

## Synthesis, Designed Assembly, and Biological Activity of Heparin Fragments Responsible for Binding Interaction to Platelets

血小板結合に關与するヘパリン部分構造の合成と集合化ならびに生物活性に關する研究

Koshida, Shuhei

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1. Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan / Current address: Discovery Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., 12-4, Sagisu 5-chome, Fukushima-ku, Osaka 553-0002, Japan, FAX: 81-6-6458-0987, E-mail: skoshida@jttk.zaq.ne.jp

**Key Words** : *assembly, binding, clustering effect, heparin, platelet, structurally-defined oligosaccharide, sulfated polysaccharide, synthesis*

### A. Introduction

Heparin, a structurally heterogeneous sulfated polysaccharide, has been used as an effective anticoagulant for over 50 years (1). But, it has been pointed out that pharmaceutical heparin binds to platelets, directly alters platelet functions and induces immuno-sensitization (2). These responses are undesirable side effects in the clinical use of heparin. It is necessary to clarify the binding interaction of heparin with platelets at the molecular level, but there has been limited research reported so far because of the heterogeneity of the heparin molecule and high sensitivity of platelet cells. Suda and Sobel identified heparin-binding proteins on the platelet surface using radio labeled heparin (3), and found that a key disaccharide unit in heparin, *O*-(2-deoxy-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid (abbreviated as GlcNS6S-IdoA2S), is responsible for the binding interaction (4, 5). Furthermore, they suggested that the frequency of GlcNS6S-IdoA2S in a heparin molecule influenced the binding potency (a so-called clustering or polymer effect on binding) (4).

The key disaccharide, GlcNS6S-IdoA2S, cannot be obtained from natural heparin by enzymatic or chemical degradation. Therefore, to develop a clearer understanding of the interaction between heparin and platelets, the synthesis of model compounds containing key disaccharide unit(s) would be very valuable. In this thesis, I first synthesized structurally defined oligomer model compounds containing multiple units of GlcNS6S-IdoA2S, and evaluated their platelet binding activities to understand the clustering effect based on the disaccharide. Additionally, we have recently found that the synthetic pentasaccharide (6) corresponding to the antithrombin III (AT III) binding region in heparin also possesses a distinct binding potency to platelets, although it does not contain GlcNS6S-IdoA2S. To identify the platelet-binding site in the pentasaccharide that may be a novel sequence in heparin responsible for its platelet-binding, the synthesis of partial structures of this particular pentasaccharide was also performed in this work.

### A. イントロダクション

不均一な構造を有する硫酸化多糖ヘパリンは、効果的な抗血液凝固剤として50年以上にわたって使用されている。しかし、血小板と結合することによって血小板の機能を変化させ、免疫系の活性化等を引き起こすことが指摘されている。これらはヘパリンの臨床使用上での副作用となっている。ヘパリンと血小板との結合を分子レベルで明らかにすることが必要とされているが、ヘパリンの不均一性および血小板の高感受性のため、これに關する研究例はほとんど報告されていない。隅田とSobelは放射標識したヘパリンを用いて血小板表面上のヘパリン結合性蛋白質を同定し、またヘパリン中の鍵二糖単位、*O*-(2-deoxy-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid (以下、GlcNS6S-IdoA2Sと略する)が血小板との結合に大きく關与することを見出した。さらに彼らは、ヘパリン1分子中におけるGlcNS6S-IdoA2Sの頻度が結合能に影響することも示唆した。(いわゆる結合におけるクラスターリング効果、またはポリマー効果)

鍵二糖 GlcNS6S-IdoA2S は天然のヘパリンの酵素処理や化学分解で得ることができない。そこで、ヘパリン-血小板相互作用をより明確に理解するために、鍵二糖を含むモデル化合物を合成する事は非常に重要である。本論文では、まず鍵二糖単位に基づくクラスターリング効果を明らかにするため、複数のGlcNS6S-IdoA2S単位を含む構造明確なオリゴマーモデル化合物を合成し、それらの結合能について調べた。さらに我々は近年、ヘパリン中のアンチトロンビンIII(AT III)結合部位に相当する合成五糖が、GlcNS6S-IdoA2S構造を有していないにも関わらず明らかな血小板結合能を有していることを見いだした。この五糖の中に含まれる、ヘパリン中の新規な血小板結合性シークエンスと考えられる構造を同定するために、本研究ではこの五糖の部分構造の合成も行った。

