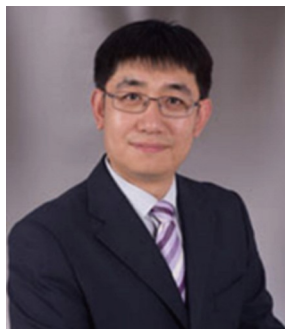


综述



生举正, 博士, 教授, 山东大学药学院微生物与生化药学博士生导师。依托国家糖工程技术研究中心和天然产物化学生物学(教育部)重点实验室, 团队基于合成生物学理念, 搭建糖胺聚糖工程化生物合成体系, 推动糖类药物开发研究。承担国家重点研发计划重点项目(首席), 授权多项国际和国家专利, 产业化应用多项技术成果, 成果发表于*Nat Commun*、*Sci Adv*等国际高水平期刊。

酶法精准合成活性类肝素寡糖

辛思语¹, 徐美鑫^{1,2}, 生举正^{1,2*}

(¹山东大学药学院, 济南 250000; ²山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250000)

摘要: 肝素是一类重要的人源直链硫酸化多糖, 作为重要的抗凝血和治疗血栓性疾病的临床药物被广泛使用。近年来, 肝素的糖链结构所蕴含的生物信息引起了广泛关注, 其抗菌和抗炎等其他生物学功能也逐渐被揭示。然而, 目前肝素类药物的生产主要依赖于动物组织提取, 这导致了产品结构的异质性、潜在的污染风险以及质量控制的复杂性。此外, 尽管全化学合成肝素的方法存在, 但其合成过程繁琐, 且合成的糖链长度有限, 难以满足临床药物对结构多样性的需求。因此, 通过酶促级联反应实现活性类肝素寡糖的精准合成, 为解决当前肝素类药物面临的问题提供了一种有效的策略。本文系统综述了类肝素寡糖酶法合成体系的最新研究进展。

关键词: 类肝素寡糖; 酶法合成; 结构确定

Enzymatic methods for the precise synthesis of bioactive heparin-like oligosaccharides

XIN Siyu¹, XU Meixin^{1,2}, SHENG Juzheng^{1,2*}

(¹School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250000, China;

²National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Ji'nan 250000, China)

Abstract: Heparin represents a significant category of straight-chain sulfated polysaccharides derived from human sources. It is extensively utilized as a vital clinical medication for anticoagulation and the management of thrombotic disorders. Lately, there has been a surge of interest in the biological information encoded within the glycan chain of heparin, with its additional biological roles, including antimicrobial and anti-inflammatory

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFA0914300); 山东省科技厅项目(2022SFGC0104)

第一作者: E-mail: 202216781@mail.sdu.edu.cn

*通信作者: E-mail: shengjuzheng@sdu.edu.cn

properties, being progressively uncovered. However, the current methods for producing heparin analogs predominantly depend on extraction from animal tissues. This approach results in product structural heterogeneity, potential contamination risks, and intricate quality control challenges. Although there is an option for the total chemical synthesis of heparin, the arduous synthesis process and the restricted length of the glycan chains produced make it challenging to fulfill the clinical demand for structural diversity. Consequently, the precise synthesis of bioactive heparin-like oligosaccharides through enzymatic cascade reactions emerges as a viable strategy to address the issues currently encountered with heparin analogs. In this work, we provide a comprehensive review of the recent advancements in the enzymatic synthesis system for the creation of heparin-like oligosaccharides.

Key Words: heparin-like oligosaccharides; enzymatic synthesis; defined structure

肝素(heparin, HP)自被发现以来,已在抗凝血治疗领域中广泛使用近一个世纪,成为治疗血栓性疾病的首选药物^[1]。近年来,肝素的糖链结构所蕴含的生物信息引起了广泛关注,随着研究的不断深入,其抗菌、抗炎、抗病毒等其他生物学功能也逐渐被揭示。在临床实践中,肝素不仅用于心脑血管疾病、肺病、肾病、癌症等多种疾病的辅助治疗,而且在COVID-19大流行期间,作为首选的抗凝药物,在治疗中发挥了重要作用^[2]。

未分级肝素(unfractionated heparin, UFH)是最早投入临床使用的肝素类药物,被称为第一代肝素,其相对分子质量为15 000~19 000。目前,临床使用的UFH是从猪小肠黏膜组织中提取制备的。这一制备过程导致肝素多糖原料在不同批次间存在显著差异,并且伴随着供应链的不安全性、潜在的掺假以及污染等风险。2018年8月,非洲猪瘟的爆发进一步加剧了全球肝素供应的紧张局势^[3]。

