

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 7 月 6 日 (06.07.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/113197 A1

- (51) 国际专利分类号:
C08B 37/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/099901
- (22) 国际申请日: 2015 年 12 月 30 日 (30.12.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳市海普瑞药业集团股份有限公司 (SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区松坪山朗山路 21 号, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 李铿 (LI, Li); 中国广东省深圳市南山区松坪山朗山路 21 号, Guangdong 518057 (CN)。 马小来 (MA, Xiaolai); 中国广东省深圳市南山区高新中一道 19 号, Guangdong 518057 (CN)。 田方方 (TIAN, Fangfang); 中国广东省深圳市南山区高新中一道 19 号, Guangdong 518057 (CN)。 杜媛媛 (DU, Yuanyuan); 中国广东省深圳市南山区高新中一道 19 号, Guangdong 518057 (CN)。 杜宏银 (DU, Hongyin); 中国广东省深圳市南山区高新中一道 19 号, Guangdong 518057 (CN)。

dong 518057 (CN)。 刘亚晗 (LIU, Yahan); 中国广东省深圳市南山区高新中一道 19 号, Guangdong 518057 (CN)。

- (74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层, Beijing 100036 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: SULFATED HEPARIN OLIGOSACCHARIDE AND PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用

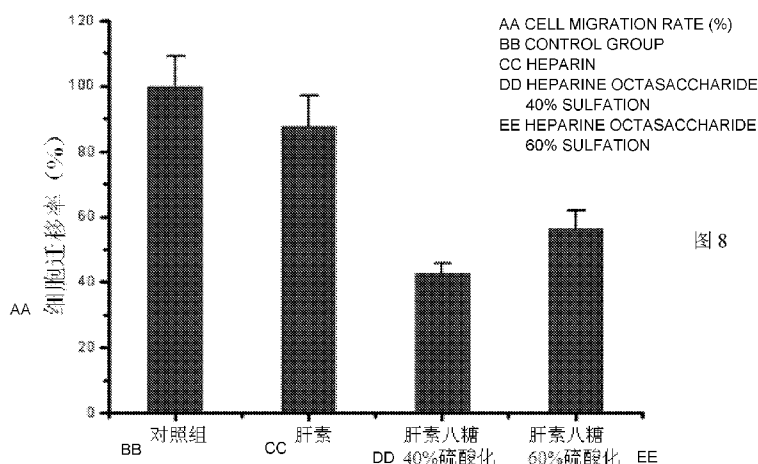


图 8

(57) Abstract: Provided are a sulfated heparin oligosaccharide as well as a preparation method and an application thereof. The sulfated heparin oligosaccharide is characterized in that a non-reducing end of a molecule of the sulfated heparin oligosaccharide contains an unsaturated double bond resulting from enzymolysis by heparinase, as well as a uronic acid derivative and a glycosylamine derivative; the sulfated heparin oligosaccharide has a structure represented by formula I, wherein $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_a, R_b, R_c$ and R_d are independently SO_3^- or H; R_x', R_y' and R_z' are independently $COCH_3$ or SO_3^- , and n is 1-3. The preparation method obtains a sulfated oligosaccharide with a controllable degree of sulfation. The sulfated heparin oligosaccharide has a high activity for inhibiting heparanase in vitro, with an activity 4-5 times higher than that of heparin for inhibiting cell adhesion and migration, and an activity 2-3 times higher than that of heparin for resisting tumor metastasis in mice, thus having a relatively good effect in resisting tumor metastasis and a relatively high specificity.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2017/113197 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, **本国际公布:**

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用，其特征在于，所述硫酸化肝素寡糖分子的非还原端含有由肝素酶酶解产生的不饱和双键，含有糖醛酸衍生物和糖胺衍生物，其具有式 I 所示结构，其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 独立地为 SO_3^- 或 H； R_x' 、 R_y' 和 R_z' 独立地为 $COCH_3$ 或 SO_3^- ， n 为 1-3。所述制备方法制备得到硫酸化程度可控的硫酸化寡糖，其体外抑制乙酰肝素酶活性高，抑制细胞粘附和迁移的活性高出肝素 4-5 倍，小鼠体内抗肿瘤转移的活性高出肝素 2-3 倍，具有较好的抗肿瘤转移效果和较高的特异性。

硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于抗肿瘤药物领域，涉及一种硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用。

背景技术

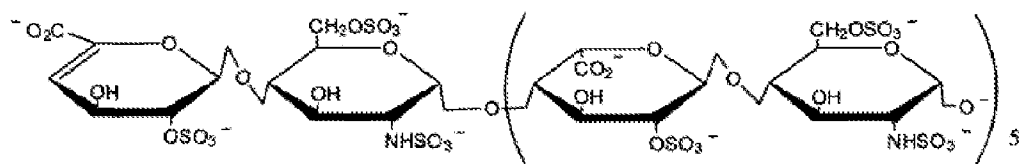
肿瘤是人类健康的重大威胁，更严重的是，肝癌、肺癌等恶性肿瘤易发生转移，目前尚无抑制肿瘤转移的药物，导致肿瘤转移治疗困难，使肿瘤转移成为肿瘤患者死亡的最重要原因。肿瘤细胞要实现侵袭和迁移，有两个过程非常关键：一是突破由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基膜(basement membrane, BM)构成的屏障，二是形成新生血管。ECM 和 BM 是肿瘤细胞侵袭及转移的屏障，恶性肿瘤细胞要实现扩散和转移，必须穿过 ECM 及 BM 进入循环。在这个过程中 ECM 各种成分和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)的降解必不可少。乙酰肝素酶(heparanase, HPA)是目前发现的哺乳动物体内唯一能切割硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)的内切- β -D-葡萄糖醛酸酶。HPA 识别 HS 的特异结构，不完全切割 HS 侧链，只在某些位点切割 HS 侧链的糖苷键，将其降解为 10-15 个糖单位大小的短糖链。另外，HS 侧链可以结合很多生物活性分子如生长因子、细胞因子、趋化因子、成形素和凝血蛋白等。HPA 通过降解 HS 释放活性生长因子，这些生长因子能促进肿瘤血管生成、肿瘤生长、侵袭和转移。因此，HPA 对肿瘤细胞的侵袭和转移具有重要作用，而 HPA 抑制剂的研究和筛选已成为人类寻找癌症治疗潜在药物的新方向。

长期以来的临床证据显示肝素具有抗肿瘤功能，且近年来低分子肝素辅助

抗肿瘤正在开展临床试验。经过长期的研究，肝素的抗肿瘤作用在业界已得到普遍的认识和认可，肝素的抗肿瘤可能主要是通过抑制肿瘤转移进行体现，更进一步体现为抑制体内乙酰肝素酶的活性。

肝素作为传统抗凝血药，其抗凝血活性是主要用途，但其结构的多样性导致其具有多种生物活性。在肝素的非抗凝应用中，其抗凝血活性是常见的和中药的副作用。因此，肝素的抗凝活性是其抗肿瘤转移方面应用的一个重大不利因素，容易引起出血等副作用。肝素的非抗凝活性应用中一个重要的研究方面就是在保留肝素基本结构的基础上，破坏其抗凝血活性。在抗肿瘤转移方面，肝素的乙酰肝素酶抑制活性较高，但细胞层次上对肿瘤生长抑制、肿瘤细胞侵袭和粘附的抑制活性都不显著，在抗肿瘤转移小鼠实验中结果较差，不能显著的抑制肿瘤转移的发生。其中主要的原因可能是肝素的特异性不高，可以和多种内源性物质发生作用，降低了与乙酰肝素酶结合的能力。

CN101824100A 公开了具有如下结构式的肝素寡糖十二聚体：



该肝素

寡糖十二聚体具有抗血管平滑肌细胞增殖的用途。但是该发明的寡糖并不具有显著的抑制肿瘤细胞粘附和迁移的能力。

CN 104764847A 公开了含 N-乙酰化结构肝素寡糖的制备方法，在该对比文件中公开了以下 4 种六糖和 3 种八糖片段：

- dp6a $\triangle$ HexA-GlcNS-HexA-GlcNS-HexA2S-GlcNS6S ;
 dp6b $\triangle$ HexA2S-GlcNS6S- HexA2S-GlcNAc- HexA 2S-GlcNS6S ;
 dp6c $\triangle$ HexA-GlcNS6S-HexA-GlcNAc6S-HexA2S-GlcNS6S ;
 dp6d $\triangle$ HexA-GlcNS6S- HexA 2S-GlcNAc6S- HexA 2S-GlcNS6S ;
 dp8a $\triangle$ HexA2S-GlcNS-[HexA2S-GlcNAc-HexA-GlcNS]-HexA2S-GlcNS6S ;
 dp8b $\triangle$ HexA2S-GlcNS6S-[HexA2S-GlcNAc-HexA-GlcNS]-HexA2S-GlcNS6S ;
 dp8c $\triangle$ HexA2S-GlcNS6S-[HexA 2S-GlcNAc- HexA-GlcNAc6S]- HexA 2S-GlcNS6S ;

该发明仅是解决了含 N-乙酰化结构肝素寡糖难制备以及结构测定问题，在抑制体内乙酰肝素酶的活性方面并无显著改善。

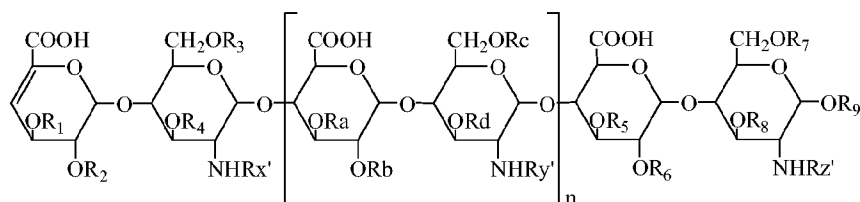
因此，在本领域中，期望能够得到一种具有抑制体内乙酰肝素酶活性，并能降低其抗凝血活性的肝素寡糖。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用。

