $10*2*16=320$.

com uma massa de 958,8 corresponde ao mesmo tetrassacárido que não é marcado. Ambas poderiam ser atribuídas a uma das seguintes sequências: ± 47 , $\pm 4-7$, $\pm 4-D$. Deste modo, com base nesta informação, metade das sequências possíveis poderia ser eliminada, deixando apenas 6 soluções de sequências possíveis para AT-10 (Tabela 3).

Para atribuir unicamente o estado isomérico das duas unidades dissacáridas na extremidade redutora de AT-10, foram utilizadas as seguintes restrições experimentais: a digestão exaustiva por ácido nitroso foi incubada com enzima exolítica α -iduronidase que especificamente prende o ácido idurônico à extremidade não-redutora. Um deslocamento no espectro em 178,0 confirmou o ácido urônico como 4 e o seu estado isomérico como +, isto é, $IH_{NAC,6S}$ ou +4. Apenas 3 sequências podiam dar os fragmentos observados, a saber, $\pm 7DD4-D$, $\pm DDD4-7$, $\pm DDD47$.

Para distinguir entre estas três últimas alternativas e para identificar o dissacáridos da extremidade redutora, o produto tratado com iduronidase foi primeiro tratado com 6-O sulfatase e N-desacetilase para remover a hexosamina, deixando apenas o dissacárido da extremidade redutora. O tratamento desta amostra com β -glucuronidase resultou na degradação dos monossacáridos. Isto identificou o dissacáridos da extremidade redutora como -7 ($G-H_{NS,3S,6S}$). Deste modo, a sequência deduzida do decassacárido fraccionado de AT-10 é $\pm DDD4-7$ ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$). De importância é o facto de que esta sequência não concorda com a atribuição da sequência para um decassacárido produzido de uma maneira idêntica (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. & Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). Deste modo, tentamos confirmar nossa atribuição de sequenciação utilizando outras metodologias analíticas.

Sequenciação IGS de AT-10.

A AT-10 também foi sequenciada utilizando a técnica recentemente estabelecida de Sequenciação Integral de Glicano (IGS), que utiliza uma separação electroforética de sacáridos marcados na extremidade redutora com um fluoróforo. A clivagem parcial do sacárido com ácido nitroso e digestão por exoenzima produz uma escada a partir da qual a sequência pode ser determinada. De acordo com os dados de PEN-MALDI, a análise electroforética da amostra marcada com fluoróforo produziu um único decassacárido importante, mas, além disso, o contaminante menor também ficou evidente. Os produtos da clivagem parcial com ácido nitroso foram deca, octa, hexa e tetrassacáridos sem produtos dissacáridos observados. Este resultado define as posições de todas as unidades NS e NAc com apenas um dissacárido N-acetilado na posição próxima à extremidade redutora. Deslocamentos de gel devido ao tratamento destes produtos com diferentes combinações de exoenzimas demonstraram resíduos de iduronato em 3 posições, 2 das quais eram 2-O sulfatadas e a presença em três posições de resíduos de glucosamina 2-O sulfatada. A extremidade não redutora era claramente 2-O sulfatada mas a confirmação da presença de um 6-O sulfato no resíduo de glucosamina da extremidade não redutora e detalhes do padrão de sulfatação no monossacárido da extremidade redutora não foi obtida nesta análise. Estes dados definem a estrutura da AT-10 como $\Delta U_{2S}H_{NS, \pm 6S} I_{2S}H_{NS, 6S} I_{2S}H_{NS, 6S} IH_{NAC, 6S} GH_{NAC/NS, \pm 3S, \pm 6S}$. Estes dados, derivados de uma abordagem de sequenciação independente, estão totalmente de acordo com a análise por PEN-MALDI.

Análise da Sequência do Contaminante de AT-10

Os dados espectrais de massa também podem ser utilizados em conjunto com a análise de composição por CE para chegar à sequência

proposta para o contaminante de AT-10 com 12 sulfatados, 1 acetilado. Conforme declarado acima, a digestão de heparinase I (Figura 2a) deu um pico em m/z de 1073,9 que corresponde a um tetrassacárido pentassulfatado ($\pm D\pm 5$, $\pm 7\pm 5$ ou $\pm 5\pm 7$), que só pode ser atribuído ao contaminante. Este fragmento de tetrassacárido não foi derivado da extremidade redutora do contaminante uma vez que em nenhuma condição foi encontrado um sacárido marcado contendo ± 5 . Além disso, uma digestão por heparinase I de decassacárido marcado coloca 4-7 na extremidade redutora tanto para o contaminante como para a AT-10. Para colocar a posição do tetrassacárido D5 ou D-5 observado na digestão por heparinase I o decassacárido foi tratado com iduronato 2-O antes do tratamento com heparinase I. Nestas condições, o tetrassacárido pentassulfatado reduziu 80 Da em massa (da massa de 1073,9 a 993,9, resultante da perda de sulfato). Deste modo, este tetrassacárido tem de ser derivado da extremidade não redutora do contaminante. Em conjunto, esta informação sugere que a sequência do contaminante é $\pm D_5D_{4-7}$ ou $\pm D-5D_{4-7}$.

A atribuição para AT-10 e o contaminante foi confirmada quando o decassacárido foi degradado de forma incompleta com ácido nitroso (Figura 4). AT-10 com um anidromanose na extremidade redutora (massa de 2673,0) é claramente observado bem como o são fragmentos resultantes da cisão de AT-10 por ácido nitroso (massas de 2209,2, 2113,2 e 1633,2). Além disso, uma espécie com massa 1057,9 só pode ser obtida de $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$, proporcionando uma assinatura de massa única da extremidade não redutora de AT-10. Significativamente, todas as espécies poderiam ser atribuídas à AT-10 ou ao contaminante.

Interpretação do Espectro de RMN de AT-10

O espectro da RMN da AT-10 está apresentado na Figura 6. Em consonância com a nossa análise, os pequenos sinais de $\alpha H-1$, $\alpha H-2$ e

α H-3 de $H_{NS,3S,6S}$ (a 5,45, 3,45 e 4,50 ppm, respectivamente) permite-nos atribuir a unidade de monossacárido da extremidade redutora como $H_{NS,3S,6S}$. Neste caso, o próton anomérico do resíduo H_{NS3S6S} da extremidade redutora tem de ser dividido em configurações α e β . A configuração α do próton anomérico do resíduo H_{NS} é dominante ($\square 95\%$) em solventes próticos, tais como óxido de deutério, com base no efeito anomérico. Além disso, a presença de duas unidades I_{2S} pôde ser detectada. Curiosamente, os sinais anoméricos das duas I_{2S} , que em geral ressoam à volta de 5,20 ppm, foram deslocados. Muito provavelmente isto resulta de uma mudança na conformação da unidade I_{2S} interna de 1C_4 a 2S_0 . Além disso, poderia ser confirmado que o oligossacárido contém três $H_{NS,6S}$ e um resíduo G não sulfatado com base nos valores de integração dos prótons H-2 de $H_{NS,6S}$ e resíduos G observados em 3,28 e 3,38 ppm, respectivamente. A presença de um sinal N-acetil metil do resíduo $H_{NAC,6S}$ em 2,1 ppm demonstra claramente que o oligossacárido contém um resíduo $H_{NAC,6S}$. A presença de sinais correspondentes aos prótons H-6 dos resíduos H_{NY} 6-O-sulfatados (Y = Ac ou S) à volta de 4,3 e 3,9 ppm, confirma que todos os resíduos H_{NY} do oligossacárido são O-sulfatados em C-6. Em conjunto, estes dados permitem a atribuição da sequência da espécie mais importante na amostra de AT-0 como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Sumário

Foi demonstrado neste exemplo que podem ser utilizadas várias técnicas analíticas rigorosas para convergir na estrutura de um oligossacárido HLGAG complexo. Além disso, foi demonstrado que a atribuição da sequência utilizando dois procedimentos de sequenciação, a saber, IGS e PEN-MALDI é a mesma. Isto é mais evidente no tratamento parcial e exaustivo do decassacárido com ácido nítrico (Figura 3). Significativamente, a partir da nossa análise torna-se agora possível atribuir as seguintes sequências

aos deca, octa, hexa e tetrassacáridos observados mediante electroforese em gel e MALDI-MS, a saber, DDD4-7, DD4-7, D4-7 e um tetrassacárido 4-7 resistente ao ácido nitroso. No próximo Exemplo, foram exploradas as consequências funcionais de um sítio de ligação à AT-III parcialmente intacta e a acção enzimática das heparinases em relação ao sítio de ligação à AT-III.

Além disso, foi demonstrado que a abordagem PEN-MALDI é suficientemente sensível e discriminativa para permitir-nos determinar a informação da sequência para uma mistura de oligossacáridos. É essencial chamar atenção para o facto de que é possível a convergência para uma única solução para AT-10 utilizando PEN-MALDI utilizando restrições experimentais ortogonais múltiplas (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42), minimizando, deste modo, a dependência a uma única restrição experimental, por exemplo, clivagem com ácido nitroso. Finalmente, o exemplo apresentado ilustra o valor de PEN-MALDI para obter informações definitivas de sequência para oligossacáridos biológica e farmacologicamente relevantes.

Exemplo 2: Clivagem do Sítio de Ligação à Antitrombina III em Heparina por Heparinase e sua Implicação na Geração de Heparina de Baixo Peso Molecular.

Introdução:

A heparina tem sido utilizada como um anticoagulante clínico há mais de 50 anos, o que a torna um dos agentes farmacológicos mais eficazes conhecidos. Grande parte da actividade da heparina pode ser remontada à sua capacidade de ligar-se à antitrombina III (AT-III). A heparina de baixo peso molecular (LMWH), derivada da heparina pela sua desagregação controlada, mantém grande parte da

actividade antitrombótica da heparina sem muitos dos graves efeitos secundários. A importância clínica da LMWH acentuou a necessidade de compreender e desenvolver meios químicos ou enzimáticos para a produzir. Os instrumentos enzimáticos primários utilizados para a produção da heparina de baixo peso molecular são as heparinases de *Flavobacterium heparinum*, especificamente as heparinases I e II. Por meio da utilização de compostos do modelo pentassacárido e hexassacárido, demonstramos que a heparinase I e II, mas não a heparinase III, cliva o sítio de ligação à AT-III. Além disso, demonstramos aqui que a 3-O sulfatação da glucosamida na extremidade redutora de uma ligação glicosídica confere resistência à clivagem da heparinase I, II e III. Finalmente, examinamos as consequências biológicas e farmacológicas de um oligossacárido de heparina. Demonstramos que este oligossacárido não possui alguns dos atributos funcionais de HLGAG contendo um sítio de AT-III intacto.

Métodos:

Materiais. Os Penta 1 e 2 foram uma generosa oferta do Dr. Robert Rosenberg, Departamento de Biologia, MIT. O Hexa 1 foi gerado utilizando digestão de heparina por heparinase I (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. & Sasisekharan, R. (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 387-444). A heparina foi adquirida de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH) e as concentrações molares dos materiais foram calculadas num peso molecular médio de 13.000 Da. A enoxaparina foi adquirida de Avantis Pharmaceuticals, (Chicago, IL).

Digestões. As digestões da heparinase I foram completadas conforme descrito (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R & Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42 e Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. & Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci*

EUA 95, 4176-81). As reacções da heparinase II ou III foram completadas, essencialmente da mesma forma à temperatura ambiente em ovalbumina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M e etilenodiamina 10 mM, pH 7,0. As digestões curtas foram completadas com enzima 50 nM durante 10 minutos ao passo que as digestões exaustivas foram completadas com enzima 200 nM de um dia para o outro. Os espectros de massa foram colhidos utilizando os parâmetros conforme indicado acima (ver também Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci EUA*, 12 de Setembro de 2000; 97(19):10359-64) e calibrados externamente utilizando sinais para o (RG)₁₉R protonado e o seu complexo como um hexassacárido derivado do ácido nitroso da sequência I_{2S}HN_{S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}.

Experiências de Titulação de Equilíbrio de Fluorescência.

