

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006833.8

[51] Int. Cl.

*C07H 3/04 (2006.01)*

*C07H 3/06 (2006.01)*

*C07H 5/04 (2006.01)*

*C07H 11/00 (2006.01)*

*A61K 31/7016 (2006.01)*

*A61K 31/702 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 6 月 27 日

[11] 公开号 CN 1989146A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 9/00 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

*A61P 35/04 (2006.01)*

*A61P 29/00 (2006.01)*

*A61P 31/00 (2006.01)*

*A61P 7/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2005.3.4

[21] 申请号 200580006833.8

[30] 优先权

[32] 2004.3.4 [33] AU [31] 2004901103

[86] 国际申请 PCT/AU2005/000314 2005.3.4

[87] 国际公布 WO2005/085264 英 2005.9.15

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.4

[71] 申请人 普罗吉恩工业有限公司

地址 澳大利亚昆士兰

[72] 发明人 V·费尔罗 J·K·法尔威瑟

T·卡洛丽 刘立功

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 唐晓峰

权利要求书 3 页 说明书 48 页 附图 1 页

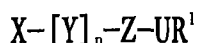
[54] 发明名称

硫酸化寡聚糖衍生物

[57] 摘要

本发明涉及多元硫酸化寡聚糖衍生物化合物，其作为硫酸乙酰肝素 - 结合蛋白和类肝素酶的抑制剂具有活性；制备所述化合物的方法；包含所述化合物的组合物，以及所述化合物及其组合物用于对哺乳动物受试者进行抗血管生成、抗转移、抗炎、抗微生物、抗凝血和/或抗血栓形成的治疗、降低血液的甘油三酯水平以及抑制心血管疾病的用途。

## 1. 一种通式化合物:



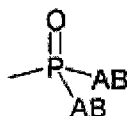
其中:

X、Y 和 Z 每个是单糖单元, 其具有通过单或多键与 X、Y 和 Z 的每个非连接的碳结合的基团 UR, 除具有通过单或多键结合的 UR<sup>1</sup> 的单糖 Z 的碳-1 之外;

n 是 0-6 的整数;

每个 U 独立地是 C、N、S 或 O 或者它们的高氧化态, 包括 CO、COO、NO、NO<sub>2</sub>、S(O)、S(O)<sub>2</sub>;

每个 R 独立地是 SO<sub>3</sub>M 或 H, 其中 M 是任何药学上可接受的阳离子或者是任何烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG、PEG 衍生物、H 或基团

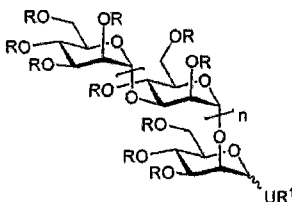


其中独立地在每个 AB 基团中, A 是 O 或 NH, 并且 B 是 H 或 M, 其中 M 是如上所定义的, 或烷基、芳基或任何其它合适的基团;

R<sup>1</sup> 是 SO<sub>3</sub>M、H、烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG 或 PEG 衍生物, 或者 R<sup>1</sup> 与 U 一起是 N<sub>3</sub> 或取代的三唑或衍生物, 或者取代的四唑或衍生物, 或者取代的芳基或衍生物, 或者取代的杂芳基或衍生物;

条件是当所有的 UR<sup>1</sup> 和 UR 基团是 OSO<sub>3</sub>M 或 OH (除所述单糖 X 的环外亚甲基基团以外) 时, 所述单糖 X 的环外亚甲基基团不能是 OP(O)<sub>2</sub>M<sub>2</sub> 基团。

## 2. 一种通式化合物:

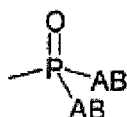


其中:

n 是 0-6 的整数;

U 是 C、N、S 或 O 或者它们的高氧化态, 包括 CO、COO、NO、NO<sub>2</sub>、S(O)、S(O)O;

每个 R 独立地是 SO<sub>n</sub>M 或 H, 其中 M 是任何药学上可接受的阳离子或者是任何烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG、PEG 衍生物、H 或基团



其中独立地在每个 AB 基团中, A 是 O 或 NH, 并且 B 是 H 或 M, 其中 M 是如上所定义的, 或烷基、芳基或任何其它合适的基团;

R<sup>1</sup> 是 SO<sub>n</sub>M、H、烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG 或 PEG 衍生物, 或者 R<sup>1</sup> 与 U 一起是 N<sub>3</sub> 或取代的三唑或衍生物, 或者取代的四唑或衍生物, 或者取代的芳基或衍生物, 或者取代的杂芳基或衍生物;

条件是当 R<sup>1</sup> 和所有的 R 基团是 SO<sub>n</sub>M 或 OH (除所述非还原 D-甘露糖的 C-6 上的 R 基团以外) 时, 所述非还原 D-甘露糖的 C-6 上的 R 基团不能是 PO<sub>n</sub>M<sub>2</sub> 基团。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物, 其中 M 是钠。
4. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物, 其中 n 是 3。
5. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物, 其中 R<sup>1</sup> 是正辛基。
6. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物, 其中至少 50% 的 R 基团含有 SO<sub>n</sub>M。
7. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物, 其中 70 至 100% 的 R 基团含有 SO<sub>n</sub>M。
8. 根据权利要求 1 的化合物, 其中所述化合物是如以上所描述的 PG500、PG501、PG502、PG503、PG504、PG506、PG507、PG508、PG509、PG510、PG511、PG512、PG513、PG514。

9. 一种用于预防或治疗哺乳动物受试者的由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的药物或兽药组合物, 所述组合物包含至少一种根据权利要求 1 或权利要求 2 的化合物以及用于所述至少一种化合物的药学或兽医学上可接受的载体或稀释剂。

10. 根据权利要求 9 所述的组合物, 其进一步包含药学或兽医学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、等渗化试剂、防腐剂或抗氧化剂。

11. 根据权利要求所述 9 的组合物, 其中所述化合物以酯、游离酸或碱、水合物或前药的形式存在。

12. 根据权利要求 1 或权利要求 2 的化合物在制备用于预防或治疗哺乳动物受试者的由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的药物中的应用。

13. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述哺乳动物受试者是人类受试者。

14. 一种用于预防或治疗哺乳动物受试者的由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的方法, 所述方法包括向所述受试者以有效量的至少一种根据权利要求 1 或权利要求 2 的化合物或包含所述至少一种化合物的组合物给药。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所述哺乳动物受试者是人类受试者。

16. 根据权利要求 14 的方法, 其中由血管生成产生的所述病症是增生性视网膜病或由实体瘤生长的血管生成。

17. 根据权利要求 14 的方法, 其中由炎症产生的所述病症是类风湿性关节炎、多发性硬化、炎症性肠病、同种异体移植排斥或慢性哮喘。

18. 根据权利要求 14 的方法, 其中由凝血和/或血栓产生的所述病症是深度静脉血栓形成、肺栓塞、血栓性中风、外周动脉血栓形成、不稳定性心绞痛或心肌梗塞。

19. 一种用于制备根据权利要求 1 的化合物的方法, 所述方法包括:

- i) 活化被保护的寡聚糖以及将所述被活化的寡聚糖与供体化合物缩合;
- ii) 将从步骤 (i) 得到的所述糖甙脱保护; 以及
- iii) 任选地衍生化所述的脱保护的糖甙。

20. 根据权利要求 19 的方法, 其中步骤 (i) 中的所述的活化是通过路易斯酸。

21. 权利要求 19 的方法, 其中所述寡聚糖的非还原的碳是磷酸化的。

## 硫酸化寡聚糖衍生物

### 技术领域

本发明在此的描述涉及具有作为硫酸乙酰肝素-结合蛋白和类肝素酶的抑制剂活性的化合物。具体地,本发明涉及硫酸化寡聚糖衍生物,尽管本发明的范围不是必然地被限制于此。具体地,本发明涉及多元硫酸化寡聚糖衍生物,所述衍生物优选在单糖单元还原端的 C-1 上和/或非还原端的 C-6 上。本发明还涉及制备所述化合物的方法,包含所述化合物的组合物,以及所述化合物及其组合物对哺乳动物受试者进行抗血管生成、抗转移、抗炎、抗微生物、抗凝血和/或抗血栓形成的治疗的用途。所述化合物及其组合物还具有在哺乳动物受试者中降低血液甘油三酯水平以及抑制心血管疾病的作用。当将其对哺乳动物受试者进行给药时,所述化合物还对预防上述病症具有作用。

### 背景技术

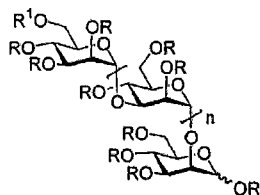
已知的硫酸化寡聚糖试剂 PI-88 [1, 2] (参见下面的化合物 1) 已经被证明是有价值的肿瘤生长和转移抑制剂 [1, 3] 并且正在癌症病人中进行 II 期临床试验 [4]。PI-88 通过抑制血管生成生长因子(具体地是 FGF-1、FGF-2 和 VEGF)以及它们的受体与硫酸乙酰肝素的相互作用来发挥抗血管生成作用 [1, 5]。另外, PI-88 是一种类肝素酶的有效抑制剂,该酶是一种分解蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素侧链的糖苷酶,该蛋白聚糖是肿瘤细胞周围的细胞外基质 (ECM) 和基底膜的主要成分 [1, 2]。已经将类肝素酶与血管紧密地联系起来:它能够从所述 ECM 中释放活性硫酸乙酰肝素-结合的血管生成生长因子并且与所述 ECM 的降解以及随后的与新血管的生长相联系的组织重塑有关 [6]。所述的通过类肝素酶的 ECM 的降解在所述肿瘤细胞的扩散(转移)中也是决定性的,该肿瘤细胞的扩散(转移)是通过允许它们进入血流并且固定在远处的,在那里它们能够形成次生瘤 [6, 7]。

除它的抗血管生成作用之外, PI-88 通过以下来抑制凝血系统: (i) 抑制在固有途径中的蛋白酶, (ii) 刺激组织因子途径抑制物 (TFPI) 的释放, 以及 (iii) 活化肝素辅因子 II-介导的凝血酶的抑制。然而, PI-88 不与 AT III 相互作用并且因此显示无抗-Xa 或 AT III-介导的抗-IIa 的活性 [8, 9]。在猴子的体内研

究中表明低剂量的PI-88促进完全硫酸乙酰肝素结合的TFPI从血管细胞壁释放[9]。除了其在凝血方面的影响,TFPI最近被证明是一种抗血管生成剂[10]和转移抑制剂[11]。PI-88还显示出阻滞血管平滑肌细胞增殖以及内膜增厚[12],抑制细胞的单纯疱疹病毒(HSV)感染以及HSV-1及HSV-2的细胞向细胞的传播[13],以及抑制在被动埃曼肾炎(passive Heymann nephritis)中的蛋白尿征[14]。

PI-88是一种高度硫酸化、大小范围为二-至己糖的单磷酸化甘露糖寡聚糖的混合物[15,16]。通过完全磺化[2,16]所述寡聚糖磷酸盐部分(2)(参见在本段之后的式I)制得PI-88,该寡聚糖磷酸盐部分(2)是通过温和的、酸催化水解所述酵母 *Pichia (Hansenula) holstii* NRRL Y-2448的细胞外磷酸甘露聚糖获得的[17,18]。所述主要组分分别地是五-和四糖磷酸盐3(~60%)以及4(~30%),同时剩余的10%是由二-、三-和己糖磷酸盐(5-7)以及四糖基胺(tetrasaccharylamine,未示出)组成的[15,16]。

式 I



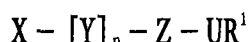
|    | n   | R                       | R¹                              |
|----|-----|-------------------------|---------------------------------|
| 1  | 0-4 | SO <sub>3</sub> Na or H | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 2  | 0-4 | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 3  | 3   | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 4  | 2   | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 5  | 0   | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 6  | 1   | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 7  | 4   | H                       | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 8  | 0   | H                       | H                               |
| 9  | 1   | H                       | H                               |
| 10 | 2   | H                       | H                               |
| 11 | 3   | H                       | H                               |

各种其它多元硫酸化的低聚-及多聚糖以及它们的衍生物被熟知为显示出与PI-88类似的生物活性类型[19-25]。这些生物活性被归因于抑制各种硫酸乙酰肝素(HS)-结合蛋白。本发明的目的是产生PI-88的衍生物,其具有类似的生物活性但具有改善的性质,例如,在它们的药代动力学和/或ADME(吸收、分配、

代谢、排泄)的方面中。本发明更进一步的目的是提供含有单一碳骨骼的化合物从而促进它们的合成和表征。

### 发明概述

根据本发明的第一个实施方案,提供一种通式化合物:



II

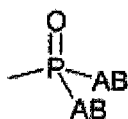
其中;

X、Y和Z每个是单糖单元,其具有通过单或多键与X、Y和Z的每个非连接碳结合的基团UR,除具有通过单或多键结合的UR<sup>1</sup>的单糖Z的碳-1之外;

n是0-6的整数;

每个U独立地是C、N、S或O或者它们的高氧化态,包括CO、COO、NO、NO<sub>2</sub>、S(O)、S(O)<sub>2</sub>;

每个R独立地是SO<sub>3</sub>M或H,其中M是任何药学上可接受的阳离子或者是任何烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG、PEG衍生物、H或基团



其中独立地在每个AB基团中,A是O或NH,并且B是H或M,其中M是如上所述的,或烷基、芳基或任何其它合适的基团;

R<sup>1</sup>是SO<sub>3</sub>M、H、烷基、芳基、酰基、芳酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、PEG或PEG衍生物,或者R<sup>1</sup>与U一起是N<sub>3</sub>或取代的三唑或衍生物,或者取代的四唑或衍生物,或者取代的芳基或衍生物,或者取代的杂芳基或衍生物;

条件是当所有UR<sup>1</sup>和UR基团是OSO<sub>3</sub>M或OH(除所述单糖X的环外亚甲基基团以外)时,所述单糖X的环外亚甲基基团不能是OPOM<sub>2</sub>基团。

根据本发明的第二个实施方案,提供一种用于在哺乳动物受试者中预防或

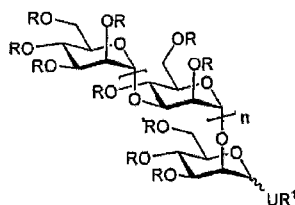
治疗由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的药物或兽药组合物，该组合物包含至少一种根据第一个实施方案的化合物以及用于所述至少一种化合物的药学或兽药上可接受的载体或稀释剂。

本发明的第三个实施方案包括根据第一个实施方案的化合物在制备用于在哺乳动物受试者中预防或治疗由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的药物中的应用。

根据本发明的第四个实施方案，提供一种用于在哺乳动物受试者中预防或治疗由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症的方法，该方法包括将有效量的至少一种根据第一个实施方案的化合物或者包含所述的至少一种化合物的组合物向所述的受试者给药。

本发明更进一步的实施方案包括在制备第一个实施方案的硫酸化寡聚糖中的新的中间体以及合成路径。

根据本发明优选的化合物，其中所述单糖分子是专用的 D-甘露糖以及所述糖苷键是  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) 和  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)，其被描述在以下的结构中：



其中 R、R<sup>1</sup>、U 和 n 如上所述。

为了使得本发明可以被更容易地理解和实施，现将描述其的一个或多个优选实施方案，仅以例子的方式，参照附图。

#### 附图简述

图 1 显示了 PI-88 类似化合物对于 HSV-1 感染性 (A) 和 HSV-1 细胞-向-细胞传播 (B) 的作用。在板 A 中，所述结果被表示为在被所述化合物处理的病毒体感染的细胞中形成的病毒噬斑形成单位 (PFU) 数量相对于伪-处理对照的百分数。在板 B 中，所述结果被表示为在所述化合物连续存在的条件下形成的 20 病毒噬斑的平均面积相对于伪-处理对照细胞的百分数。

#### 优选实施方案的详细描述

本发明人已经发现能够使用如下所广泛描述的以及在所述实施例中举例说明的许多不同策略来合成许多硫酸化寡聚糖衍生物。这些化合物在预防或治疗哺乳动物受试者由血管生成、转移、炎症、凝血、血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染和/或心血管疾病产生的病症中具有作用。该作用是由所述化合物阻滞硫酸乙酰肝素-结合蛋白与它们的受体结合的能力，或者抑制所述类肝素酶的活性的能力所产生。

关于式 II 的主题化合物，所述单糖单元 X、Y 和 Z 可以是，例如，任何己糖或戊糖以及可以是 D 或 L 异构体。这样的己糖包括葡萄糖、甘露糖、阿卓糖、阿洛糖、塔罗糖、半乳糖、艾杜糖以及古罗糖。这样的戊糖包括核糖、阿拉伯糖、木糖以及来苏糖。所述单糖单元的糖苷键按照结构和连接可以是唯一的一种类型的或不同类型的。

所述药学上可接受的阳离子 M 优选钠。

关于整数 n，优选值是 3，从而提供五糖化合物。

优选的合适的 R<sup>1</sup> 基团是正辛基。

所述的端基异构构型，其中所适用的，在式 II 化合物的 UR<sup>1</sup> 可以是  $\alpha$  或  $\beta$  或端基异构  $\alpha/\beta$  混合物。

关于在上面给出的式 II 化合物的定义中的所述取代基，术语“烷基”，当其被单独或在复合词例如“芳基烷基”中使用，是指直链、支链或环烷基团，优选 C<sub>1-20</sub>，例如 C<sub>1-10</sub>。例如，术语“C<sub>1-6</sub> 烷基”是指 1 至 6 个碳原子的直链、支链或环烷基。“C<sub>1-6</sub> 烷基”的例子包括甲基、乙基、异丙基、正丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、2,2-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、3-甲基戊基和 2,3-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、3-甲基戊基和 2,3-二甲基丙基。环 C<sub>1-6</sub> 烷基的例子包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。烷基的其它例子包括：庚基、5-甲基己基、1-甲基己基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、4,4-二甲基戊基、1,2-二甲基戊基、1,3-二甲基戊基、1,4-二甲基戊基、1,2,3-三甲基丁基、1,1,2-三甲基丁基、1,1,3-三甲基丁基、辛基、6-甲基庚基、1-甲基庚基、1,1,3,3-四甲基丁基、壬基、1-、2-、3-、4-、5-、6-或 7-甲基辛基、1-、2-、3-、4-或 5-乙基庚基、1-、2-或 3-丙基己基、癸基、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-和 8-甲基壬基、1-、2-、3-、4-、5-或 6-乙基辛基、1-、2-、3-或 4-丙基庚基、十一烷基、1-