在上世纪八十年代,医学界迎来了第二代肝素——低相对分子质量肝素(low-molecular weight heparin, LMWH),其相对分子质量为3 500~6 000,通过UFH的可控化学解聚或酶法解聚制备而成。相较于UFH,LMWH的优势在于其便于皮下注射,具有更持久的半衰期、更高的生物利用度,以及较低的肝素诱导血小板减少症(heparin-induced thrombocytopenia, HIT)和骨质疏松症风险^[4]。然而,LMWH通常表现出多分散性和结构异质性。这导致了其药效学和药代动力学特性的显著差异。此外,LMWH的抗凝作用较难逆转,这也可

能增加了出血风险。

继LMWH之后,化学合成方法制备的超低相对分子质量肝素(ultra low-molecular weight heparin, ULMWH)问世,其平均相对分子质量小于2 000。其中,最具代表性的是磺达肝癸钠(fondaparinux sodium, FS),商品名为Arixtra^[5],在2001年成功上市。与UFH和LMWH相比,ULMWH有明确的化学结构,皮下注射的生物利用度高,出血风险低。然而,其化学合成过程复杂,需要多达60个步骤,且总收率不足0.1%,这导致了其生产成本的显著提高,限制了其在大规模应用中的可行性^[6]。尽管已有研究团队通过改进合成策略,实现了通过14个步骤以3.5%的总产率合成磺达肝癸钠的关键前体^[7],但合成过程中仍需进行多次纯化以去除副产物。这进一步增加了生产成本并降低了总产量。

尽管存在全化学合成肝素的方法,但其合成过程繁琐,且合成的糖链长度有限,难以满足临床药物对结构多样性的需求。因此,目前临床使用的肝素类药物主要依赖于从动物组织中提取,但2007—2008年爆发的肝素危机引发了人们对动物源性肝素可靠性与安全性的普遍担忧,这促使我们寻求开发新的合成方法——化学酶法合成。化学酶法合成结合了化学合成的灵活性和酶促反应的立体及区域选择性,同时借助酶的高催化效率,能够高效、精确地合成具有生物活性的类肝素寡糖。本文系统综述了类肝素寡糖化学酶法合成体系的最新研究进展。

1 肝素的生物合成过程

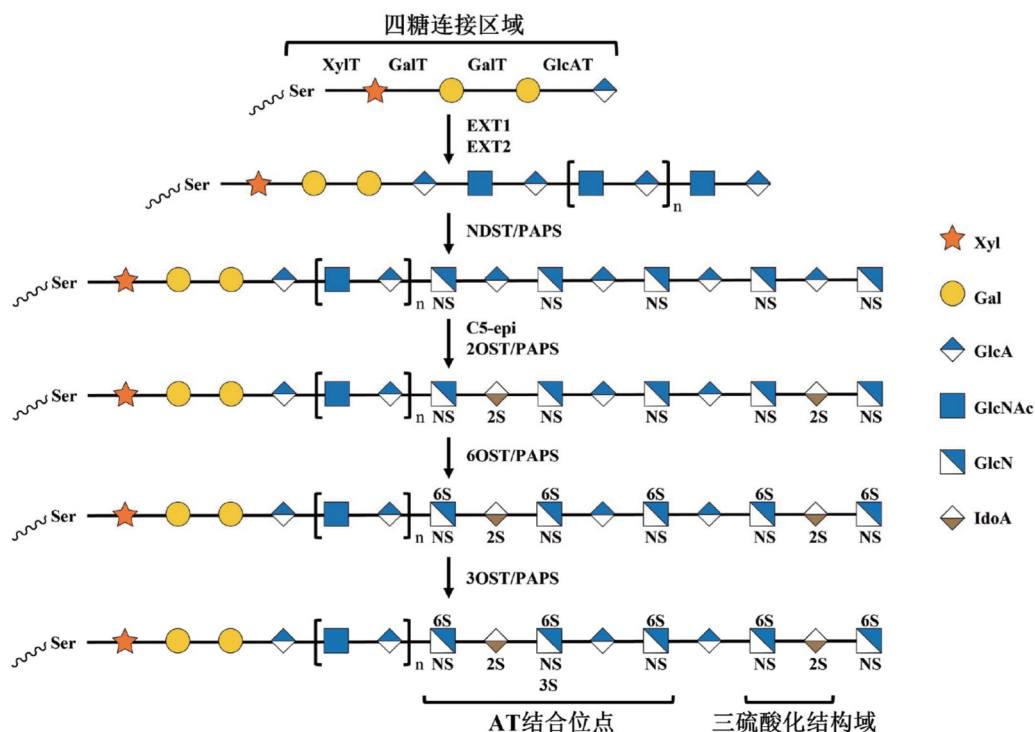
肝素和硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)是一类重要的糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG), 肝素在结缔组织型肥大细胞中生物合成, 而HS在几乎所有细胞中都能合成。它们不仅具有很强的抗凝作用, 而且在维持细胞功能方面也起着至关重要的作用。

