



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102924627 A

(43) 申请公布日 2013.02.13

(21) 申请号 201210464468.7

(22) 申请日 2012.11.19

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号

(72) 发明人 滕丽萍 陈敬华

(51) Int. Cl.

C08B 37/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的制备方法。其以肝素为起始物进行完全脱硫酸化肝素的制备,进而进行 N- 位重新硫酸化,在此基础上采用 PAPS 再生系统,通过 AST-IV、6-OST-1 和 2-OST 组合酶法合成特定位点硫酸化肝素,最后再将以上肝素衍生物进行 N- 位脱硫酸化,最终得到具有低抗凝活性的专一抗肿瘤作用的肝素衍生物。这种肝素衍生物避免了普通肝素运用于肿瘤患者出现出血、血小板减少、骨质疏松等副作用,将有助于拓宽肝素类药物的临床应用范围。

1. 一种制备具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的方法,是以现有肝素为起始物进行完全脱硫酸化肝素的制备,进而进行 N- 位重新硫酸化,在此基础上采用 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)再生系统,通过 AST-IV、6-OST-1 和 2-OST 组合酶法合成特定位点硫酸化肝素,最后再将以上肝素衍生物进行 N- 位脱硫酸化,最终得到具有低抗凝活性的专一抗肿瘤作用的肝素衍生物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:肝素钠过氢离子交换柱得到肝素酸溶液,用三丁胺(tributylamine, TBA)将该溶液 pH 调至 5.5 左右,冻干得到肝素三丁胺盐,将冻干粉溶于含 10% 甲醇的二甲亚砷溶液中,105℃,反应 12-36h,优选为 24h;醇沉,透析,脱盐,冻干得到完全脱硫酸化肝素按质量比 1 : 2 逐步加入三甲基铵三氧化硫共聚物(trimethylamine sulfur trioxide complex, TMA·S₀₃),30-70℃,pH 9 条件下反应 2-10h,优选为 55℃,pH 9 条件下反应 6h。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:在完全脱硫酸化肝素的基础上,通过肝素生物合成酶 6-OST-1 和 2-OST 将 PAPS 再生系统中 PAPS 分子的活性硫酸基转移到低抗凝血活性肝素的特定序列位置,生成低抗凝血活性而较好抗肿瘤活性的肝素衍生物;所述 PAPS 再生系统是通过 AST-IV(Arylsulfotransferase IV) 的酶促反应,由对硝基苯酚磺酸钾盐(PNPS)和 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸(PAP)制备 PAPS,PNPS 的浓度为 0.1-10mM,PAP 的浓度为 0.1-50 μ M,AST-IV 的用量为 0.1-50mg/ml,优选为 5-10mg/ml。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于:酶法硫酸化反应条件为室温下震荡(300rpm)反应 1-15h,优选为 4-8h,反应液包含 50mM Tris-HCl(pH 7.2),1% Triton X-100,1% BSA,1mM MgCl₂,1mM MnCl₂,1mM PNPS,40 μ M PAP,4mg AST-IV,肝素生物合成酶 6-OST-1 或 2-OST 的用量为 0.1-50mg/mg 底物,优选为 1-20mg/mg 底物。

5. 根据权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于:所述方法中,按照以下方法纯化酶促反应产物:终止反应后,离心分离得到上清液,将此上清液与两倍体积的缓冲液 A 混合,对 DEAE 柱上样;依次以缓冲液 A 和缓冲液 B 进行梯度洗脱,收集第二次洗脱所得洗脱液,得到酶促反应产物;所述 DEAE 柱分离所用的缓冲液 A 为含质量百分含量为 0.5-2.5% 的 NaCl 水溶液,缓冲液 B 为含质量百分含量为 2.5-5.0% 的 NaCl 水溶液。