2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-或9-甲基癸基、1-、2-、3-、4-、5-、6-或7-乙基壬基、1-、2-、3-、4-或5-丙基辛基、1-、2-或3-丁基庚基、1-戊基己基、十二烷基、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-或10-甲基十一烷基、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-或8-乙基癸基、1-、2-、3-、4-、5-或6-丙基壬基、1-、2-、3-或4-丁基辛基、1-2-戊基庚基等。烷基可以任选地被一或多个如在此所定义的任意取代基取代。任选地，所述直链的、支链的或环状烃基团(具有至少2个碳原子)可包含一个、两个或更多不饱和度从而形成烯基或炔基基团，优选 $C_{2-20}$ 烯基，更优选 $C_{2-6}$ 烯基，或者 $C_{2-20}$ 炔基，更优选 $C_{2-6}$ 炔基。其中的例子包括包含一个或两个或更多个双键，或者一个或两个或更多个三键的烃残基。因此，“烷基”被认为包括烯基和炔基。

术语“芳基”，当单独或在复合词例如“芳基烷基”中使用时，表示芳烃或芳香族杂环(杂芳基)环状系统的单一的、多核的、共轭的或稠合的残基，其中环烃残基的一个或多个碳原子被杂原子取代从而提供芳香族残基。在两个或更多个碳原子被替换的情况下，这可以是两个或多个同样的杂原子或被不同的杂原子替换。合适的杂原子包括O、N、S和Se。

“芳基”的例子包括苯基、联苯基、联三苯基、四联苯基、萘基、四氢萘基、蒽基、二氢蒽基、苯并蒽基、二苯并蒽基、菲基、芴基、芘基、茚基、䓬基、屈基、吡啶基、4-苯基吡啶基、3-苯基吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、嘌呤基、喹唑啉基、吩嗪基、吡嗪基、苯并噻唑基、苯并噻唑基等。优选的烃芳基基团包括苯基和萘基。优选的杂环芳基基团包括吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基。芳基基团可以被一或多个如在此所定义的任意取代基任选地取代。

术语“酰基”是指基团 $-C(O)-R$ ，其中R是烷基或芳基基团。酰基的例子包括直链或支链烷酰基例如乙酰基、丙酰基、丁酰基、2-甲基丙酰基、戊酰基、2,2-二甲基丙酰基、己酰基、庚酰基、辛酰基、壬酰基、癸酰基、十一烷酰基、十二烷酰基、十三烷酰基、十四烷酰基、十五烷酰基、十六烷酰基、十七烷酰基、十八烷酰基、十九烷酰基和二十烷酰基；环烷基羰基，例如环丙基羰基、环丁基羰基、环戊基羰基和环己基羰基；芳酰基例如苯甲酰基、甲苯酰基和萘甲酰基；芳烷酰基例如苯基烷酰基(例如，苯基乙酰基、苯基丙酰基、苯基丁酰基、

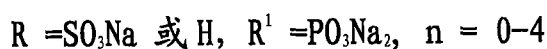
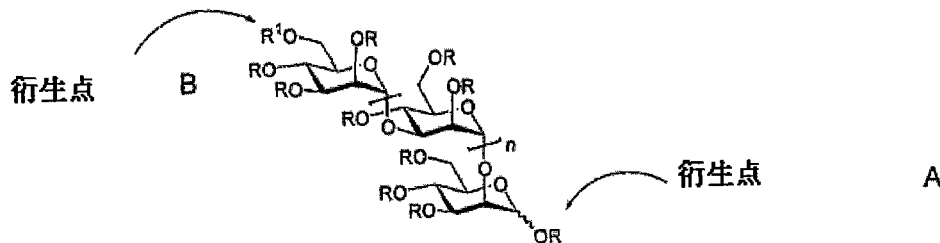
基、苯基异丁酰基、苯基戊酰基和苯基己酰基)和萘基烷酰基(例如,萘基乙酰基、萘基丙酰基和萘基丁酰基)。既然所述R基团可以如上所述任选被取代,“酰基”被认为是指任选取代的酰基。

对于烷基、芳基或酰基的任意取代基包括卤素(溴、氟、氯、碘)、羟基、 $C_{1-6}$ 烷基(例如,甲基、乙基、丙基(正-和异-异构体))、 $C_{1-6}$ 烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基(正-和异-异构体)、丁氧基(正-、仲-和叔-异构体)、硝基、氨基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基(例如,甲基氨基、乙基氨基、丙基(正-和异-异构体)氨基)、 $C_{1-6}$ 二烷基氨基(例如,二甲基氨基、二乙基氨基、二异丙基氨基)、卤代甲基(例如,三氟甲基、三溴甲基、三氯甲基)、卤代甲氧基(例如,三氟甲氧基、三溴甲氧基、三氯甲氧基)和乙酰基。

5-6元杂环基基团包括如上所述的芳香族5-6元杂环基团(杂芳基)以及包含一个或多个独立地选自O、N、S和Se的杂原子(优选1或2个)的非芳香族5-6元杂环基团。其中的例子包括二氧六环基、吡喃基、四氢呋喃基、哌啶基、吗啉代、哌嗪基、硫代吗啉代以及糖。

根据本发明的化合物的硫酸化程度一般地是至少50%。即,寡聚糖衍生物的R基团的至少50%包含 $SO_3M$ 。硫酸化的程度一般地是70至100%以及优选至少高达90%。

可以通过逐步的合成路线或通过从已经在原位具有的PI-88骨架开始(使用容易得到的化合物8-11;参见以上的式I)以及向其进行所需要的修饰来制备式II的PI-88衍生物。发明人从对PI-88(1)及其前身(2)的结构考虑中确定,有两个优选的衍生化位置:所述还原端(A)以及在所述非还原端(B)上的末端6-位置,如以下的结构式所示。



应该注意的是可以通过相同的化学过程制备所有的二-、三-、四-和五糖(以

及更大的)衍生物。然而,优选所述五糖衍生物因为它们是最大生物活性的[1, 2, 5, 8, 13]。然后将所有制得的衍生物脱保护(一般地,以 NaOMe 脱乙酰基)以及用磺化试剂例如三氧化硫吡啶复合物或三氧化硫三甲胺复合物将得到的多羟基化合物磺化。

如上所指明的,根据本发明的化合物在预防或治疗哺乳动物受试者由血管生成、转移、炎症、凝血、血栓、升高的血液甘油三酯水平、微生物感染或心血管疾病产生的病症中具有作用。所述化合物在治疗人类的上述病症中具有特殊的作用。一般地,所述化合物被作为在以下段落中描述的药物组合物的组分给药。如将在下面举例说明的,所述化合物显示与 PI-88 本身类似的或更好的活性。

用于口服的药物组合物可以是片、胶囊、粉末或液体形式的。片剂可以包括固体载体例如胶质或辅助剂或惰性稀释剂。液体药物组合物一般包括液体载体例如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、或乙二醇类例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。这样的组合物以及制剂一般将包含至少 0.1wt%的所述化合物。

肠胃外给药包括通过以下路径给药:静脉内地、皮肤地或皮下地、鼻地、肌内地、眼内地、经上皮地、腹膜内地以及局部地。局部给药包括皮肤、眼、直肠、鼻的给药,以及通过吸入或通过气雾剂方式给药。对于静脉内的、皮肤的或皮下注射、或在需要治疗的位置注射,所述活性成分将是以无热原物并且具有适宜的 pH、等渗压性和稳定性的胃肠外可接受的水溶液的形式。本领域熟练技术人员将能够很好地制备合适的溶液来使用,例如,所述主题化合物或其衍生物的溶液。

除至少一种所述化合物和载体或稀释剂之外,根据本发明的组合物可以进一步地包括药学或兽药学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、等渗化试剂、防腐剂或抗氧化剂或任何其它本领域熟练技术人员已知的材料。熟练的技术人员将理解这样的材料应该是无毒的并且将不会干扰所述化合物的效力。任何添加剂的准确性质可以依赖于所述组合物的给药途径:即,是否所述组合物将是口服给药的或胃肠外给药的。关于缓冲剂,含水组合物一般地包括这样的物质从而使所述组合物保持在接近生理性 pH 或至少在大约 pH 5.0 至 8.0 的范围之内。

根据本发明的组合物还可以包括除至少一种所述化合物之外的活性成分。这样的成分将主要地根据它们的效力来选择作为抗血管生成、抗转移、抗炎、抗凝血、抗微生物以及抗血栓形成试剂，以及对抗升高的血液甘油三酯水平和心血管疾病有效的试剂，但可以根据任何相关的条件来选择它们的效力。

根据本发明的药物或兽药组合物将以所考虑的具体情况必需的预防有效量或治疗有效量向给受试者给药。以组合物方式被给药的至少一种化合物的实际量，以及给药的频率和次数-疗程，将依赖于被治疗的情况的性质和严重性或所要求的预防。治疗的处方例如对剂量的确定等将在负责照料受试者的开业医师或兽医的技能的范围之内。然而一般地，对于向人类受试者给药的组合物将包括大约每 kg 体重 0.01 至 100mg 的所述化合物以及更优选大约 0.1 至 10mg/kg 体重。

所述化合物可以作为药学或兽药学上可接受的衍生物被包括在组合物中。如同在此使用的，所述化合物的“衍生物”包括盐、与金属离子例如  $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  的配位络合物、酯例如体内可水解酯、游离酸或碱、水合物或前药。具有酸性基团的化合物例如磷酸酯或硫酸酯可以与碱或碱土金属例如 Na、K、Mg 和 Ca，以及与有机胺例如三乙胺和三(2-羟乙基)胺形成盐。还可以在化合物与碱性基团，例如胺，与无机酸例如盐酸、磷酸或硫酸，或有机酸例如乙酸、柠檬酸、苯甲酸、富马酸或酒石酸之间形成盐。既具有酸性基团又具有碱性基团的化合物可以形成内盐。

可以使用本领域熟练技术人员熟知的技术，在存在于所述化合物中的羟基或羧酸基团与适当的羧酸或醇反应性配对之间形成酯。

本发明所述化合物的前药衍生物可以在体内或体外被转变为所述母体化合物。一般地，所述母体化合物的至少一种生物活性可以在所述化合物的前药形式中被抑制，以及可以通过将所述前药转化为所述母体化合物或其代谢物而将其活化。前药的例子是糖脂衍生物，其中的一个或多个脂质部分被提供作为在所述部分上的取代基，通过用具有磷脂酶活性的酶裂解来释放出所述化合物的游离形式。本发明的化合物的前药包括使用保护基，其可以在体内被除去从而释放所述的活性化合物或者用来抑制所述药物的清除。合适的保护基对本领域熟练技术人员是已知的并且包括乙酸酯基团。

还是如上所指明的，根据本发明的化合物在制备用于预防或治疗哺乳动物

受试者由血管生成、转移、炎症、凝血/血栓、微生物感染、升高的血液甘油三酯水平和/或心血管疾病产生的病症的药物中具有作用。用于制备这样的药物的方法对本领域熟练技术人员是已知的并且包括用于制备如上所述的药物组合物的方法。

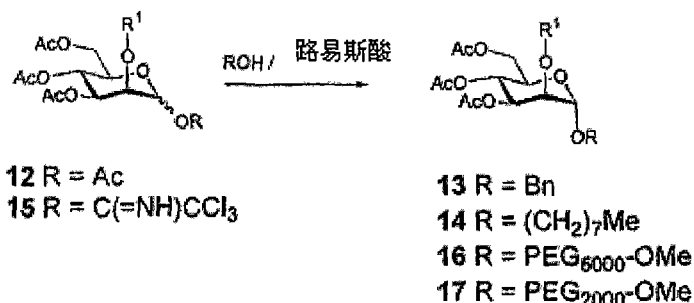
现将给出根据本发明的化合物的合成路线的一般性描述。为了简化，在随后的所有图表、图和表格中， $R^1$ 将表示 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-连接的 $\text{Man}_4$ 四糖部分(有或者没有末端6-*O*-磷酸基团)，除非另有说明。

### 一般方法

#### PI-88的糖苷衍生物(*O*-、*S*-和*C*-糖苷)

可以通过活化所述用于糖化的寡聚糖(有或者没有末端6-*O*-磷酸基团)以及用适当的醇将其缩合容易地制备糖苷衍生物。适宜的方法是全乙酰化糖，例如，12，与醇受体的路易斯酸催化的或促进的反应，例如，得到13和14。其中需要更惰性的受体，需要制备更具反应性的糖基供体，例如，所述三氯亚氨乙酸酯15被用于制备PEG化衍生物16和17(图表1)。

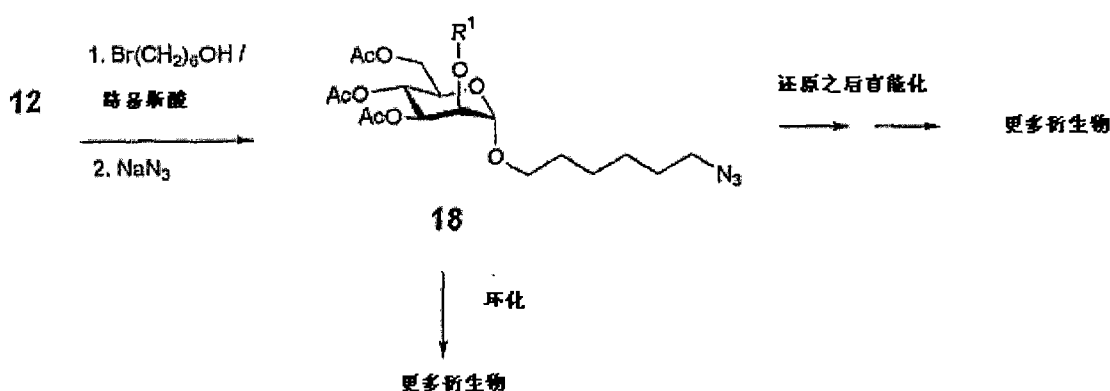
图表 1



在本领域中已知各种其它类型的供体并且适宜作为供体，例如，硫糖苷、卤化物、正戊烯基糖苷、硒代糖苷等。本领域熟练技术人员将认识到可以通过在文献中已知的类似或相关方法制备*S*-和*C*-糖苷，例如通过使用适当的硫醇(或硫醇衍生物)或者具有适宜活化的供体的已知的碳亲核物(例如，烯丙基三甲硅烷或适当的苯酚)。然后所述产物可以容易地被脱乙酰基以及磺化。所述糖化的产物可以是单一端基异构体( $\alpha$ 或 $\beta$ )或者两个端基异构体的混合物。所述纯的 $\alpha$ 和 $\beta$ 端基异构体以及端基异构体混合物都适合于随后的转化。这还应用于

通过在随后的部分所描述的端基异构中心的操作来获得其它衍生物。因此,在表示单一端基异构体的情况下,这表示相反的端基异构体或两种端基异构体的混合物也被要求。所述初始形成的糖苷,依赖于所述糖苷配基的性质,可以被进一步地衍生化,这对本领域熟练技术人员而言还是清楚的。作为一个例子,如果有人使用 2-溴代己醇作为所述醇,所述产物可以被转变为叠氮化物(18)。这是一种极端易变的化合物(图表 2)并且可以进一步地通过,例如,与包含适宜的亲偶极的化合物环加成被官能化。可选择地,所述叠氮化物可以被还原为胺以及然后进一步地被官能化,例如,通过烷基化、酰化、4-组分 Ugi 缩合等。

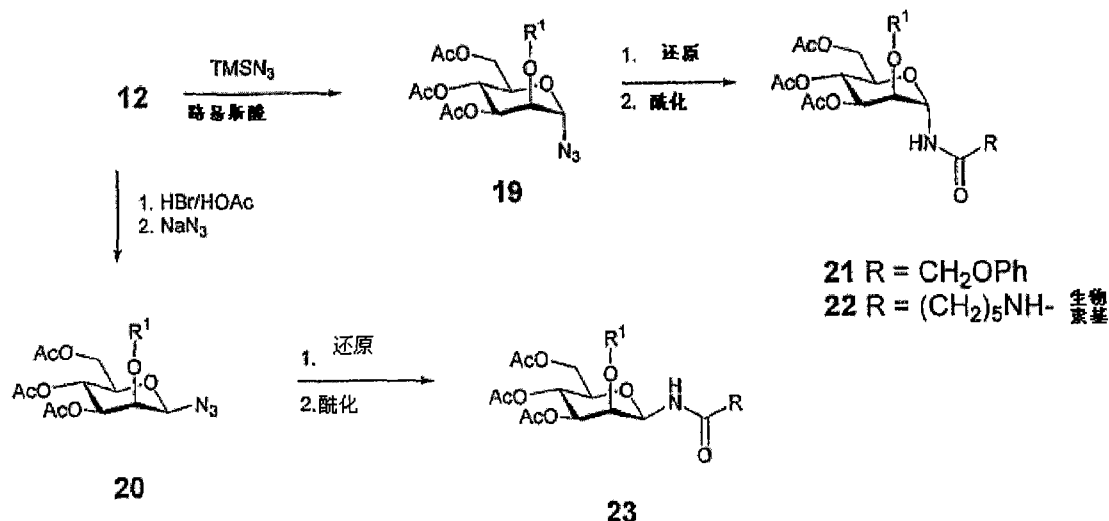
图表 2



### N-连接的衍生物

由 12, 与 TMSN<sub>3</sub> 的路易斯酸催化反应得到叠氮化物 19 (主要的是 α)。可选择地, 可以通过初始形成 α-溴化物以及接着用 NaN<sub>3</sub> 取代来专门地形成 β-叠氮化物 20 (图表 3)。例如, 所述溴化物还可以被用作制备硫糖苷或异硫氰酸酯的中间体。所述叠氮化物可以被脱保护以及磺化, 或者可以被还原以及用各种酰基氯酰化来提供一系列糖基酰胺(图表 3)。