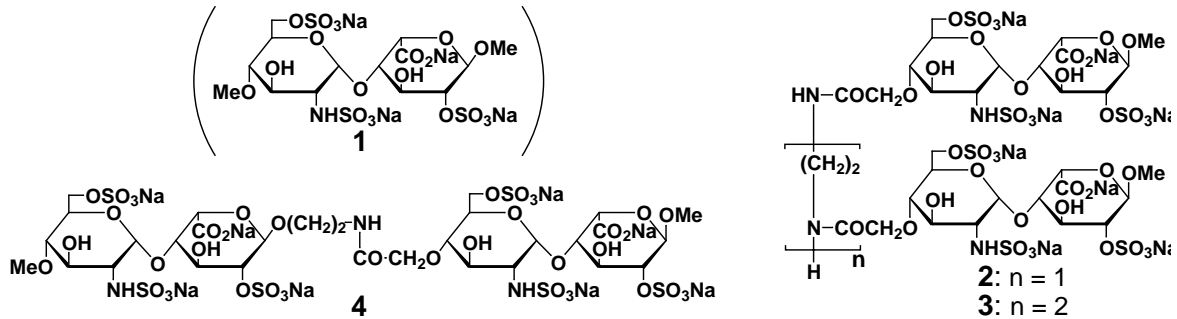


Fig. 1.

### B. Synthesis of Oligomer Compounds Containing Multiple Units of GlcNS6S-IdoA2S and Their Platelet-Binding Activities (7, 8)

Synthesis of two types of oligomer-model compounds was performed (Fig. 1). The compound **2** (containing two units of GlcNS6S-IdoA2S) and **3** (containing three units) were designed so that the units were connected as a 'tail-to-tail' type, and another compound **4** (containing two units) was a 'head-to-tail' type. The special arrangement of the units of GlcNS6S-IdoA2S differs between the two types. The synthesis of **2** was carried out as follows. To predominantly form a  $\alpha$ -D-glucosaminyl linkage to L-iduronic acid, an azide sugar derivative was used for the precursor of the D-glucosamine unit. An azide sugar possessing an O-allyl group at the 4-position and an iduronic acid derivative were prepared, and coupled to give an  $\alpha$ -linked disaccharide. The 4'-O-allyl group was oxidized to a carboxymethyl group and then two units of the disaccharide were condensed with ethylenediamine to form a pseudo tetrasaccharide backbone. Sequential deprotections and O- and N sulfations were performed to give the desired tail-to-tail type **2** containing two units of GlcNS6S-IdoA2S. Compounds **3** and **4** were prepared by a similar procedure.

Through the syntheses described above, the synthesis of oligomer compounds became feasible. In this synthetic concept, however, the protected oligomeric framework is first prepared, and then many steps of deprotections and sulfations must be done. It might be difficult to perform these transformations perfectly for more complex compounds. Thus, to prepare complex and diverse types of oligomer compounds efficiently, a new strategy was planned to assemble components containing the 'completed' GlcNS6S-IdoA2S unit that is already deprotected and sulfated (8). Based on this concept, the sulfated trisaccharide **5** which consisted of the GlcNS6S-IdoA2S and a D-glucose employed as a hydrophilic linker moiety was synthesized (Fig. 2). Using the reducing position of the D-glucose, the corresponding numbers of the component **5** can be assembled

B. 複数の GlcNS6S-IdoA2S 単位を含むオリゴマーモデル化合物の合成と血小板結合活性

2つの形式のオリゴマーモデル化合物の合成を行った(図1)。二糖単位を'tail-to-tail'型に連結するようデザインした、化合物**2**(二単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含む)および**3**(三単位含む)、'head-to-tail'型に連結した**4**(二単位含む)を考案した。この2つの形式間ではGlcNS6S-IdoA2Sの空間的配置が異なっている。化合物**2**の合成は以下のように行った。D-グルコサミンをL-イズロン酸と結合させるため、アジド糖誘導体をD-グルコサミン単位の前駆体として用いた。4位にO-アリル基を有するアジド糖とイズロン酸誘導体を合成し、縮合させることで結合した二糖を得た。4'位のO-アリル基はカルボキシメチル基へと酸化し、2つの二糖をエチレンジアミンと縮合させることによって擬四糖骨格を調製した。次いで脱保護、O、N-硫酸化によって二単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含む目的のtail-to-tail型の**2**を得た。化合物**3**および**4**も同様の方法で合成した。