Titulações de AT-III humana com decassacárido AT-10 ou heparina foram completadas a 25 °C utilizando uma máquina Fluorolog 2 (Spex Instruments) (Meagher, J. L., Beechem, J. M., Olson, S. T. & Gettins, P. G. (1998) *J Biol Chem* 273, 23283-9 e Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. & Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). As medições foram completadas em fosfato de sódio 20 mM, contendo EDTA 0,1 mM e PEG 8000 0,1%, ajustadas ao pH 7,4 ou 6,0. Com o tampão ao pH 7,4, cloreto de sódio foi adicionado a uma concentração final de 100 mM.

Os espectros de emissão de fluorescência foram colhidos a partir de 300-400 nm com um comprimento de onda de excitação de 280 nm e um tempo de integração de 5 segundos. Em resumo, as experiências de titulação foram conduzidas como a seguir: alíquotas de decassacárido ou heparina foram adicionadas a uma solução 1 μ M de AT-III, deixou-se a solução ficar em equilíbrio durante um minuto e foi colhido um espectro de emissão. A adição sequencial de alíquotas de sacárido e sinal de fluorescência foi ajustada para

ser responsável pela diluição da proteína.

Medições Biológicas da Actividade do Decassacárido. A actividade anticoagulante *in vitro* foi determinada conforme descrito anteriormente (Hoppensteadt, D. A., Jeske, W. P., Walenga, J. M., Fu, K., Yang, L. H., Ing, T. S., Herbert, J. M. & Fareed, J. (1999) *Thromb Res* 96, 115-24 e Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. & Nader, H. B. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1428, 273-83), de acordo com a United States Pharmacopoeia. Os ensaios de inibição de geração de trombina (FIIa) e factor Xa (FXa) foram completados essencialmente conforme descrito. Em resumo, o decassacárido AT-10, a Enoxaparina LMWH ou o pentassacárido de ligação à AT-III sintética (Penta 1) utilizados neste estudo foi dissolvido em solução salina estéril nas concentrações designadas. A esta amostra adicionou-se um volume igual de plasma deficiente em fibrinogénio diluído a uma proporção de 1:8 em 100 mM Tris-HCl (pH 8,5). Numa amostra separada, a mesma concentração do oligossacárido heparina e actina foram adicionadas numa proporção de 1:1 a Spectrozyme TH ou FXa. Desta maneira, foi medida a geração intrínseca de IIA e Xa. Além disso, para responder pela inibição de trombina e geração extrínseca de FXa, tromboplastina C foi diluída numa proporção de 1:6 com Spectrozyme TH ou FXa. Para todas as amostras a densidade óptica foi medida em 405 nm e os resultados estão expressos como uma % da inibição comparada a um controlo de solução salina não suplementada. Para estes ensaios, o reagente trombina (Fibrindex) foi obtido da Ortho Diagnostic Systems, Inc. (Raritan, NJ), e o factor Xa foi obtido da Enzyme Research (South Bend, IN). Spectrozyme TH e FXa foram obtidos da American Diagnostica (Greenwich, CT).

Foram também utilizados dados de sangue inteiro para determinar a actividade anticoagulante de AT-10. Os ensaios, tempo

de tromboplastina parcial activada (APTT) e o tempo de protrombina (PT) foram conduzidos de uma maneira semelhante à que foi anteriormente relatado (Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. & Nader, H. B. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1428, 273-83). O reagente APTT foi obtido da Organon Teknika (Durham, NC) e o Reagente HepTest foi obtido da Haemachem (St. Louis, MO).

Resultados:

Acção Enzimática das Heparinases em relação ao Sítio de Ligação à AT-III: Anteriormente, investigamos a especificidade do substrato das heparinases I e II em relação à AT-10 (Rhomberg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 12232-7 e Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4182-7). No entanto, estes estudos foram realizados presumindo uma estrutura publicada (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. & Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). À luz da estrutura recém-determinada de AT-10 aqui descrita (ver também Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci EUA*, 12 de Setembro de 2000; 97(19):10359-64), reexaminamos a acção enzimática das heparinases I, II e III em relação aos oligossacáridos contendo um 3-O sulfato que é importante para ligação de alta afinidade à AT-III. Para estes estudos utilizamos três oligossacáridos, dois pentassacáridos (Penta 1 e Penta 2, Figura 5) e um hexassacárido (Hexa 1, Figura 5). De importância é o facto de que os pentassacáridos são sinteticamente derivados, ao passo que o Hexa 1 é derivado do tratamento da heparina por heparinase I. Como resultado, ao contrário do Penta 1 ou Penta 2, o Hexa 1 contém um ácido urónico $\Delta^{4,5}$ na extremidade não redutora. Além disso, o Penta 1 e Penta 2

diferem um do outro apenas pela presença (Penta 1) ou ausência (Penta 2) de um 3-O sulfato no resíduo da glucosamina interna (Figura 5). A estratégia aqui empregue essencialmente envolve o tratamento de cada um dos sacáridos com heparinase I, II ou III, respectivamente, em condições de digestão exaustiva, seguida pela identificação dos produtos resultantes por meio de espectrometria de massa. A massa calculada dos substratos e produtos dos sacáridos, sua identidade e massa observada estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4: Estruturas químicas e valores m/z dos oligossacáridos HLGAG

Complexo (M+H) ⁺	Sacárido (massa)	Estrutura Química	Massa (Calculada)
5842,0	1615,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}(RS14),6S IH_{NAC},6S GH_{NS},3S,6S$	1614,3
5735,1	1508,3	$H_{NS}(RS15),6S GH_{NS},3S,6S IH_{NAC},6S GH_{NS},3S,6S,OMe$	1508,2
5655,1	1428,3	$H_{NS}(RS15),6S GH_{NS},6S I_{2S}H_{NS},6S,OMe$	1428,1
5316,3	1089,5	$\Delta UH_{NS}(RS17),6S I_{2S}H_{NS},6S,OMe$	1088,9
5266,3, 5264,2	1036,5, 1036,1	$\Delta UH_{NAC}(RS18),6S GH_{NS},3S,6S$	1036,9
5064,1	837,3	$H_{NS},6S GH_{NS},6S$	<u>836,7</u>
5143,4, 5144,0	916,7, 917,3	$H_{NS},6S GH_{NS},3S,6S$	916,8
4818,0, 4818,0, 4818,7, 4818,7	591,3, 5913, 591,9, 592,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}(RS19),6S,OMe$	591,5
4807,2, 4805,9	577,4, 577,8	$\Delta U_{2S}H_{NS}(RS20),6S$	577,5

Apresentado na coluna 1 da Tabela 4 está o valor m/z do complexo 1:1 protonado do sacárido e o péptido básico (RG)₁₉R. A coluna 2 apresenta a massa observada do sacárido obtida pela subtração da massa do péptido básico protonado do complexo 1:1 protonado. As estruturas químicas dos sacáridos para os picos correspondentes nos espectros de massa estão apresentados na coluna 3. Na coluna 4 estão apresentadas as massas teóricas calculadas para as estruturas químicas. Deve ser assinalado que a massa observada está em ± 1 Dalton da massa calculada.

No caso de Penta 1, apenas a heparinase I e II, mas não a heparinase III, cliva o oligossacárido num trissacárido pentassulfatado de massa 916,7 e um dissacárido trissulfatado de massa 591,3 (Figura 6), indicativo de clivagem na ligação glicosídica contendo I_{2S} (ligação A.2 na Figura 5). Os dados apresentados na Figura 6 mostram que as ligações contendo 3-O são resistentes à clivagem por heparinase I, II ou III. Esta resistência parece ser independente do comprimento. Com base na compreensão anterior da estrutura da AT-10 (Toida, T., Hileman, R E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. & Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7), foi relatado que a heparinase II podia clivar um sacárido contendo 3-O sulfato desde que o mesmo tivesse comprimento suficiente (Rhombert, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. & Sasisekharan, R (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 12232-7). À luz da estrutura recém-determinada para o decassacárido AT-10 (ver também Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, EUA, 12 de Setembro de 2000; 97(19):10359-64), bem como os dados apresentados na Figura 6, as verificações anteriores têm de ser reinterpretadas e conclui-se aqui que a heparinase II não cliva ligações com uma extremidade redutora próxima à glucosamina 3-O sulfatada. Além disso, a resistência desta ligação à acção da heparinase I, II e III é totalmente devido à presença de um 3-O sulfato conforme demonstrado pelo tratamento de Penta 2 com heparinase I, II e III (Figura 7). Neste caso, todas as heparinases clivam o substrato de forma eficaz. Como com o Penta 1, a heparinase I cliva na ligação que contém I_{2S} dando um trissacárido de massa 591,9 (clivagem na ligação B.2 na Figura 5). Inversamente, tanto a heparinase II como III clivam a ligação contendo G não sulfatada que agora pode ser fendida (ligação B.1 na Figura 5). A heparinase III cliva apenas esta ligação dando um tetrassacárido de massa 1428,3 e um monossacárido (não observado). A heparinase II cliva na ligação B.2 bem como na B.1, reduzindo o Penta 2 a um monossacárido e dois

dissacáridos, um dos quais é observado e tem uma massa de 592,0 (Figura 7).

Para explorar adicionalmente a especificidade do substrato em relação aos sacáridos 3-O sulfatados, utilizamos Hexa 1, um hexassacárido derivado de heparinase I contendo 3-O sulfato (Figura 8). O Hexa 1 também foi seleccionado como um substrato para este estudo porque representa uma truncagem da extremidade não redutora de AT-10 e contém a mesma unidade $\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ na extremidade redutora. Constatamos que o Hexa 1 é susceptível à clivagem por heparinase II e III mas não à cisão por heparinase I. De importância é o facto de que a clivagem do Hexa 1 pela heparinase II ou III não ocorre na ligação contendo G mas, ao contrário, na ligação contendo I (clivagem em C.1, mas não C.2 na Figura 5). No caso de clivagem por heparinase II, os produtos são um tetrassacárido de massa 1036,1 e um dissacárido de massa 577,8. Para clivagem por heparinase III, são observados os mesmos produtos, a saber, um tetrassacárido de massa 1036,1 e um dissacárido de massa 577,8. Estes resultados confirmam nossa avaliação de que as ligações com uma extremidade redutora próxima a 3-O sulfato são protegidas contra a acção da heparinase, incluindo a heparinase II. Com o tratamento de Hexa 1 pela heparinase II e III, é formado um tetrassacárido resistente à heparinase, com a sequência $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$. Está de acordo com as observações anteriores que este tetrassacárido seja resistente à clivagem adicional por heparinase (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. & Dell, A. (1993) *J Biol Chem* 268, 4780-7). Está também de acordo com a especificidade conhecida do substrato da heparinase I, o Hexa 1, que não contém ligações $\text{I}_{2\text{S}}$, não é clivado por esta enzima.

À luz destes estudos, fica agora evidente que as heparinases I e II podem clivar o sítio da AT-III na ligação $\text{H}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, onde a ligação que pode ser fendida é indicada com uma seta (A.2 de

Penta 1 e B.2 de Penta 2, Figura 5). Além disso, com a estrutura recém-atribuída para AT-10, constatamos que as ligações com um 3-O sulfato na glucosamina da extremidade redutora, a saber, $H_{NS,6S}^1GH_{NS,3S,6S}$ não podem ser clivadas pela heparinase II ou III (A.1 de Penta 1 e B.1 de Penta 2, Figura 5). Além disso, constatamos que esta inibição é totalmente devido à rara modificação 3-O sulfato. Finalmente, tomado em conjunto com os nossos estudos anteriores da acção enzimática da heparinase I, a estrutura de AT-10 reforça o facto de que a heparinase I actua de uma maneira exolítica, progressiva sobre os oligossacáridos heparina/heparan (Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95, 4182-7).