1.1 肝素的基本结构

肝素和HS具有相似的二糖重复单元结构, 是由 β -D-葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid, GlcA)或 α -L-艾杜糖醛酸(L-iduronic acid, IdoA)与葡萄糖胺(glucosamine, GlcN)通过1,4-糖苷键交替连接形成的线性共聚物。该二糖单元可以发生不同程度的硫酸化修饰, 但肝素的硫酸化程度较高, 相应地, 其抗凝血活性也更为显著^[8]。由于肝素分子链的多分散性和结构多样性, 肝素表现为一种高度异质且带有大量负电荷的多糖, 这种结构特征赋予了肝素与多种不同蛋白质相互作用的能力, 从而产生了多种生物活性。

1.2 肝素的生物合成

肝素存在于肥大细胞内, 其生物合成过程涉及内质网和高尔基体中的一系列复杂酶促反应。肝素的生物合成(图1)起始于四糖核心结构的合成—— β -D-葡萄糖醛酸- β -D-半乳糖- β -D-半乳糖- β -D-木糖-(β -D-glucuronic acid-D-galactose-D-galactose-D-xylose, -GlcA-Gal-Gal-Xyl-), 该过程由四种不同的酶催化。首先, 木糖基转移酶-1(xylosyltransferase-1, XylT-1)或XylT-2将Xyl连接到丝氨酸上, 随后, 半乳糖基转移酶-1(galactosyltransferase-1, GalT-1)和GalT-2依次添加Gal, 而葡萄糖醛酸基转移酶(glucuronosyltransferase, GlcAT)负责添加GlcA^[9]。接下来, 糖基转移酶外切蛋白1(exostosin 1, EXT1)和外切蛋白2(exostosin 2, EXT2)交替催化添加GlcA和N-乙酰基-D-葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc), 以延长GAG链^[10]。随着GAG链的延长, N-脱乙酰基酶/N-硫酸基转移酶(N-deacetylase/N-sulfotransferase, NDST)催化GlcNAc生成N-硫酸基-D-葡萄糖胺(N-sulfo-D-



Ser: 丝氨酸; Xyl: 木糖; Gal: 半乳糖; GlcA: 葡萄糖醛酸; GlcNAc: 乙酰葡萄糖胺; GlcN: 葡萄糖胺; IdoA: 艾杜糖醛酸; PAPS: 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐, 作为硫酸基供体; AT: 抗凝血酶

图1 肝素的生物合成过程及抗凝结构序列

glucosamine, GlcNS)^[11]。此后, 肝素C5-差向异构酶(C5-epimerase, C5-epi)将大部分GlcA转化为IdoA。然后, 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)作为硫酸基供体, 2-O-硫酸基转移酶(2-O-sulfotransferase, 2OST)催化IdoA和少量GlcA分别生成2-O-硫酸基-L-艾杜糖醛酸(2-O-sulfo-L-iduronic acid, IdoA2S)和2-O-硫酸基-D-葡萄糖醛酸(2-O-sulfo-D-glucuronic acid, GlcA2S)。C5-epi和2OST均只有一种亚型, 并共定位于高尔基体^[12], C5-epi可以靶向GlcNS富集的区域, 之后在C5-epi/2OST复合物的作用下, 一旦引入第一个2-O-硫酸基团, 2OST将催化形成连续的含有IdoA2S的结构域^[13]。随后, 6-O-硫酸基转移酶(6-O-sulfotransferase, 6OST)对GlcNAc或GlcNS的C6位羟基进行6-O-硫酸化^[14]。最终, 3-O-硫酸基转移酶(3-O-sulfotransferase, 3OST)在GlcNAc和GlcNS残基的C3位羟基上引入硫酸基。经过这一系列酶促反应合成的肝素链与核心蛋白丝氨酸残基共价结合, 形成蛋白多糖, 储存在肥大细胞的分泌颗粒中。在需要时, 肝素链可被肝素酶裂解, 从细胞外基质中释放, 并发挥其生物学作用^[15]。