一种具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的制备方法。

背景技术

[0002] 自 1935 年以来肝素作为抗凝药物已广泛应用于临床,但其除了抗凝血的作用以外,还具有促进脂蛋白脂酶和肝脂酶的释放,抑制补体激活,抑制血管生成和肿瘤生长,抗病毒等活性。近来发现肝素在抗炎以及抗肿瘤转移方面也发挥着重要作用。然而,由于肝素强烈的抗凝活性,限制了它的临床应用,对肝素进行化学或酶法修饰,可降低其抗凝活性,但可增强其抗肿瘤作用。

[0003] 肝素的抗凝血活性来自于它的一个特殊的戊糖结构顺序,这个戊糖结构与抗凝血酶(AT-III)的结合可以导致其构象改变而被活化。对肝素这个特殊五糖结构的微小改变都会导致与抗凝血酶结合力的下降,从而显著降低其抗凝血活性。现有研究表明,肝素与 AT-III 结合发挥抗凝血活性取决于其戊糖活性中心的数量。戊糖结构中 N-位,3-0-位及 6-0-位硫酸基参与结合 AT-III,与抗凝血活性有关;而 2-0-位硫酸基和艾杜醛酸的作用尚不清楚,其中 3-0-位硫酸基尤其重要,如果缺少 3-0-位硫酸基,肝素的抗凝血活性则会降低 1000 倍以上。另有研究发现,N-位脱硫酸化肝素的抗凝、抗 FIIa、抗 FXa 活性分别是未修饰肝素的 1.5%、0.9%、0.1%,说明 N-位硫酸基是肝素抗凝活性所必需具有的。

[0004] 几乎所有的研究都证实,肝素的抗肿瘤活性在很大程度上并不依赖于其抗凝血活性,主要取决于它的硫酸基取代情况(sulfation pattern,硫酸化图案)。据文献报道,肝素结构中葡萄糖胺 6-0-位硫酸基的存在对于肝素的抗肿瘤和抗炎活性至关重要。Lapierre 等证实肝素结构中葡萄糖胺 6-0-位硫酸基和 N-位硫酸基对其抗肿瘤转移活性是必需的。并有研究发现 6-0-位和 N-位脱硫酸化肝素可降低肝素的抗病毒活性,而 2-0-位和 3-0-位脱硫酸化肝素则基本无影响。陈金联等研究 N-位脱硫酸肝素对人胃癌重度联合免疫缺陷 SCID 小鼠转移模型肿瘤转移抑制、血管生成和表达的影响。陈明祥等发现 N-位脱硫酸肝素通过抑制胃癌组织 bFGF 基因表达和血管生成,抑制肿瘤转移,而 N-位脱硫酸肝素无明显出血等不良反应。

[0005] 国内外药物研究人员尝试用化学法对肝素的结构改造,化学法脱硫酸化可以在一定的程度上降低肝素的抗凝血活性,但由于缺乏选择性及硫酸化程度过低,导致抗肿瘤活性不明显。因此,选择性地去掉一些与抗凝相关的硫酸基,如 3-0-位硫酸基;用酶法特异性的修饰与抗肿瘤活性有关的位点,如 6-0-位硫酸基、2-0-位硫酸基,就有可能合成具有低抗凝活性的专一抗肿瘤作用的肝素衍生物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的制备方法。

[0007] 本发明的技术方案为:以肝素为起始物,首先用化学法进行完全脱硫酸化肝素的

制备,然后在 pH 9.0 的条件下用硫酸化试剂进行 N- 位重新硫酸化,在此基础上采用 PAPS 再生系统,以 6-OST-1 酶和 2-OST 酶对特定位点进行有效的选择性硫酸化,合成得到具有低抗凝活性的专一抗肿瘤作用的肝素衍生物。