Ligação de AT-III ao Decassacárido AT-10: Nossa análise da sequência de AT-10 relatada aqui e em Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. & Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci EUA*, 12 de Setembro de 2000; 97(19):10359-64 revelou que este decassacárido não contém uma sequência de pentassacárido de ligação à AT-III intacta mas, ao contrário, contém apenas a unidade trissacárida da extremidade não redutora. Procuramos estender esta atribuição de sequência e proporcionar um contexto funcional para este resultado medindo a afinidade de ligação de AT-10 à AT-III. Ao pH 7,4, $I=0,15$, a AT-10 tem muito pouca afinidade por AT-III (Figura 9). Inversamente, nas mesmas condições, a heparina da mucosa intestinal porcina ligou-se à AT-III com uma K_D aparente de 36 nM. Para medir com precisão uma afinidade de AT-10 por AT-III, a titulação foi completada, ao contrário, com um pH 6,2, condições que são conhecidas por promover a ligação de AT-III a sacáridos. Nestas condições, a AT-10 ligou-se à AT-III com uma K_D aparente de 0,8 μ M ao passo que a K_D para a heparina de comprimento total diminuiu para 10 nM. A K_D medida para AT-10 é comparável a sacáridos semelhantes com uma extremidade redutora truncada, como

valores de K_D medidos de 0,3-2 μM (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. & Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Deste modo, os resultados das experiências de titulação estão de acordo com a AT-10 contendo uma sequência de ligação de pentassacárido AT-III parcialmente intacta (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. & Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). As três unidades sacáridas na extremidade não redutora da sequência de pentassacáridos, a saber, $\text{H}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, são principalmente responsáveis pela ligação do estado nativo da AT-III, ao passo que a unidade dissacárida da extremidade redutora, $\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, que está ausente em AT-10, é importante para ligar a AT-III activa, conformacionalmente alterada. A K_D medida para AT-10 (0,8 μM ao pH 6,0, $I=0,05$) é ≈ 100 vezes superior à da heparina de comprimento total, confirmando que a AT-10 não contém uma sequência de pentassacáridos AT-III intacta. A diminuição na afinidade à AT-III observada para a AT-10 não pode ser simplesmente devido a uma questão de tamanho, uma vez que, em estudos anteriores, o pentassacárido sozinho demonstrou ter uma afinidade semelhante à da heparina de comprimento total (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. & Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Tendo medido a interacção de ligação entre a AT-III e o decassacárido, em seguida procuramos definir as consequências funcionais de um oligossacárido HLGAG que contém apenas um sítio de ligação parcial à AT-III.

Actividade Biológica de AT-10: Como pode ser esperado para um oligossacárido que não contém um sítio de AT-III intacto, a actividade biológica da AT-10 é inferior à da enoxaparina (aqui utilizada como exemplo de uma LMWH) ou o pentassacárido, Penta 1 (Figura 10). Em consonância com o mecanismo conhecido de inibição mediada por heparina da actividade da trombina pela AT-III, nem o decassacárido nem o pentassacárido têm actividade anti-IIa significativa (Figura 10a). No caso do pentassacárido esta ausência de actividade é totalmente devido ao seu tamanho sendo insuficiente

actuar como um modelo para a formação de um complexo AT-III/IIa. Para o decassacárido, esta restrição de tamanho é também uma explicação provável (uma vez que rigorosos estudos bioquímicos implicaram os oligossacáridos com pelo menos 18 unidades monossacáridas como sendo importantes para a eficaz formação de complexo) (Petitou, M., Herault, J. P., Bernat, A., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Lormeau, J. C. & Herbert, J. M. (1999) *Nature* 398, 417-22), embora a ausência de um sítio de AT-III intacto também possa contribuir para a sua reduzida actividade anti-IIa.

Estes resultados são confirmados e estendidos pelo exame da actividade anti-Xa dos três que utilizam factores Xa de soro (Figura 10b) ou factor Xa purificado (Figura 10c). Conforme foi demonstrado anteriormente, a inibição do Factor Xa pela AT-III exige ligação do motivo pentassacárido apenas concomitante com uma mudança conformacional em AT-III. No ensaio anti-Xa, a enoxaparina e o pentassacárido têm uma actividade marcadamente superior em relação ao decassacárido. Os valores IC_{50} para a enoxaparina e o pentassacárido sintético são de 66 nM e 39 nM, respectivamente, enquanto os valores da AT-10 são dez vezes superiores em 280 nM. Estes valores estão em concordância com a afinidade inferior de AT-10 para AT-III em comparação com a heparina que foi determinada nas experiências de titulação fluorescente de AT-III (Figure 9). Não é surpreendente que o decassacárido possua uma actividade anti-Xa uma vez que a unidade trissacárida não redutora (presente no decassacárido) é principalmente responsável pela ligação inicial da heparina à AT-III. Espera-se que a unidade dissacárida da extremidade redutora, a saber, $I_{2S}H_{NS,6S}$ (ausente em AT-10) ligue-se à antitrombina III conformacionalmente alterada, estabilizando-a. As medições por HepTest (Figura 10d) deram resultados semelhantes, a saber, a enoxaparina e o pentassacárido têm actividade significativamente mais elevadas do que o decassacárido AT-10. Tomadas em conjunto, as actividades anti-IIa e anti-Xa do

decassacárido em comparação com o pentassacárido e a enoxaparina estão de acordo com as experiências de titulação de AT-III bem como a conhecida farmacologia do mecanismo da heparina de inibição da cascata de coagulação.

Em resumo, é demonstrado neste exemplo que as heparinases I e II clivam no sítio de ligação à AT-III deixando para trás a unidade trissacárida na extremidade redutora do oligossacárido. Demonstramos também que a heparinase III não cliva no sítio de AT-III por causa da presença de um 3-O sulfato no resíduo de glucosamida interna. Deste modo, a utilização das heparinases I ou II para a geração de LMWHs exige um extremo cuidado para assegurar a retenção de sítios de antitrombina III intactos em fragmentos de LMWH. De facto, o resultados aqui demonstrados mostram que as heparinases I ou II podem ser agentes ideais para a *neutralização* de doses farmacológicas de heparina.

Exemplo 3: Desenvolvimento de um Método de Análise Composicional e Caracterização Estrutural de Heparinas:

Introdução

Para purificar a UFH e identificar os seus componentes, a UGH foi digerida exaustivamente e analisada utilizando electroforese capilar e espectrometria de massa MALDI. A electroforese capilar (CE) é um método muito sensível com alto poder de resolução para a análise composicional do dissacárido das heparinas. Foi desenvolvido um método de análise composicional (CAM) que utiliza CE para quantificar os blocos de construção do dissacárido de UFH e LMWH. Este método utiliza menos do que um micrograma de heparina, é rápido (cada ciclo de dura 25 minutos), é independente da concentração e é altamente reproduzível. Uma vantagem deste método é a sua eficácia como um processo de controlo de qualidade que pode

auxiliar a minimizar variações de lote para lote na composição de LMWH diferentes.

Deste modo, utilizou-se a técnica de CE em combinação com espectrometria de massa MALDI offline para identificar um tetrassacárido único na digestão exaustiva de UFH e LMWH. Este tetrassacárido, que faz parte do domínio de pentassacárido de ligação à AT-III de glicosaminoglicanos, é resistente à degradação adicional com Heparinase I, II ou III. Está demonstrado adiante que a utilização deste tetrassacárido único na medição directa do factor anti Xa da heparina mediou a actividade anticoagulante.

Métodos

Químicos e Materiais: A UFH foi adquirida de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH) e as concentrações molares dos materiais foram calculadas num peso molecular médio de 13.000 Da. Os padrões de dissacáridos foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). As Heparinase I e III são heparinases recombinantes. A Heparinase II é de *Flavobacterium heparinum* purificada conforme descrito anteriormente. (Shriver *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273, 22904-22912.)

Análise Composicional: A UFH foi submetida à despolimerização exaustiva com um cocktail de enzimas feito de Heparinase I, Heparinase II e Heparinase III. 9 µL de 10 µg/µL de concentração de UFH em H₂O foram digeridos com 1 µL do cocktail de enzimas consistindo em 100 nM cada de Heparinase I, II e III em acetato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 100 mM, tampão acetato de cálcio 5 mM, pH 7,0, durante 12 horas a 37 °C. A amostra para CE foi preparada diluindo 1 µL da digestão com 9 µL de H₂O. As amostras foram analisadas por CE em polaridade reversa com um tampão contínuo de 50 mM tris/fosfato, sulfato de dextrano 10 µM, pH 2,5.

57 nL de cada amostra foram injectados na CE e os tempos dos ciclos eram de 25 minutos. Cada amostra foi digerida em duplicata e a experiência foi repetida duas vezes para cada amostra, resultando em quatro leituras por amostra. Todos os 8 picos resultantes foram colhidos e a pureza das amostras colhidas foi verificada por reinjecção na CE e a sua massa foi medida por Espectrometria de Massa MALDI offline. A identidade dos picos 1-7 foi adicionalmente confirmada pela correspondência do seu tempo de migração com o de dissacáridos padrão, disponíveis comercialmente. Por exemplo, o espectro de CE do pico 1 foi colhido da análise por CE da digestão da enzima total de UFH e um espectro de massa MALDI do pico 1 foi gerado. Os espectros de massa foram colhidos utilizando parâmetros conforme indicado anteriormente e calibrados externamente utilizando sinais para o (RG)₁₉R protonado e seu complexo com um hexassacárido derivado do ácido nitroso da sequência I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}.

Resultados

Conforme observado na Figura 11A, são vistos oito picos no espectro CE. Cada um dos picos marcados de 1 até 8 tem tempos de migração idênticos em amostras diferentes. Depois da colheita de cada pico e a pureza verificada de cada amostra por reinjecção no CE, a sua massa foi medida por Espectrometria de Massa MALDI offline. O pico 1 tem a mesma massa que o dissacárido heparina $\Delta U_{2S,HNS,6S}$. O $\Delta U_{2S,HNS,6S}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 1 em condições de CE idênticas. Isto identifica o pico 1 como $\Delta U_{2S,HNS,6S}$. De maneira semelhante, foram estabelecidas as identidades dos sete picos de 2-7 na digestão de análise composicional de UFH. Os resultados estão apresentados nas Figuras 3A e 3B - 6A e 6B. A identidade de cada pico foi ainda confirmada pela correspondência do seu tempo de migração com o de dissacáridos padrão, disponíveis comercialmente. Os picos 2, 3 e 4 são

dissacáridos dissulfatados e 5, 6 e 7 são dissacáridos monossulfatados.

Foi gerado um gráfico do espectro de massa por CE e MALDI do pico 2. Este pico tem a mesma massa que $\Delta U_{2S, H_{NS}}$. Além disso, o $\Delta U_{2S, H_{NS}}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 2 em condições de CE idênticas. Isto confirma que o pico 2 é $\Delta U_{2S, H_{NS}}$.

Foi gerado um gráfico do espectro de massa por CE e MALDI do pico 3. Este pico tem a mesma massa que $\Delta U, H_{NS, 6S}$. Além disso, o $\Delta U, H_{NS, 6S}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 3 em condições de CE idênticas. Isto confirma que o pico 3 é $\Delta U, H_{NS, 6S}$.

Foi gerado um gráfico do espectro de massa por CE do pico 5. Este pico tem a mesma massa que $\Delta U, H_{NS}$. Além disso, o $\Delta U, H_{NS}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 5 em condições de CE idênticas. Isto confirma que o pico 5 é $\Delta U, H_{NS}$.

Foi gerado um gráfico do espectro de massa por CE do pico 6. Este pico tem a mesma massa que $\Delta U_{2S, H_{NAC}}$. Além disso, o $\Delta U_{2S, H_{NAC}}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 6 em condições de CE idênticas. Isto confirma que o pico 6 é $\Delta U_{2S, H_{NAC}}$.

Foi gerado um gráfico do espectro de massa por CE do pico 7. Este pico tem a mesma massa que $\Delta U, H_{NAC, 6S}$. Além disso, o $\Delta U, H_{NAC, 6S}$ comercial da Sigma tem o mesmo tempo de migração que o pico 7 em condições de CE idênticas. Isto confirma que o pico 7 é $\Delta U, H_{NAC, 6S}$.

Para além dos sete dissacáridos, foi também identificado um tetrassacárido (pico 8) na digestão exaustiva da heparina com heparinase I, II e III. Este tetrassacárido foi isolado e a sua

massa foi determinada por Espectrometria de Massa MALDI. Este tetrassacárido tinha o mesmo tempo de migração na CE que o tetrassacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ que fazia parte do decassacárido $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ cuja estrutura foi anteriormente determinada. Isto leva à confirmação do pico 8 como o tetrassacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Este pico é resistente à degradação adicional com heparinases I, II ou III.