图表 3



### 非还原端衍生物

还可以在所述非还原端实现衍生化,例如,通过使用磷酸化寡聚糖(单个地或作为混合物)以及通过所述磷酸基团衍生化,例如,制备磷酸酯或磷酰胺。实际上,可以按所述还原端也是被类似或不同的官能团衍生化来制备适宜的化合物。

已经广泛地描述了本发明,现在将给出所述化合物、它们的合成以及它们的生物活性的非限制性实施例。

### 实施例

#### 中性甘露-寡聚糖

(a) 根据文献方法[17]通过空间排阻色谱法从得自 *P. holstii* NRRL Y-2448 的细胞外磷酸甘露聚糖的弱酸催化水解的中性部分中分离出甘露-寡聚糖(8)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man、(9)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man、(10)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man 以及(11)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man。可选择地,如实施例1所描述,以逐步的方式从单糖结构单元合成所述寡聚糖8-11(参见下文)。

(b) 可选择地,所述中性部分被直接地乙酰化(过量 Ac<sub>2</sub>O/吡啶)以及通过闪色谱法(硅胶)分离出单个全乙酰化寡聚糖并且被以该形式直接用于下一步。

(c) 在另一种方法中,来自(b)的全乙酰化混合物被直接用在下一个步骤中以及然后通过闪色谱法分离单个的产物。

### 用于脱乙酰基的一般方法

用甲醇钠的甲醇溶液(1.35M, 0.2-0.6 当量)处理所述全乙酸酯的无水甲醇溶液(0.1M)。将所述混合物在室温下搅拌1-3个小时(由TLC监测)。加入酸性树脂AG<sup>®</sup>-50W-X8(H<sup>+</sup>形式)调节pH=6-7, 过滤所述混合物并且用甲醇冲洗所述树脂。将所述的合并的滤液和冲洗液在真空中浓缩并且彻底干燥从而获得所述多元醇产物。

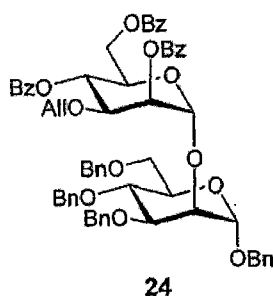
### 用于磺化的一般方法

将所述多元醇与SO<sub>3</sub>·三甲胺或SO<sub>3</sub>·吡啶复合物在DMF中的混合物(2当量每醇)加热(60°C, o/n)。用MeOH处理冷却了(室温)的反应混合物以及然后通过加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(10% w/w)使其为碱性(至pH>10)。将所述混合物过滤并且蒸发以及共蒸发(H<sub>2</sub>O)所述滤液。将所述粗多元硫酸化的物料溶解在H<sub>2</sub>O中以及进行空间排阻色谱法处理(参见下文)从而得到所述硫酸化的产物。当需要时, 在冷冻干燥之后, 将所述产物通过离子交换树脂柱(AG<sup>®</sup>-50W-X8, Na<sup>+</sup>形式, 1×4 cm, 去离子H<sub>2</sub>O, 15 mL)以将所述产物均一地转化为钠盐形式。将收集到的溶液蒸发并且冷冻干燥从而得到无色玻璃状或白色粉末状的最终产品。

### 空间排阻色谱法

在5×100 cm柱中的Bio-Gel P-2上用0.1 M的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>·HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>以2.8 mL/min的流速进行空间排阻色谱, 收集2.8分钟(7.8 mL)的部分。通过在硅胶板上点样并且用碳化显像来分析各部分的碳水化合物的含量, 和/或通过二甲基亚甲蓝试验分析多电荷物质。最后, 通过CE<sup>15</sup>检测组分的纯度并且将那些被认为是无盐的倾出以及冷冻干燥。在存在劣硫酸化(undersulfated)的副产物或其它有机盐杂质(通常仅少量, 但是相当经常地被检出)的情况下, 使用LH20柱色谱法(2×95cm, 去离子水, 1.2mL/分钟, 3.5分钟 每小瓶)将它们完全地除去。

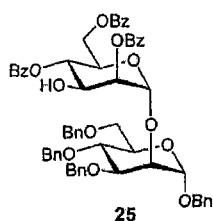
### 实施例1: 从*Pichia*全合成中性甘露-寡聚糖(8-11)



苄基 2-O-(3-O-烯丙基-2,4,6-三-O-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-3,4,6-三

### -O-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (24)

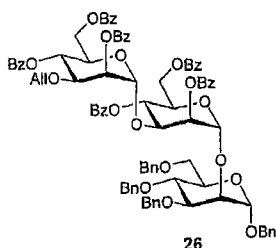
将 3-O-烯丙基-2, 4, 6-三-O-苄甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯 [26] (902mg, 1.21mmol) 与苄基 3, 4, 6-三-O-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 [27] (723mg, 1.34mmol) 在 1, 2-DCE (10mL) 中的混合物在分子筛 (1.0g 的 3Å 粉末) 的存在下在氩气氛下搅拌 (30 分钟)。在加入 TMSOTf (219  $\mu$ L, 1.21mmol) 之前将所述混合物在继续搅拌 (10 分钟) 下冷却 (0°C)。在一段时间 (10 分钟) 之后, 引入 Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) 并且将所述混合物过滤。蒸发溶剂并且将残余物进行 FC (10-50% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述三苯甲酸酯 (24) (1.14g, 84%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.67-3.81, 3.88-3.95, 4.06-4.15, 4.30-4.35 (4 m, 12 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, OCH<sub>2</sub>), 4.94-4.70 (m, 7 H; CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 (d, 1 H,  $J_{A,B}$  10.8 Hz; AB 四重峰的 A), 4.93-4.96, 5.04-5.09 (2 m, 2 H; =CH<sub>2</sub>), 5.02 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.24 (d, 1 H;  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>II</sup>), 5.59-5.69 (m, 1 H; =CH), 5.72 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H-2<sup>II</sup>), 5.75 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.8,  $J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 7.09-7.58, 7.97-8.06 (2 m, 35 H; Ar)。 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  61.50, 63.49 (2 C; C-6<sup>I</sup>, -6<sup>II</sup>), 68.63, 69.17, 69.31, 69.46, 69.64, 71.08, 72.04, 72.64, 73.60, 74.73, 75.30, 75.38 (13 C; C-3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>, -3<sup>II</sup>, -4<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, OCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 79.97 (C-2<sup>I</sup>), 98.52, 99.60 (C-1<sup>I</sup>, -1<sup>II</sup>), 117.67 (=CH<sub>2</sub>), 127.70-138.43 (43 C; =CH, Ar), 165.61, 165.69, 166.42 (3 C; C=O)。



### 苄基 2-O-(2, 4, 6-三-O-苄甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-3, 4, 6-三-O-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (25)

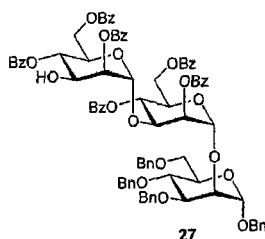
将 PdCl<sub>2</sub> (40 mg) 加到所述烯丙醚 (24) (1.09g, 0.97mmol) 在 MeOH (10 mL) 与 1, 2-DCE (10 mL) 的溶液中并且将所述合并的混合物加热 (70°, 40 分钟)。此后, 蒸发所述溶剂并且将残余物进行 FC (20-30% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述醇 (25) (0.96g, 91%)。 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.68-3.81, 3.97-4.06, 4.32-4.71 (3 m, 18 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, CH<sub>2</sub>Ph),

4.84 (d, 1 H,  $J_{A,B}$  12 Hz; AB 四重峰的 A), 5.05 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.26 (d, 1 H;  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>II</sup>), 5.61 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3 Hz; H-2<sup>II</sup>), 5.67 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.8,  $J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 7.13–7.40, 7.48–7.59, 7.98–8.06 (3 m, 35 H; Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  60.61, 63.32 (2 C; C-6<sup>I</sup>, -6<sup>II</sup>), 69.06, 69.12, 69.25, 69.44, 70.45, 72.14, 72.65, 72.77, 73.48, 74.79, 75.48, 75.47, 76.23 (13 C; C-3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>, -3<sup>II</sup>, -4<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, OCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 79.66 (C-2<sup>I</sup>), 98.34, 99.40 (C-1<sup>I</sup>, -1<sup>II</sup>), 127.70–138.47 (42 C; Ar), 165.97, 166.36, 166.97 (3 C; C=O).



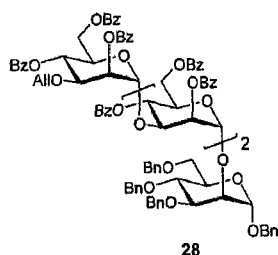
苄基 2-*O*[(3-*O*-烯丙基-2,4,6-三-*O*-苄甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-三-*O*-苄甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-3,4,6-三-*O*-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (26)

将 3-*O*-烯丙基-2,4,6-三-*O*-苄甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯 (742mg, 1.01mmol) 与所述醇 (25) (908mg, 0.84mmol) 在 1,2-DCE (10mL) 中的混合物在分子筛 (1.0g 的 3Å 粉末) 的存在下在氩气氛下搅拌 (30 分钟)。在加入 TMSOTf (181  $\mu$ L, 1.01mmol) 之前将所述混合物在继续搅拌 (10 分钟) 下冷却 (0  $^{\circ}$ C)。在一段时间 (10 分钟) 之后, 引入 Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) 并且将所述混合物过滤。蒸发溶剂并且将残余物进行 FC (10–50% EtOAc/己烷) 处理来得到无色油状的所述六苄甲酰基 (26) (1.26g, 90%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.51–3.56, 3.66–4.06, 4.23–4.27, 4.30–4.42, 4.47–4.72, 4.78–4.86 (6 m, 26 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, OCH<sub>2</sub>, =CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 5.04 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.15 (dd, 1 H,  $J_{1,2}$  1.8,  $J_{2,3}$  2.7 Hz; H-2<sup>II</sup>), 5.26 (d, 1 H; H-1<sup>II</sup>), 5.28 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz; H-1<sup>III</sup>), 5.33–5.43 (m, 1 H; =CH), 5.77–5.82 (m, 2 H; H-4<sup>II</sup>, -2<sup>III</sup>), 5.92 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  9.5,  $J_{4,5}$  9.8 Hz; H-4<sup>III</sup>), 7.00–7.61, 7.80–8.19 (2m, 50 H; Ar)。



苄基 2-*O*[(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-3, 4, 6-三-*O*-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (27)

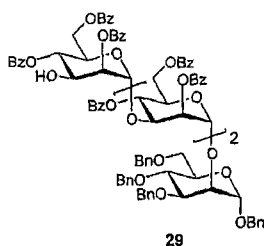
将 PdCl<sub>2</sub> (40mg) 加到所述烯丙醚 (26) (394 mg, 241  $\mu$ mol) 在 MeOH (10mL) 与 1, 2-DCE (10mL) 的溶液中并且将所述合并的混合物加热 (70° , 60 分钟)。此后, 蒸发所述溶剂并且将残余物进行 FC (20-30% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述醇 (27) (317 mg, 84%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.67-3.82, 3.91-3.99, 4.01-4.21, 4.29-4.71 (4 m, 21 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 (d, 1H,  $J_{A,B}$  10.9 Hz; AB 四重峰的 A), 5.03-5.05 (m, 2 H; H-1<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>), 5.25-5.28 (m, 2 H; H-1<sup>II</sup>, -1<sup>III</sup>), 5.63 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 5.77 (dd, 1 H,  $J_{1,2}$  2.0,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H-2<sup>III</sup>), 5.92 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  9.7,  $J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>III</sup>), 6.99-7.62, 7.80-8.16 (2 m, 50 H; Ar)。



苄基 2-*O*[(3-*O*-烯丙基-2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-3, 4, 6-三-*O*-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (28)

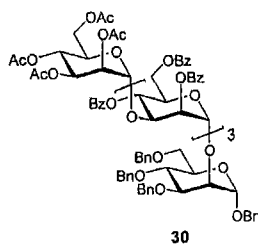
将 3-*O*-烯丙基-2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯 (102 mg, 138  $\mu$ mol) 与所述醇 (27) (135 mg, 86.5  $\mu$ mol) 在 1, 2-DCE (6mL) 中的混合物在分子筛 (100 mg 的 3Å 粉末) 的存在下在氩气氛下搅拌 (30 分钟)。在加入 TMSOTf (25  $\mu$ L, 138  $\mu$ mol) 之前将所述混合物在继续搅拌 (10 分钟) 下冷却 (0

°)。在一段时间(10分钟)之后,引入  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ ) 并且将所述混合物过滤。蒸发溶剂并且将残余物进行 FC(10-50%  $\text{EtOAc}$ /己烷)处理从而得到无色油状的所述九苯甲酸酯(28) (173 mg, 94%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.44-3.49, 3.60-3.99, 4.05-4.16, 4.42-4.44, 4.48-4.68, 4.73-4.77 (6 m, 30 H;  $\text{H-2}^{\text{I}}, -3^{\text{I}}, -4^{\text{I}}, -5^{\text{I}}, -6\text{a}^{\text{I}}, -6\text{b}^{\text{I}}, -3^{\text{II}}, -5^{\text{II}}, -6\text{a}^{\text{II}}, -6\text{b}^{\text{II}}, -3^{\text{III}}, -5^{\text{III}}, -6\text{a}^{\text{III}}, -6\text{b}^{\text{III}}, -3^{\text{IV}}, -5^{\text{IV}}, -6\text{a}^{\text{IV}}, -6\text{b}^{\text{IV}}$ ,  $\text{OCH}_2, =\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.83 (d, 1H,  $J_{\text{A,B}}$  10.9 Hz; AB 四重峰的 A), 5.01-5.04 (m, 2 H;  $\text{H-1}^{\text{I}}, -2^{\text{III}}$ ), 5.19-5.23 (m, 1 H;  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 5.27-5.40 (m, 4 H;  $\text{H-1}^{\text{I}}, -1^{\text{II}}, -1^{\text{III}}, =\text{CH}_2$ ), 5.61 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = 4.5$  9.9 Hz;  $\text{H-4}^{\text{IV}}$ ), 5.77 (dd, 1 H,  $J_{1,2}$  2.0,  $J_{2,3}$  3.1 Hz;  $\text{H-2}^{\text{IV}}$ ), 5.90-5.96 (m, 2 H;  $\text{H-4}^{\text{II}}, -4^{\text{III}}$ ), 7.01-7.56, 7.70-8.16 (2 m, 65 H; Ar)。



苄基 2- $O$ -[(2,4,6-三- $O$ -苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-三- $O$ -苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-三- $O$ -苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-3,4,6-三- $O$ -苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷(29)

将  $\text{PdCl}_2$  (30mg) 加到所述烯丙醚(28) (155 mg, 70.4  $\mu\text{mol}$ ) 在  $\text{MeOH}$  (5mL) 与 1,2-DCE (5mL) 的溶液中并且将所述合并的混合物加热(70°, 40分钟)。此后, 蒸发所述溶剂并且将残余物进行 FC(20-40%  $\text{EtOAc}$ /己烷)处理从而得到无色油状的所述醇(29) (97 mg, 64%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67-3.82, 3.90-4.10, 4.24-4.68 (3 m, 26 H;  $\text{H-2}^{\text{I}}, -3^{\text{I}}, -4^{\text{I}}, -5^{\text{I}}, -6\text{a}^{\text{I}}, -6\text{b}^{\text{I}}, -3^{\text{II}}, -5^{\text{II}}, -6\text{a}^{\text{II}}, -6\text{b}^{\text{II}}, -3^{\text{III}}, -5^{\text{III}}, -6\text{a}^{\text{III}}, -6\text{b}^{\text{III}}, -3^{\text{IV}}, -5^{\text{IV}}, -6\text{a}^{\text{IV}}, -6\text{b}^{\text{IV}}$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.84 (d, 1 H,  $J_{\text{A,B}}$  11.2 Hz; AB 四重峰的 A), 4.86 (d,  $J_{1,2}$  1.8 Hz;  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 4.90 (dd, 1 H;  $J_{1,2}$  1.8,  $J_{2,3}$  3.1 Hz;  $\text{H-2}^{\text{III}}$ ), 5.03 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  1.5 Hz;  $\text{H-1}^{\text{IV}}$ ), 5.22 (dd, 1 H,  $J_{1,2}$  2.1,  $J_{2,3}$  2.6 Hz;  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 5.27-5.29 (m, 2 H;  $\text{H-1}^{\text{III}}, -1^{\text{IV}}$ ), 5.46 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  9.7,  $J_{4,5}$  9.9 Hz;  $\text{H-4}^{\text{IV}}$ ), 5.79 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.9 Hz;  $\text{H-2}^{\text{IV}}$ ), 5.90-5.96 (m, 2 H;  $\text{H-4}^{\text{II}}, -4^{\text{III}}$ ), 7.01-7.56, 7.68-8.16 (2 m, 65 H; Ar)。



苄基 2-*O*[(2, 3, 4, 6-四-*O*-乙酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)]-3, 4, 6-三-*O*-苄基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (30)