[0008] 本发明提出的具有抗肿瘤活性的低抗凝肝素的具体操作步骤如下:采用不同的硫酸基转移酶组合来实现合成。首先从 N- 位硫酸化肝素出发,通过 AST-IV 和 6-OST-1 合成 N- 位,6-O- 位硫酸化的衍生物;通过 AST-IV 和 2-OST 合成葡萄糖醛酸 2-O- 位硫酸化的衍生物,并进一步通过 AST-IV 和 6-OST-1 合成 N- 乙酰氨基葡萄糖 6 位硫酸化的衍生物,即得 N- 位,6-O-,2-O- 位硫酸化肝素。最后再将以上肝素衍生物在含 10% 甲醇的二甲亚砷溶液中反应 2h,进行 N- 位脱硫酸化,最终得到 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-,2-O- 位硫酸化肝素。

[0009] 本发明的独到之处有两点:首先将对现有肝素药物进行完全脱硫酸化,最大限度地降低抗凝血活性中心的数量,从而大幅度降低其肝素的抗凝血活性。其次用 6-OST-1 酶和 2-OST 酶选择性修饰与抗肿瘤活性有关的硫酸基,提高其活性位点的电荷密度。这种肝素衍生物避免了普通肝素运用于肿瘤患者出现出血、血小板减少、骨质疏松等副作用。本发明将有助于拓宽肝素类药物的临床应用范围,因此其不仅具有科学研究价值,而且将具有较大的社会价值和经济价值。

具体实施方式

[0010] 以下利用实施例进一步详细说明本发明,但不能认为是限定发明的范围。

[0011] 实施例一:完全脱硫酸化肝素的制备

[0012] 1g 肝素钠溶于 20mL 去离子水中,过氢离子交换柱得到肝素酸溶液,用三丁胺(tributylamine, TBA) 将该溶液 pH 调至 5.5 左右,冻干得到肝素三丁胺盐。将冻干粉溶于 25mL 含 10% 甲醇的二甲亚砷溶液中,105℃,反应 24h。反应结束,反应液用等体积水稀释后将其 pH 调至 9,再用 4 倍体积的饱和乙酸钠乙醇溶液醇沉,透析,脱盐,冻干得到完全脱硫酸化肝素。经元素分析测定硫含量确定脱硫酸率达 95% 以上。

[0013] 实施例二:N- 位硫酸化肝素的制备

[0014] 完全脱硫酸化肝素溶于水,按质量比 1 : 2 逐步加入三甲基铵三氧化硫共聚物(trimethylamine sulfur trioxide complex, TMA · SO₃),55℃, pH 9 条件下反应 6h。反应结束调节 pH 至中性,透析、冻干得到 N- 位硫酸化的肝素。

[0015] 实施例三:N- 位,6-O- 位硫酸化肝素的制备

[0016] 通常酶法硫酸化反应条件为 1mg N- 位硫酸化肝素在 20ml 反应液中于室温下震荡(300rpm) 反应 6h。反应液包含 50mM Tris-HCl(pH 7.2),1% Triton X-100,1% BSA,1mM MgCl₂,1mM MnCl₂,1mM PNPS,40 μ M PAP,8mg 6-OST-1 及 4mgAST-IV。100℃下加热反应液十分钟终止反应,离心分离得到上清液,将此上清液与两倍体积的 2.0% 的 NaCl 水溶液混合,对 DEAE 柱上样;依次以 2.0% 的 NaCl 水溶液和 3.0% 的 NaCl 水溶液进行梯度洗脱,收集第二次洗脱所得洗脱液。所得溶液用去离子水透析 24 小时,冻干得 N- 位,6-O- 位硫酸化肝素的冻干粉。

[0017] 实施例四:N- 位,2-O- 位硫酸化肝素及 N- 位,6-O-,2-O- 位硫酸化肝素的制备

[0018] 酶法硫酸化反应条件为 1mg N- 位硫酸化肝素在 20ml 反应液中于室温下震荡

(300rpm) 反应 6h。反应液包含 50mM Tris-HCl (pH 7.2), 1% Triton X-100, 1% BSA, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM PNPS, 40 μ M PAP, 8mg 2-OST 及 4mg AST-IV。100℃ 下加热反应液十分钟终止反应, 离心分离得到上清液, 将此上清液与两倍体积的 2.0% 的 NaCl 水溶液混合, 对 DEAE 柱上样; 依次以 2.0% 的 NaCl 水溶液和 3.0% 的 NaCl 水溶液进行梯度洗脱, 收集第二次洗脱所得洗脱液。所得溶液用去离子水透析 24 小时, 冻干得 N- 位, 2-O- 位硫酸化肝素的冻干粉。在此基础上将反应液调整为 50mM Tris-HCl (pH 7.2), 1% Triton X-100, 1% BSA, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM PNPS, 40 μ M PAP, 8mg 6-OST-1 及 4mg AST-IV, 制备得到 N- 位, 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素。