Para além dos picos 1-8, havia uma pequena quantidade de dissacáridos não sulfatados que migram muito mais lentamente do que os sacáridos sulfatados, conforme ilustrado na Figura 11B. Estima-se que os dissacáridos não sulfatados constituam < 2 % de UFH conforme apresentado na Tabela 5 (adiante).

A Figura 12 demonstra o gráfico de CE da digestão exaustiva do pentassacárido AT-10 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $IH_{NAC,6S}$ $GH_{NS,3S,6S}$. O tetrassacárido 8 na digestão exaustiva da heparina tem a mesma massa e tempo de migração que o $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Isto confirma o pico 8 como $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Exemplo 4: Resposta UV dos dissacáridos 1-7

Introdução

Foi determinado o factor de resposta (RF) UV de cada um dos dissacáridos (1-7) para melhor identificar os componentes dos dissacáridos da digestão exaustiva. O RF para um dissacárido é definido como a quantidade daquele dissacárido em ng que dá a mesma resposta que um ng de $\Delta U_{2S,HNS,6S}$.

Métodos

Determinação do Factor de Resposta: O RF para os diferentes dissacáridos foi calculado medindo a resposta UV de 57 ng de cada dissacárido e normalizando a mesma com a do $\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$ conforme apresentado na Tabela 5.

Resultados

Cada um dos sete dissacáridos (1-7) tem uma extensão diferente da resposta UV A_{232} . Havia uma quantidade insuficiente do tetrassacárido 8 ($\Delta U_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$) para permitir a medição da absorbância UV A_{232} para este tetrassacárido. Espera-se que os tetrassacáridos tenham uma absorbância UV A_{232} inferior aos dissacáridos e, deste modo presumiu-se que o $\Delta U_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$ tem a mesma resposta que o menos sensível dos dissacáridos, a saber, o 1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$).

Tabela 5

Composto	Resposta para 57 ng de dissacáridos	Factor de Resposta (RF)
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	10421,1	1
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	13551,45	0,769
3 ($\Delta U_{NS, 6S}$)	14595,3	0,714
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	13551,45	0,769
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	23956,35	0,435
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	32363,55	0,322
7 ($\Delta U, H_{NAC, 6S}$)	22903,35	0,455
8 ($\Delta U_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$)	10421,1 (suposição)	1

Na Tabela 5 foi calculado o factor de resposta (RF) para os picos 1-8. A segunda coluna dá a absorbância UV a 232 nM para injeção de 57 nL de 1 ng/nL de concentração, isto é, 57 ng dos dissacáridos de padrão comercial (1-7). Não pudemos medir a absorbância UV a 232 nM para concentrações conhecidas de 8 por falta da disponibilidade da amostra em quantidade suficiente. Presume-se que 8 tenha a mesma resposta que o menos sensível dos 7 dissacáridos, a saber, 1. A terceira coluna dá o RF para cada um dos sete picos, sendo o RF para um dissacárido definido como a fracção de um ng do mesmo, que dá a mesma resposta que um ng de ($\Delta U_{2S}, H_{NS,6S}$).

Exemplo 5: Determinação de sacáridos não sulfatados em heparina

Introdução

Embora a heparina tenha sido classificada como um glicosaminoglicano sulfatado, a mesma contém uma quantidade mínima de sacáridos não sulfatados. Foram realizados procedimentos para determinar a quantidade de sacáridos não sulfatados na heparina. Depois desta determinação, o RF calculado para os picos 1-8 pode ser utilizado para estimar a % do peso dos blocos de construção sulfatados da heparina a partir da AUC medida por CE.

Métodos

Um peso conhecido de heparina submetido a digestão exaustiva com o cocktail de enzimas foi injectado na CE. A área sob a curva (AUC) medida para os picos 1-8 na Figura 11 é convertida no peso dos sacáridos sulfatados utilizando a resposta para quantidades

conhecidas dos picos 1-8. A diferença entre a quantidade total dos sacáridos heparina injectados na CE e a quantidade total de dissacáridos e tetrassacáridos sulfatados dá a quantidade de sacáridos não sulfatados na digestão completa da UFH. A multiplicação da % relativa da AUC pelo RF dá a concentração relativa corrigida ou a % relativa da AUC dos picos 1-8 em termos de $\Delta U_{2S, H_{NS}, 6S}$.

Resultados

A Tabela 6 apresenta a estimativa dos sacáridos não sulfatados na heparina. Conforme apresentado na Tabela 6, foi determinado que os sacáridos não sulfatados constituem menos de 2% da heparina. Os sacáridos não sulfatados não são levados em consideração na construção da tabela da análise de composição da heparina conforme explicado adiante. A coluna 1 da Tabela 7 dá a AUC medida para os picos 1-8. A coluna 2 dá a % relativa da AUC. A multiplicação da % relativa da AUC pelo RF dá a concentração relativa corrigida ou a % relativa da AUC dos picos 1-8 em termos de $\Delta U_{2S, H_{NS}, 6S}$. Estes são então normalizados para obter a % de peso dos picos 1-7 dos dissacáridos e do pico 8 do tetrassacárido. Conforme aqui demonstrado, a construção desta tabela da análise de composição é independente da concentração ou do peso da digestão da heparina analisada por CE.

Tabela 6

Composto	AUC	Resposta por amostra de 57 ng	Quantidade de sacárido em ng
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	10421,1	39,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{HS}}$)	1040,8	13551,45	4,4
3 ($\Delta U_{H_{NS, 6S}}$)	1437,9	14595,3	5,3
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	379,3	13551,45	1,6
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	685,1	23956,35	1,7
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	502,9	32363,55	0,9
7 ($\Delta U, H_{NAC, 6S}$)	482,3	22903,35	1,1
8 ($\Delta U_{NAC, 6S}GH_{HS, 3S, 6S}$)	184,7	10421,1 (suposição)	1
Quantidade total dos sacáridos sulfatados de 1-8			55,9
Quantidade de sacáridos não sulfatados			57-55,9 = 1,1 ng (1,9 %)

A Tabela 6 apresenta uma estimativa da quantidade de sacáridos não sulfatados na digestão exaustiva de UFH com as heparinases I, II e III. Os picos 1-7 são apresentados como dissacáridos conhecidos, conforme explicado nas Figuras 2-6. O pico 8 é o tetrassacárido $\Delta U_{H_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}}$ que é resistente à degradação adicional pelas heparinases I, II ou III. A segunda coluna dá a área sob a curva (AUC) medida para cada um dos picos para uma injeção de 57 nL de 1 ng/nL de concentração da digestão da análise de composição de UFH. A terceira coluna dá a absorvância UV a 232 nM para injeção de 57 nL de 1 ng/nL de concentração de cada um dos 7 dissacáridos de padrão comercial (1-7). A coluna 4 dá o peso dos vários sacáridos sulfatados em ng. A diferença entre a sua soma (55,9 ng) e a quantidade de heparina injectada (57 X 1 = 57 ng) dá a quantidade de sacáridos não sulfatados presentes na digestão da análise de composição da UFH.

Exemplo 6: Verificação de instrumentação e totalidade da digestão

Introdução

Para verificar a reprodutibilidade instrumental e para certificar se a digestão da análise de composição está de facto completa com as concentrações de enzimas utilizadas, as amostras de UFH foram digeridas em duplicata e analisadas duas vezes por CE. Os resultados foram, então, comparados para determinar se houve variabilidade entre os ciclos.

Métodos

A UFH foi digerida conforme descrito na Exemplo 1A, métodos com 1 μ L ou 5 μ L do cocktail de enzimas (EC). Cada amostra foi digerida em duplicata e cada digestão foi analisada duas vezes por CE.

Resultados

A comparação da análise em duplicata da mesma amostra (UFH 1/1 com UFH 1/2, UFH 2/1 com UFH 2/2 e UFH 3/2 com UFH 3/2) demonstra que há boa reprodutibilidade instrumental. A comparação de UFH 1/1 ou UFH 1/2 com UFH 2/1 ou UFH 2/2 demonstra que há uma variação mínima de ciclo para ciclo. A comparação de UFH digerida com 1 μ L de EC com UFH digerida com 5 μ L de EC demonstra que o aumento da quantidade de enzimas não muda o perfil do dissacárido de forma apreciável. Isto confirma que a digestão exaustiva é alcançada utilizando 1 μ L de EC conforme ilustrado na Figure 11. A análise de composição da LMWH realizada por CE de acordo com o protocolo indicado na Figura 11 e na Tabela 7 pode ser utilizada para comparar de forma rigorosa lotes diferentes de LMWH.

Tabela 7

Composto	AUC	% Relativa da AUC	Factor de Resposta (RF)	Concentração relativa corrigida	% Peso
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	60,7	1	60,7	70,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	1040,8	8,7	0,769	6,7	7,8
3 ($\Delta U_{NS, 6S}$)	1437,9	12,0	0,714	8,6	10,0
4 ($\Delta_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	379,3	3,2	0,769	2,5	2,9
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	685,1	5,7	0,435	2,5	2,9
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	502,9	4,2	0,322	1,4	1,6
7 ($\Delta U, H_{NAC, 6S}$)	482,3	4,0	0,455	1,8	2,1
8 ($\Delta U_{H_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, S}}$)	184,7	1,5	1	1,5	1,8

A Tabela 7 apresenta os valores da Análise de composição para UFH. A área sob a curva (AUC) foi medida para cada pico do espectro de CE da UFH digerida com o cocktail de enzimas conforme apresentado na Figura 11. O factor de resposta calculado para cada sacárido conforme apresentado na Figura 6 foi utilizado para calcular a sua concentração relativa corrigida na digestão por enzima. A última coluna dá a percentagem do peso de cada bloco de construção de UFH. Os sacáridos não sulfatados, que constituem < 2% de UFH, não são levados em consideração na construção da tabela de análise de composição. Conforme aqui demonstrado, a construção desta tabela de análise de composição como demonstrada por este método é independente da concentração ou do peso da digestão de heparina analisada por CE.

Exemplo 7: Determinação da eficácia da acção anticoagulante do anti-factor Xa mediada por AT-III da heparina: Correlação entre $IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ e a actividade anti-Xa

Introdução

A quantificação do tetrassacárido $\Delta H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ por CAM tem um papel adicional em estimar a eficácia da acção anticoagulante do anti-factor Xa mediada por AT-III da heparina. O $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ é uma parte do pentassacárido de ligação à AT-III. A quantificação de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ é uma medida da determinação da quantidade do pentassacárido de ligação à AT-III presente na heparina e, deste modo, o mesmo auxilia na medição directa da anticoagulação mediada pelo anti-factor Xa da heparina que é dependente do domínio do pentassacárido de ligação à AT-III da heparina.

Métodos

A UFH foi fraccionada por tamanho através de uma coluna de exclusão por tamanho P10. A análise de composição foi realizada nas fracções resultantes para estimar o seu teor de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Estas fracções foram também testadas quanto à sua actividade anti-factor Xa.

Resultados

Um gráfico da actividade do anti-factor Xa de fracções diferentes como uma função do seu $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ resulta numa linha recta com $r = 0,91$, conforme apresentado na Figura 11. Isto indica que a acção anticoagulante mediada pelo anti-factor Xa das heparinas pode ser medida directamente a partir do seu teor de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Os dados estão também apresentados na Tabela 8.

Tabela 8

Amostra	1 $\Delta U_{2S, HNS6S}$	2 $\Delta U_{2S, HNS6S}$	3 $\Delta U, HNS, 6S$	4 $\Delta U_{2S, HNAC}$	5 $\Delta U, HNS$	6 $\Delta U_{2S, HNAC}$	7 $\Delta U_{HNAC, 6S}$	8 $\Delta U_{HNAC, 6S} CH_{HS, 3S, 6S}$
UFH 1/1 1 μ L EC	70,9	7,8	10,0	2,9	2,9	1,6	2,1	1,8
UFH 1/2 1 μ L EC	71,0	7,7	10,2	3,0	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 2/1 1 μ L EC	71,5	7,5	10,1	2,9	2,7	1,5	2,1	1,7
UFH 2/2 1 μ L EC	71,3	7,5	10,3	2,8	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 3/1 5 μ L EC	72,0	7,3	10,0	2,8	2,8	1,6	1,8	1,7
UFH 3/2 5 μ L EC	72,2	7,5	9,9	2,7	2,7	1,6	1,7	1,7

A Tabela 8 apresenta uma análise de composição de UFH realizada por CE de acordo com o protocolo indicado na Figura 11 e Tabela 7 que pode ser utilizado para comparar de forma rigorosa lotes diferentes de LMWH. A UFH foi digerida com 1 μ L ou 5 μ L do cocktail de enzimas (EC). Cada amostra foi digerida em duplicata e cada digestão foi analisada em duplicata por CE. Em todas as amostras os picos dos sacáridos 1-8 tinham o mesmo tempo de migração. A comparação da análise em duplicata da mesma amostra (UFH 1/1 com UFH 1/2, UFH 2/1 com UFH 2/2 e UFH 3/1 com UFH 3/2) demonstra que há boa reprodutibilidade instrumental. A comparação de UFH 1/1 ou UFH 1/2 com UFH 2/1 ou UFH 2/2 demonstra que há uma variação mínima de ciclo para ciclo.