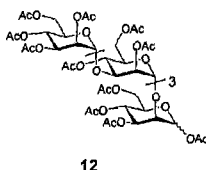
将 2, 3, 4, 6-四-*O*-乙酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯[28] (39mg, 78  $\mu$ mol) 与所述醇(29) (85 mg, 39  $\mu$ mol) 在 1, 2-DCE (3mL) 中的混合物在分子筛 (100 mg 的 3Å 粉末) 存在下在氩气氛下搅拌(30 分钟)。在加入 TMSOTf (14.2  $\mu$ L, 78  $\mu$ mol) 之前将所述混合物在继续搅拌(10 分钟)下冷却(0°)。在一段时间(30 分钟)之后, 引入 Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) 并且将所述混合物过滤。蒸发溶剂并且将残余物进行 FC (30-60% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述四乙酸酯(30) (85 mg, 87%)。 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.82-2.04 (4 s, 3 H 每个; CH<sub>3</sub>CO), 3.67-3.95, 4.05-4.72, 4.82-5.03, 5.21-5.28, 5.69-5.50 (m, 43H; H-1<sup>I-IV</sup>, -2<sup>I-IV</sup>, -3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, -5<sup>I-IV</sup>, -6ab<sup>I-IV</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 7.01-7.56, 7.68-8.16 (2 m, 65 H; Ar)。

用于将所述甘露寡聚糖(25, 27, 29, 30)脱保护的一般方法

(A) 将一小片钠加入所述的四苧基醚(25, 27, 29, 30)在MeOH与THF中的溶液中并且搅拌所述合并的混合物(室温, o/n)。此后, 将所述混合物用Dowex 50X8树脂(H<sup>+</sup>)形式中和并且过滤。蒸发以及共蒸发(MeOH)所述溶剂并且不用进一步纯化用于后面的反应中。

(B) 将  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (10% 在 C 上) 加入来自 (A) 的粗产物在 THF 与包含少量  $\text{AcOH}$  (50  $\mu\text{L}$ ) 的  $\text{H}_2\text{O}$  的溶液中以及将所述合并的混合物在氢气 (100 p. s. i., 3 个小时) 下剧烈搅拌。此后, 将所述混合物过滤并且蒸发所述溶剂。将所述残余物进行凝胶过滤色谱 (Biogel P2;  $\text{H}_2\text{O}$ ; 60 ml/小时) 处理从而在冷冻干燥之后得到无色粉末状的所述甘露寡聚糖 (8-11)。化合物 8-11 在所有方面都与如上所述的从 *Pichia* 水解过程 (hydrolysis) 中分离出来的那些相一致。

## 实施例 2: 苄基糖苷多元硫酸酯 (PG 500)

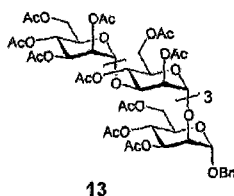


### 全乙酸酯 12

将所述五糖 11 (1.03g, 95% M5)、乙酸钠 (1.2g) 和乙酸酐 (50mL) 在搅拌下在 140°C 在干燥管下加热过夜。将所述混合物冷却至室温, 蒸发至干, 在 EtOAc 中吸收, 用盐水 ( $\times 3$ ) 洗涤以及进行闪色谱 (40g 硅胶, 80:20 EtOAc: Hx) 处理来得到伴随极少纯物质的玻璃状的 810mg 全乙酸酯 12。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.14 (d, 0.84H,  $J=2.0$ ,  $\alpha\text{H1}^1$ ), 5.71 (d, 0.16H,  $J=0.9$ ,  $\beta\text{H1}^1$ ), 5.30–5.10 (m, 8H), 5.00–4.85 (m, 7H), 4.25–3.70 (m, 19H), 2.20–1.90 (m, 51H)。对于  $\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{O}_{43}$  的 HRMS 计算值  $[\text{M} + \text{H}]^+$  1543.4623, 实测值 1543.4599。

### 用于直接糖化全乙酰化寡聚糖的一般方法:

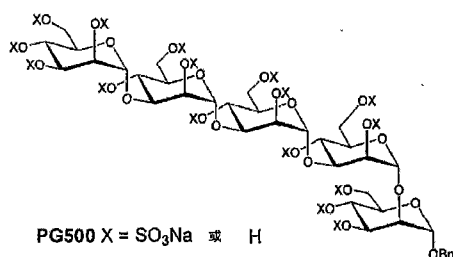
将所述醇 (6 当量) 加入所述全乙酸酯 (例如, 12) (1 当量) 在 3Å MS 干燥的 DCM 的溶液 (0.03M) 中。在一些情况下, 加入少量 3Å MS 粉末。加入三氟化硼醚化物 (4 当量) 以及将所述混合物在氩气氛下在 60°C 或 75°C 搅拌 2 至 26 个小时。将所述混合物冷却并且加入三乙胺。将所述混合物用二氯甲烷稀释, 用饱和碳酸钠水溶液洗涤并且干燥 (无水  $\text{MgSO}_4$ )。将干燥过的所述溶液过滤并且用二氯甲烷洗涤滤饼。将所述合并的滤液以及洗涤液浓缩, 装在硅胶上并且通过闪色谱 (硅胶, 用己烷–EtOAc 6:1 至 1:4 梯度洗脱) 纯化从而在蒸发以及在高真空下干燥之后提供所要的糖苷。



### 苄基糖苷 13

使用 12 和苄醇进行所述糖化从而得到无色胶体状的所述产物 (13), 108mg, 46% ( $R_f=0.32$ , 己烷–EtOAc=1:3)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.35–7.27 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.30–5.12 (m, 8H), 5.00–4.85 (m, 8H), 4.68 (AB 四重峰, 1H,  $J=11.8$ )

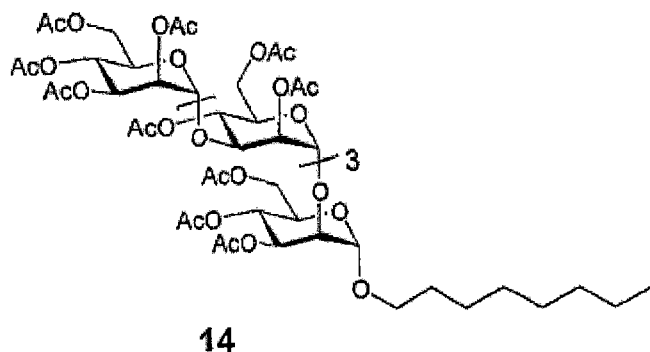
和 4.50 (AB 四重峰, 1H,  $J=11.8$ ,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 4.27–3.74 (m, 19H), 2.14 (4), 2.13 (5), 2.13, 2.10, 2.08 (4), 2.07 (9), 2.07 (6), 2.06 (9), 2.06 (6), 2.06 (2  $\times$ ), 2.02, 2.00, 1.99, 1.97, 1.94 (15s, 48H,  $16 \times \text{Ac}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  171.0, 170.5 (3), 170.5 (1), 170.5 (0), 170.4, 170.3, 170.2, 170.0 (4), 170.0 (2), 169.8 (9), 169.8 (8), 169.7, 169.6, 169.5 (6), 169.4 (6) 和 169.3 (总计  $16 \times \text{CO}$ ), 136.1 (*ipso*- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 128.5, 128.2 和 127.9 (*o*, *m*, *p*- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 99.2 (2C), 98.9, 98.8, 97.3 ( $5 \times \text{糖-C1}$ ), 76.7, 75.1, 74.9 (9), 74.9 (7), 71.1, 70.9, 70.8, 70.2, 69.7, 69.5 (9), 69.5 (6), 69.4 (2), 69.3 (7), 69.2, 68.6, 68.3, 67.1, 66.7 (3), 66.6 (7), 66.1, 65.5, 62.4, 62.1, 61.9, 61.6 和 60.2 (26C,  $25 \times \text{糖碳排除} 5 \times \text{糖-C1}$  以及 苄基  $\text{CH}_2$ ), 20.9, 20.8 (2), 20.8 (0), 20.7 (8), 20.7, 20.6, 20.5 (4), 20.5 (1), 20.4 (9) 和 20.4 (6) (10C,  $16 \times \text{Ac}$ )。



### 苄基糖苷多元硫酸酯 (PG 500)

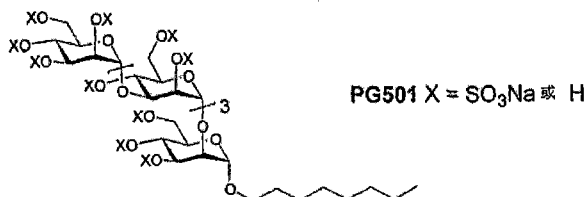
将化合物 13 脱去乙酰基 (对于多元醇  $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{O}_{26}$  的 HRMS 计算值  $[\text{M} + \text{H}]^+$  919.3296, 实测值 919.3279) 并且根据所述一般方法磺化从而得到白色粉末状的所述产物 (PG 500), 76.1mg, 44%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  7.35–7.26 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.32 (s, 1H), 5.30 (d, 1H,  $J=1.2$ ), 5.26 (d, 1H,  $J=2.0$ ), 5.24 (d, 1H,  $J=1.6$ ), 5.05 (dd, 1H,  $J=2.8, 2.0$ ), 5.00 (d, 1H,  $J=2.0$ ), 4.87–4.85 (m, 2H), 4.68–4.34 (m, 12H), 4.32–3.86 (m, 17H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  137.0, 129.5, 129.4, 129.1, 100.5 (9), 100.5 (6), 100.2, 97.9, 93.8, 76.9, 76.8, 75.6, 75.5 (3), 75.4 (8), 74.4, 73.8, 73.1, 73.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.3, 70.7, 70.6, 70.4, 69.9, 69.8, 69.7, 68.0, 67.8, 67.5, 66.6, 66.3 (7), 66.3 (5)。

## 实施例 3: 辛基糖苷多元硫酸酯 (PG 501)



## 辛基糖苷 14

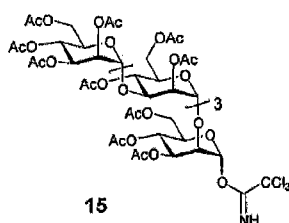
使用 12 和辛醇进行所述糖化来得到无色胶体状的所述产物 (14), 207mg, 66% (Rf=0.41, 己烷-EtOAc=1:3).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.23–5.09 (m, 8H), 4.96–4.82 (m, 8H), 4.23–3.71 (m, 19H), 3.59 (dt, 1H,  $J=9.4, 6.8, \text{OCH}_2\text{R}$ ), 3.35 (dt, 1H,  $J=9.4, 6.8, \text{OCH}_2\text{R}$ ), 2.11, 2.10 (2), 2.09 (8), 2.06, 2.05, 2.04 (4), 2.04 (1), 2.03 (8), 2.03, 2.02, 2.01, 1.99 (3), 1.98 (8), 1.96, 1.94 和 1.90 (16s, 48H,  $16 \times \text{Ac}$ ), 1.52 (五重峰, 2H,  $J=7.2, \text{CH}_2$ ), 1.27–1.18 (m, 10H,  $(\text{CH}_2)_5$ ), 0.80 (t, 3H,  $J=7.2, \text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  170.4 (0) (2C), 170.3 (8) (2C), 170.3, 170.2, 170.1, 169.9 (2C), 169.8 (2), 169.7 (5), 169.6, 169.5, 169.4 (4), 169.3 (5), 169.3 ( $16 \times \text{CO}$ , 3 重叠的), 99.1 (2C), 98.8, 98.7, 98.0 ( $5 \times \text{糖-C1}$ ), 77.0, 75.0, 74.8 (3), 74.7 (5), 71.0, 70.8, 70.7, 70.1, 69.4 (9), 69.4 (7), 69.3 (0), 69.2 (7), 69.2, 68.3, 68.2 (0), 68.1 (6), 67.2, 66.6 (4), 66.6 (0), 66.1, 65.4, 62.4, 62.3, 61.8 和 61.5 (25C, 糖碳排除糖-C1 以及辛基- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 31.5, 29.1, 29.0, 28.9, 25.9, 22.4 ( $6 \times \text{辛基-CH}_2$ ), 20.7 (3), 20.7 (0), 20.6 (7), 20.6, 20.5, 20.4 (3), 20.4 (0), 20.3 (9), 20.3 (7) (9C,  $16 \times \text{Ac}$ ), 13.85 (辛基- $\text{CH}_3$ ).



将化合物 14 脱去乙酰基 (对于多元醇  $\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{O}_{26}$  的 HRMS 计算值  $[\text{M} + \text{H}]^+ 941.40784$ , 实测值 941.4060.) 并且根据所述一般方法磺化来得到白色粉末

状的所述产物(PG 501), 195mg, 72%。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  5.33 (s, 1H), 5.29 (d, 1H,  $J=1.6$ ), 5.24 (d, 1H,  $J=1.6$ ), 5.21 (d, 1H,  $J=1.6$ ), 5.03 (dd, 1H,  $J=2.8, 2.0$ ), 4.87 (d, 1H,  $J=1.6$ ), 4.86–4.83 (m, 2H), 4.70–3.92 (m, 27H), 3.59 (dt, 1H,  $J=9.6, 7.0$ ), 3.44 (dt, 1H,  $J=9.6, 7.0$ ), 1.48–1.40 (m, 2H), 1.21–1.08 (m, 10H), 0.678 (t, 3H,  $J=7.2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  100.5, 100.4, 100.1, 100.0, 99.0, 98.4 (1), 98.3 (8), 98.3 (6), 98.3 (5), 76.8 (5), 76.7 (9), 76.7, 76.6, 76.5 (2), 76.4 (7), 76.0, 75.4 (0), 75.3 (5), 75.3, 75.2, 74.3, 73.0 (5), 72.9 (9), 72.7, 72.6, 71.7, 70.4, 70.2, 69.8 (4), 69.7 (5), 69.6, 69.1, 67.8 (5), 67.7 (7), 66.5, 66.2, 31.5, 30.0, 28.8, 25.8, 22.5, 14.0。

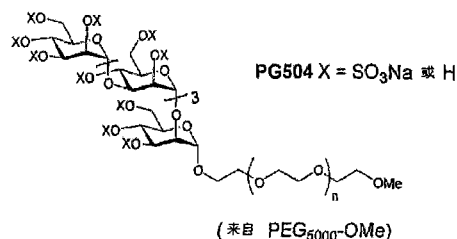
#### 实施例 4: PEG<sub>5000</sub> 多元硫酸酯(PG504)



#### 亚胺酯(Imidate) 15

(A) 在一段时间(2天)中将所述乙酸酯(12) (68mg, 51  $\mu\text{mol}$ ) 与  $\text{BnNH}_2$  (17  $\mu\text{L}$ , 152  $\mu\text{mol}$ ) 在 THF (2mL) 中的混合物搅拌(室温)。将所述混合物用  $\text{CHCl}_3$  (20mL) 稀释并且进行处理。将所述有机相蒸发以及共蒸发 ( $2 \times 10\text{mL MeCN}$ ) 并且不用进一步纯化用于后面的反应。

(B) 将 DBU (10  $\mu\text{L}$ , 6.7  $\mu\text{mol}$ ) 加入所述粗产物(来自 A) 与三氯乙腈 (1.0mL, 10mmol) 在 1,2-DCE (4mL) 中的溶液中以及搅拌所述合并的混合物 ( $0^\circ\text{C} \rightarrow 12^\circ\text{C}$ , o/n)。将所述混合物浓缩以及将所述残余物进行 FC (50–90% EtOAc/己烷) 处理从而得到浅黄色油状的 15 (35mg, 48%, 2步)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.70 (s, 1H, NH), 6.32 (d, 1H,  $J=2.0$ ,  $\text{H}1'$ ), 5.36–5.13 (m, 8H), 5.00–4.90 (m, 6H), 4.26–3.75 (m, 20H), 2.15–1.94 (m, 48H)。



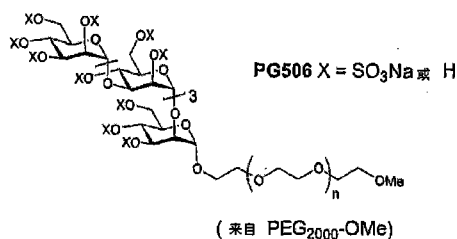
### PEG<sub>5000</sub> 多元硫酸酯 (PG504)

(A) 将所述亚胺酯 15 (33mg, 20.2 μmol) 与 PEG<sub>5000</sub>-单甲基醚 (151mg, 30.3 μmol) 在 1,2-DCE (3mL) 中的混合物在分子筛 (50mg 的 3Å 粉末) 的存在下在氩气氮下搅拌 (10 分钟)。在加入 TMSOTf (5 μL, 2.8 μmol) 之前将所述混合物在继续搅拌 (10 分钟) 下冷却 (-20°C)。在一段时间 (20 分钟) 之后, 引入 Et<sub>3</sub>N (10 μL) 并且将所述混合物过滤。蒸发溶剂并且将残余物进行 FC (0-7.5% MeOH/CHCl<sub>3</sub>) 处理从而得到无色玻璃状的 16 (104 mg, 80%, 基于平均 M<sub>r</sub> 6483)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.28-4.87 (m, 14H), 4.43-3.42 (m, 829 H, ), 3.34 (s, 3H, OMe), 2.15-1.94 (m, 48H)。

(B) 根据一般方法将化合物 16 (104mg, 16 μmol) 脱去乙酰基从而得到无色蜡状的 Man<sub>5</sub>-PEG<sub>5000</sub>-OMe (82mg, 89%, 基于平均 M<sub>r</sub> 5769)。

(C) 根据一般方法将所述 M<sub>5</sub>-PEG<sub>5000</sub>-OMe (82mg, 14 μmol) 磺化从而得到无色泡沫状的 PG504 (45mg, 42%, 基于平均 M<sub>r</sub> 7401)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.34-4.87 (m, 7H), 4.71-3.97 (m, 20H), 3.76-3.35 (m, 432H), 3.23 (s, 3H, OMe)。