上で述べてきたように、オリゴマー化合物の合成を可能とした。しかしながら、今までの合成方法ではまず保護オリゴマー骨格を合成し、その後に多段階の脱保護や硫酸化を行っていた。より複雑な化合物に対してこれら多段階の変換を完全に行うことは困難である。そこで、より複雑かつ多様なオリゴマー化合物を効率的に合成するために、既に脱保護や硫酸化を済ませた'完成した'GlcNS6S-IdoA2Sを集積化させる新しい合成戦略を取ることを計画した。この考えに基づき、GlcNS6S-IdoA2Sと親水性リンカー部となるD-グルコースで構成された硫酸化三糖**5**を合成した(図2)。D-グルコース部の還元位を用いて還元アミノ化反応を行い、複数のアミノ基を有するマトリッ

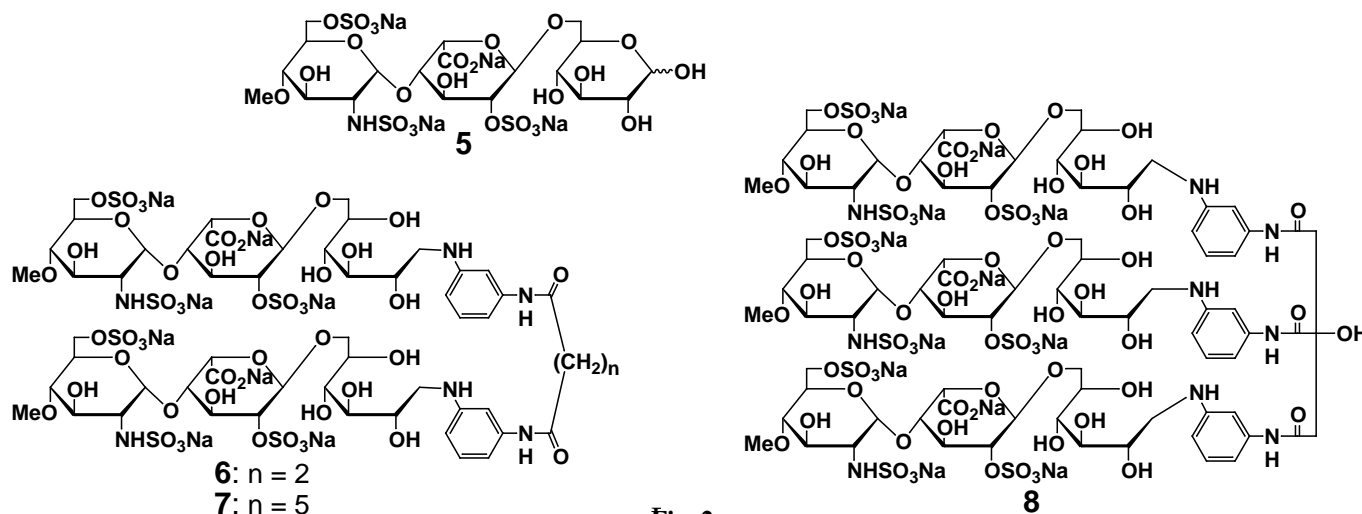


Fig. 2.

by reductive amination reaction onto a matrix having multiple amino groups without alteration of the structure of ‘completed’ GlcNS6S-IdoA2S. After optimizing the reaction conditions for the reductive amination, the assembly of sulfated saccharides became possible using newly developed linkers under acidic conditions (9). The oligomeric compounds **6–8** containing two or three units of GlcNS6S-IdoA2S were prepared using this strategy (8). This method may be applicable not only to sulfated saccharides but also to any oligosaccharides from natural or synthetic sources, provided that they have reducing ends.