A comparação de UFH digerida com 1 μ L de EC com UFH digerida com 5 μ L de EC demonstra que o aumento da quantidade de enzimas não muda o perfil do dissacárido de forma apreciável demonstrando que a digestão exaustiva é alcançada utilizando 1 μ L de EC conforme apresentado na Figura 11.

Exemplo 8: Geração de Fracções de LMWH e caracterização da actividade biológica

Métodos:

As fracções de LMWH de MS 57-1 até MS 57-4 e MS 59-1 até MS59-4 foram preparadas tratando a UFH com 200 µg de Heparinase III (conforme descrito acima) e passando o produto resultante por uma coluna P10.

As fracções de LMWH de MS56-1 até MS56-4 foram preparadas tratando a UFH com 1000 µg of Heparinase III e passando o produto resultante por uma coluna P10.

As fracções de LMWH de MS60-1 até MS 60-3 e de MS55-1 até MS55-4 foram geradas preparando a Fracção 2 com 200 µg de Heparinase III e passando o produto resultante por uma coluna P10.

As fracções de LMWH MS66-1 e MS66-2 foram preparadas tratando a Fracção 2 com 1000 µg de Heparinase III e passando o produto resultante por uma coluna P10.

A Fracção 1 é a heparina de peso molecular alto que é precipitada mediante o tratamento da UFH com acetato de bário à temperatura ambiente, conforme descrito na referência Volpi descrita acima.

Tabela 9 - Geração de Heparina de Peso Molecular/Carga/Propriedades Biológicas seleccionadas

Método	Amostra	Peso (mg)	Peso Molecular médio	PD	Anti-Xa IU/mg	Anti IIa IU/mg	Xa/IIa	% peso 1	% peso 8	% peso 2	% peso 3	% peso 4	% peso 5	% peso 6	% peso 7
	Fracção 2	300	< 8000		400,0	75	5,3	70,0	4,5	7,8	11,1	3,2	2,4	1,4	0
	Fracção 1	150	8000-14.000		105,6	54,5	2,0	87,2	0	9,0	1,6	0,4	1,8	0	0
UFH, 200 µg HepII P10	MS57-1	130	8743 ± 177	1,1	292,9	72,3	4,0	77,8	3,5	3,0	10,7	1,4	0,3	0,2	3,0
	MS57-2	140	6010 ± 138	1,1	186	33,33	5,6	75,5	3,5	4,0	10,7	1,6	0,5	0,4	3,8
	MS57-3	60	3000 - 5000		70,8	0		73,9	2,8	4,9	10,2	1,8	1,2	0,6	5,0
	MS57-4	10	< 3000		42,6	0		73,9	1,5	4,4	10,0	1,3	2,0	0,9	0,4
	MS59-1	130	8800		255	29,2	8,7	73,1	4,3	5,8	11,5	2,5	0	0,5	2,4
	MS59-2	130	6500		255	54,5	4,7	77,8	3,8	3,2	10,3	1,3	0,4	0,3	3,4
	MS59-3	70	3000 - 5000		54	0		75,3	2,3	4,6	10,2	1,9	0,8	0,8	3,8
	MS59-4	30	< 3000		15	0		71,3	1,9	7,7	9,4	1,9	1,8	2,0	6,2
UFH, 1000 µg HepII P10	MS56-1	60	9204 ± 192	1,2	261,4	50	5,2	78,8	4,7	3,3	9,3	1,7	0,2	0,3	2,2
	MS56-2	40	6000 ± 146	1,2	123,8	75	1,7	70,7	3,8	7,0	10,5	2,8	1,2	1,0	2,9
	MS56-3	100	3000 - 5000		126,9	36,4	3,5	76,4	3,0	4,1	11	1,5	0,5	0,3	3,6
	MS56-4	80	< 3000	31	0	78,7	0	5,0	12,0	2,1	0	0	0		
Fracção 2, 200 µg HepII P10 Fracção 2 1000 µg HepII P10	MS60-1	110	7224 ± 139	1,2	347,4	58,33	6,0	68,8	5,0	6,0	13,1	2,8	0,4	0,5	3,0
	MS60-2	140	5736 ± 238	1,1	353,6	75	1,5	69,9	3,8	6,2	13	2,1	0,8	0,7	3,8
	MS60-3	140	< 5000		51	0		65,9	0	5,7	12,7	2,2	3,7	1,7	8,4
	MS55-1	140	6505 ± 100	1,1	335	60,0	5,6	68,6	6,5	5,5	13,9	3,3	0,3	0,3	2,1
	MS55-2	130,0	5964 ± 87	1,1	201,2	54,6	3,7	74,4	4,9	3,7	11,3	2,6	0	0	3,5
	MS55-3	50,0	3000 - 5000		11,6	0		76,1	2,3	4,4	9,8	1,7	0,8	0,6	4,2
	MS55-4	31	< 3000		15,6	0		73,4	0	5,0	9,8	2,0	1,8	1,0	6,5
	MS66-1	150	6470 ± 142	1,2	250,1	100	2,5	75,0	3,6	7,5	8,6	2,6	3,8	1,0	0,3
	MS66-2	150	5592 ± 159	1,1	206,0	20,8	6,0	74,0	3,6	7,8	9,2	3,4	1,1	1,0	0,2

A Fracção 2 é a segunda fracção de um peso molecular mais baixo que é precipitada mantendo a heparina tratada com acetato de bário a 4 °C. Esta é a fracção utilizada de acordo com os métodos da invenção.

Foram medidos os perfis de absorção subcutâneos e *in vivo* de MS55-2. O perfil de absorção de MS55-2 foi comparado com o das LMWHs Ardeparina e Enoxaparina disponíveis comercialmente. A actividade anti-Xa das várias espécies de heparina também foi testada quanto à sua actividade biológica *in vitro*.

Resultados:

A Tabela 9 proporciona a análise de composição e funcional das preparações de LMWH preparadas de acordo com a invenção e da fracção de controlo 1. A tabela lista o peso molecular, a actividade *in vitro* e a composição de várias fracções.

A MS55-2 apresentou farmacocinética muito semelhante à da enoxaparina como fica evidente na fase comparável de absorção e eliminação, bem como T_{max} . A biodisponibilidade e concentração de pico foram comparáveis entre todas as três LMWHs testadas por injeção subcutânea. Quando administrada pela via IV, a actividade anti-Xa inicial é muito superior para a MS55-2 em comparação com a Ardeparina. Uma vez mais, a biodisponibilidade entre as duas LMWHs era quase idêntica. Tanto a ardeparina como a MS55-2 exibiram diminuição exponencial na actividade anti-Xa e, deste modo, a eliminação segue farmacocinética de primeira ordem.

A actividade anti-Xa da MS55-2 foi observada como sendo de 205 IU/mg. Isto é superior às LMWHs, tais como a Enoxaparina (135 IU/mg), Ardeparina (93 IU/mg) que estão actualmente disponíveis nos Estados Unidos. Os resultados estão também apresentados na Figura 13.

A memória descritiva escrita precedente é considerada como sendo suficiente para permitir que um especialista pratique a invenção. A presente invenção e outras formas de realização funcionalmente equivalentes encontram-se no âmbito da invenção. Várias modificações da invenção, para além destas aqui apresentadas e descritas tornar-se-ão evidentes aos especialistas na técnica a partir da descrição precedente e enquadram-se no âmbito das reivindicações apensas.

Lisboa, 22 de Junho de 2009.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para analisar uma amostra compreendendo:

- a) aplicar uma restrição experimental a um polissacárido numa amostra para produzir um polissacárido modificado tendo um componente assinatura,
- b) detectar a presença do componente assinatura na amostra como uma indicação de que o polissacárido está presente na amostra, e
- c) determinar a presença ou ausência do componente assinatura para analisar a amostra;

em que o componente assinatura é seleccionado de

$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$; $IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$; $H_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $\Delta UH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$;
 $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS}$;
 $\Delta UH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$; ΔUH_{NS} ; $\Delta U_{2S}H_{NAC}$; $\Delta UH_{NAC,6S}$ ou $\Delta UH_{NS,3S,6S}$.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o componente assinatura tem uma actividade biológica conhecida.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o componente assinatura é biologicamente inactivo.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a restrição experimental aplicada à amostra é electroforese capilar, cromatografia líquida de alta pressão, cromatografia por permeação em gel ou ressonância magnética nuclear.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra é um lote de polissacáridos e o componente assinatura é utilizado para monitorizar a pureza do lote determinando a quantidade do componente assinatura no lote.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o método de análise é um método para monitorizar a presença de componentes activos na amostra, em que a presença do componente assinatura na amostra é indicativa de um componente activo na amostra.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o método de análise é um método para monitorizar a presença de componentes activos na amostra, em que a presença do componente assinatura na amostra é indicativa de uma amostra sem uma actividade específica.

8. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o método de análise é um método para determinar a quantidade de componentes activos na amostra determinando a quantidade do componente assinatura na amostra.

9. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o método é realizado em pelo menos duas amostras e em que são determinadas as quantidades relativas do componente assinatura em cada uma das pelo menos duas amostras, em que o nível relativo mais alto do componente assinatura é indicativo da amostra mais activa.

10. Método de acordo com a reivindicação 2, que compreende ainda a utilização do componente assinatura para identificar moléculas biologicamente activas.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o componente assinatura é utilizado para rastrear uma biblioteca.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o componente assinatura é uma porção biologicamente activa de um polissacárido.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a porção biologicamente activa é um tetrassacárido do domínio de ligação à AT-III da heparina ou um tetrassacárido do domínio de ligação ao FGF da heparina.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a restrição experimental aplicada à amostra é digestão com uma exoenzima, digestão com uma endoenzima, digestão química, modificação química ou modificação com uma enzima.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polissacárido na amostra é comparado com a base de dados de referência de polissacáridos de tamanho idêntico ao polissacárido, em que os polissacáridos da base de dados de referência também foram submetidos às mesmas restrições experimentais que o polissacárido na amostra, em que a comparação proporciona uma análise de composição do polissacárido da amostra.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra é um produto farmacêutico, uma amostra biológica ou uma amostra de sangue.

17. Método para avaliar a qualidade de uma amostra de polissacárido compreendendo os passos de:

identificar um componente na amostra de polissacárido, e determinar um valor quantitativo da quantidade de componente, em que o valor quantitativo do componente é indicativo da qualidade da amostra de polissacárido;

e em que o componente é seleccionado de $\Delta U_{H_{NAC}, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$\Delta U_{H_{NS}, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$; $\Delta U_{H_{NAC}, 6S}GH_{NS, 3S}$; $\Delta U_{H_{NS}, 6S}GH_{NS, 3S}$;

$\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}GH_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GMan_{3S, 6S}$;

$I_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$I_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GMan_{3S, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$;

$I_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}IH_{NS, 6S}$;

$\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}GH_{NS, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}I_{2S}Man_{6S}$; $I_{H_{NAC, 6S}GMan_{3S, 6S}}$; $H_{NAC, 6S}GMan_{3S, 6S}$;

$H_{NS, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S, OMe}$; $H_{NS, 6S}GH_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S, OMe}$; $\Delta U_{H_{NS, 6S}I_{2S}H_{NS, 6S, OMe}}$;

$H_{NS, 6S}GH_{NS, 6S}$; $H_{NS, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S, OMe}$; $\Delta U_{2S}H_{NS, 6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS}$; $\Delta U_{H_{NS, 6S}}$;

$\Delta U_{2S}H_{NAC, 6S}$; $\Delta U_{H_{NS}}$; $\Delta U_{2S}H_{NAC}$; $\Delta U_{H_{NAC, 6S}}$ or $\Delta U_{H_{NS, 3S, 6S}}$.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o método envolve identificar pelo menos dois componentes na amostra de polissacárido e determinar um valor quantitativo da quantidade de cada um dos pelo menos dois componentes para avaliar a qualidade da amostra de polissacárido.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o valor quantitativo é calculado como a área sob a curva quando a amostra é processada por electroforese capilar.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o valor quantitativo é calculado como o factor de resposta.

21. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o valor quantitativo é calculado como a percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o passo de calcular a percentagem da quantidade relativa de cada fracção presente na amostra é determinado de acordo com a equação adiante:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

em que

PRA = percentagem da quantidade relativa de cada fracção

RF = factor de resposta

AUC_{%R} = percentagem relativa AUC [(100 x AUC_C) / AUC_T]

AUC_C = Área sob a curva para um componente

AUC_T = a soma da Área sob a curva para todos os componentes.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o cálculo é implementado por computador e é utilizado para gerar uma estrutura de dados, tangivelmente incorporada num meio legível por computador, representando um valor quantitativo de um componente de um polissacárido.

24. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 17, em que o polissacárido é um glicosaminoglicano, uma heparina de baixo peso molecular, heparina, sulfato de heparano, uma heparina preparada biotecnologicamente, uma heparina quimicamente modificada ou uma heparina sintética.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o polissacárido é um glicosaminoglicano semelhante à heparina.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o polissacárido é uma heparina de baixo peso molecular.

27. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 17, em que o componente assinatura é um dos picos correspondentes a qualquer um de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; or $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

Lisboa, 22 de Junho de 2009.

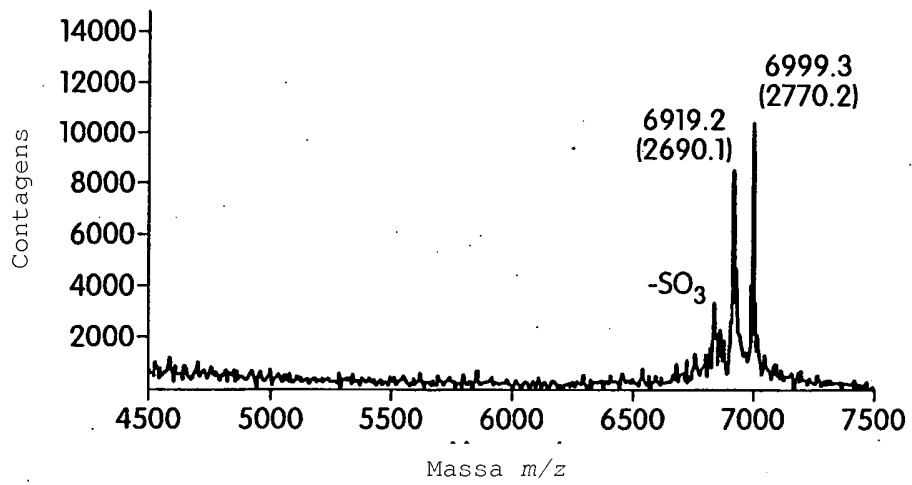


Fig. 1

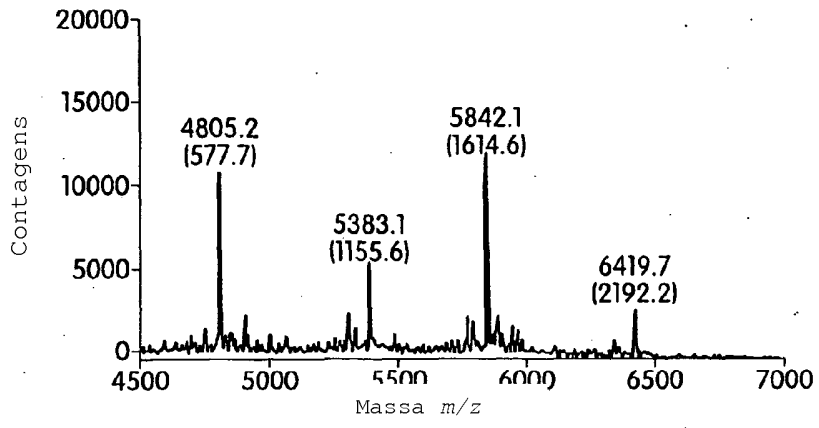


Fig. 2A

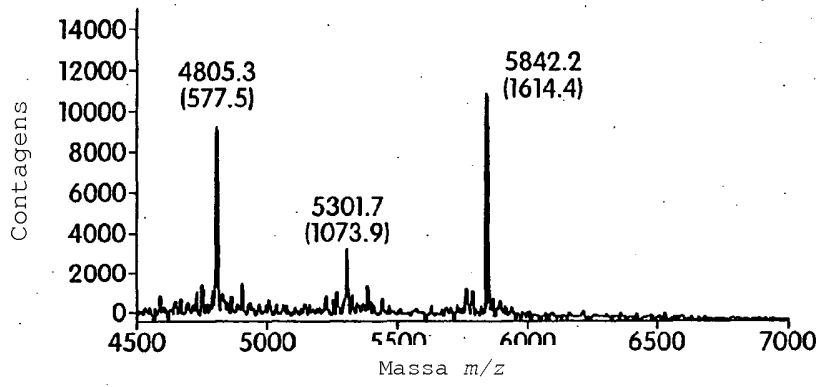


Fig. 2B

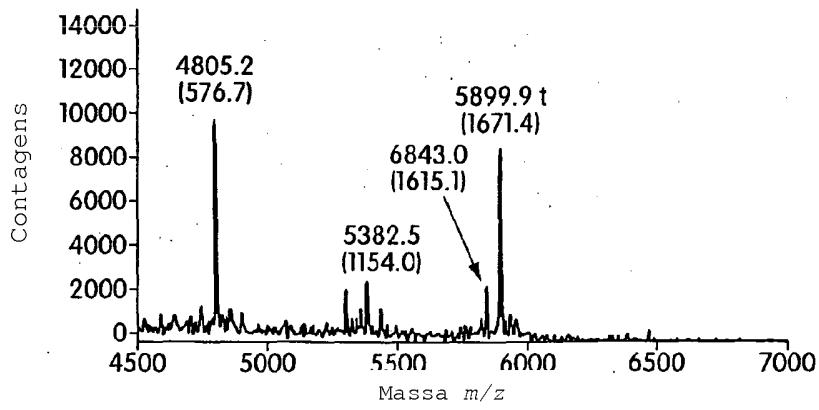


Fig. 2C

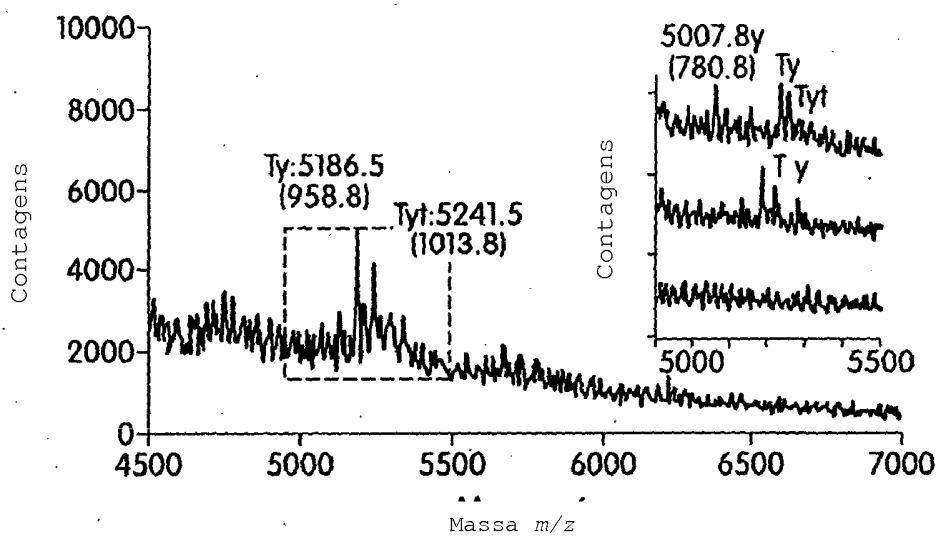


Fig. 3

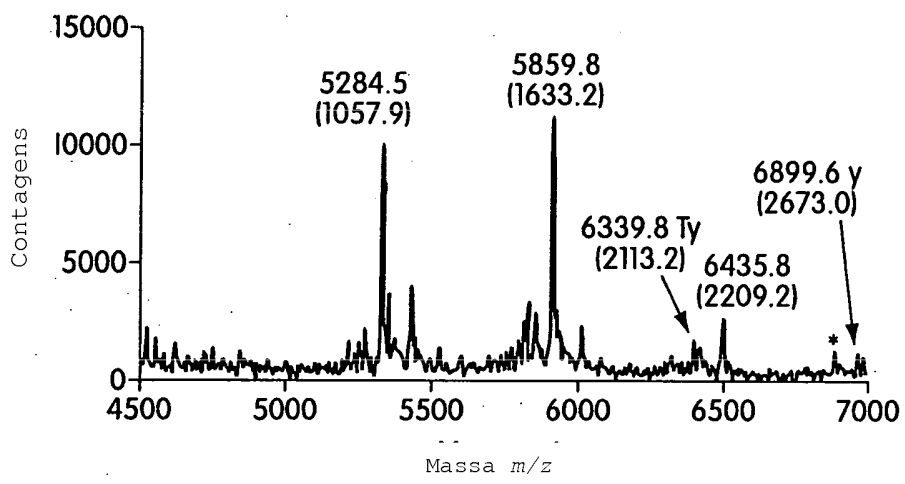


Fig. 4

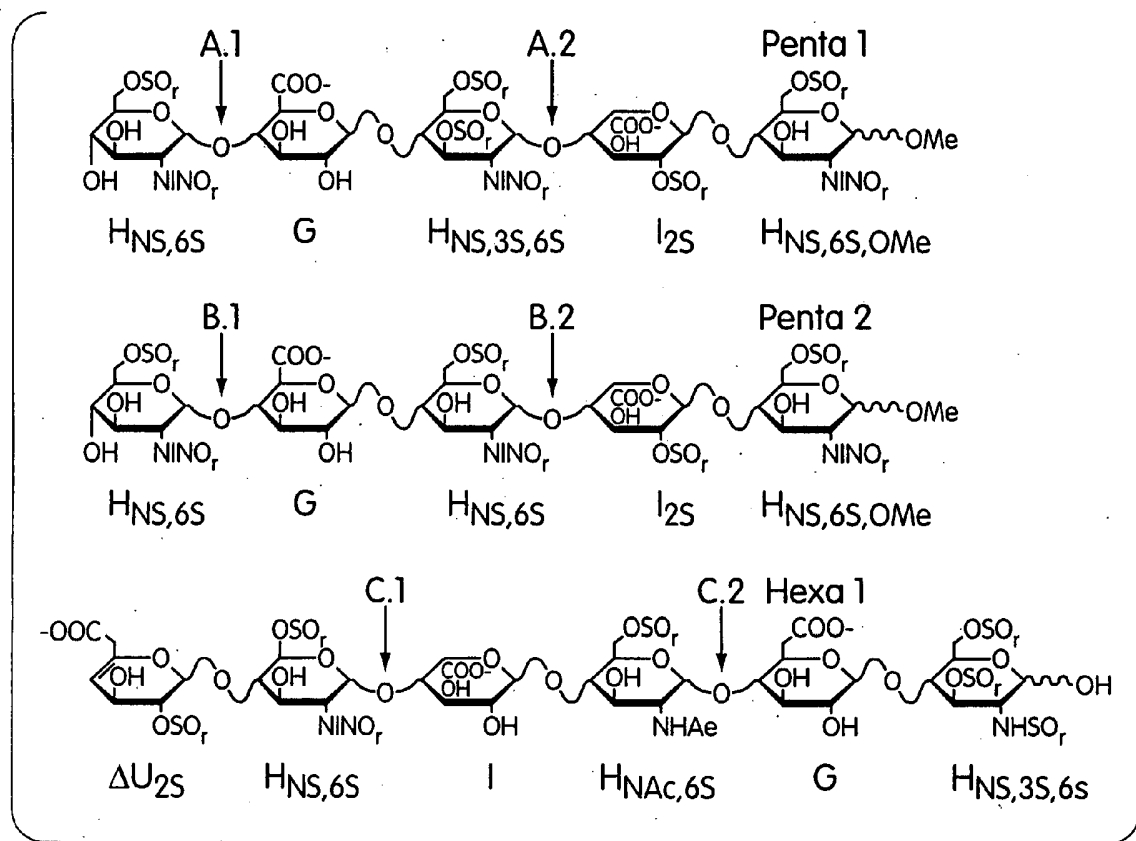


Fig. 5

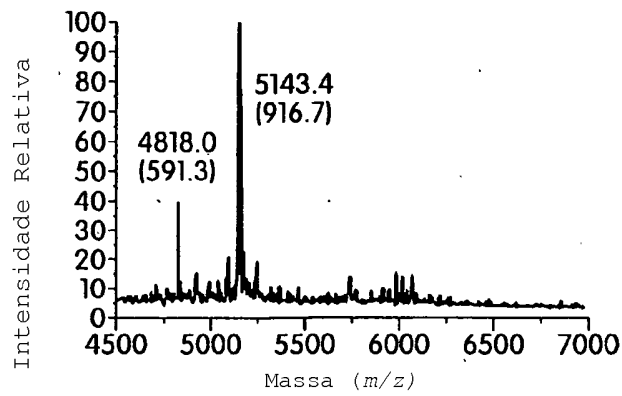


Fig. 6A

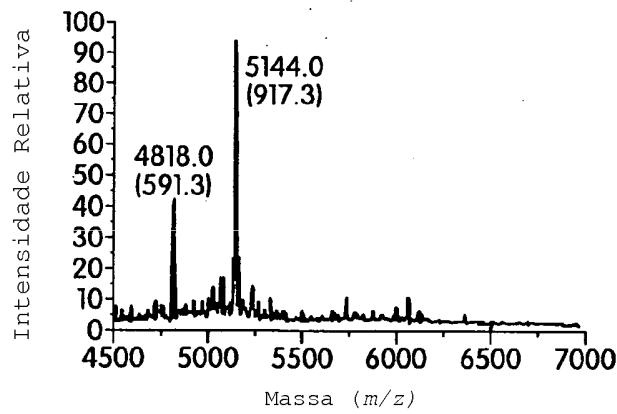


Fig. 6B

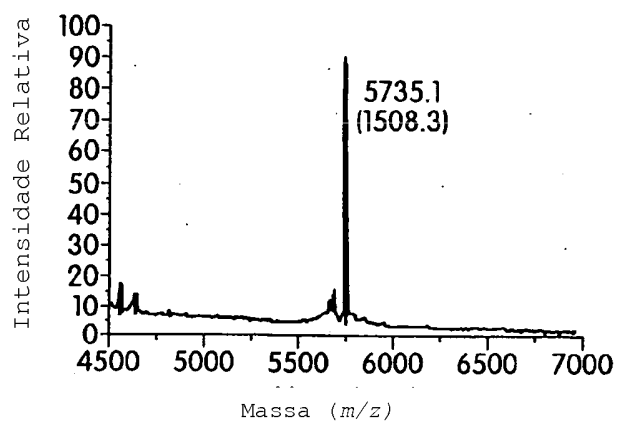


Fig. 6C

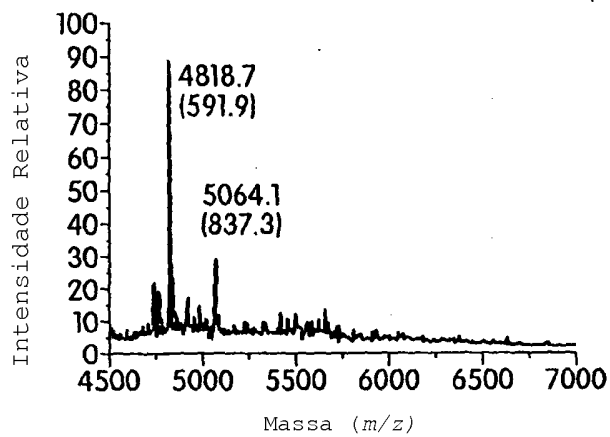


Fig. 7A

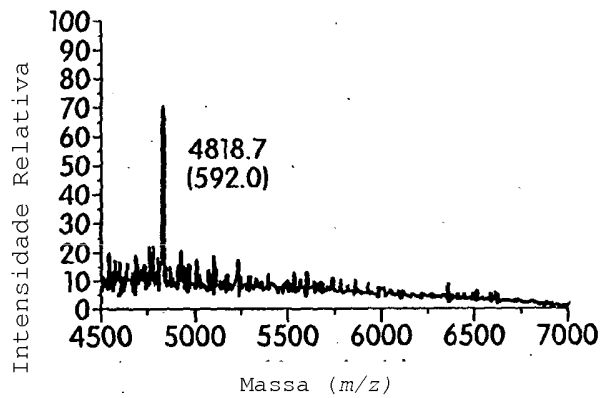


Fig. 7B

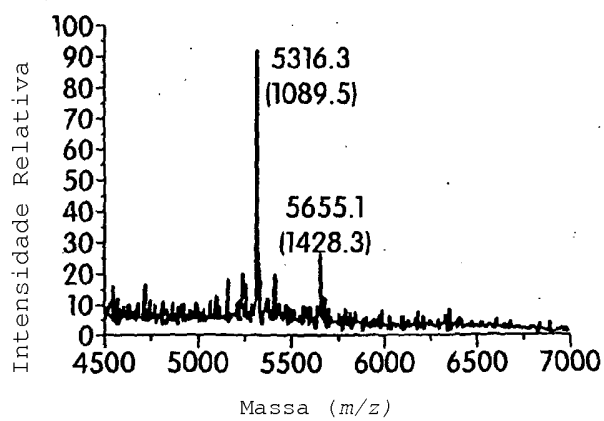


Fig. 7C

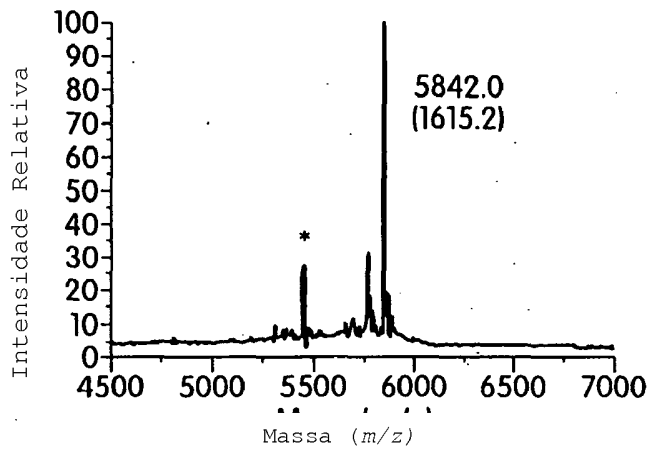


Fig. 8A

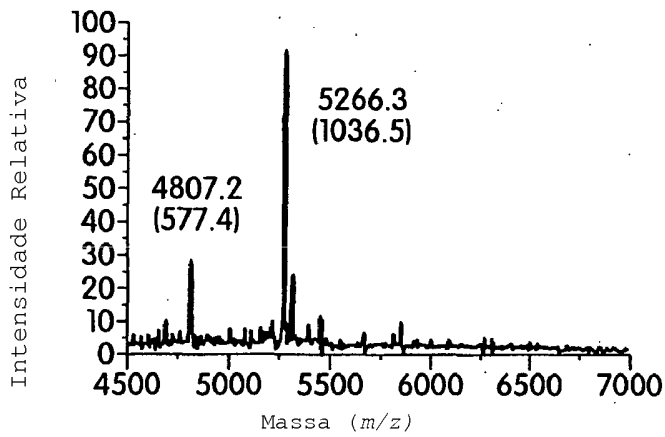


Fig. 8B

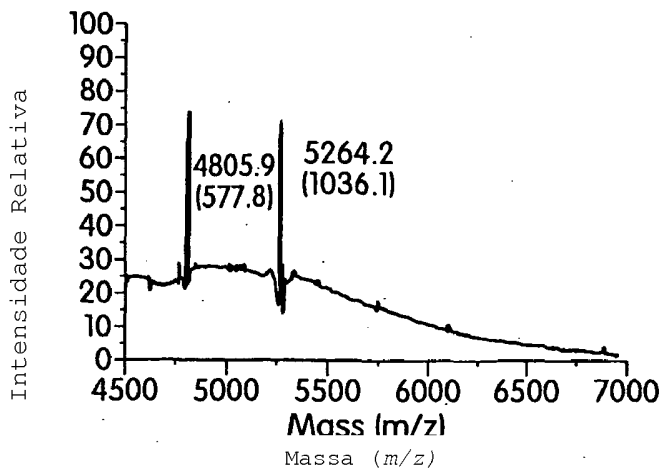


Fig. 8C

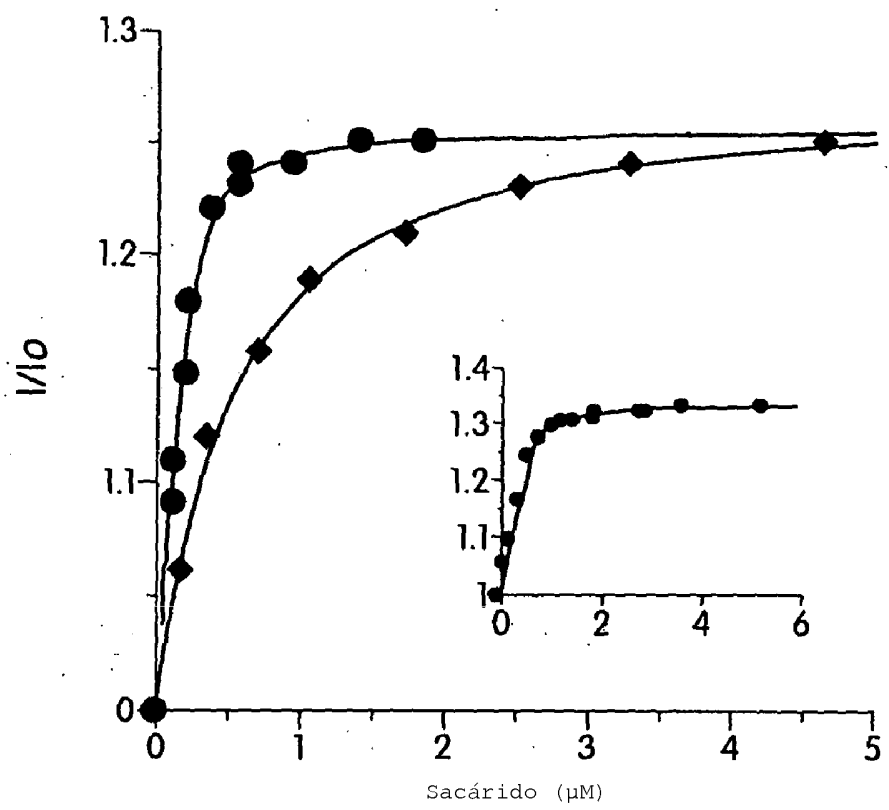


Fig. 9

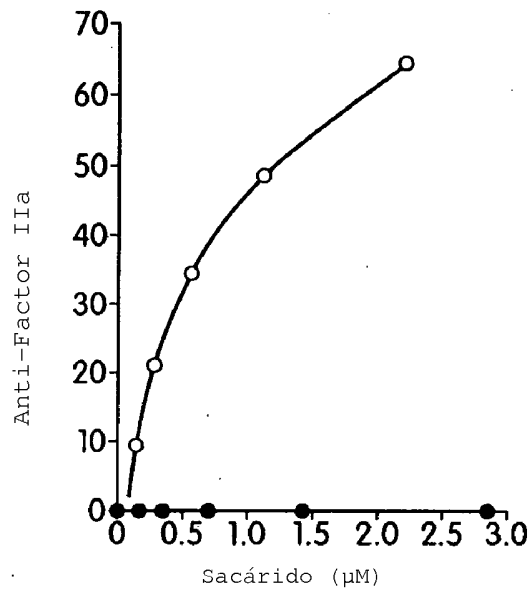


Fig. 10A

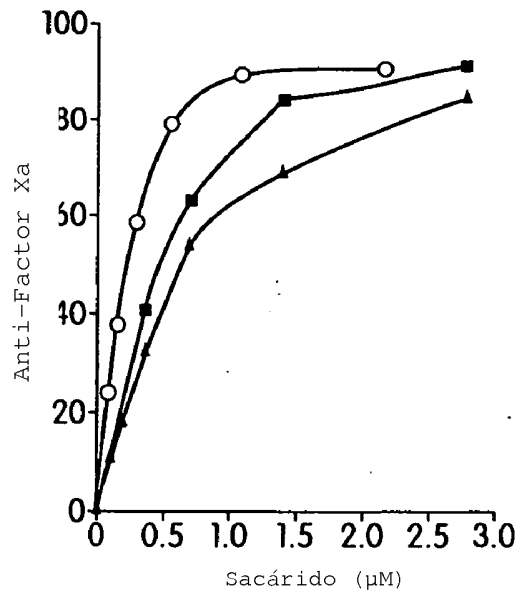


Fig. 10B

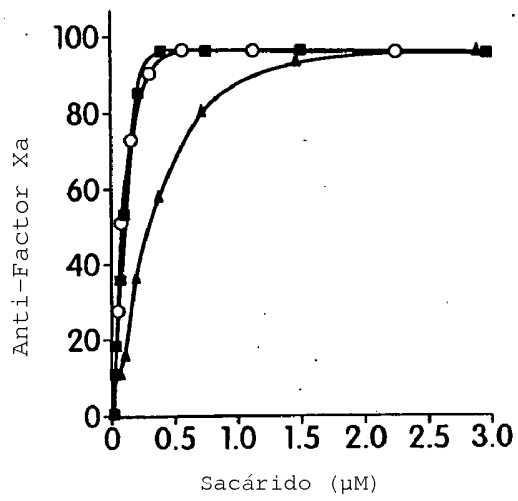


Fig. 10C

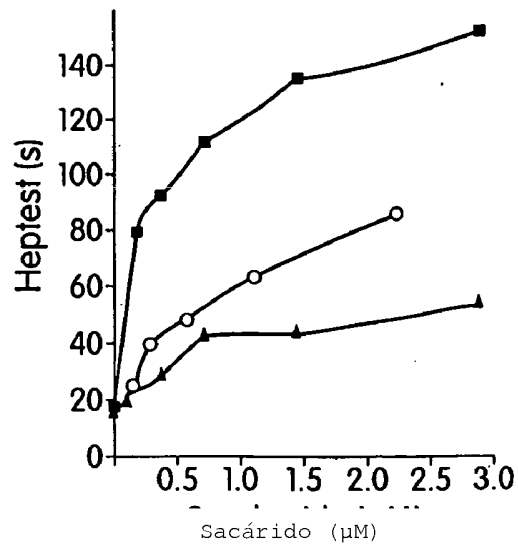