为达到此发明目的，本发明采用以下技术方案：

第一方面，本发明提供一种硫酸化肝素寡糖，所述硫酸化肝素寡糖分子的非还原端含有由肝素酶酶解产生的不饱和双键，含有糖醛酸衍生物和糖胺衍生物，其具有式 I 所示结构：



式 I

其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 独立地为 SO_3^- 或 H； R_x' 、 R_y' 和 R_z' 独立地为 COCH_3 或 SO_3^- ， n 为 1-3。

在本发明中 n 为 1-3，即为 1、2 或 3，当 $n=1$ 时，所述硫酸化肝素寡糖为硫酸肝素六糖，当 $n=2$ 时，所述硫酸化肝素寡糖为硫酸肝素八糖，当 $n=3$ 时，所

述硫酸化肝素寡糖为硫酸肝素十糖。

在本发明硫酸化肝素寡糖的结构中有双键，所以该硫酸化肝素寡糖在紫外区 232nm 附近有较强的吸收峰，可以非常方便的用于肝素寡糖的定性和定量检测。

本发明的硫酸肝素寡糖具有良好的乙酰肝素酶抑制活性和抑制肿瘤转移活性，其糖链较短，分子量小，完全没有抗凝血活性，同时硫酸化肝素寡糖具有较高的特异性，能特异性的抑制乙酰肝素酶，抑制肿瘤转移。

在本发明所述的硫酸化肝素寡糖中，式 I 中平均每个双糖单元中磺酸基个数不少于 2 个，例如平均每个双糖单元中磺酸基个数可以为 2 个、3 个、4 个或 5 个，平均每个双糖单元中乙酰基不多于 0.5 个，例如可以是 0.5 个或 0.4 个，平均每个双糖单元的葡萄糖胺 6-位和 3-位磺酸基都不少于 0.5 个，例如可以是 0.5 个、0.8 个、1 个、1.5 个或 2 个。

所述每个双糖单元中基团（例如磺酸基、乙酰基或葡萄糖胺 6-位和 3-位磺酸基）的个数是指以整个肝素寡糖中磺酸基的个数平均到每个双糖单元所得到的个数，例如如果硫酸化肝素八糖中有共有 2 个乙酰基，则平均到每个双糖单元中乙酰基的数量为 0.5 个。

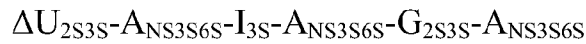
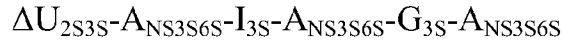
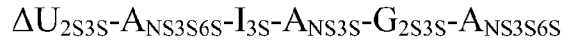
优选地，式 I 中糖醛酸为葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸。

优选地，与式 I 中所含羧基和/或磺酸基成盐的阳离子选自 Na^+ 、 K^+ 或 Ca^{2+} 。

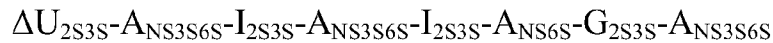
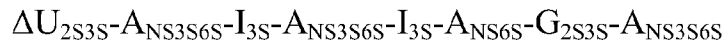
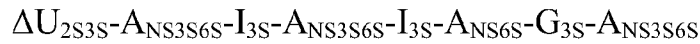
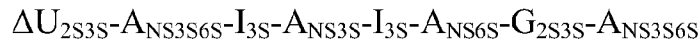
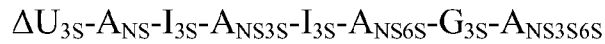
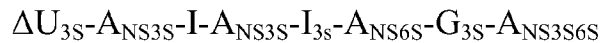
上述结构式中，葡萄糖醛酸中的羧基或者磺酸基都带有负电荷，因此一般要与一些阳离子成盐，通常是 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 。

优选地，所述硫酸化肝素寡糖为具有以下结构的化合物中的任意一种或至少两种的组合：

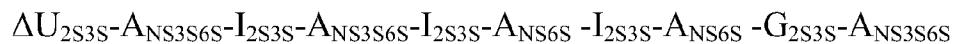
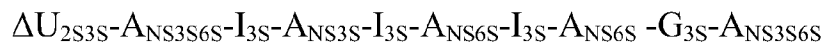
DP6 肝素六糖衍生物:

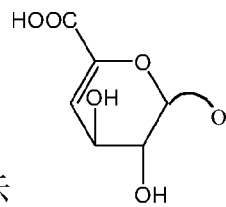


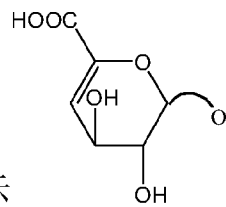
DP8 肝素八糖衍生物:



DP10 肝素十糖衍生物:





以上结构中， ΔU 表示 ，I 表示 α -L-艾杜糖醛酸，G 代表 β -D-葡萄糖醛酸，A 代表 α -D-葡萄糖胺。NS 表示氨基上的磺酸基，2S、3S、6S 等表示糖环的 2-O，3-O 和 6-O 位置的磺酸基。

第二方面，本发明提供了如第一方面所述的硫酸化肝素寡糖的制备方法，所述方法包括以下步骤：

- (1) 利用肝素酶降解肝素，分离、纯化得到肝素寡糖；
- (2) 利用硫酸化试剂对步骤 (1) 得到的肝素寡糖进行硫酸化，得到所述硫酸化肝素寡糖。

在本发明所述硫酸化肝素寡糖的制备方法中，步骤 (1) 所述肝素酶为肝素酶 I。

在本发明所述硫酸化肝素寡糖的制备方法中，步骤 (1) 所述利用肝素酶降解肝素时需加入缓冲液，优选为 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液。

优选地，步骤 (1) 所述肝素酶的加酶量为 15~25 IU/g 肝素，例如 16 IU/g 肝素、16.5 IU/g 肝素、17 IU/g 肝素、17.5 IU/g 肝素、18 IU/g 肝素、18.5 IU/g 肝素、19 IU/g 肝素、19.5 IU/g 肝素、20 IU/g 肝素、21.5 IU/g 肝素、22 IU/g 肝素、23 IU/g 肝素或 24 IU/g 肝素，优选 18~23 IU/g 肝素。

优选地，步骤 (1) 所述利用肝素酶降解肝素的温度为 4~37℃，例如 5℃、8℃、10℃、12℃、15℃、18℃、20℃、22℃、25℃、28℃、30℃、32℃、35℃或 37℃，优选为 8~25℃。

优选地，步骤 (1) 所述降解的时间为 8~24 小时，例如 9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时、18 小时、

19 小时、20 小时、21 小时、22 小时或 23 小时，优选为 10~20 小时。

优选地，步骤（1）所述利用肝素酶降解肝素包括在降解之后于 95℃ 灭活 5~10 min，例如 5.5 min、6 min、6.5 min、7 min、7.5 min、8 min、8.5 min、9 min、9.5 min 或 9.8 min，优选为 5~8 min，进一步优选为 6 min。

优选地，步骤（1）所述分离包括超滤，优选为利用 10 KDa 超滤离心管进行超滤。

优选地，步骤（1）所述纯化为利用柱层析法分离提纯。

利用柱层析法分离后经过浓缩、脱盐和冻干等过程获得肝素寡糖。

在本发明所述硫酸化肝素寡糖的制备方法中，在步骤（2）所述硫酸化之前包括将步骤（1）得到的肝素寡糖进行溶胀处理；

优选地，所述溶胀处理使用的溶剂为 DMF。

优选地，步骤（2）所述硫酸化试剂为 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ 。

优选地，相对于 1g 肝素寡糖，硫酸化试剂的用量为 1~10g，例如 1.2 g、1.5 g、2 g、2.5 g、3 g、3.5 g、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g 或 9.8 g。

优选地，步骤（2）所述硫酸化的温度为 60~120℃，例如 63℃、65℃、70℃、73℃、75℃、78℃、80℃、83℃、85℃、88℃、90℃、93℃、95℃、98℃、100℃、115℃、118℃ 或 120℃。

优选地，步骤（2）所述硫酸化的时间为 1~12 小时，例如 1.5 小时、2 小时、2.3 小时、2.5 小时、2.8 小时、3 小时、3.5 小时、4 小时、4.5 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、10.5 小时、11 小时或 11.5 小时。

在本发明中，通过控制肝素寡糖与硫酸化试剂的比例、反应温度和反应时间，可以控制肝素寡糖的硫酸化程度，得到不同程度硫酸基取代的肝素寡糖。

在本发明中，硫酸化试剂对步骤（1）得到的肝素寡糖进行硫酸化后，需要对反应混合物进行后处理和纯化，即向反应混合物中加入 10 倍体积纯水溶解沉淀，转入截留分子量为 100~500Da 的透析袋，透析三天后，利用 P10 柱脱盐，浓缩后，利用阳离子交换柱除去阳离子杂质，用高纯 NaOH、KOH 或 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 等中和酸性，浓缩后经过冻干或乙醇沉淀可以得到相应的硫酸化肝素寡糖。

作为本发明的优选技术方案，本发明所述硫酸化肝素寡糖的制备方法包括以下步骤：

（1）利用肝素酶 I 于 4~37℃ 下降解肝素 8~24 h，加酶量为 15~25 IU/g 肝素，所用缓冲液为 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液，降解之后于 95℃ 灭活 5~10 min，利用 10 KDa 超滤离心管进行超滤分离、而后利用柱层析法分离提纯得到肝素寡糖；