1.3 肝素的抗凝结构序列

五糖结构序列(GlcNAc/NS6S→GlcA→GlcNS3S6S→IdoA2S→GlcNS6S)(图1)已被确认为肝素和HS中能抗凝血酶(antithrombin, AT)特异性结合的最小结构单元。这种结构通过与AT特异性结合, 增强AT对凝血因子Xa(factor Xa, FXa)的抑制作用, 发挥其抗凝血活性。通过化学合成或化学酶法合成得到的ULMWH通常包含此种结构, 因此它们被广泛认为具有特异性抗FXa活性, 而对凝血因子IIa(factor IIa, FIIa)的抑制作用较弱。

在钙离子的参与下, 较长的肝素链通过模板效应结合AT和FXa, 从而进一步增强了对FXa的抑制效果。对于FIIa的抑制同样通过模板效应, 形成肝素、AT和FIIa的三元复合物需要在五糖结构的非还原端至少有13个额外的糖单元, 相对分子质量约为5 400。然而, 即便是相对分子质量低于5 400的肝素片段, 也能够对FIIa起到一定的抑制作用^[16]。因此, UFH和LMWH表现出不同的抗

FIIa和FXa活性。

此外, 一种包含重复三硫酸化的二糖单元结构(图1)也展现出一定的抗凝血活性。尽管这种三硫酸化的二糖结构对AT的亲和力并不高, 但它能够与肝素辅因子及肝素抑制剂结合, 进而发挥抗凝血的作用^[17]。

2 用于化学酶法合成类肝素寡糖的构建单元

2.1 糖基供体

尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)单糖作为GAGs化学酶促合成的关键供体, 通过糖基转移酶或骨架合酶的催化转移到糖基受体上。其中, UDP-GlcA和UDP-GlcNAc是肝素化学酶法合成所需的天然供体底物。UDP-GlcA可以通过辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)依赖的UDP-葡萄糖脱氢酶催化UDP-Glc氧化合成^[18]。然而, 由于NAD合成成本较高, 其在大规模生产中的应用受限。Muthana等^[19]开发了一种用于合成UDP-糖醛酸的一锅多酶法, 该方法以拟南芥葡萄糖醛酸激酶(*Arabidopsis thaliana* glucuronokinase, AtGlcAK)为基础, 结合UDP-糖焦磷酸化酶(UDP-sugar pyrophosphorylase, USP)和多杀性巴氏杆菌无机焦磷酸化酶(*Pasteurella multocida* inorganic pyrophosphatase, PmPpA), 从简单的游离单糖GlcA合成UDP-GlcA, 实现了高达80%的UDP-GlcA产率。

N-乙酰己糖胺1-激酶(N-acetylhexosamine 1-kinase, NahK)被用于化学酶法合成GlcNAc-1-磷酸(GlcNAc-1-P)及其类似物^[20,21]。GlcNAc-1-P尿苷转移酶(GlcNAc-1-P uridylyltransferase, GlmU)则负责催化GlcNAc-1-P转化为UDP-GlcNAc^[22,23]。Gottschalk等^[24]利用这两种酶实现了UDP-GlcNAc的规模化制备。随后, 有研究者构建了同时具有NahK和GlmU活性的融合酶, 以83%的收率合成UDP-GlcNAc, 并简化了合成及纯化步骤, 同时该融合酶还具有合成UDP-GlcNAc类似物的潜力^[25]。

由于只有具有N-硫酸基转移酶(N-sulfotransferase, NST)活性的结构域才可以在大肠杆菌表达系统中表达, 导致进行N-硫酸化修饰时缺乏有效的脱乙酰基手段。这使得合成含有GlcNS残基的肝素骨架成为一个限制因素。为解决这一问

题,科学家们引入了一种非天然的糖核苷酸——尿苷二磷酸 N -三氟乙酰葡萄糖胺(uridine diphosphate N -trifluoroacetylglucosamine, UDP-GlcNTFA),它不仅是大肠杆菌K5 N -乙酰氨基葡萄糖基转移酶(*Escherichia coli* K5 N -acetylglucosaminyl transferase, KfiA)的良好底物(转化率>95%),而且多杀性巴氏杆菌肝素合酶2(*Pasteurella multocida* heparosan synthase 2, PmHS2)也能催化在非还原端具有GlcNTFA的寡糖链的延伸^[26]。引入的GlcNTFA残基可以在温和的碱性条件下脱去三氟乙酰基,进而进行 N -硫酸化修饰。不过,GlcNTFA残基容易水解生成GlcNH₂,一旦非还原端的GlcNTFA残基发生水解,糖链将无法继续延伸。