The platelet-binding activities of the synthetic oligomers **2–4** and **6–8** were evaluated by the competitive binding assay using  $^3\text{H}$ -labeled heparin (7, 8). The competitive binding activities of synthetic oligomers were compared with those of a commercial heparin and **1** containing a single unit of GlcNS6S-IdoA2S, which was previously confirmed to be a structural element responsible for the platelet-binding of heparin (5). Even at the low concentration range where the monomeric **1** didn’t show significant activity, all oligomeric compounds exhibited distinct binding ability though weaker than that of the commercial heparin of a large molecular weight. Compounds **3** and **8** containing three units of GlcNS6S-IdoA2S showed higher binding activity than **2**, **6** and **7** containing two units. These results clearly indicate the role of the clustering effect based on GlcNS6S-IdoA2S for the binding. Tail-to-tail type **3** containing three units of GlcNS6S-IdoA2S had a binding activity similar to that of the trimer **8**, and tail-to-tail type **2** containing two units showed almost the same binding activity as **6** and **7**. These results suggest that the binding potency is not influenced by the distance between the units of GlcNS6S-IdoA2S. Furthermore, the binding activity of the head-to-tail type dimer **4** was significantly higher than that of the tail-to-tail type dimer **2**, suggesting that the special arrangement of the two units of GlcNS6S-

クス上に、相当する数の **5** をその‘完成した’GlcNS6S-IdoA2Sの構造を変化させることなく集合化することができる。還元アミノ化反応の条件最適化の結果、新規に開発したリンカーを用いて酸性条件で反応を行うことによって硫酸化糖の集合化に成功した。二または三単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含むオリゴマー化合物 **6–8** をこの方法によって合成した。本方法は硫酸化糖だけでなく、還元末端を有する天然または合成由来の糖の集合化にも広く応用可能である。

合成オリゴマー化合物 **2–4**、**6–8** の血小板結合活性はトリチウム標識したヘパリンを用いた結合阻害実験で評価した。合成オリゴマーの結合阻害活性は市販ヘパリン、および血小板結合に必要な最小構造であることが確かめられている一単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含む化合物 **1** と比較した。モノマー体 **1** が十分な活性を示さない低濃度範囲においても、全てのオリゴマー化合物は大きな分子量を持つ市販ヘパリンよりは弱いものの、明らかな結合能を示した。三単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含む化合物 **3**、**8** は二単位含む化合物 **2**、**6**、**7** より強い結合活性を示した。これらの結果は、結合におけるGlcNS6S-IdoA2Sに基づくクラスタリング効果の役割を明らかに示している。三単位のGlcNS6S-IdoA2Sを含むtail-to-tail型の **3** は三量体 **8**、二単位含むtail-to-tail型の **2** は二量体 **6**、**7** とほぼ同じ結合活性を示した。これらのことからGlcNS6S-IdoA2S間の距離は結合能に影響しないことが示唆された。さらに、head-to-tail型の **4** はtail-to-tail型の **2** よりも明らかに強い活性を示し、二単位のGlcNS6S-IdoA2S