（2）利用硫酸化试剂在 60~120℃ 下对步骤（1）得到的肝素寡糖进行硫酸化 1~12 小时，得到所述硫酸化肝素寡糖。

本发明利用所述制备方法可以得到硫酸化程度不同的硫酸化寡糖，所述硫酸化肝素寡糖中每个糖链的非还原端有一个双键，该双键来源于肝素酶酶解构成中的消除反应，由于结构中有双键，所以寡糖在紫外区 232nm 附近有较强的吸收峰，可以非常方便的用于肝素寡糖的定性和定量检测。该双键在肝素寡糖硫酸化过程中基本不发生变化。肝素本身没有强的特征吸收峰，因此肝素类物质只能采用 DMB 染色法等进行检测，但该方法灵敏度较低，且不能适用于复杂体系。因此双键的存在，极大方便了肝素寡糖及其衍生物的检测，在生物代谢过程的检测中也可以发挥重要作用。

第三方面，本发明提供了如第一方面所述的硫酸化肝素寡糖在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

本发明的硫酸化肝素寡糖具有良好的乙酰肝素酶抑制活性和抑制肿瘤转移

活性，其可以作为抗肿瘤药物或者作为抗肿瘤活性成分制备成为抗肿瘤药物，以用于肿瘤的治疗，预防和抑制肿瘤的转移。

在本发明的硫酸化肝素寡糖中，不同程度磺酸化的肝素六糖、肝素八糖和肝素十糖都有显著的抑制活性，在磺酸化程度相同的情况下，链长不同，其对乙酰肝素酶的抑制活性也会有所不同，抑制活性的大小表现为：磺酸化肝素六糖<磺酸化肝素十糖<磺酸化肝素八糖。在链长相同的情况下，不同程度硫酸化的肝素寡糖对乙酰肝素酶的抑制活性也有所不同，表现为：低度硫酸化（10-40%）肝素寡糖<高度硫酸化（60-90%）肝素寡糖<中度硫酸化（40-60%）肝素寡糖。在硫酸化肝素寡糖的结构上，糖胺 6-位磺酸化和糖胺 3-位磺酸化对乙酰肝素酶抑制活性贡献较大。

相对于现有技术，本发明具有以下有益效果：

本发明的硫酸化肝素寡糖具有良好的乙酰肝素酶抑制活性和抑制肿瘤转移活性，其糖链较短，分子量小，完全没有抗凝血活性，无抗凝活性和出血风险。通过本发明的制备方法可以制备得到硫酸化程度可控的硫酸化寡糖，该硫酸化肝素寡糖的体外抑制乙酰肝素酶活性很高，其抑制细胞粘附和迁移的活性高出肝素 4-5 倍，小鼠体内抗肿瘤转移的活性也比肝素高 2-3 倍，具有较好的抗肿瘤转移效果和较高的特异性。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 利用 Bio-Gel P-10 (2.5×100 cm) 层析柱分离肝素寡糖的结果图；

图 2 为本发明实施例 1 得到的等聚合度的肝素寡糖的分子量分布图；

图 3 为本发明实施例 1 得到的肝素十糖的 UPLC-MS 的总离子流图；

图 4 为本发明实施例 1 得到的肝素十糖的 UPLC-MS 的总离子流图（局部）

及对应峰的归属图；

图 5 为肝素八糖 (A) 与 40%硫酸化的肝素八糖 (B) 的 HSQC 谱及对应的一维氢谱图 (δ_{H} ppm 6.1~3.165/ δ_{C} ppm 112~52.6)；

图 6 为硫酸化的肝素寡糖对乙酰肝素酶抑制活性测定结果图；

图 7 为硫酸化的肝素寡糖对 HeLa 细胞的细胞粘附抑制活性结果图；

图 8 为硫酸化的肝素寡糖对 HeLa 细胞的细胞迁移抑制活性结果图。

具体实施方式

下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了，所述实施例仅仅是帮助理解本发明，不应视为对本发明的具体限制。

实施例 1 肝素寡糖的制备

取肝素 24g，加入 240mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液，搅拌溶解，加入 480IU 的肝素酶 I，搅拌均匀后，置于 10℃ 环境下酶解反应 16h。反应完成后，将反应混合物加热至 95℃ 灭活 6min，10 KDa 超滤离心管超滤。滤液用 Bio-Gel P-10 (2.5 × 100 cm) 层析柱分离，0.2M 的 NH_4HCO_3 作为洗脱液，收集 1.75~2.15 倍柱体积的组分得到肝素四糖混合物，收集 1.35~1.75 倍柱体积的组分得到肝素六糖混合物，收集 1.05~1.35 倍柱体积的组分得到肝素八糖糖混合物，收集 0.85~1.05 倍柱体积的组分得到肝素十糖混合物，收集 0.75~0.85 倍柱体积的组分得到肝素十二糖混合物，旋转蒸发除去 NH_4HCO_3 后，冻干得到相应肝素寡糖。

如图 1 所示，为肝素寡糖的 Bio-Gel P-10 (2.5 × 100 cm) 层析柱分离图，由图可以看出：通过 P10 柱进行分离后，肝素寡糖根据分子量的不同分成了不同的峰，通过收集峰尖处组分可以获得不同聚合度的寡糖。

图 2 为等到的等聚合度肝素寡糖的分子量分布图，由图可以看出：寡糖分子量分布峰尖而对称，说明寡糖分子量分布范围较窄，同时分子量分布从十二糖到四糖逐渐降低，说明寡糖质量符合要求。

肝素寡糖的结构利用 UPLC-MS 等方式进行了表征确认，例如，图 3 为本发明得到的肝素十糖的 UPLC-MS 的总离子流质谱图，图 4 为肝素十糖的总离子流图中对应峰的归属图，其中， $\Delta U_{x,y,z}$ （图中已经给出了具体的 x、y、z 的值）中 x 代表寡糖链中糖单元数，y 代表寡糖链中总的磺酸基数目，z 表示寡糖链中总的乙酰基数目；LR 代表结合区域。由图 4 结构归属可以看出，其中肝素十糖中绝大多数寡糖都是肝素十糖，仅有少部分是高度硫酸化的肝素八糖。以上表征结果说明寡糖制备是成功的，纯度满足要求。

实施例 2 20%~80%硫酸化的肝素八糖的制备

称取 0.54g 肝素八糖原料，转移至反应瓶中，加入 25mL 无水 DMF，搅拌溶解。称取 0.86g $(CH_3)_3N \cdot SO_3$ ，在搅拌下逐渐加入上述溶液中，搅拌 10min。塞好瓶盖，将反应瓶置于 80℃油浴中搅拌反应 4h。停止反应后，自然冷却至室温。将固体以 90mL 纯水溶解，用 2M NaOH 调节 pH 至接近中性。将溶液转移至截留分子量为 100~500Da 的透析袋中，透析三天后，以 $BaCl_2$ 检验透析液中是否存在大量硫酸根。若没有，则先以 2M NaOH 调节 pH 至中性，在旋转蒸发仪上浓缩至 10mL 左右。上 P2 柱，以纯水洗脱，以部分收集器收集洗脱液。测定 232nm 吸光度，确定肝素八糖衍生物的位置，以 $BaCl_2$ 检验收集液是否存在大量硫酸根，收集无盐部分的肝素八糖硫酸化衍生物。浓缩至 10mL 左右，上 Dowex 阳离子交换柱，纯水洗脱，以部分收集器收集洗脱液测定 232nm 吸光度，确定肝素八糖衍生物的位置，收集含肝素八糖衍生物组分，小心的用 0.1M 的高纯 NaOH 溶

液调节 pH 至 7.0 后, 浓缩冻干即可得到 20%硫酸化的肝素八糖。

相对于 0.54g 肝素八糖原料, 通过如表 1 中所示调节反应原料中 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ 的投料量以及反应温度和反应时间可以控制得到所述硫酸化程度的肝素寡糖。

表 1

硫酸化程度	反应原料	反应温度	反应时间
20%硫酸化	0.835g $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$	80℃	2-6h
40%硫酸化	1.67g $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$	90℃	2-6h
60%硫酸化	3.34g $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$	90℃	4-8h
100%硫酸化	5.01g $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$	100℃	6-10h

例如可以通过以下反应条件以及投料量的调整获得相应硫酸化程度的肝素寡糖:

将 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ 的量调整为 1.67g, 反应温度调整为 90℃, 反应时间调整为 4h, 其余操作均相同, 可制得 40%硫酸化的肝素八糖。

将 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ 的量调整为 3.34g, 反应温度调整为 90℃, 反应时间调整为 6h, 其余操作均相同, 可制得 60%硫酸化的肝素八糖。

将 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ 的量调整为 5.01g, 反应温度调整为 100℃, 反应时间调整为 8h, 其余操作均相同, 可制得 80%硫酸化的肝素八糖。

图 5 为肝素八糖 (A) 与 40%硫酸化的肝素八糖 (B) 的 HSQ C 谱及对应的一维氢谱图 (δ_{H} ppm 6.1~3.165/ δ_{C} ppm 112~52.6), 由图可以看出, 硫酸化反应后, 肝素八糖的信号峰发生了显著变化, 出现了很多的新信号, 说明出现了天然肝素不存在的结构, 与硫酸化衍生的预期是一致的。

实施例 3 40%和 60%硫酸化的肝素八糖的乙酰肝素酶抑制活性

采用文献[Hammond E, Li CP, Ferro V. Development of a colorimetric assay for heparanase activity suitable for kinetic analysis and inhibitor screening. Anal.