### 实施例 5: PEG<sub>2000</sub> 多元硫酸酯 (PG506)



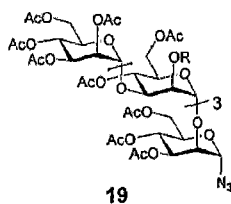
(A) 如 PEG<sub>5000</sub>-OMe 所描述的用 TMSOTf 处理所述亚胺酯 (15) (60mg, 36.5 μmol) 与 PEG<sub>2000</sub>-OMe (110mg, 55.0 μmol) 的混合物从而得到无色玻璃状的化合物 17 (96mg, 74%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.28-5.13, 5.00-4.87, 4.27-3.40 (3m, 许多 H, H1<sup>I-V</sup>, 2<sup>I-V</sup>, 3<sup>I-V</sup>, 4<sup>I-V</sup>, 5<sup>I-V</sup>, 6a<sup>I-V</sup>, 6b<sup>I-V</sup>, OCH<sub>2</sub>CHO), 3.34 (s, 3H, OMe),

2.15-1.94 (16s, 3H 每个, COMe)。

(B) 根据一般方法将化合物 17 脱去乙酰基从而得到无色蜡状的 PEG<sub>2000</sub>-OMe 多元醇 (63mg, 81%)。将该残余物不用进一步纯化或性能描述用于下一步反应。

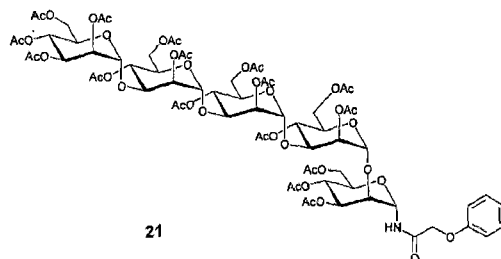
(C) 根据一般方法将来自以上 (B) 的产物磺化从而得到无色粉末状的所述标题化合物 (PG506) (47mg, 68%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.34-3.97 (m, 498H), 3.80-3.35 (m, 81H), 3.23 (s, 3H, OMe)。

### 实施例 6: PG502



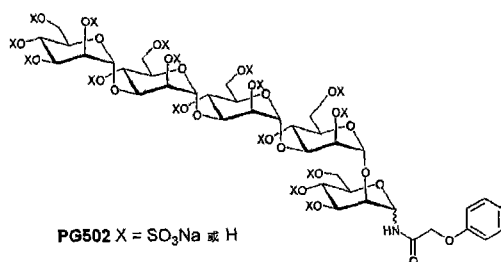
### 叠氮化物 19

将全乙酸酯 12 (270mg, 175 μmol)、TMSN<sub>3</sub> (60mg, 525 μmol) 以及 SnCl<sub>4</sub> (1M 在 DCM 中的 200 μL) 在无水 DCM (20mL) 中的溶液在黑暗中搅拌过夜。加入附加量 (3 当量) 的 TMSN<sub>3</sub> 和 SnCl<sub>4</sub> 并且继续在黑暗中再次搅拌过夜。加入冰和 NaHCO<sub>3</sub> (饱和水溶液) 并且将所述混合物用 EtOAc 萃取, 用盐水洗涤, 蒸发以及进行闪色谱 (10g 硅胶, 梯度洗脱, 50: 50 至 75: 25 EtOAc: Hx) 处理从而得到 218mg (82%) 叠氮化物 19。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.52 (d, 1H, *J* = 2.0, H1<sup>1</sup>), 5.29-5.12 (m, 8H), 5.02-4.87 (m, 7H), 4.29-3.76 (m, 19H), 2.18-1.95 (m, 48H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5 (9), 170.5 (7), 170.5 (6), 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.9 (9), 169.9 (8), 169.9 (5), 169.7 (3), 169.6 (9), 169.6 (6), 169.6, 169.5, 169.3, 99.3 (0), 99.2 (7), 99.1, 99.0, 88.1, 75.2, 75.1, 74.8, 71.1, 70.9, 70.8, 70.6, 69.7, 69.5, 69.4, 69.2, 68.3, 67.3, 66.8, 66.7, 65.5 (9), 65.5 (8), 62.6, 62.2, 62.0, 61.7, 20.8 (8), 20.8 (6), 20.8, 20.7, 20.6 (2), 20.5 (8), 20.5 (7), 20.5。对于 C<sub>62</sub>H<sub>84</sub>N<sub>3</sub>O<sub>41</sub> 的 HRMS 计算值 [M+H]<sup>+</sup>1526.4583, 实测值 1526.4557。



### 1-脱氧-1- $\alpha$ -苯氧乙酰胺基全乙酸酯 21

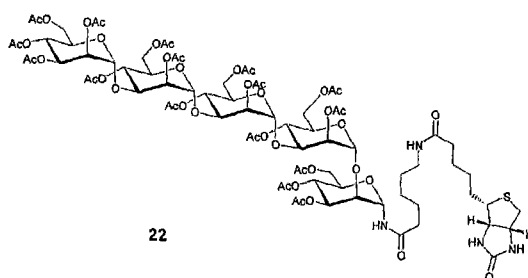
将 19 (32mg, 21  $\mu$ mol)、 $\text{PPh}_3$  (11mg, 42.6  $\mu$ mol) 和苯氧乙酰氯 (7.3mg, 43  $\mu$ mol) 在无水乙腈 (5mL) 中的溶液在 0℃ 搅拌 4 个小时然后在室温过夜。加入  $\text{EtOAc}$  和  $\text{NaHCO}_3$  (饱和水溶液) 并且将所述有机层用盐水洗涤然后干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 以及进行闪色谱 (梯度洗脱 60:40 至 90:10  $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ ) 处理从而得到 11.4mg (33%) 的带有一些残留  $\text{PPh}_3/\text{PPh}_3\text{O}$  的酰胺 21。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36–7.32 (m, 2H), 7.18 (br d, 1H,  $J=8.1$ , NH), 7.00–6.90 (m, 3H), 5.79 (dd, 1H,  $J=3.8, 8.2$ ,  $\text{H1}^1$ ), 5.32–4.97 (m, 15H), 4.60–3.76 (m, 21H), 2.20–1.95 (m, 48H, AcO)。对于  $\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{NO}_{43}$  的 HRMS 计算值  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1634.5045, 实测值 1634.5002。



### PG502

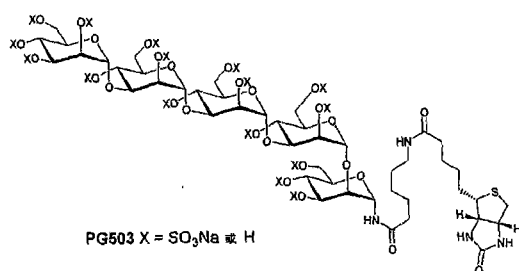
将所述全乙酸酯 21 (11mg, 6.7  $\mu$ mol) 脱去乙酰基并且根据一般方法磺化从而在冷冻干燥之后得到 6mg (34%, 对于 2 步) 的 PG502。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 溶剂压缩的)  $\delta$  : 7.30–7.21 (m, 2H,  $\text{ArH}^{\text{m}}$ ), 6.96–6.84 (m, 3H,  $\text{ArH}^{\text{n,p}}$ ), 5.56–3.59 (m, 30H 受压缩影响的)。

### 实施例 7: PG503



### 1-脱氧-1- $\alpha$ -生物素氨基己酰胺全乙酸酯 22

将 19 (70mg, 46  $\mu$ mol) 与 Adam 催化剂 (2mg) 在 2:1 EtOAc: EtOH (3mL) 中的混合物在  $H_2$  (100psi) 下搅拌过夜, 然后过滤, 蒸发以及用无水吡啶共蒸发。加入生物素氨基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (31mg, 68  $\mu$ mol) 和 1mL 无水吡啶并且将所述混合物在搅拌下加热至 60 $^{\circ}$ C 加热 3 天。将所述溶液蒸发并且进行闪色谱 (9.4g Et<sub>3</sub>N 洗涤的硅胶, 梯度洗脱 75:25 EtOAc : Hx 至 30:70 MeOH : EtOAc) 处理从而得到 30.8mg (36%, 经过两步的) 的酰胺 22。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.41 (br d, 1H,  $J$ =9.4, NH), 6.47, 6.17 (2  $\times$  br s, 2  $\times$  1H, 酰亚胺 NHs), 5.40 (br d, 1H,  $J$ =9.4, H1'), 5.40-4.90 (m, 16H), 4.52 (dd, 1H,  $J$ =4.9, 7.5, 生物素-H4), 4.36-3.72 (m, 20H), 3.25-3.12 (m, 3H), 2.91 (dd, 1H,  $J$ =5.0, 13.0, 生物素-H4), 2.75 (d, 1H,  $J$ =12.9, 生物素-H5B), 2.27-1.96 (m, 52H), 1.82-1.29 (m, 12H, 烷基链)。

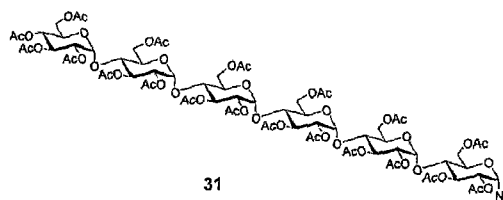


### PG503

将所述全乙酸酯 22 (30mg, 16.3  $\mu$ mol) 脱去乙酰基以及根据一般方法磺化从而在冷冻干燥之后得到 28mg (61%, 对于 2 步) 的 PG503。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 溶剂压缩的, 受酰胺旋转异构体影响的)  $\delta$  5.60-4.75 (m, 7H, 糖 Hs), 4.68 (dd, 1H,  $J$ =4.7, 7.2, 生物素-H4), 4.60-3.60 (m, 26H, 糖 Hs), 4.21 (dd, 1H,  $J$ =4.4, 7.2, 生物素-H3), 3.33-3.16 (m, 1H, 生物素-H2), 3.07-2.97 (m, 3H, 生物素-H5A+CH<sub>2</sub>N), 2.92 (dd, 1H,  $J$ =4.9, 13.5, 生物素-H5B), 2.33-2.14 (m,

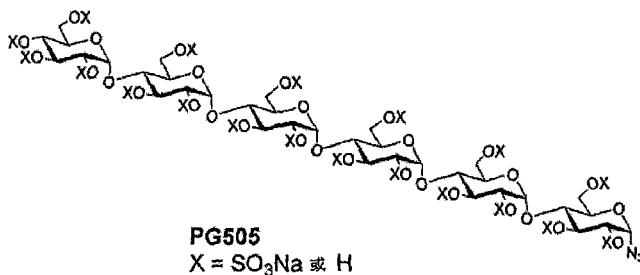
2H, COCH<sub>2</sub>B), 2.09 (t, 2H,  $J = 7.4$ , COCH<sub>2</sub>A), 1.63–1.15 (m, 12H, 烷基链)。

### 实施例 8: PG505



#### 叠氮化物 31.

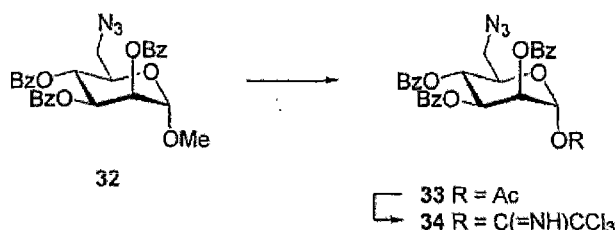
将麦芽六糖全乙酸酯 (500mg, 273  $\mu$ mol)、TMSN<sub>3</sub> (83mg, 726  $\mu$ mol) 和 SnCl<sub>4</sub> (在 DCM 中的 1M, 145  $\mu$ L) 在无水 DCM (20mL) 中的溶液在黑暗中搅拌过夜。加入附加量的 TMSN<sub>3</sub> (50  $\mu$ L) 和 SnCl<sub>4</sub> (在 DCM 中的 1M, 100  $\mu$ L) 并且继续在黑暗中再次搅拌过夜。加入冰和 NaHCO<sub>3</sub> (饱和水溶液) 并且将所述混合物用 EtOAc 萃取, 用盐水洗涤, 蒸发以及进行闪色谱 (10g 硅胶, 梯度洗脱, 75: 20 至 80: 20 EtOAc: Hx) 处理从而得到 488 mg (98%) 叠氮化物 31。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 5.30–5.11 (m, 11H), 4.93 (t, 1H,  $J = 9.9$ ), 4.72 (dd, 1H,  $J = 4.0, 10.5$ ), 4.68–4.57 (m, 6H), 4.44–3.67 (m, 23H), 2.09–1.85 (m, 57H)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 170.3 (4), 170.3 (1), 170.2 (7), 170.2, 170.1 (4), 170.1 (0), 170.0 (7), 170.0, 169.6, 169.4, 169.3, 169.2 (3), 169.2 (2), 169.1 (7), 169.1 (4), 169.1 (1), 95.5 (0), 95.4 (5), 95.4, 95.3, 87.1, 74.7, 73.9, 73.3, 73.2, 72.2, 71.4, 71.3, 71.2 (4), 71.2 (1), 70.2, 70.1, 69.8, 69.0, 68.8, 68.7, 68.2, 67.7, 62.4, 62.3, 62.1 (8), 62.1 (6), 62.0, 61.1, 30.0, 20.5 (5), 20.5 (3), 20.5 (0), 20.4 (6), 20.3 (3), 20.2 (8), 20.2 (4), 20.2 (2)。



PG505

将所述叠氮化物 31 (97 mg, 54  $\mu\text{mol}$ ) 脱去乙酰基并且根据一般方法磺化从而在冷冻干燥之后得到 66mg (41%, 对于 2 步) 的 PG505。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 溶剂压缩的)  $\delta$  : 3.69–5.78 (m, 42H 受溶剂压缩影响的)。

#### 实施例 9: PG515



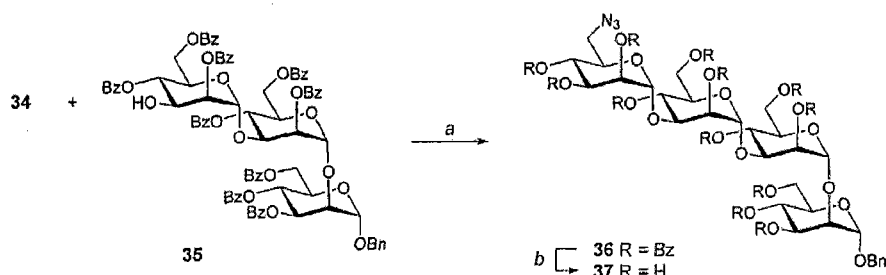
6-叠氮-6-脱氧-2, 3, 4-三-O-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯 (34)

(A) 将  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.5 mL) 加入到所述甲基糖苷 (32) [29] (1.52 g, 2.9 mmol) 与  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10 mL) 在  $\text{AcOH}$  (5 mL) 中的冷却 ( $0^\circ$ ) 溶液中并且搅拌所述合并的混合物 ( $0^\circ \rightarrow$  室温, o/n)。分份加入  $\text{NaOAc}$  (1.0 g) 直到  $\text{pH} > 5.0$  以及然后用  $\text{MeOH}$  (3 mL) 处理所述混合物。过滤所述混合物并且在处理 ( $\text{EtOAc}$ ) 和  $\text{RSF}$  (10–20%  $\text{EtOAc}$ /己烷) 之前蒸发和共蒸发 (甲苯) 所述溶剂从而大概地得到无色泡沫状的所述乙酸酯 (33) (1.12 g, 70%)。

(B) 将胍乙酸酯 (196 mg, 2.13 mmol) 加入搅拌的所述乙酸酯 (33) (1.08 g, 1.94 mmol) 在  $\text{DMF}$  (10 mL) 中的溶液中并且加热所述合并的混合物 ( $55^\circ$ , 15 分钟)。将所述混合物倾倒在饱和  $\text{NaCl}$  上并且萃取 ( $\text{EtOAc}$ )。蒸发所述有机层以及进行  $\text{RSF}$  (10–30%  $\text{EtOAc}$ /己烷) 处理从而得到无色油 (888 mg)。将该残余物共蒸发 ( $2 \times 100\text{ mL } \text{CH}_3\text{CN}$ ) 以及不用进一步纯化或性能描述用于下一反应。

(C) 将  $\text{DBU}$  (3 滴) 加入至来自 (B) (以上) 的所述粗产物 (888 mg) 与  $\text{Cl}_3\text{CN}$  (2.0 mL, 20 mmol) 在 1, 2- $\text{DCE}$  (8 mL) 中的溶液中并且搅拌所述合并的混合物 ( $0^\circ \rightarrow$  室温, 1 h)。将所述混合物过滤, 蒸发所述溶剂并且将所述残余物进行  $\text{FC}$  (10–30%  $\text{EtOAc}$ /己烷) 处理从而得到无色油状的所述亚胺酯 (34) (777 mg, 61%, 2 步)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.88 (br s, 1H, NH), 8.10–7.22 (m, 15H, ArH), 6.56 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz, H1), 5.99 (dd, 1H,  $J_{3,4+5}$  9.6 Hz, H4), 5.94–5.88 (m, 2H, H2, 3), 4.44 (ddd, 1H,  $J_{5,6}$  2.8, 5.6 Hz, H5), 3.54 (dd, 1H,  $J_{6,6}$  13.6 Hz, H6), 3.47 (dd, 1H, H6)。  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.61, 165.37, 159.95, 134.00, 133.92, 133.58,

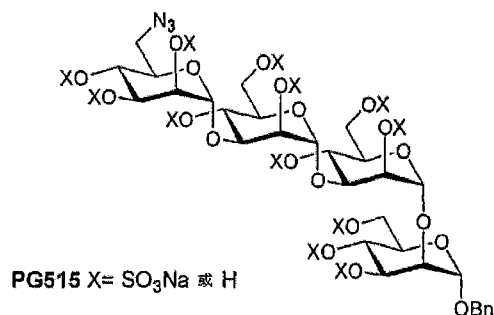
130.25, 130.05, 129.12, 129.04, 128.97, 128.91, 128.76, 128.74, 128.57, 94.62, 73.03, 69.69, 68.90, 67.05, 51.06.