Fig. 10D

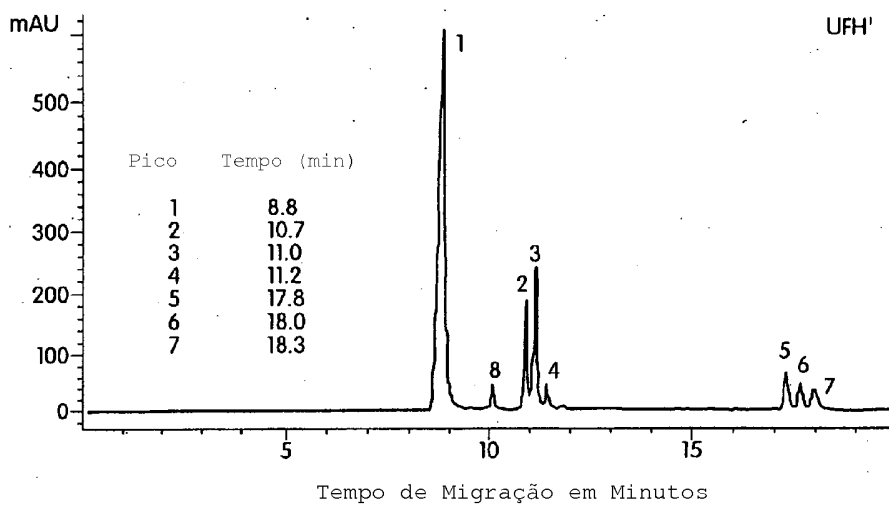


Fig. 11A

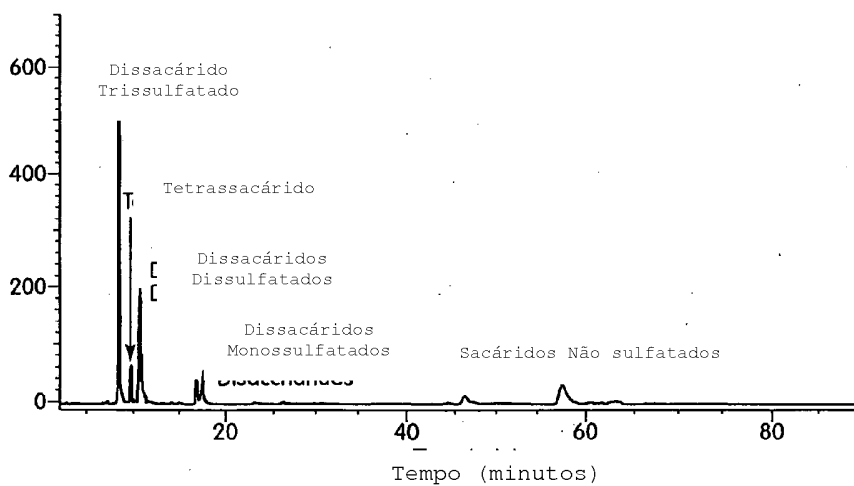
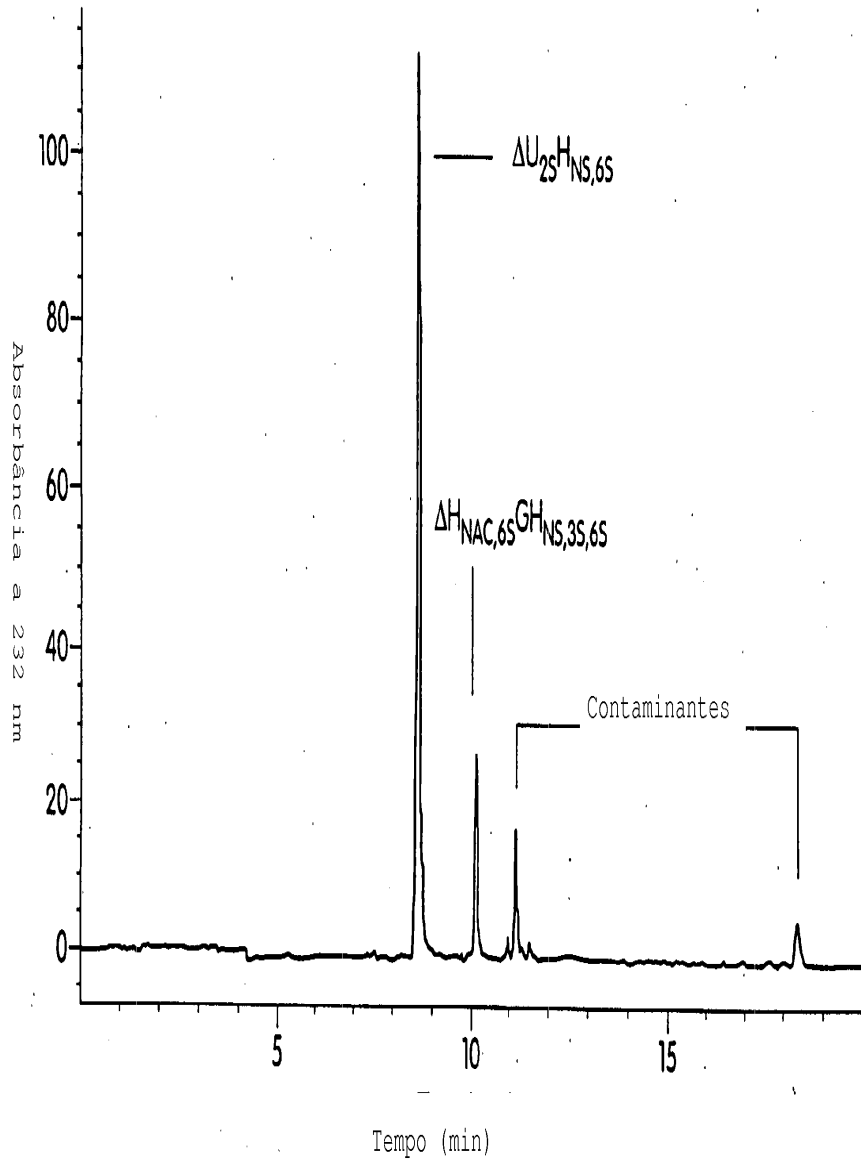


Fig. 11B



Tempo (min)
Fig. 12

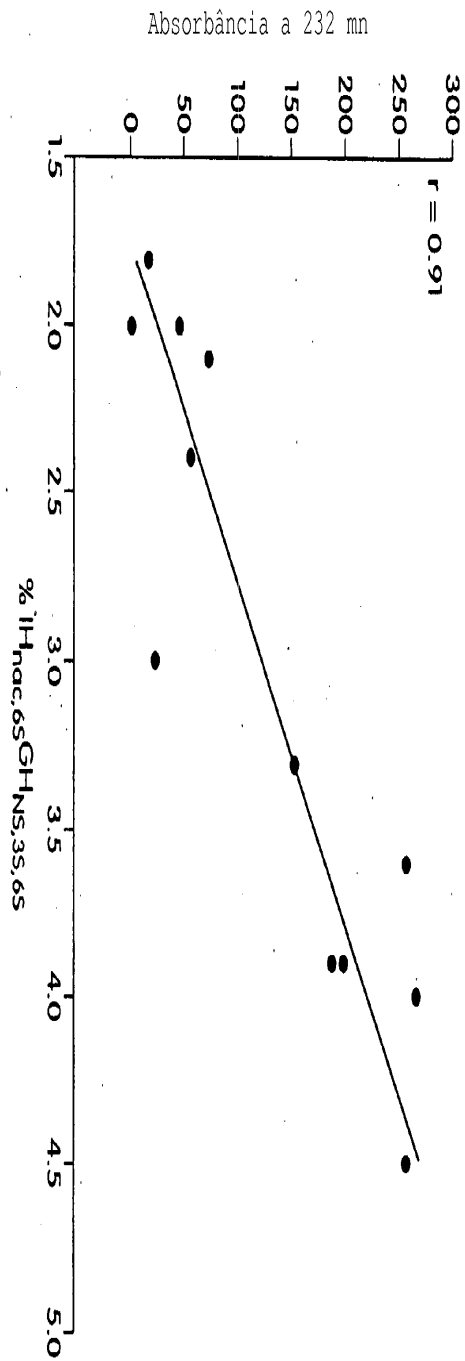


Fig. 13



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Elend, Almut Susanne
Venner Shipley LLP
Byron House
Cambridge Business Park
Cowley Road
Cambridge CB4 0WZ
GRANDE BRETAGNE

**For any questions about
this communication:**
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
26.02.09

Reference TSJ/43479EP1	Application No./Patent No. 01972994.6 - 2404 / 1319183
Applicant/Proprietor MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY	

Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 01972994.6 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 08.02.08 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

The request for amendments received at the EPO on 02.10.08 and any subsequent modifications agreed with the applicant have been taken into account.

Patent No. : 1319183
Date of filing : 12.09.01
Priority claimed : 12.09.00/USP 231994

Designated Contracting States
and Proprietor(s) : AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139/US

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 09/13 of 25.03.09.

Examining Division

Moreno De Vega C

Gonçalves Mauger M

Weijland A