Biochem. 2011;396:112-116]中所述方法,测定硫酸化肝素寡糖的乙酰肝素酶抑制活性,即具体实验操作如下:

实验组的反应液由 40mM 的乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 和 100mM 的磺达肝癸钠, 以及特定浓度的硫酸化肝素八糖组成, 对照组的反应液中以与硫酸化肝素八糖同样浓度的 SST0001 对照品替代硫酸化肝素八糖。向 96 孔板中各孔加入 100 μ L 实验组或对照组的反应液, 然后分别加入乙酰肝素酶开始反应, 乙酰肝素酶的终浓度为 140 pM。将 96 孔板用胶带密封后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2-24h, 完成反应后, 加入 100 μ L 含有 1.69mM WST-1 的 0.1M NaOH 溶液终止反应。将 96 孔板再次密封后于 60 $^{\circ}$ C 孵育 60min。冷却至室温后, 测定 584nm 吸光度值。按照如下方法计算药物的抑制率:

$$\text{抑制率} = (1 - \text{样品吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$$

根据以上方法, 测得硫酸化肝素寡糖的对乙酰肝素酶的抑制活性如图 6 所示, 由图可见, 40%硫酸化的肝素八糖 (Hep8-40%) 对乙酰肝素酶的半抑制浓度 (IC₅₀) 为 43ng/mL, 60%硫酸化的肝素八糖 (Hep8-60%) 对乙酰肝素酶的半抑制浓度 (IC₅₀) 为 57ng/mL。

实施例 4 20%和 60%硫酸化的肝素八糖的细胞粘附测定

在本实施例中, 应用以下方法测定 20%和 60%硫酸化的肝素八糖的细胞粘附性:

(1) 包被基底膜: 用灭菌二蒸水分别配制 2 种溶液: 10 g/L BSA(1%), 50 mg/L Matrigel, 1: 8 稀释液; Matrigel 以 50 μ L/孔分别加入 96 孔培养板, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(2) 水化基底膜: 吸出培养板中残余液体, 每孔加入 50 μ L 含 10 g/L BSA

的无血清培养液，37℃，30min；

(3) 细胞的准备：取正常培养的 HeLa 细胞，PBS 清洗三次后，将细胞分对照组（不添加药物，仅添加相应体积的 PBS）和实验组（添加肝素和硫酸化肝素八糖，浓度均为 62.5 μg/mL），培养 24h。

(4) 接种细胞：取正常培养或步骤(3)中肝素/HS 寡糖的衍生物处理 24h 的肿瘤细胞，PBS 清洗三次后加入 0.5mL 胰酶消化。严密关注消化情况，消化完成后，加 5mL 培养基充分吹打，使细胞分散成单细胞悬液。计数，根据计数结果调整细胞悬液浓度，使细胞密度为 10^5 个细胞/mL，每孔 100 μL 细胞悬液接种于包被 Matrigel 的 96 孔培养板中，每组平行 3 个样本；

(5) 培养细胞：37℃二氧化碳培养箱培养 1h，弃去各孔培养液，用 PBS 冲洗 1 次，之后每孔加入 200 μL 新鲜培养基，观察并照相；

(6) 检测：每孔加入 10 μL CCK-8 染料溶液，37℃二氧化碳培养箱培养 3h 后，多功能酶标仪读数，以肝素对照组为参照，按下述公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{处理组吸光值} / \text{对照组吸光}) \times 100\%$$

根据以上方法，测得肝素（Heparin）对 HeLa 细胞粘附的抑制率为 8.3%，20%硫酸化的肝素八糖（Hep8-20%）对 HeLa 细胞粘附的抑制率为 45.3%，60%硫酸化的肝素八糖（Hep8-60%）对 HeLa 细胞粘附的抑制率为 37.9%。

实施例 5 40%和 60%硫酸化的肝素八糖的细胞迁移测定

在本实施例中，通过以下方法测定 40%和 60%硫酸化的肝素八糖的细胞迁移：

(1) 实验前将 Transwell 小室放置于 24 孔板中，下室加入 600ul 的 DMEM 液体培养基，上室加入 100ul 的 DMEM 液体培养基，培养箱过夜待用；

(2) 细胞的准备：取对数生长期的 HeLa 细胞，胰酶消化，计数细胞浓度，将细胞分对照组（不添加肝素或肝素寡糖，仅添加相应体积的 PBS）和实验组（添加肝素和硫酸化肝素八糖，浓度均为 $62.5\mu\text{g/mL}$ ）。分别用无血清、含 2.5%BSA 的 DMEM 培养基和无血清、含相应肝素寡糖的 2.5%BSA DMEM 培养基稀释细胞，调整细胞浓度为 2.5×10^5 个/mL。

(3) 加 $800\mu\text{L}$ 含 5% FBS 的培养基至 Transwell 小室的下室。

(4) 加 $400\mu\text{L}$ 步骤 (2) 的细胞悬液至 Transwell 小室的上室内。

(5) 置于温度 37°C 、 CO_2 浓度 5% 的培养箱中培养 8 小时。

(6) 小心吸去上室内的液体，用棉签轻柔的擦拭小室膜的内面以去除未迁移的细胞。注意操作轻柔，避免损坏小室的膜。

(7) 将小室移入另一个含有 $400\mu\text{L}$ 细胞染液的 24 孔板，在室温下染色细胞 10 分钟。

(8) 用蒸馏水轻柔的洗 Transwell 小室 3-5 次，置于室温令其自然风干。

(9) 在显微镜下计数细胞并拍照。

(10) 将小室转入另一干净 24 孔板中，每空加入 $200\mu\text{L}$ 细胞溶解液，置摇床上。

(11) 室温下孵育 10 分钟后，取 $100\mu\text{L}$ 细胞溶解液加入 96 孔板，在 560nm 处读取吸光度值。以肝素对照组为参照，按下述公式计算转移率和抑制率：

$$\text{转移率} = \text{处理组吸光值} / \text{对照组吸光值} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{处理组粘附率} / \text{对照组粘附率})] \times 100\%$$

根据以上方法，测得细胞粘附结果如图 7 所示，表明肝素 (Heparin) 对 HeLa

细胞迁移的抑制率为 12.6%，40%硫酸化的肝素八糖（Hep8-40%）对 HeLa 细胞迁移的抑制率为 57.3%，60%硫酸化的肝素八糖（Hep8-60%）对 HeLa 细胞迁移的抑制率为 43.5%。

实施例 6 40%和 60%硫酸化的肝素八糖的抗肿瘤转移性

在本实施例中通过以下方法对 40%和 60%硫酸化的肝素八糖的抗肿瘤转移性进行测定：

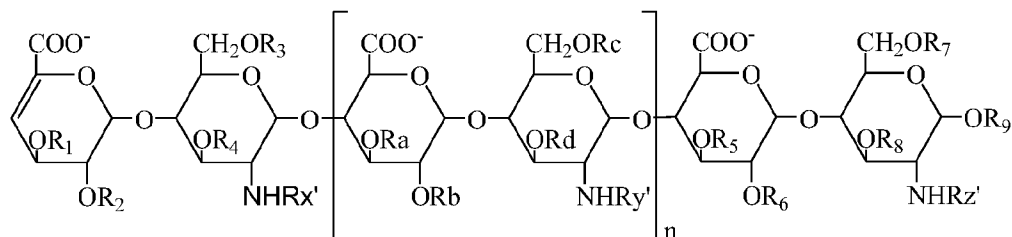
通过尾静脉将 B16-BL6 小鼠黑色素瘤细胞(2×10^5)注射到 C57BL/6 小鼠体内，小鼠分为对照组（不添加肝素寡糖，以 PBS 作为对照）和实验组（添加 40%硫酸化的肝素八糖，每只小鼠 200 μ g），每组 10 只小鼠。3 周后，解剖小鼠，在 Bouin 溶液中固定小鼠肺部，计算小鼠肺部肿瘤个数。我们将使用荧光素酶标记的 B16-BL6 小鼠黑色素瘤细胞，通过 IVIS-200 荧光成像系统每周检测转移瘤的形成。图片将在腹部注射 2.5mg 荧光素 10min 后采集。

根据以上方法，测得抗肿瘤转移性结果如图 8 所示，由图可知，肝素（Heparin）对小鼠体内肿瘤转移的抑制率为 17.3%，40%硫酸化的肝素八糖（Hep8-40%）对小鼠体内肿瘤转移的抑制率为 65.1%，60%硫酸化的肝素八糖（Hep8-60%）对小鼠体内肿瘤转移的抑制率为 56.2%。

申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明硫酸化肝素寡糖及其制备方法和应用，但本发明并不局限于上述实施例，即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种硫酸化肝素寡糖，其特征在于，所述硫酸化肝素寡糖分子的非还原端含有由肝素酶酶解产生的不饱和双键，含有糖醛酸衍生物和糖胺衍生物，其具有式 I 所示结构：



式 I

其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 独立地为 SO_3^- 或 H ； R_x' 、 R_y' 和 R_z' 独立地为 COCH_3 或 SO_3^- ， n 为 1-3。

2、根据权利要求 1 所述的硫酸化肝素寡糖，其特征在于，式 I 中平均每个双糖单元中磺酸基个数不少于 2 个，平均每个双糖单元中乙酰基不多于 0.5 个，平均每个双糖单元的葡萄糖胺 6-位和 3-位磺酸基都不少于 0.5 个；