苄基(6-叠氮-6-脱氧- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1 $\rightarrow$ 2)-( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷)(37)

(A) 将所述亚胺酯(34) (93mg, 141  $\mu$ mol)、所述醇(35) (90mg, 94.1  $\mu$ mol) 和分子筛(50mg 的 3Å 粉末)在 1,2-DCE (3mL) 中的混合物用 TMSOTf (10  $\mu$ L, 55.1  $\mu$ mol) 处理并且搅拌所述合并的混合物 (0°  $\rightarrow$  室温, 20 分钟)。引入 Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), 过滤所述混合物以及蒸发所述溶剂。将所述残余物进行 FC (10-40% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述叠氮化物(36) (68 mg, 57%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.80-7.12 (m, 65H, ArH), 6.01 (dd, 1H,  $J_{3,4^{IV},5}$  9.9 Hz, H4<sup>III</sup>), 5.96 (dd, 1H,  $J_{3,4^{IV},5}$  9.9 Hz, H4<sup>I</sup>), 5.92 (dd, 1H,  $J_{3,4^{IV},5}$  9.6 Hz, H4<sup>II</sup>), 5.83 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3Hz, H3<sup>I</sup>), 5.79 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  2.0,  $J_{2,3}$  3.3 Hz, H2<sup>II</sup>), 5.70 (dd, 1H,  $J_{3,4^{IV},5}$  9.9 Hz, H4<sup>IV</sup>), 5.50 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3 Hz, H3<sup>IV</sup>), 5.36 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz, H1<sup>III</sup>), 5.29 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz, H2<sup>III</sup>), 5.23 (d, 1H, H1<sup>II</sup>), 5.18 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz, H2<sup>IV</sup>), 5.16 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz, H1<sup>I</sup>), 4.87 (d, 1H, H1<sup>IV</sup>), 4.72-4.24 (m, 14H, H2<sup>I</sup>, H3<sup>II,III</sup>, H5<sup>I-III</sup>, H6<sup>I-III</sup>), 3.99 (ddd, 1H,  $J_{5,6}$  2.9, 3.4 Hz, H5<sup>IV</sup>), 3.02 (dd, 1H,  $J_{6,6}$  13.5 Hz, H6<sup>IV</sup>), 2.83 (dd, 1H, H6<sup>IV</sup>)。

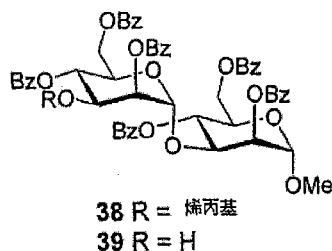
(B) 根据一般方法将所述苯甲酸酯(36) (63mg, 31  $\mu$ mol) 进行酯交换并且将所述残余物进行色谱 (C18, 0-10% MeOH/H<sub>2</sub>O) 处理从而得到无色玻璃状的所述四糖(37) (15mg, 62%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.34-7.22 (m, 5H, ArH), 5.12 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.5 Hz, H1a), 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz, H1b), 5.07 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz, H1c), 4.92 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz, H1d), 4.71, 4.48 (AB 四重峰的 AB,  $J$  11.7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz, H2a), 4.19 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.2 Hz, H2b), 3.96 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.4 Hz, H2c), 3.94 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.4 Hz, H3b), 3.88-3.52 (m, 19H, H2d, H3a, c, d, H4a-d, H5a-d, H6a-d), 3.44 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  6.3,  $J_{6,6}$  10.1 Hz, H6<sup>IV</sup>)。



## PG515

根据一般方法将所述四糖 37 (12 mg, 15.3  $\mu$ mol) 磺化从而在冷冻干燥之后得到 14 mg (38 %, 对于 2 步) 的 PG515. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.47–7.37 (m, 1H, ArH), 5.45–4.02 (m, 29H, C1<sup>I-IV</sup>, 2<sup>I-IV</sup>, 3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, 5<sup>I-IV</sup>, 6a<sup>I-IV</sup>, 6b<sup>I-III</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 3.69–3.67 (m, 1H, H6b<sup>IV</sup>).

## 实施例 10: PG509

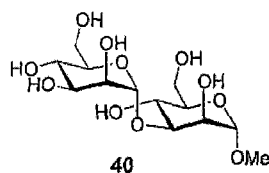


甲基 3-*O*-(2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷 (39)

(A) 将 3-*O*-烯丙基-2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯[26] (410 mg, 0.57 mmol) 与甲基 2, 4, 6-三-*O*-苯甲酰基- $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷[26] (300 mg, 0.51 mmol) 在 1, 2-DCE (6 mL) 中的混合物在分子筛 (700 mg 的 3Å 粉末) 存在下用 TMSOTf (30  $\mu$ L, 0.17 mmol) 处理并且搅拌所述合并的混合物 (0° → 室温, 30 分钟)。引入 Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), 过滤所述混合物以及蒸发所述溶剂。将所述残余物进行 FC (10–50% EtOAc/己烷) 处理从而大概地得到无色油状的二糖 38。

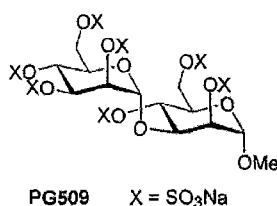
(B) 将 PdCl<sub>2</sub> (40 mg) 加至来自 (A) 的所述产物在 MeOH (10 mL) 与 1, 2-DCE (10 mL) 中的溶液中并且加热所述合并的混合物 (70°, 40 分钟)。蒸发所述溶剂并且将所述残余物进行 FC (10–50% EtOAc/己烷) 处理从而得到无色油状的所述醇 (39) (316 mg, 68%, 2 步)。所述 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 光谱与在文献[26]中已经

报告的那些类似。



甲基(α-D-甘露吡喃糖基)-(1→3)-(α-D-甘露吡喃糖苷) (40)

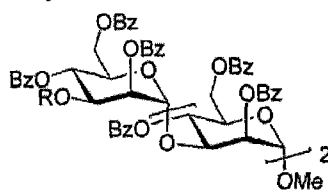
根据一般方法将所述醇(39) (10 mg, 0.10 mmol)进行酯交换从而得到无色油状的所述二糖(40) (3 mg, 85%), 根据文献[30, 31]中报道的NMR确认。



PG509.

根据一般方法将所述二糖 40 (25 mg, 70 μmol)磺化从而在冷冻干燥之后得到 27 mg (36%) 的 PG509。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H1<sup>II</sup>), 4.98 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.4 Hz; H2<sup>II</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.60–4.55 (m, 1H; H3<sup>II</sup>), 4.53 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.3 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.41–4.19 (m, 5H; H4<sup>I</sup>, 4<sup>II</sup>, 6a<sup>I</sup>, 6a<sup>II</sup>, 6b<sup>II</sup>), 4.15 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.3 Hz; H3<sup>I</sup>), 4.06–3.91 (m, 3H; H5<sup>I</sup>, 5<sup>II</sup>, 6b<sup>I</sup>), 3.29 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>)。

#### 实施例 11: PG508



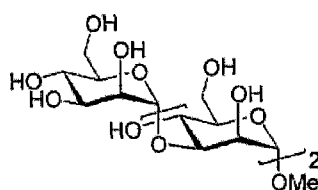
41 R = 烯丙基  
42 R = H

甲基 3-O-[3-O-(2,4,6-三-O-苯甲酰基-α-D-甘露吡喃糖基)-2,4,6-三-O-苯甲酰基-α-D-甘露吡喃糖基]-2,4,6-三-O-苯甲酰基-α-D-甘露吡喃糖苷 (42)

(A) 将 3-O-烯丙基-2,4,6-三-O-苯甲酰基-α-D-甘露吡喃糖基三氯亚氨乙酸酯(269 mg, 0.37 mmol)与所述醇(39) (306 mg, 0.31mmol)在 1,2-DCE(5 mL)中的混合物在分子筛 (100 mg 的 3Å 粉末)的存在下用 TMSOTf (20 μL, 0.11 mmol)

处理并且搅拌所述合并的混合物( $0^{\circ}$  → 室温, 30 分钟)。引入  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ ), 过滤所述混合物以及蒸发所述溶剂。将所述残余物进行 FC (10–50%  $\text{EtOAc}$ /己烷) 处理从而大概地得到无色油状的所述三糖 41。

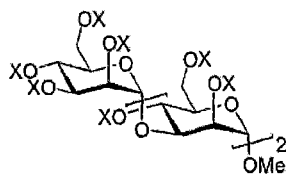
(B) 将  $\text{PdCl}_2$  (40 mg) 加至来自 (A) 的产物在  $\text{MeOH}$  (10 mL) 与 1, 2-DCE (10 mL) 中的溶液中并且加热所述混合物 ( $70^{\circ}$ , 40 分钟)。蒸发所述溶剂并且将所述残余物进行 FC (10–50%  $\text{EtOAc}$ /己烷) 处理从而得到无色油状的所述醇 (42) (316 g, 70%, 2 步)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.14–7.22 (m, 45H, ArH), 6.63 (dd, 1H,  $J_{1\text{III}, 2\text{III}}$  1.8,  $J_{2\text{III}, 3\text{III}}$  3.3 Hz,  $\text{H}^{2\text{III}}$ ), 5.94 (dd, 1H,  $J_{3\text{III}, 4\text{III}}$  10.0,  $J_{4\text{III}, 5\text{III}}$  10.0 Hz,  $\text{H}^{4\text{III}}$ ), 5.84 (dd, 1H,  $J_{3\text{II}, 4\text{II}}$  9.9,  $J_{4\text{II}, 5\text{II}}$  9.9 Hz,  $\text{H}^{4\text{II}}$ ), 5.48 (dd, 1H,  $J_{3\text{I}, 4\text{I}}$  9.8,  $J_{4\text{I}, 5\text{I}}$  9.8 Hz,  $\text{H}^{4\text{I}}$ ), 5.26 (d, 1H,  $J_{1\text{I}, 2\text{I}}$  1.9 Hz,  $\text{H}^{1\text{I}}$ ), 5.22 (dd, 1H,  $J_{1\text{II}, 2\text{II}}$  2.1,  $J_{2\text{II}, 3\text{II}}$  3.0 Hz,  $\text{H}^{2\text{II}}$ ), 4.91 (d, 1H,  $\text{H}^{1\text{III}}$ ), 4.90 (dd, 1H,  $J_{2\text{I}, 3\text{I}}$  3.2 Hz,  $\text{H}^{2\text{I}}$ ), 4.86 (dd, 1H,  $J_{1\text{II}, 2\text{II}}$  1.7 Hz,  $\text{H}^{1\text{II}}$ ), 4.67–4.63 (, 12H,  $\text{H}^{3\text{I}}$ ,  $3^{\text{II}}$ ,  $3^{\text{III}}$ ,  $5^{\text{I}}$ ,  $5^{\text{II}}$ ,  $5^{\text{III}}$ ,  $6^{\text{I}}$ ,  $6^{\text{II}}$ ,  $6^{\text{III}}$ )。  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.49, 166.38, 166.25, 166.07, 165.94, 165.77, 165.63, 165.19, 165.15, 133.80, 133.60, 133.61, 133.58, 133.52, 133.06, 130.22, 130.16, 130.09, 130.05, 130.16, 129.97, 129.9, 129.88, 129.84, 129.51, 129.17, 129.01, 128.85, 128.63, 128.53, 128.5, 128.46, 99.35, 99.24, 98.73, 76.48, 76.12, 72.45, 71.77, 71.64, 69.93, 69.7, 69.01, 68.86, 68.6, 68.53, 67.82, 63.17, 62.79, 62.41, 55.66; ESMS:  $m/z$  1373.4  $[\text{M-Bz}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , 1269.4  $[\text{M-2Bz}+2\text{H}+\text{Na}]^+$ 。



43

甲基 ( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1→3)-( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖基)-(1→3)-( $\alpha$ -D-甘露吡喃糖苷) (43)

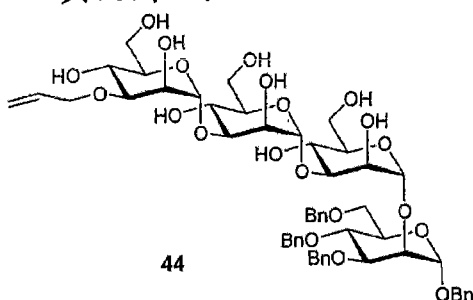
根据一般方法将所述醇 (42) (115 mg, 0.79 mmol) 进行酯交换从而得到无色油状的所述三糖 (43) (35 mg, 86%), 根据文献 [32] 中报道的 NMR 确认。HRMS:  $m/z$  519.1862  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 541.1646  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

PG508 X = SO<sub>3</sub>Na 或 H

PG508.

根据一般方法将所述三糖 43 (25 mg, 49 μmol) 磺化从而在冷冻干燥之后得到 36 mg (49%) 的 PG508。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H1<sup>III</sup>), 5.22 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H1<sup>II</sup>), 5.04 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.4 Hz; H2<sup>III</sup>), 4.89 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.76–4.75 (m, 1H; H2<sup>II</sup>), 4.60–4.55 (m, 1H; H3<sup>III</sup>), 4.55 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.50 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.6,  $J_{4,5}$  9.7 Hz; H4<sup>III</sup>), 4.41–4.12, 4.04–3.91 (m, 12H; H3<sup>II</sup>, 4<sup>I</sup>, 4<sup>II</sup>, 5<sup>I-III</sup>, 6a<sup>I-III</sup>, 6b<sup>I-III</sup>), 4.10 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.5 Hz; H3<sup>I</sup>), 3.29 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>)。

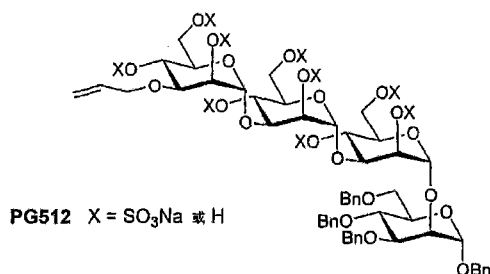
#### 实施例 12: PG512



苄基 (3-*O*-烯丙基-α-D-甘露吡喃糖基)-(1→3)-(α-D-甘露吡喃糖基)-(1→3)-(α-D-甘露吡喃糖基)-(1→2)-(3,4,6-三-*O*-苄基-α-D-甘露吡喃糖苷) (44)

将钠(小片)加入在 MeOH (6 mL) 中的所述九苯甲酸酯 (28) (115 mg, 0.79 mmol) 中以及搅拌所述合并的混合物 (室温, o/n)。将所述混合物中和 (Dowex 50X8, H<sup>+</sup>)，过滤并且将所述滤液浓缩以及进行 FC (0–10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 处理从而得到无色油状的所述四苄基醚 (44) (89 mg, 64%)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 7.33–7.13 (m, 20H, ArH), 6.02–5.92 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.32–5.27, 5.11–5.09 (2m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.4 Hz, H1a), 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.5 Hz, H1b), 5.03 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.2 Hz, H1c), 4.97 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.4 Hz, H1d), 4.74, 4.49 (2d, ABq 的 AB,  $J_{H,H}$  10.9 Hz, PhCH<sub>2</sub>-a), 4.67, 4.48 (2d, ABq 的 AB,  $J_{H,H}$  11.8 Hz, PhCH<sub>2</sub>-b), 4.65, 4.58 (2d, ABq 的 AB,  $J_{H,H}$  11.6 Hz, PhCH<sub>2</sub>-c), 4.57, 4.51 (2d, ABq

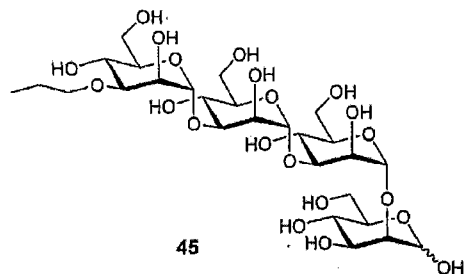
的 AB,  $J_{H,H}$  12.4 Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-d}$ ,  
4.21-3.62 (m, 26H,  $\text{H}_2^{\text{I-IV}}$ ,  $3^{\text{I-IV}}$ ,  $4^{\text{I-IV}}$ ,  $5^{\text{I-IV}}$ ,  $6a^{\text{I-IV}}$ ,  $6b^{\text{I-IV}}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH=}$ ).



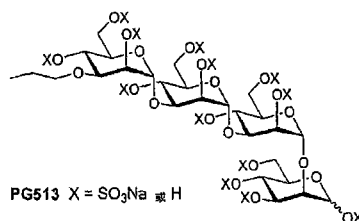
### PG512

根据一般方法将所述四糖 44 (23 mg, 21.5  $\mu\text{mol}$ ) 磺化从而得到无色粉末状的 PG512 (26 mg, 61%)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.32-7.18, 7.00-6.98 (2m, 20H, ArH), 5.88-5.78 (m, 1H,  $\text{CH=CH}_2$ ), 5.30-5.23, 5.08-5.04, 4.91-4.90, 4.83-4.82, 4.71-4.08, 4.00-3.89, 3.73-3.70, 3.62-3.45 (8m, 40H,  $\text{CH=CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ,  $\text{H}_1\text{-6}^{\text{I-IV}}$ ,  $\text{PhCH}_2^{\text{I-IV}}$ ).