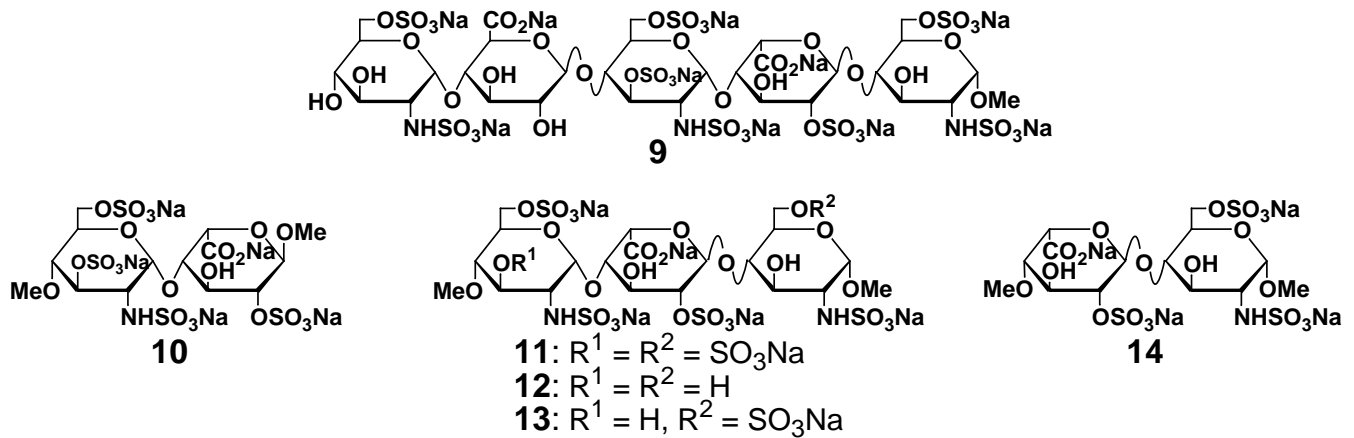


Fig. 3.

IdoA2S influences the activity.

From the platelet-binding potencies of the synthetic oligomers, the role of the clustering effect based on GlcNS6S-IdoA2S for the binding was clearly proved. GlcNS6S-IdoA2S itself shows low binding activity and forms a low-affinity site. The clustering of multiple GlcNS6S-IdoA2S units remarkably increases the affinity.

### C. Synthesis and Platelet-Binding Activity of Partial Oligosaccharides to Identify a Novel Platelet-Binding Site (10)

Recently, we found that the pentasaccharide **9** synthesized by Petitou *et al* (6) corresponding to the AT III binding domain in heparin possesses distinct binding potency to platelets, although it does not contain GlcNS6S-IdoA2S. To identify the platelet-binding sequence in the pentasaccharide, that may be a novel sequence in heparin responsible for the platelet-binding, partial structures of this particular pentasaccharide were synthesized. It was already known that a heparin fragment that is similar to the non-reducing trisaccharide in **9** was not responsible for the binding(11). Therefore, we focused on the trisaccharide at the reducing end of **9**, and the trisaccharide **11** and its partially desulfated derivatives (**12** and **13**), as well as two disaccharides (**10**, **14**) were synthesized (Fig. 3). From the platelet-binding assay of these synthetic compounds, only the trisaccharide **11** had a distinct binding activity, and the activity was high and comparable to that of oligomers **3** and **8** containing three units of GlcNS6S-IdoA2S. Therefore, it was concluded that the trisaccharide sequence, *O*-(2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranose (abbreviated as GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S), was a novel and high-affinity binding site to platelets in heparin.

の空間的配置が活性に影響を及ぼすことも示唆された。

合成オリゴマーの血小板結合能から、結合における GlcNS6S-IdoA2Sに基づくクラスタリング効果の役割がはっきりと証明された。GlcNS6S-IdoA2Sは単体では弱い結合能しか示さず、low-affinity siteである。複数のGlcNS6S-IdoA2S単位のクラスタリングによってアフィニティーは著しく強まる。

### C. 新規血小板結合部位同定のための部分構造の合成と血小板結合活性

我々は近年、Petitouらによって合成されたヘパリン中のAT III結合部位に相当する五糖 **9** が、GlcNS6S-IdoA2S 構造を有しないにも関わらず明らかな血小板結合能を有することを見出した。この五糖の中に含まれる、ヘパリン中の新規な血小板結合性シーケンスと考えられる構造を同定するために、この五糖の部分構造の合成を行った。既に **9** の還元末端側三糖に似た構造をしたヘパリンフラグメントは結合に関与しないことがわかっていて、そこで、**9** の還元末端側三糖に注目し、三糖 **11**、その部分脱硫酸化誘導体 (**12**, **13**)、および2種の二糖 (**10**, **14**) を合成した (図3)。これら合成化合物の血小板結合能測定の結果、三糖 **11** のみが明らかな結合活性を示し、その結合活性は三単位の GlcNS6S-IdoA2S を含むオリゴマー **3** および **8** に匹敵するぐらいの高いものであった。よって、三糖シーケンス *O*-(2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranose (GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S) が新規なヘパリン中の血小板結合high-affinity siteであると結論した。