优选地，式 I 中糖醛酸为葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸；

优选地，与式 I 中所含羧基和/或磺酸基成盐的阳离子选自 Na^+ 、 K^+ 或 Ca^{2+} 。

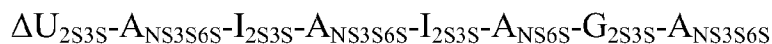
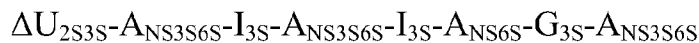
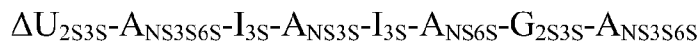
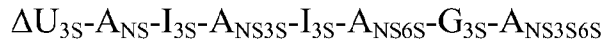
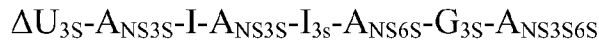
3、根据权利要求 1 或 2 所述的硫酸化肝素寡糖，其特征在于，所述硫酸化肝素寡糖为具有以下结构的化合物中的任意一种或至少两种的组合：

DP6 肝素六糖衍生物：

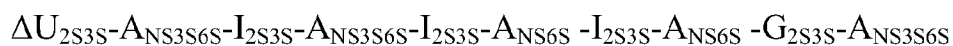
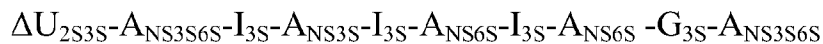




DP8 肝素八糖衍生物:



DP10 肝素十糖衍生物:



4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的硫酸化肝素寡糖的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

(1) 利用肝素酶降解肝素，分离、纯化得到肝素寡糖；

(2) 利用硫酸化试剂对步骤 (1) 得到的肝素寡糖进行硫酸化，得到所述硫酸化肝素寡糖。

5、根据权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 所述肝素酶为肝素酶 I。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的制备方法，其特征在于，步骤（1）所述利用肝素酶降解肝素时需加入缓冲液，优选为 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

优选地，步骤（1）所述肝素酶的加酶量为 15~25 IU/g 肝素，优选 18~23 IU/g 肝素；

优选地，步骤（1）所述利用肝素酶降解肝素的温度为 4~37℃，优选为 8~25℃；

优选地，步骤（1）所述降解的时间为 8~24 小时，优选为 10~20 小时；

优选地，步骤（1）所述利用肝素酶降解肝素包括在降解之后于 95℃灭活 5~10 min，优选为 5~8min，进一步优选为 6min；

优选地，步骤（1）所述分离包括超滤，优选为利用 10 KDa 超滤离心管进行超滤；

优选地，步骤（1）所述纯化为利用柱层析法分离提纯。

7、根据权利要求 4-6 中任一项所述的制备方法，其特征在于，在步骤（2）所述硫酸化之前包括将步骤（1）得到的肝素寡糖进行溶胀处理；

优选地，所述溶胀处理使用的溶剂为 DMF。

8、根据权利要求 4-7 中任一项所述的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述硫酸化试剂为 $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ ；

优选地，相对于 1g 肝素寡糖，硫酸化试剂的用量为 1~10g；

优选地，步骤（2）所述硫酸化的温度为 60~120℃；

优选地，步骤（2）所述硫酸化的时间为 1~12 小时。

9、根据权利要求 4-8 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

（1）利用肝素酶 I 于 4~37℃下降解肝素 8~24 小时，加酶量为 15~25 IU/g

肝素,所用缓冲液为 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,降解之后于 95℃ 灭活 5~10 min,利用 10 KDa 超滤离心管进行超滤分离、而后利用柱层析法分离提纯得到肝素寡糖;

(2) 利用硫酸化试剂在 60~120℃ 下对步骤 (1) 得到的肝素寡糖进行硫酸化 1~12 小时, 得到所述硫酸化肝素寡糖。

10、根据权利要求 1-3 中任一项所述的硫酸化肝素寡糖在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