### 实施例 13: PG513



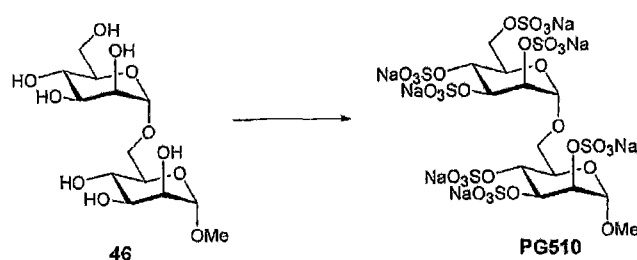
将所述四苄基醚 (44) (62 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) 与  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (10 mg 的 10% 在 C 上) 在 THF (1 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL) 中的混合物在  $\text{H}_2$  (100 p. s. i.) (室温 o/n) 下搅拌。将所述混合物过滤, 浓缩以及进行 FC ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ ) 处理从而得到无色玻璃状的所述丙基醚 (45) (32 mg, 73%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.22 (br s, 1H, H1a), 5.00 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz, H1b), 4.97 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz, H1c), 4.87 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz, H1d), 4.11-4.07, 3.91-3.35 (2m, 26H,  $\text{H}_2^{\text{I-IV}}$ ,  $3^{\text{I-IV}}$ ,  $4^{\text{I-IV}}$ ,  $5^{\text{I-IV}}$ ,  $6a^{\text{I-IV}}$ ,  $6b^{\text{I-IV}}$ ,  $\text{OCH}_2$ ), 1.50-1.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.76 (t, 3H,  $J_{H,H}$  7.2Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).



## PG513

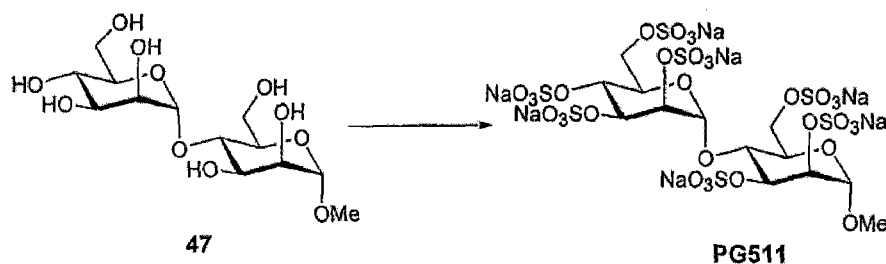
根据一般方法将所述四糖 45 (21 mg, 29.6 μmol) 磺化从而得到无色粉末状的 PG513 (29 mg, 34%)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 5.61 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.3 Hz; H1a), 5.61 (br s, 1H; H1b), 5.32 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H1c), 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1d), 4.90–4.88, 4.77–4.31, 4.23–4.04, 3.98–3.81, 3.57–3.51, 3.41–3.36 (6m, 26H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, H2–6<sup>I–IV</sup>), 1.48–1.39 (m, 1H; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.76 (dd, 1H,  $J_{H,H}$  7.4 Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

## 实施例 14: PG510



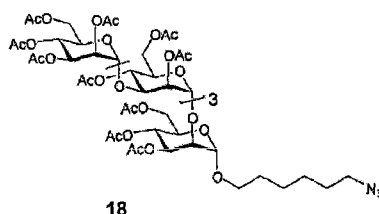
根据一般方法将所述多元醇 46 [31] (22 mg, 61.7 μmol) 磺化从而得到无色粉末状的 PG510 (46 mg, 70%)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1<sup>II</sup>), 4.90 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.78 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz; H2<sup>II</sup>), 4.73 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.64–4.40 (m, 1H; H3<sup>II</sup>), 4.52 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.5 Hz; H3<sup>I</sup>), 4.33–4.30 (m, 2H; H4<sup>II</sup>, 6a<sup>II</sup>), 4.22 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.7 Hz; H4<sup>I</sup>), 4.12–4.04 (m, 2H; H5<sup>II</sup>, 6b<sup>II</sup>), 3.96–3.90 (m, 2H; H5<sup>I</sup>, 6a<sup>I</sup>), 3.76 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  8.6,  $J_{6a,6b}$  11.3 Hz; H6b<sup>I</sup>), 3.31 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>)。

## 实施例 15: PG511



根据一般方法将所述多元醇 47 [31] (20 mg, 56  $\mu\text{mol}$ ) 磺化从而得到无色粉末状的 PG511 (29 mg, 48%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.36 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.2 Hz;  $\text{H1}^{\text{II}}$ ), 4.90 (br s, 1H;  $\text{H2}^{\text{II}}$ ), 4.87 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.1 Hz;  $\text{H1}^{\text{I}}$ ), 4.74 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz;  $\text{H2}^{\text{I}}$ ), 4.58–4.40, 4.29–4.10, 3.88–3.85 (3m, 10H,  $\text{H3-6}^{\text{I,II}}$ ), 3.30 (s, 3H;  $\text{OCH}_3$ )。

#### 实施例 16: PG514

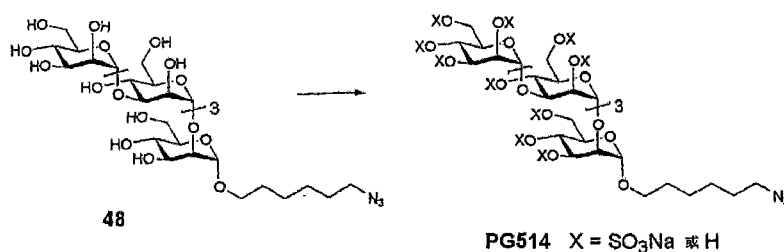


#### 叠氮化物 18

(A) 将三氟化硼二乙基醚化物 (257mg, 1.81mmol) 慢慢地加入至所述全乙酸酯 12 (700mg, 0.453mmol) 与 6-溴-1-己醇 (492.7mg, 2.721mmol) 在 DCE (20mL, 3Å 分子筛) 中的溶液中并且将所述混合物在氩气下在 60°C 搅拌 72 个小时。将所述溶液冷却, 用  $\text{Et}_3\text{N}$  中和, 用 DCM (30mL) 稀释, 用饱和  $\text{NaHCO}_3$  洗涤, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 以及进行闪色谱 (硅胶, 梯度洗脱, 40:60 至 100:0  $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ ) 处理从而提供 340mg (0.204 mmol, 45.0%) 的所述 6-溴己基糖苷。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.25–5.08 (m, 8H), 4.98–4.81 (m, 8H), 4.25–3.70 (m, 19H), 3.607 (dt, 1H,  $J = 9.553$ ,  $J = 6.635$ ,  $\text{OCH}_2\text{A}$ ), 3.354 (dt, 1H,  $J = 9.641$ ,  $J = 6.637$ ,  $\text{OCH}_2\text{B}$ ), 3.33 (t, 2H,  $J = 6.700$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 2.104, 2.096, 2.09, 2.06, 2.043, 2.038, 2.036, 2.033, 2.029, 2.02, 2.01, 1.97, 1.95, 1.94 和 1.90 (16x s, 48H,  $\text{OAc}$ ), 1.85–1.74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.59–1.46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.44–1.35 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.35–1.25 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz): 170.42, 170.41, 170.39, 170.28, 170.16, 170.07, 169.96, 169.94, 169.83, 169.77, 169.58, 169.52, 169.45, 169.36, 169.25 (19x CO), 99.10, 98.83, 98.75, 98.01 (糖-C1), 76.96,

75.00, 74.83, 74.75, 70.96, 70.82, 70.70, 70.08, 69.49, 69.28, 69.16, 68.24, 68.17, 68.04, 67.20, 66.65, 66.60, 66.09, 65.44, 62.41, 62.31, 61.86, 以及 61.54 (糖碳 排除 糖-C1 以及 溴己基-CH<sub>2</sub>O), 33.49, 32.32, 29.43, 28.92, 27.59, 25.12 (6x 溴己基-CH<sub>2</sub>), 20.73, 20.71, 20.68, 20.62, 20.56, 20.47, 20.44, 20.41, (Ac-CH<sub>3</sub>), 13.85 (CH<sub>2</sub>Br)。

(B) 将来自 (A) 的 6-溴己基糖苷 (340mg, 0.204mmol) 与叠氮化钠 (66mg, 1.02mmol) 在 DMF (4mL) 中的溶液在 100°C 加热 48 个小时。所述粗混合物的 TLC 分析显示没有变化。然后加入碘化四丁基铵 (20mg) 并且允许所述混合物进一步反应 48 个小时。将所述粗混合物冷却以及进行闪色谱 (0: 100 至 5: 95 DCM: MeOH) 处理从而提供 21.1mg (0.013 mmol, 6.4%) 的叠氮化物 18。



#### PG514

(A) 在标准 Zemplén 条件下 (2 mL MeOH) 将所述叠氮化物 18 (21.1mg, 0.013 mmol) 脱去乙酰基从而提供 12.6mg (0.013 mmol, 102%) 的多元醇 48。

(B) 根据一般硫酸化的方法用 SO<sub>3</sub>·三甲胺处理所述多元醇 48 (12.6 mg, 13.2 μmol) 从而得到无色粉末状的 PG514 (18.4 mg, 54%)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): 5.40–4.69 (m, 8 H), 4.68–3.41 (m, 27H), 3.22 (t, 2H, *J* = 6.5), 1.51 (br s, 5H), 1.29 (br s, 5H)。

#### 化合物的生物试验

##### 生长因子结合试验

使用基于表面等离子体共振 (SPR) 的溶液亲和力试验来测量配体对于所述生长因子 FGF-1、FGF-2 和 VEGF 的结合亲和力。所述试验的原理是：固定在传感器芯片表面上的肝素区别在所述生长因子与配体的平衡溶液中的游离与结合的生长因子。当注射所述溶液时，所述游离的生长因子与所述固定的肝素相结合，被检测为 SPR 响应的增加以及由此确定其浓度。所述游离生长因子浓

度的减小作为所述配体浓度的函数来计算所述离解常数,  $K_d$ 。重要的是注意当所述相互作用涉及所述 HS 结合位点时, 只能检测到结合至所述生长因子的配体, 因此排除评价非特异性结合至所述蛋白质上的其他位点的可能性。已经假定对于所有的蛋白质: 配体的相互作用是 1:1 的化学计量关系。

对于所述生长因子结合活性的测试, 使用肝素包衣的传感器芯片。已经描述了通过固定生物素化的 BSA-肝素在抗生蛋白链菌素包衣的传感器芯片上的制备。[5] 还已经通过使用己二酸二酰肼或 1,4-二氨基丁烷的醛偶联将肝素固定。对于每个  $K_d$  测量, 溶液被制备为在缓冲液中含有固定浓度的蛋白质以及变化浓度的所述配体。在 HBS-EP 缓冲液 (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA 以及 0.005% (v/v) 聚山梨酸酯 20) 中测量结合至 FGF-1 和 VEGF 的配体, 而在含有 0.3 M NaCl 的 HBS-EP 缓冲液中测量结合至 FGF-2 的配体。[5] 在注射之前, 将样品在 4°C 保持从而使蛋白质的稳定性极大化。对于每个试验混合物, 以 5-40  $\mu\text{L}$ /分钟注射 50-200  $\mu\text{L}$  溶液并且测量相对的结合响应。所有的表面结合试验都在 25°C 进行。通过以 40  $\mu\text{L}$ /分钟注射 40  $\mu\text{L}$  的 4M NaCl 以及接着以 40  $\mu\text{L}$ /分钟注射 40  $\mu\text{L}$  的缓冲液来使所述表面再生。

使用 BIA 评价软件 (BIAcore) 分析传感器克 (sensorgram) 数据。将实验传感器克中减去背景传感器克从而得到具体结合的曲线, 以及接着将所有的曲线的基线调到零位。与所述相对响应值相对的所述注射液的蛋白质浓度相关联的标准曲线是线性的, 这表示所述的结合响应与所述蛋白质的浓度成正比例关系, 以及因此表示所述结合试验是在质量传递的条件下进行的。[34] 因此, 可以使用所述方程式将每个注射液的相对结合响应转变为游离蛋白质的浓度。

$$[P] = \frac{r}{r_m} [P]_{\text{总和}}$$

其中  $r$  是所述相对结合响应以及  $r_m$  是所述最大结合响应。

建立在注射之前的溶液中的结合平衡被假设为 1:1 化学计量关系。因此, 对于所述平衡,



其中  $P$  相当于所述生长因子蛋白质,  $L$  是所述配体, 以及  $P \cdot L$  是所述蛋白质: 配体复合物, 所述平衡方程式是

$$K_d = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]}$$

以及所述结合方程式[5]可以被表示为

$$[P] = [P]_{\text{总和}} - \frac{(K_d + [L]_{\text{总和}} + [P]_{\text{总和}})}{2} + \sqrt{\frac{(K_d + [L]_{\text{总和}} + [P]_{\text{总和}})^2}{4} - [L]_{\text{总和}}[P]_{\text{总和}}}$$

给出的  $K_d$  值是使用所述结合方程式时符合于  $[P]$  对  $[L]_{\text{总计}}$  的区域的值。其中  $K_d$  值被双份测量，所述值表示所述重复测量的平均值。已经表明紧密结合至这些生长因子的 GAG 模拟物，例如，PI-88，在体内产生生物效应。[5]

### 类肝素酶抑制试验

使用 Microcon 超滤试验来进行所述类肝素酶试验。所述试验依赖于已经被来自天然 HS 的类肝素酶消化了的物理上分离的硫酸乙酰肝素 (HS) 的原理从而确定类肝素酶活性。所述试验使用超滤装置 (Microcon YM-10) 从而分离更小的来自天然 HS 的被类肝素酶分解的 HS 片段。

以 90  $\mu\text{L}$  的体积建立反应，

40 mM 乙酸盐缓冲液 (pH 5.0)

0.1 mg/mL BSA

90 ng 类肝素酶

2.5  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$  标记的 HS

各种浓度的抑制剂。

以所有组分建立所述反应，除所述  $^3\text{H}$  标记的 HS 外，以及使其在 22°C 平衡 10 分钟。然后通过加入所述 HS 开始所述试验并且立即取出 20  $\mu\text{L}$ ，将其与 80  $\mu\text{L}$  的 10 mM 磷酸盐 (pH 7.0) 混合并且将所述 100  $\mu\text{L}$  转移入 Microcon YM-10 集中器中，然后将其以大约 14000g 离心 5 分钟。保留通过所述膜的溶液 (滤液)。将该样品定为所述时间=0 的样品。使所述试验 (目前体积为 70  $\mu\text{L}$ ) 在 22°C 反应 2.5 个小时然后对于每个试验的三个 20  $\mu\text{L}$  等分重复所述过滤步骤。

计算所述时间=0 滤液以及所述三个 2.5 小时滤液样品的  $^3\text{H}$ 。在所述时间=0 与所述平均的 2.5 小时样品之间的差异给出类肝素酶活性的量。所有抑制试验都以类肝素酶标准试验运行，这与以上的试验组分相一致除了不存在抑制剂外以及通过与该标准相比确定所述在另一个试验中的类肝素酶抑制的量。在该试验中的 PI-88 的  $\text{IC}_{50}$  是 0.98  $\mu\text{M}$ 。

抗病毒试验

始终使用非洲绿猴肾细胞的单层培养物 [35] 与单纯疱疹病毒 (HSV-1) KOS321 株 [36]。如 Nyberg 等人所描述的进行所述化合物的抗病毒试验。 [13] 简要地, 通过混合连续五倍稀释的化合物 (在 0. 032-20  $\mu$ M) 与所述病毒的大约 200 噬菌斑形成单位来测试所述化合物对外源加入的病毒对细胞的传染的效果。接着在室温下培养所述病毒和化合物 10 分钟, 将所述混合物加入至所述细胞并且在 37 $^{\circ}$ C 将其留在所述细胞单层上 2 个小时。接着, 抽出所述接种物并且用在 Eagle's 极限必需培养基 (EMEM) 中的 1% 甲基纤维素溶液的重叠培养基替换。以 1% 结晶紫溶液将在 37 $^{\circ}$ C 培养细胞 3 天之后所生成的所述病毒噬菌斑进行染色并且计算。通过用 HSV-1 传染它们之后向细胞中加入在所述无血清重叠培养基中的连续五倍稀释的化合物 (在 0. 032-20  $\mu$ M) 来测试所述化合物对 HSV-1 的细胞向细胞传播的效果。在 37 $^{\circ}$ C 培养所述化合物与所述细胞 3 天之后, 得到 20 噬菌斑的图像并且使用 IM500 软件 (Leica) 进行面积测定。细胞的病毒感染的结果以及病毒的细胞向细胞传播的结果分别显示于图 1A 和 1B 中, 而所衍生的 IC<sub>50</sub> 值列于表 1 中。

结果

如在前部分所述的测试的结果列于表 1 中。

表 1

| 化合物   | K <sub>a</sub> FGF<br>(pM) | K <sub>b</sub> FGF<br>(nM) | K <sub>a</sub> VEGF<br>(nM) | 类肝素酶<br>抑制<br>(IC <sub>50</sub> , $\mu$ M) | HSV-1<br>传染<br>(IC <sub>50</sub> , $\mu$ M) | HSV-1 细胞-向-<br>细胞传播<br>(IC <sub>50</sub> , $\mu$ M) |
|-------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| PG500 | 120 $\pm$ 25               | 86 $\pm$ 7                 | 1. 72 $\pm$ 0. 19           | 1. 83 $\pm$ 0. 483                         | 2                                           | 1                                                   |
| PG501 | 144 $\pm$ 8                | 68. 3 $\pm$ 2. 9           | 1. 67 $\pm$ 0. 11           | 1. 64 $\pm$ 0. 406                         | 1                                           | 0. 4                                                |
| PG502 | 660 $\pm$ 40               | 112 $\pm$ 9                | 7. 1 $\pm$ 0. 6             | 2. 02 $\pm$ 0. 284                         | 7                                           | 5                                                   |
| PG503 | 390 $\pm$ 70               | 84 $\pm$ 8                 | 7. 2 $\pm$ 0. 6             | 1. 85 $\pm$ 0. 311                         | 2                                           | 3                                                   |
| PG504 | 361 $\pm$ 28               | 150 $\pm$ 9                | 8. 1 $\pm$ 0. 6             | 6. 03 $\pm$ 1. 05                          | 未测试                                         | 11                                                  |
| PG505 | 1960 $\pm$ 300             | 137 $\pm$ 12               | 4. 8 $\pm$ 0. 4             | 1. 04 $\pm$ 0. 147                         | 3                                           | 6                                                   |
| PG506 | 88 $\pm$ 17                | 114 $\pm$ 13               | 3. 5 $\pm$ 0. 8             | 2. 12 $\pm$ 0. 152                         | 10                                          | 7                                                   |