## D. Conclusion

An efficient method of synthesizing various types of heparin fragments was established, and the structural specificity of heparin for the platelet binding was clarified. The GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S may be a high-affinity site, but is a minor constituent in heparin because of the rare 3-O-sulfation at the glucosamine residue. On the other hand, the GlcNS6S-IdoA2S is the most predominant sequence in heparin, but does not have sufficient affinity by the disaccharide alone. Multi-unit assembly of GlcNS6S-IdoA2S was found to be necessary in the present work. It is proposed that a combination of GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S and clustering of GlcNS6S-IdoA2S are responsible for the binding of heparin to platelets: the cluster region of GlcNS6S-IdoA2S in heparin may be responsible for the first binding and GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S is the final binding site after the dynamically equilibrium. It becomes possible to analyze the binding interaction of heparin with proteins on platelet or other vascular cells using structurally defined heparin partial structure. Further work is now in progress in our laboratory.

## D. まとめ

様々なタイプのヘパリンフラグメントの効率的な合成法を確立し、ヘパリンの血小板結合における構造特異性を明らかにすることができた。GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6Sはhigh affinity siteであるが、グルコサミン残基の3位硫酸化は稀なため、ヘパリン中ではこの構造はマイナーな構成成分である。一方、GlcNS6S-IdoA2Sはヘパリン中でもっとも主要な構造であるが、単体では十分なアフィニティーを持たない。複数個のGlcNS6S-IdoA2Sの集合化が必要であることが本研究において明らかになった。GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6Sと集合化したGlcNS6S-IdoA2Sの組合せがヘパリンの血小板結合に関与していると考えられる。つまり、ヘパリン中のGlcNS6S-IdoA2Sの集合化部位が先ず最初に結合し、動的平衡の後にGlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6Sが最終的な結合部位となっているのであろう。このように構造明確なヘパリン部分構造を用いることによってヘパリンと血小板や他の血管系細胞上の蛋白との相互作用を観測することが可能になった。我々の研究室ではさらなる研究が進行中である。

## References

1. "Heparin" (1989) (Lane, D.A., Lindahl, U., Eds.) Edward Arnold, London
2. Sobel, M. (1992) *Perspec. Vasc. Surg.* **5**, 1–30
3. Suda, Y., Koshida, S., Kimura, K., Fukase, K., Kusumoto, S., Marques, D., Bird, K., and Sobel, M. (1996) *Polymer Preprints* **37**, 151–152
4. Suda, Y., Marques, D., Kermode, J.C., Kusumoto, S., and Sobel, M. (1993) *Throm. Res.* **69**, 501–508
5. Suda, Y., Bird, K., Shiyama, T., Koshida, S., Marques, D., Fukase, K., Sobel, M., and Kusumoto, S. (1996) *Tetrahedron Lett.* **37**, 1053–1056
6. Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J., Sinay, P., Jacquinot, J.C., and Torri, G. (1986) *Carbohydr. Res.* **147**, 221–236
7. Koshida, S., Suda, Y., Fukui, Y., Ormsby, J., Sobel, M., Kusumoto, S. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 5725–5728
8. Koshida, S., Suda, Y., Sobel, M., Kusumoto, S. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 1287–1292
9. Koshida, S., Suda, Y., Arano, A., Sobel, M., and Kusumoto, S. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 1293–1296
10. Koshida, S., Suda, Y., Sobel, M., Ormsby, J., and Kusumoto, S. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3127–3132
11. Suda, Y., Ueda, K., Koshida, S., Yamada, S., Sugahara, K., Bird, K., Marques, D., Sobel, M., and Kusumoto, S. *J. Biol. Chem.* (submitted)

Received on December 17, 2000, accepted on January 18, 2001

### Profile of the Author



**Shuhei Koshida** received BS and MS degree from Osaka University. He worked on the chemistry of heparin and obtained a Doctoral Degree of Philosophy in Science in 1999 from the same university under the supervision of Professor Shoichi Kusumoto. He then worked as a Research Associate of Graduate School of Science of Osaka University. Since

Apr 2000, he works at the Discovery Research Laboratories of SHIONOGI & CO., LTD.