说明书附图

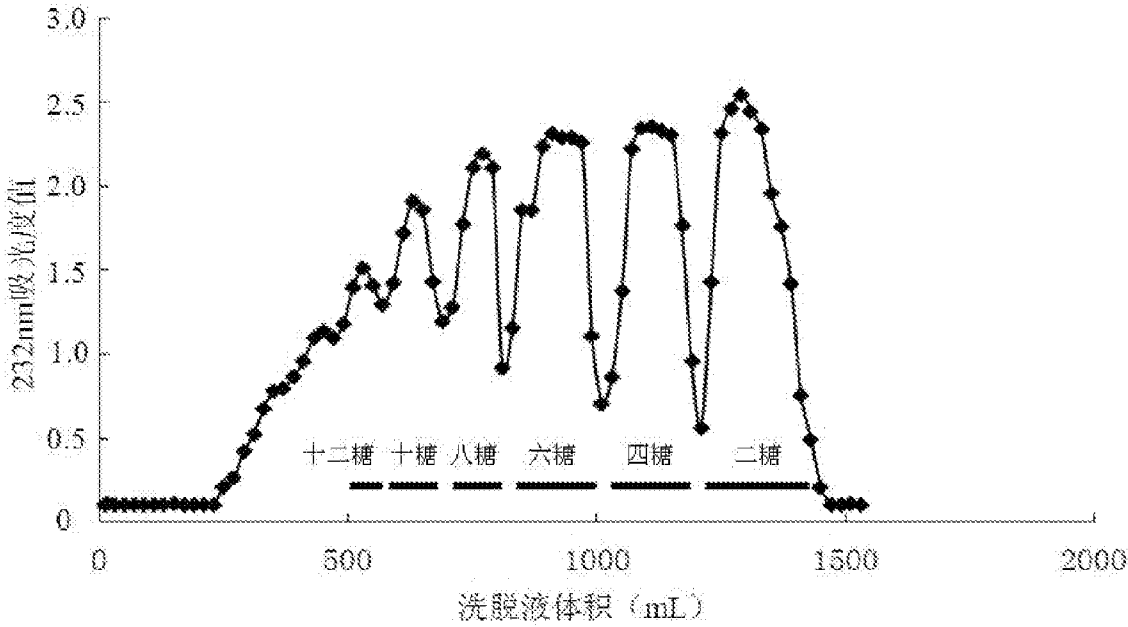


图 1

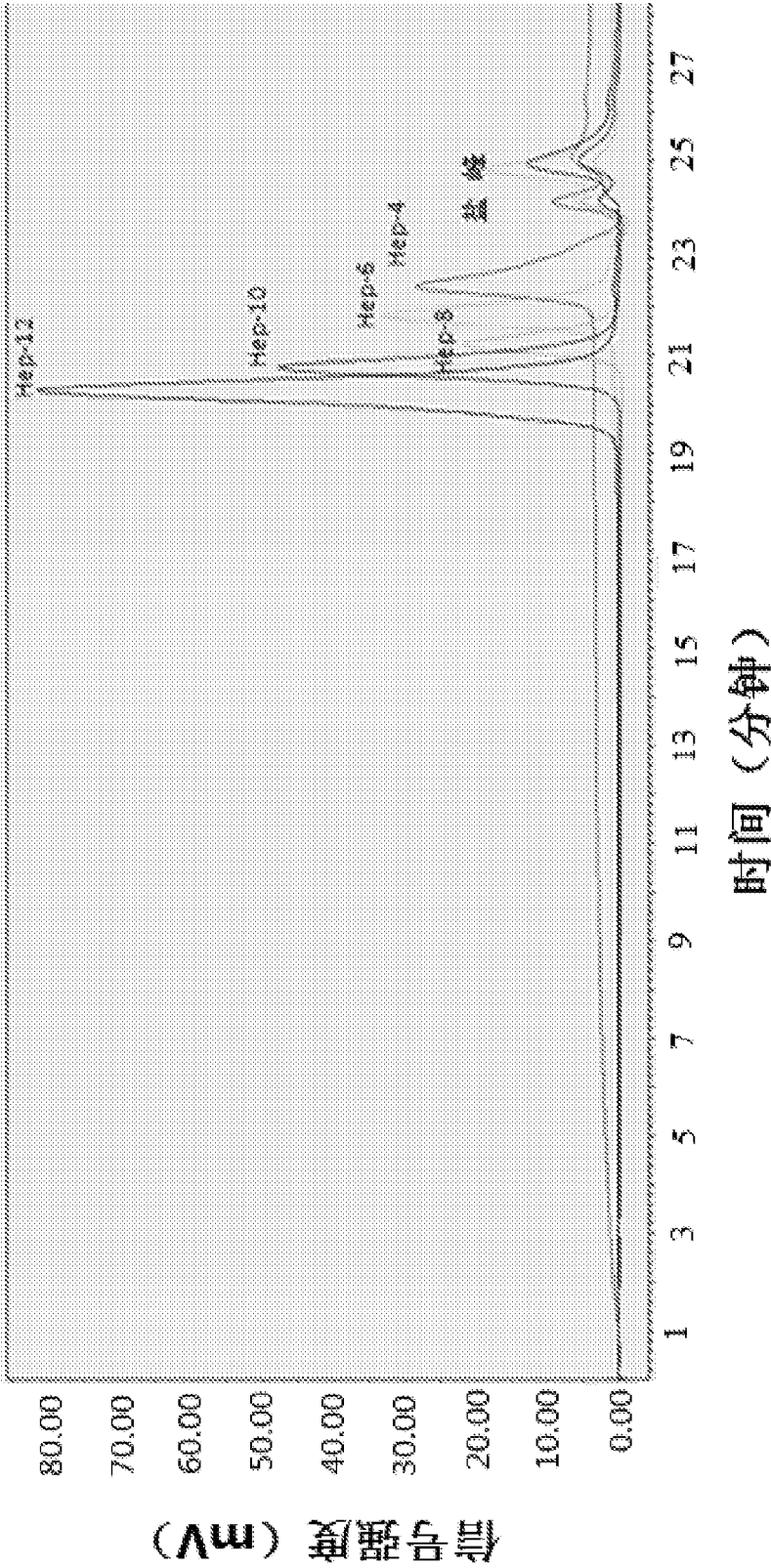


图 2

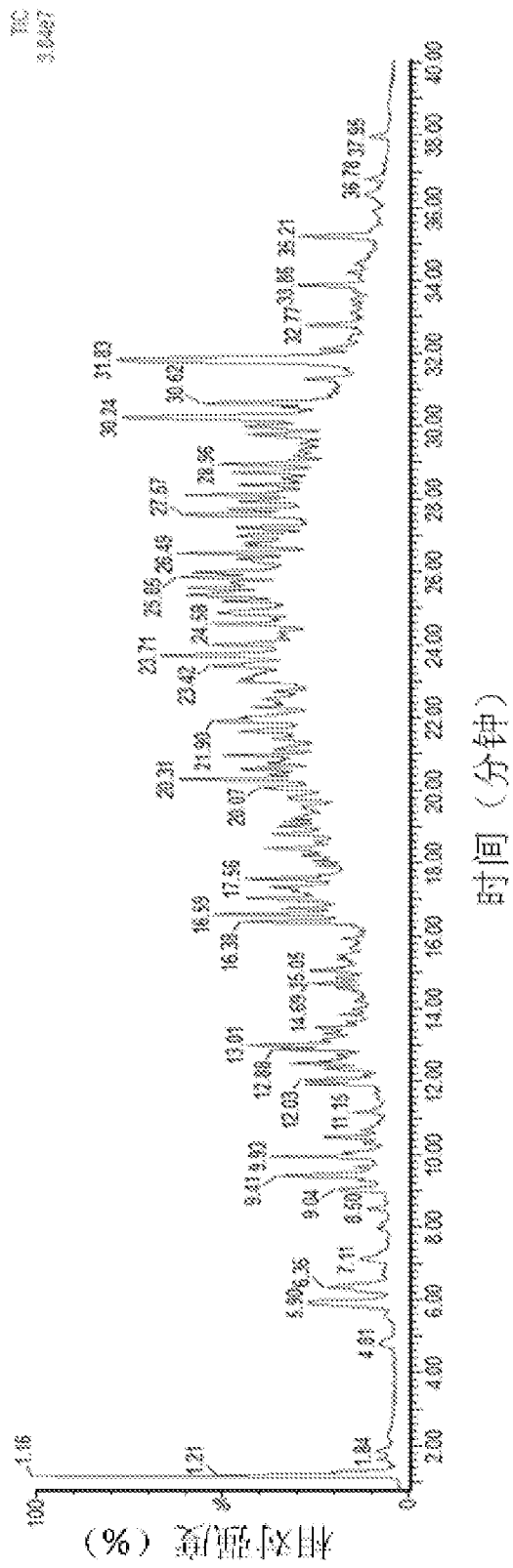


图 3

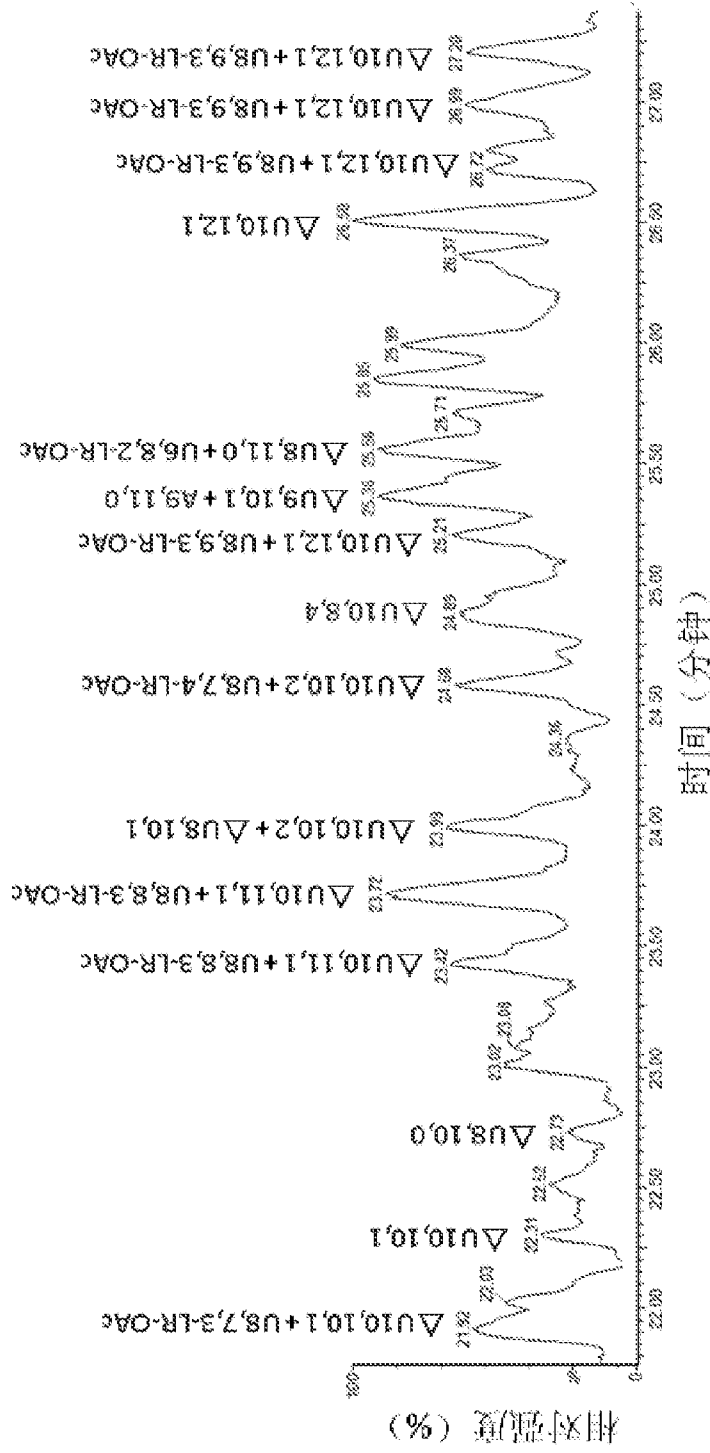


图 4

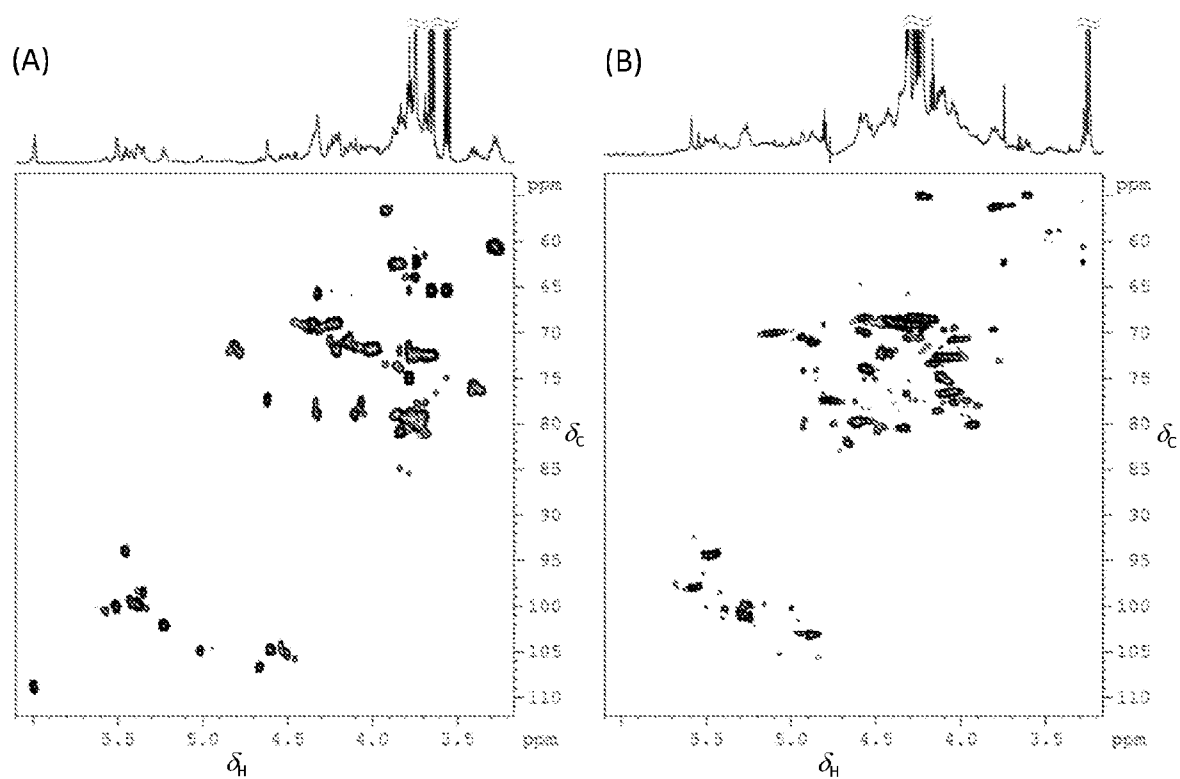


图 5

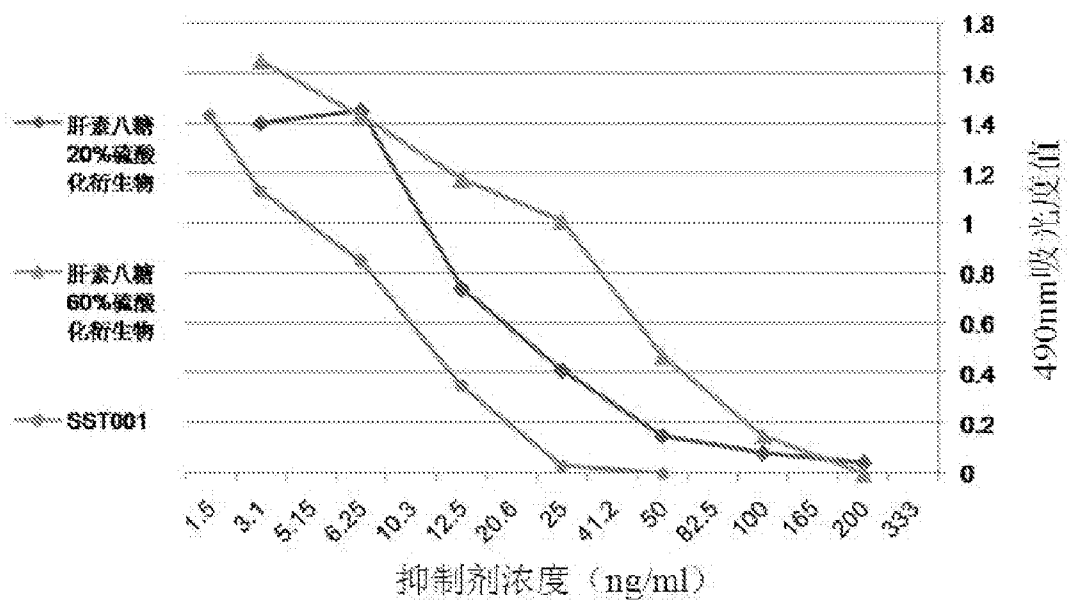


图 6

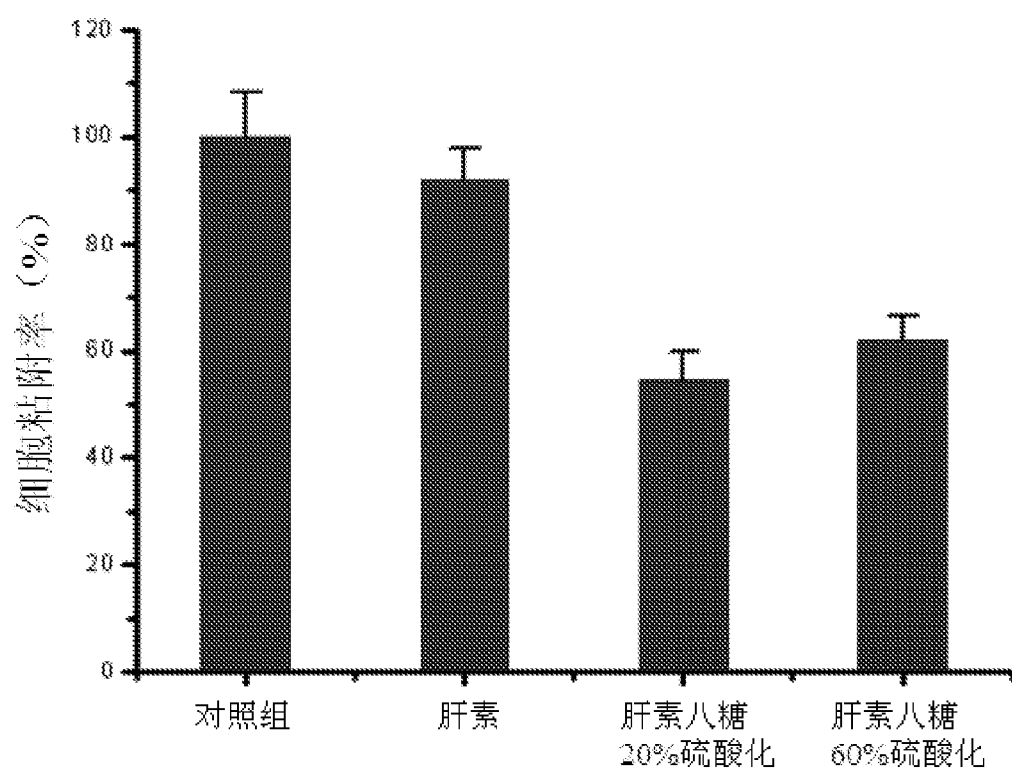


图 7

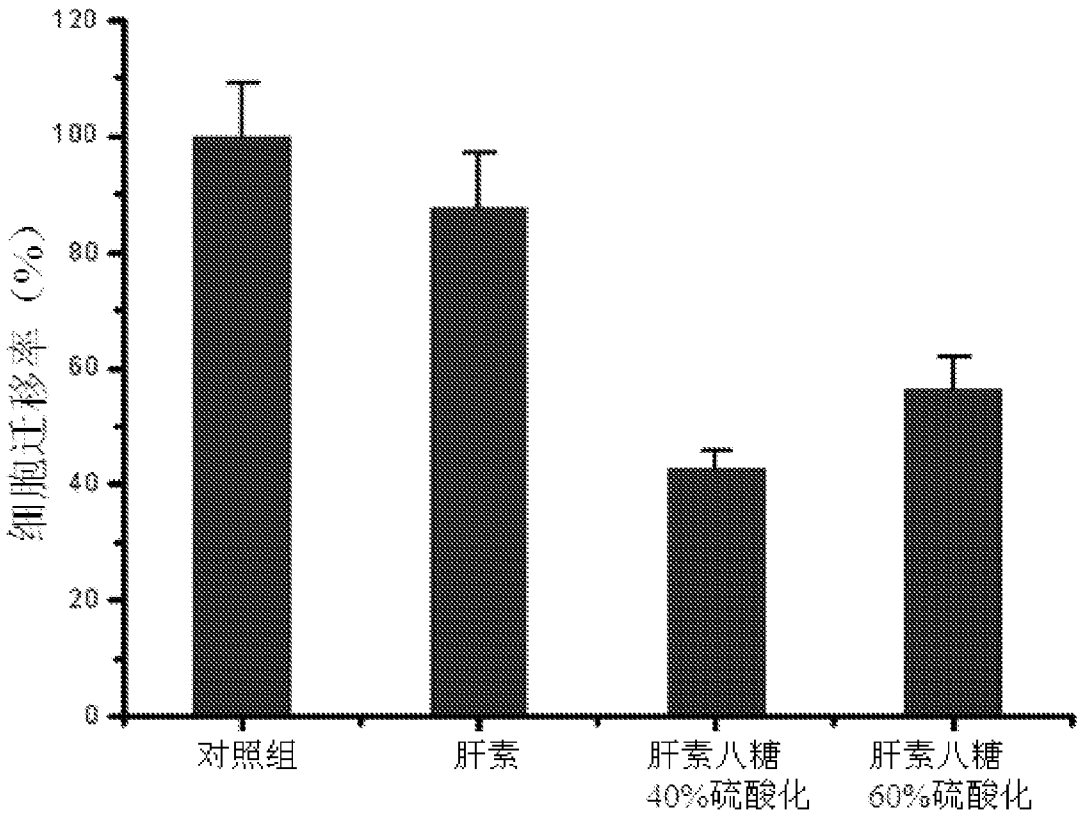


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/10 (2006.01) i; A61K 31/727 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B; C12P; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CMQ, WPI, EPODOC, ISI, CA: HEPALINK PHARMACEUTICAL; sulfuric acid, sulfat+, heparin, oligosaccharide, enzyme, degradat+, LMWH, low molecule, SO3, sulfur trioxide trimethylamine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101495517 A (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.), 29 July 2009 (29.07.2009), description, page 6, paragraph 3 and page 20, paragraph 3 to page 21, paragraph 1	1-3, 10
Y	CN 101495517 A (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.), 29 July 2009 (29.07.2009), description, page 6, paragraph 3 and page 20, paragraph 3 to page 21, paragraph 1	4-9
Y	CN 103288981 A (SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 11 September 2013 (11.09.2013), description, paragraphs [0004] and [0007]-[0009]	4-9
X	CN 1798771 A (AVENTIS PHARMA S.A.), 05 July 2006 (05.07.2006), claim 1	1-2
X	CN 103788232 A (SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 14 May 2014 (14.05.2014), claims 1 and 2	1
E	CN 105504097 A (SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 20 April 2016 (20.04.2016), claims 1-10	1-10
A	US 6190875 B1 (INSIGHT STRATEGY & MARKETING et al.), 20 February 2001 (20.02.2001), description, column 17, line 30 to column 18, line 27	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 07 September 2016 (07.09.2016)	Date of mailing of the international search report 22 September 2016 (22.09.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer HAN, Xiaojie Telephone No.: (86-10) 010-82246864