[0019] 实施例五: 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素的制备

[0020] 将上述肝素衍生物溶于含 10% 甲醇的二甲亚砷溶液中, 55℃, 反应 2h。反应结束用等体积水稀释后将其 pH 调至 9, 再用 4 倍体积的饱和乙酸钠乙醇溶液醇沉, 透析, 脱盐, 冻干得到 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素。

[0021] 实施例六: 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素体外抗栓和抗凝活性测定

[0022] 用底物显色法测定。首先, 用含 1mg/mL BSA 的 PBS 将凝血因子 Xa、thrombin 及抗凝血酶 AT-III 分别稀释为 1U/mL、8U/mL 及 27 μ M 备用。显色底物 S-2765 和 S-2238 分别用 PBS 配成 1mM 的溶液。合成产物用含 50mM Tris-HCl (pH 8.4), 7.5mM Na₂EDTA, 175mM NaCl 的缓冲液配成系列浓度 (1-1000ng/mL) 的溶液。测试时, 首先将 25 μ L 的多糖溶液和 25 μ L 的 AT-III 溶液混合均匀, 于 37℃ 保持 2 分钟。然后加入 25 μ L 的凝血因子 Xa 或 thrombin 溶液, 混合均匀, 于 37℃ 保持 4 分钟。最后, 加入 25 μ L 的显色底物 S-2765 或 S-2238, 混合均匀, 并连续测定 10 分钟内 405nm 处的吸光度变化, 比较并计算凝血因子 Xa 和 thrombin 半抑制值 IC₅₀ (表 1)。结果证实, 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素体外抗栓和抗凝活性显著降低, 制备得到样品为低抗凝活性肝素。

[0023] 表 1 肝素及其衍生物的体外抗栓、抗凝活性

[0024]

名称	抗栓活性 (IC ₅₀ , ng/mL)	抗凝活性 (IC ₅₀ , ng/mL)
肝素	20	25
6-O-位硫酸化肝素	>2000	>3000
2-O-位硫酸化肝素	>5000	>3000
6-O-, 2-O-位硫酸化肝素	>2000	>3000

[0025] 实施例七: 6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素体外抗肿瘤活性研究

[0026] 以黑色素瘤细胞 B16 为体外抗肿瘤实验对象, 取对数生长期的肿瘤细胞进行传代, 细胞悬液以 8×10^4 /mL 接种于 96 孔培养板, 每孔接种 100 μ L, 接种后分别加入终浓度为 0.1、1、10、50、100 μ g/mL 的肝素、6-O- 位硫酸化肝素、2-O- 位硫酸化肝素和 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素, 每个浓度组设 4 个复孔, 对照组不加药物, 培养 48h 后检测细胞的存活率 (表 2)。结果表明, 6-O-, 2-O- 位硫酸化肝素体外抗肿瘤活性显著优于未修饰肝素。

[0027] 表 2 肝素及其衍生物的体外抗肿瘤活性（存活率%）

[0028]

药物浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 药物名称	0	0.1	1	10	50	100
肝素	100.0	101.0	102.3	99.4	96.3	90.8
6-O-位硫酸化肝素	100.0	99.8	99.3	98.1	96.4	94.1
2-O-位硫酸化肝素	100.0	102.3	100.1	99.5	93.2	88.2
6-O-, 2-O-位硫酸化肝素	100.0	99.5	87.6	85.6	84.8	70.7