## 药代动力学评价

### 制备 [ $^{35}\text{S}$ ]-标记的化合物

在真空下用  $\text{P}_2\text{O}_5$  将所述 PG500、501、503、504、506 和 PI-88 的多元醇前体(每个 2mg)干燥 3 天。向每个小瓶中倾入 1.77mg (2.0 mCi)  $^{35}\text{SO}_3 \cdot \text{吡啶复合物}$  与 2mg  $\text{SO}_3 \cdot \text{Me}_3\text{N}$  在 300  $\mu\text{L}$  无水 DMF (Aldrich, 使用新开始的 3A 分子筛重新干燥) 中的储备溶液 50  $\mu\text{L}$ 。向所述  $\text{SO}_3$  小瓶中再加入 600  $\mu\text{L}$  无水 DMF 并且分配给每个样品小瓶。将所述样品加热至  $60^\circ$  持续 66 个小时。向每个容器中加入  $\text{SO}_3 \cdot \text{Me}_3\text{N}$  (14 mg, 在 300  $\mu\text{L}$  无水 DMF 中) 并且将所得到的溶液加热至  $60^\circ$  过夜。将所述小瓶冷却至室温并且在  $-80^\circ\text{C}$  储存等待纯化。

通过加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (被调节至 pH 8-9 的饱和水溶液) 将每个样品猝灭, 蒸干并且进行 SEC (Biogel P2,  $2.6 \times 90 \text{ cm}$ , 流速为 30 mL/小时, 5 分钟/份) 处理。使用盖格-弥勒计数器并且之后用 CE 的 DMB 测试来检测含有所需材料的部份。所述结果总结于表 2 中。

表 2: 放射标记试验结果的总结

| 化合物   | 分离的量(mg) | 放射化学试剂纯度 | 比活度( $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) |
|-------|----------|----------|---------------------------------|
| PI-88 | 2.8      | 99.0%    | 38.01                           |
| PG500 | 2.1      | 98.7%    | 29.19                           |
| PG501 | 1.7      | 98.0%    | 6.56                            |
| PG503 | 1.0      | 99.2%    | 5.49                            |
| PG504 | 5.0      | 98.3%    | 6.47                            |
| PG506 | 3.6      | 99.0%    | 26.23                           |

### 药代动力学研究

使用雄性 Sprague Dawley 大鼠(250-350 g)。使所述动物在所述试验之前和期间自由获取食物和水,在此期间它们在代谢试验笼中保持不受约束。用异氟烷(Forthane<sup>®</sup>)使大鼠麻醉。通过在颈部的切口在外颈静脉中插入导管,以及在皮下通至在背部皮肤的第二个切口(肩胛骨的中线附近)。然后在轻金属弹簧的保护下将此由腹取出。闭合所述切口并且将所述弹簧固定到所述具有 Michel 缝合的皮肤上从而使得所述大鼠具有最大的运动范围。在恢复(1-4 个小时)期间小心地监控所述动物。

通过混合适量的未标记的以及放射性同位素标记的药物(溶于磷酸缓冲盐水中的)从而得到 1.25 mg/mL 的总药物浓度来制备储备剂量溶液。以 2 mL/kg 的剂量体积作为 2.5 mg/kg 的丸剂静脉注射液来施用所有剂量。向每个大鼠给药的放射性活度的总量是 0.5-10  $\mu\text{Ci}$ 。用于该研究的剂量水平比先前建立用于 PI-88 的急性毒性的无效果剂量低 10 倍。在施用剂量前以及在施用剂量之后 5、15、30、45 分钟,以及 1、1.5、2、4、8、12、24、36 和 48 个小时收集血液样品( $\sim 250 \mu\text{L}$ )。将所述血液样品立即离心并且收集所述血浆。在完成所述试验时,通过致命过量的 IV 戊巴比妥麻醉剂(Nembutal<sup>®</sup>)处死所述动物。以施用剂量之后 0-12 h、12-24 h 以及 24-48 h 的间隔收集每个动物的尿液。并且收集笼子洗涤物( $\sim 15 \text{ mL}$  去离子水)。在实验结束时,将每个动物的膀胱内的物质抽出并且加入至所述 24-48 h 排泄物中。用与所述尿液相同的时间间隔来收集粪便。

将血浆(100  $\mu$ L)、尿液与笼子洗涤物(500  $\mu$ L)的等分试样直接地转移至 6 mL 聚丙烯闪烁管中用于测定放射性活度。将在每次周期(从给一个动物服用每个化合物)期间收集的粪便称重并且使用机械匀浆器在 4 体积的去离子水中均化。将大约 1 g(精确称重的)该浆液转移至 20 mL 玻璃闪烁管中,加入 2 mL 组织溶解剂并且将所述小瓶加盖以及在 60°C 培养至少 24 个小时。在混合样品与帕卡德最终金色液体闪烁计数鸡尾酒(Packard Ultima Gold liquid scintillation counting cocktail)(对于血浆和剂量是 2.0 mL,对于尿液以及笼子洗涤物是 5.0 mL,对于粪便是 10 mL)之后,测量放射性活度。在 Packard Tr-Carb 液体闪烁计数器上进行计数。任何小于所述背景三倍的结果被认为是小于数量的下限,在计算中不使用。在收集的 5 天之内以三倍计算血浆、尿液以及笼子洗涤物并且不对放射性化学衰减做出修正。在所述研究完成时处理作为一批的粪便并且将来自这些样品的计数对放射性化学衰减进行修正。使用 PK Solutions 2.0 软件(Summit Research Services, Ohio)计算血浆药代动力学参数并且列在表 3 中。

表 3

在对雄性 Sprague Dawley 大鼠 iv 给药之后确定的 <sup>35</sup>S-标记的化合物的药代动力学参数

|                                                | PI-88         | PG500         | PG501         | PG503                   | PG504         | PG506                  |
|------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------|---------------|------------------------|
| n                                              | 4             | 4             | 4             | 4                       | 4             | 4                      |
| C <sub>0</sub>                                 | 17.7 ± 2.23   | 20.5 ± 1.3    | 35.6 ± 3.1    | 14.0 ± 0.84             | 30.5 ± 2.3    | 17.1 ± 1.8             |
| (μg-eq/mL)                                     |               |               |               |                         |               |                        |
| AUC <sub>0-12h</sub>                           | 9.6 ± 1.9     | 12.6 ± 1.2    | 29.7 ± 3.4    | 6.5 ± 0.4 <sup>b</sup>  | 14.7 ± 1.2    | 6.2 ± 1.0 <sup>a</sup> |
| (μg-eq/h·mL)                                   |               |               |               |                         |               |                        |
| t <sub>1/2</sub> <sup>a</sup> (h) <sup>c</sup> | 0.83 ± 0.09   | 0.83 ± 0.02   | 1.10 ± 0.09   | 0.79 ± 0.03             | 2.81 ± 0.04   | 0.59 ± 0.01            |
| k <sup>a</sup> (h <sup>-1</sup> )              | 0.844 ± 0.096 | 0.836 ± 0.024 | 0.633 ± 0.053 | 0.879 ± 0.028           | 0.247 ± 0.003 | 1.17 ± 0.024           |
| Cl <sup>a</sup> (mL/h/kg)                      | 250 ± 27.6    | 199 ± 13.2    | 83.6 ± 9.1    | 380 ± 24.3 <sup>b</sup> | 172 ± 11.8    | 404 ± 59.5             |
| Vd <sup>a</sup> (mL)                           | 43.1 ± 1.9    | 38.4 ± 3.8    | 22.9 ± 2.2    | 55.1 ± 2.6              | 24.9 ± 2.9    | 44.5 ± 4.5             |
| 尿液回收                                           | 59.1 ± 13.1   | 39.3 ± 5.5    | 41.8 ± 1.5    | 80.5 ± 3.9              | 66.5 ± 9.4    | 79.1 ± 3.6             |
| (% 剂量)                                         |               |               |               |                         |               |                        |

\*表观值

<sup>a</sup>仅计算以施用剂量后 0-8 小时间隔的。

<sup>b</sup>仅计算以施用剂量后 0-4 小时间隔的。

<sup>c</sup>计算对于 PI-88、PG500、PG501、PG503 和 PG506 以施用剂量后 0.75-4.0 小时间隔的；计算对于 PG504 以施用剂量后 4.0-12 小时间隔的。

列在表 1 中的结果表明通过本发明所包括的广泛范围的化合物具有类肝素酶抑制活性并且对于 GAG 结合生长因子具有强亲和力并且因此可以用与 PI-88 类似的方式作为这样的因子的活性调节剂。此外,所述化合物具有与 PI-88 类似的抗病毒活性。列在表 3 的结果说明所述化合物与 PI-88 相比具有改变了的药代动力学性质。

上述实施方案仅是对本发明的原理的说明,并且各种修饰和变化对于本领域熟练技术人员而言将是显而易见的。本发明能够以各种方式以及用其它实施方案进行实施和执行。还可以理解的是在此使用的术语是以说明为目的并不应被认为是用于限制。

所述术语“包含”以及该术语的变化形式例如“包含(s)”或“包含(ing)”在此被用于表示状态的整体包含物或状态的整体而不是排除任何其他整体或任何其他整体,除非在所述上下文或使用中要求了所述术语的专有的解释。

任何对于在本说明书中引用的出版物的参考不是允许所述公开的内容形成在澳大利亚公共的常识。

## 参考文献

- [1] Parish, C. R.; Freeman, C.; Brown, K. J.; Francis, D. J.; Cowden, W. B. *Cancer Res.* 1999, *59*, 3433.
- [2] Parish, C. R.; Cowden, W. B. 6,143, 730, 2000.
- [3] Iversen, P. O.; Sorenson, D. R.; Benestad, H. B. *Leukemia* 2002, *16*, 376.
- [4] Ferro, V.; Don, R. *Australas. Biotechnol.* 2003, *13*, 38.
- [5] Cochran, S.; Li, C.; Fairweather, J. K.; Kett, W. C.; Coombe, D. R.; Ferro, V. *J Med. Chem.* 2003, *46*, 4601.
- [6] Vlodavsky, I.; Friedmann, Y. *J. Clin. Invest.* 2001, *108*, 341.
- [7] Parish, C. R.; Freeman, C.; Hulett, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, *1471*, M99.
- [8] Wall, D.; Douglas, S.; Ferro, V.; Cowden, W.; Parish, C. *Thromb. Res.* 2001, *103*, 325.
- [9] Demir, M.; Iqbal, O.; Hoppensteadt, D. A.; Piccolo, P.; Ahmad, S.; Schultz, C. L.; Linhardt, R. J.; Fareed, J. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2001, *7*, 131.
- [10] Hembrough, T. A.; Ruiz, J. F.; Papathanassiou, A. E.; Green, S. J.; Strickland, D. K. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 12241.
- [11] Amirkhosravi, A.; Meyer, T.; Chang, J. Y.; Amaya, M.; Siddiqui, F.; Desai, H.; Francis, J. L. *Thromb. Haemost.* 2002, *87*, 930.
- [12] Francis, D. J.; Parish, C. R.; McGarry, M.; Santiago, F. S.; Lowe, H. C.; Brown, K. J.; Bingley, J. A.; Hayward, I. P.; Cowden, W. B.; Campbell, J. H.; Campbell, G. R.; Chesterman, C. N.; Khachigian, L. M. *Circ. Res.* 2003, *92*, e70.
- [13] Nyberg, K.; Ekblad, M.; Bergström, T.; Freeman, C.; Parish, C. R.; Ferro, V.; Trybala, E. *Antiviral Res.* 2004, *63*, 15.
- [14] Levidiotis, V.; Freeman, C.; Punler, M.; Martinello, P.; Creese, B.; Ferro, V.; van der Vlag, J.; Berden, J. H. M.; Parish, C. R.; Power, D. A. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, *15*, 2882.
- [15] Ferro, V.; Li, C.; Fewings, K.; Palermo, M. C.; Linhardt, R. J.; Toida, T. *Carbohydr. Res.* 2002, *337*, 139.

- [16] Yu, G.; Gunay, N. S.; Linhardt, R. J.; Toida, T.; Fareed, J.; Hoppensteadt, D. A.; Shadid, H.; Ferro, V.; Li, C.; Fewings, K.; Palermo, M. C.; Podger, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37, 783.
- [17] Ferro, V.; Fewings, K.; Palermo, M. C.; Li, C. *Carbohydr. Res.* 2001, 332, 183.
- [18] Parolis, L. A. S.; Parolis, H.; Kenne, L.; Meldal, M.; Bock, K. *Carbohydr. Res.* 1998, 309, 77.
- [19] Gunay, N. S.; Linhardt, R. J. *Planta Med.* 1999, 65, 301.
- [20] Ferro, V.; Hammond, E.; Fairweather, J. K. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 159.
- [21] Alban, S.; Franz, G. *Biomacromolecules* 2001, 2, 354.
- [22] Foxall, C.; Wei, Z.; Schaefer, M. E.; Casabonne, M.; Fugedi, P.; Peto, C.; Castellot, J. J., Jr; Brandley, B. K. *J. Cell. Physiol.* 1996, 168, 657.
- [23] Fugedi, P.; Tyrrell, D. J.; Tressler, R. J.; Stack, R. J.; Ishihara, M. 5, 739, 115, 1998.
- [24] Katsuraya, K.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Uryu, T. *Carbohydr. Res.* 1999, 315, 234.
- [25] Wessel, H. P. *Topics Curr. Chem.* 1997, 187, 215.
- [26] Chen, L.; Kong, F. *J. Carbohydr. Chem.* 2002, 21, 341.
- [27] Mori, M.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* 1989, 192, 131.
- [28] Kerekgyarto, J.; Kamerling, J. P.; Bouwstra, J. B.; Vliegthart, J. F.; Liptak, A. *Carbohydr. Res.* 1989, 186, 51.
- [29] Jacobsen, S. *Acta Chem. Scand. Ser. B, Org Chem. Biochem.* 1984, B38, 157.
- [30] Ogawa, T.; Sasajima. *Carbohydr. Res.* 1981, 93, 53.
- [31] Ogawa, T.; Sasajima. *Carbohydr. Res.* 1981, 97, 205.
- [32] Garegg, P. J.; Olsson, L.; Oscarson, S. *Bioorg Med. Chem.* 1996, 4, 1867.
- [33] Fairweather, J. K.; Karoli, T.; Ferro, V. *Bioorg Med. Chem.* 2004, 12, 6063.
- [34] Karlsson, R.; Roos, H.; Fägerstam, L.; Persson, B. *Methods*

---

1994, 6, 99.

[35] Guna1p, A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, 118, 185.

[36] Holland, T. C.; Homa, F. L.; Marlin, S. D.; Levine, M.; Glorioso, J. *J Virol.* 1984, 52, 566.

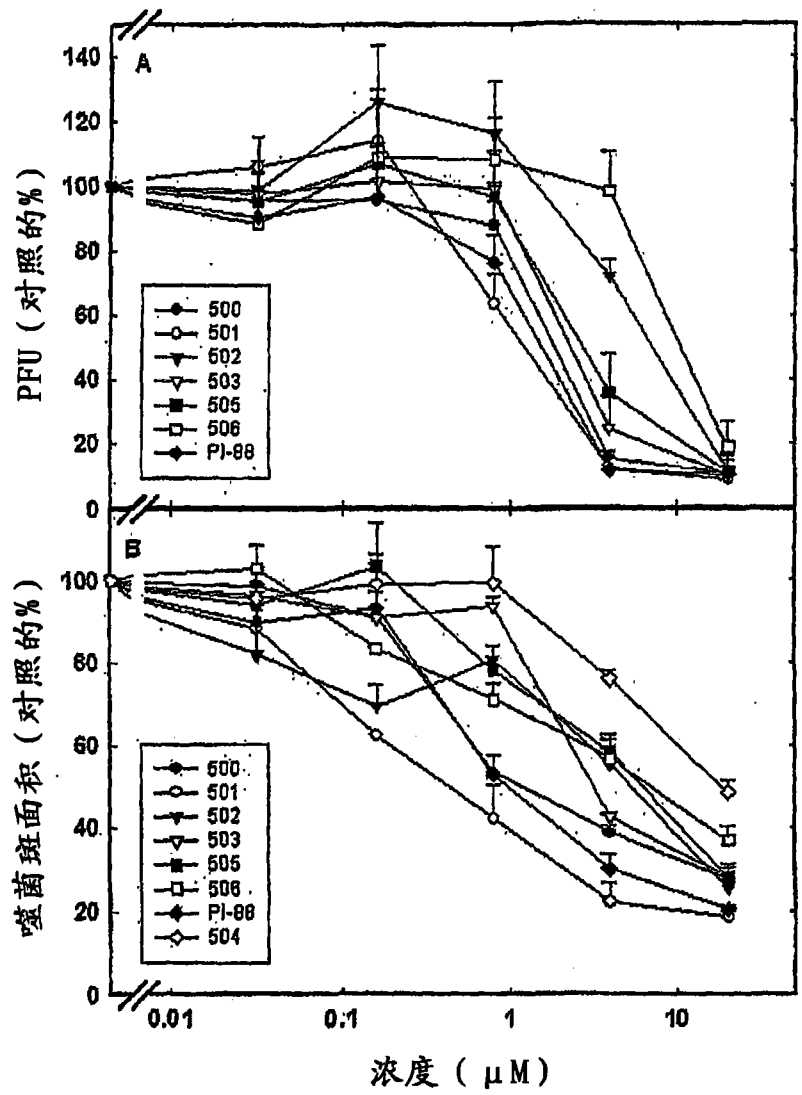


图1