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/099901

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101495517 A	29 July 2009	EP 2447285 A2 US 8609632 B2 WO 2007140231 A2 JP 2009538386 A WO 2007140231 A3 AU 2007267561 B2 CA 2652205 A1 AU 2007267561 A1 EP 2019843 A2 EP 2404939 A3 CN 101495517 B US 2007287683 A1 EP 2404939 A2 US 2010305022 A1 EP 2447285 A3 RU 2008151420 A RU 2451515 C2 IN 200804734 P2 BR PI0713123 A2	02 May 2012 17 December 2013 06 December 2007 05 November 2009 04 December 2008 17 May 2012 06 December 2007 06 December 2007 04 February 2009 21 March 2012 10 October 2012 13 December 2007 11 January 2012 02 December 2010 16 January 2013 27 June 2010 27 May 2012 13 March 2009 10 April 2012
CN 103288981 A	11 September 2013	None	
CN 1798771 A	05 July 2006	ZA 200502787 B JP 5389140 B2 ZA 200502787 A NO 20052170 A EC SP055722 A EP 1556414 A1 OA 12940 A NZ 539229 A SV 2004001626 A CN 101810637 A WO 2004033503 A1 IL 167868 A JP 2012051926 A JP 5021898 B2 PT 1556414 E GT 200300181 A CA 2501546 A1 FR 2845686 A1 PE 05072004 A1 CN 101812189 A AT 548393 T PA 8584201 A1 CN 101812190 A EP 1556414 B1 UA 81925 C2 CA 2501546 C AU 2003300161 B2 HN 2003000312 A TW 200418882 A TW I332010 B	18 October 2005 15 January 2014 18 October 2005 07 July 2005 06 July 2005 27 July 2005 13 October 2006 28 March 2008 08 March 2004 25 August 2010 22 April 2004 31 May 2010 15 March 2012 12 September 2012 21 May 2012 24 March 2004 22 April 2004 16 April 2004 13 October 2004 25 August 2010 15 March 2012 31 August 2004 25 August 2010 07 March 2012 25 February 2008 03 April 2012 27 August 2009 20 October 2005 01 October 2004 21 October 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/099901

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		MA 27398 A1	01 June 2005
		FR 2845686 B1	30 August 2013
		JP 2006517185 A	20 July 2006
		ES 2383597 T3	22 June 2012
		NO 20052170 D0	03 May 2005
		CN 101812139 A	25 August 2010
		MX PA05003321 A	05 July 2005
		SI 1556414 T1	29 June 2012
		CN 101817940 A	01 September 2010
		CY 1112808 T1	10 February 2016
		RS 20050274 A	04 June 2007
		MY 142376 A	30 November 2010
		DK 1556414 T3	25 June 2012
		RU 2332424 C2	27 August 2008
		AU 2003300161 A1	04 May 2004
		RU 2005113987 A	27 January 2006
		BR 0315149 A	16 August 2005
		UY 28016 A1	30 April 2004
		SG 110926 B	30 September 2008
		US 8071570 B2	06 December 2011
		US 2011212915 A1	01 September 2011
		KR 1104107 B	12 January 2012
		VN 10010772 B	26 November 2012
		IN 200500569 P4	25 May 2007
		IN 219266 B	06 June 2008
		MX 258770 B	15 July 2008
		US 2011201573 A1	18 August 2011
		KR 20050061527 A	22 June 2005
		US 2008182820 A1	31 July 2008
		US 2004171819 A1	02 September 2004
		US 8003623 B2	23 August 2011
		HK 1145031 A0	25 March 2011
		HK 1145015 A0	25 March 2011
		HK 1145029 A0	25 March 2011
		HK 1145030 A0	25 March 2011
CN 103788232 A	14 May 2014	None	
CN 105504097 A	20 April 2016	None	
US 6190875 B1	20 February 2001	CA 2335382 A1	20 January 2000
		JP 2002520029 A	09 July 2002
		AU 4869799 A	01 February 2000
		AU 758485 B2	20 March 2003
		WO 0003036 A1	20 January 2000
		NO 20010136 D0	09 January 2001
		NO 20010136 A	09 March 2001
		EP 1097241 A1	09 May 2001

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/099901

A. 主题的分类

C08B 37/10(2006.01)i; A61K 31/727(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C08B; C12P; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI, CA; 海普瑞药业, 肝素, 寡糖, 低分子, 硫酸, 硫酸化, 酶, 降解, sulfat+, heparin, oligosaccharide, enzyme, degradat+, LMWH, low molecule, SO3, sulfur trioxide trimethylamine

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101495517 A (莫曼塔医药品有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 说明书第6页第3段, 第20页第3段-第21页第1段	1-3, 10
Y	CN 101495517 A (莫曼塔医药品有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 说明书第6页第3段, 第20页第3段-第21页第1段	4-9
Y	CN 103288981 A (深圳市海普瑞药业股份有限公司) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 说明书第4, 7-9段	4-9
X	CN 1798771 A (安万特医药股份有限公司) 2006年 7月 5日 (2006 - 07 - 05) 权利要求1	1-2
X	CN 103788232 A (深圳市海普瑞药业股份有限公司) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 权利要求1-2	1
E	CN 105504097 A (深圳市海普瑞药业股份有限公司) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 权利要求1-10	1-10
A	US 6190875 B1 (INSIGHT STRATEGY & MARKETING等) 2001年 2月 20日 (2001 - 02 - 20) 说明书第17栏30行-第18栏第27行	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 9月 7日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 22日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

韩晓洁

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)010-82246864

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/099901

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101495517	A	2009年 7月 29日	EP	2447285	A2	2012年 5月 2日
				US	8609632	B2	2013年 12月 17日
				WO	2007140231	A2	2007年 12月 6日
				JP	2009538386	A	2009年 11月 5日
				WO	2007140231	A3	2008年 12月 4日
				AU	2007267561	B2	2012年 5月 17日
				CA	2652205	A1	2007年 12月 6日
				AU	2007267561	A1	2007年 12月 6日
				EP	2019843	A2	2009年 2月 4日
				EP	2404939	A3	2012年 3月 21日
				CN	101495517	B	2012年 10月 10日
				US	2007287683	A1	2007年 12月 13日
				EP	2404939	A2	2012年 1月 11日
				US	2010305022	A1	2010年 12月 2日
				EP	2447285	A3	2013年 1月 16日
				RU	2008151420	A	2010年 6月 27日
				RU	2451515	C2	2012年 5月 27日
				IN	200804734	P2	2009年 3月 13日
				BR	PI0713123	A2	2012年 4月 10日
CN	103288981	A	2013年 9月 11日	无			
CN	1798771	A	2006年 7月 5日	ZA	200502787	B	2005年 10月 18日
				JP	5389140	B2	2014年 1月 15日
				ZA	200502787	A	2005年 10月 18日
				NO	20052170	A	2005年 7月 7日
				EC	SP055722	A	2005年 7月 6日
				EP	1556414	A1	2005年 7月 27日
				OA	12940	A	2006年 10月 13日
				NZ	539229	A	2008年 3月 28日
				SV	2004001626	A	2004年 3月 8日
				CN	101810637	A	2010年 8月 25日
				WO	2004033503	A1	2004年 4月 22日
				IL	167868	A	2010年 5月 31日
				JP	2012051926	A	2012年 3月 15日
				JP	5021898	B2	2012年 9月 12日
				PT	1556414	E	2012年 5月 21日
				GT	200300181	A	2004年 3月 24日
				CA	2501546	A1	2004年 4月 22日
				FR	2845686	A1	2004年 4月 16日
				PE	05072004	A1	2004年 10月 13日
				CN	101812189	A	2010年 8月 25日
				AT	548393	T	2012年 3月 15日
				PA	8584201	A1	2004年 8月 31日
				CN	101812190	A	2010年 8月 25日
				EP	1556414	B1	2012年 3月 7日
				UA	81925	C2	2008年 2月 25日
				CA	2501546	C	2012年 4月 3日
				AU	2003300161	B2	2009年 8月 27日
				HN	2003000312	A	2005年 10月 20日
				TW	200418882	A	2004年 10月 1日
				TW	I332010	B	2010年 10月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/099901

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		MA 27398 A1	2005年 6月 1日
		FR 2845686 B1	2013年 8月 30日
		JP 2006517185 A	2006年 7月 20日
		ES 2383597 T3	2012年 6月 22日
		NO 20052170 D0	2005年 5月 3日
		CN 101812139 A	2010年 8月 25日
		MX PA05003321 A	2005年 7月 5日
		SI 1556414 T1	2012年 6月 29日
		CN 101817940 A	2010年 9月 1日
		CY 1112808 T1	2016年 2月 10日
		RS 20050274 A	2007年 6月 4日
		MY 142376 A	2010年 11月 30日
		DK 1556414 T3	2012年 6月 25日
		RU 2332424 C2	2008年 8月 27日
		AU 2003300161 A1	2004年 5月 4日
		RU 2005113987 A	2006年 1月 27日
		BR 0315149 A	2005年 8月 16日
		UY 28016 A1	2004年 4月 30日
		SG 110926 B	2008年 9月 30日
		US 8071570 B2	2011年 12月 6日
		US 2011212915 A1	2011年 9月 1日
		KR 1104107 B	2012年 1月 12日
		VN 10010772 B	2012年 11月 26日
		IN 200500569 P4	2007年 5月 25日
		IN 219266 B	2008年 6月 6日
		MX 258770 B	2008年 7月 15日
		US 2011201573 A1	2011年 8月 18日
		KR 20050061527 A	2005年 6月 22日
		US 2008182820 A1	2008年 7月 31日
		US 2004171819 A1	2004年 9月 2日
		US 8003623 B2	2011年 8月 23日
		HK 1145031 A0	2011年 3月 25日
		HK 1145015 A0	2011年 3月 25日
		HK 1145029 A0	2011年 3月 25日
		HK 1145030 A0	2011年 3月 25日
CN 103788232 A	2014年 5月 14日	无	
CN 105504097 A	2016年 4月 20日	无	
US 6190875 B1	2001年 2月 20日	CA 2335382 A1	2000年 1月 20日
		JP 2002520029 A	2002年 7月 9日
		AU 4869799 A	2000年 2月 1日
		AU 758485 B2	2003年 3月 20日
		WO 0003036 A1	2000年 1月 20日
		NO 20010136 D0	2001年 1月 9日
		NO 20010136 A	2001年 3月 9日
		EP 1097241 A1	2001年 5月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)