Chen等^[18]通过将GlcN的C6位羟基替换为叠氮基,成功合成了包括UDP-GlcNAcN₃在内的糖核苷酸,利用UDP-GlcNAcN₃在PmHS2的催化下合成双糖(产率91%),并以100%的转化率合成了三糖,而叠氮基可以通过催化加氢转化为氨基,进而进行 N -硫酸化修饰。

2.2 硫酸基供体

PAPS是一种天然的硫酸基供体,由ATP硫酸腺苷酸转移酶(ATP sulfate adenylyltransferase, ATPS)和腺苷-5'-磷酸硫酸(adenosine-5'-phosphosulfate, APS)激酶(ATP adenylylsulfate 3'-phosphotransferase, APSK)催化ATP生成^[27]。Zhou等^[28]使用来自乳酸克鲁维酵母的ATPS、来自产黄青霉菌的APSK和焦磷酸化酶,通过酶促反应合成PAPS,从1 L的反应体系中成功获得了5 g PAPS,且成本大约50美元,显著降低了肝素寡糖合成的经济成本。

为了进一步提升ATP向PAPS转化的效率,研究者开发了一种ATP再生系统,该系统与PAPS合成相结合,利用磷酸烯醇式丙酮酸钾作为磷酸供体,将合成过程中产生的副产物ADP重新转化为ATP^[29]。Xu等^[30]通过融合不同物种中已鉴定的ATPS和APSK,构建了一种新型的人工活性双功能酶,该酶能够直接将ATP转化为PAPS,并联用了一种多磷酸盐依赖性的ATP再生系统,使用焦磷酸盐(pyrophosphate, PPi)作为磷酸盐供体,ATP向PAPS的转化率达到92.3%。与磷酸烯醇式丙酮酸钾

相比,PPi作为副产物可以循环利用,这为PAPS的大规模合成提供了更低成本的可能性。然而,需要注意的是,ATP再生系统在联用过程中可能会因为积累的PAP对硫酸基转移酶产生反馈抑制作用。

Xu等^[31]发现,APS也可以作为活性硫酸基供体,但其利用率相对较低,以NST为例,其活性大约只有PAPS的一半。此外,他们还设计了PAPS和APS的再生系统,其中PAPS的再生系统能够持续提供PAPS并消耗积累的PAP,从而提高了PAPS的利用率。

Burkart等^[32]开创性地以对硝基苯硫酸酯(p -nitrophenyl sulfate, PNPS)为主要的硫酸基供体,构建了一个大鼠芳基硫酸基转移酶Ⅳ(aryl sulfotransferase Ⅳ, ASTⅣ)依赖性的PAPS再生系统。鉴于PAPS的价格较为昂贵,利用ASTⅣ依赖的PAPS再生系统,通过一锅多酶法合成肝素,可以有效减少PAPS的用量^[33]。然而,有毒副产物对硝基苯酚的积累以及相对较高成本的底物PNPS限制了该系统在大规模合成中的应用。

2.3 起始受体

在化学酶法合成类肝素寡糖的过程中,多种单糖和二糖衍生物被用作起始受体。它们的应用极大地推动了化学酶法合成类肝素寡糖技术的进步。Xu等^[34]采用GlcA-AnMan(表1)作为起始受体,成功合成了两种结构均一的ULMWH。然而,由于该受体缺乏疏水性发色团,限制了其广泛应用。

GlcNAc-OMe^[35](表1)在PmHS2的催化下可以进行糖基化,生成GlcA-GlcNAc-OMe,该产物已被用作化学酶法合成Arixtra的起始受体。尽管如此,GlcNAc-OMe并不是PmHS2的理想受体(转化率≤15%),且不能被紫外检测,不利于后续检测和纯化。因此,他们将^FBoc(表1)标签连接在GlcA-GlcNAc-OMe二糖受体上,成功合成了一系列部分 N -硫酸化、6- O -硫酸化的乙酰肝素寡糖,这些带有氟标签的寡糖可以通过氟固相萃取快速纯化,但^FBoc的大体积可能会干扰酶的识别和结合^[36]。

此外,还有一类市售的 β -葡萄糖醛酸苷衍生物,因其还原端具有疏水性紫外发色团被广泛用作起始受体,包括GlcA- p NP^[37]和GlcA- p NA-N₃^[38]。 p NA-N₃(表1)含有一个叠氮基,可以用作探针或贴在芯片上用于聚糖微阵列分析,同时还能通过叠

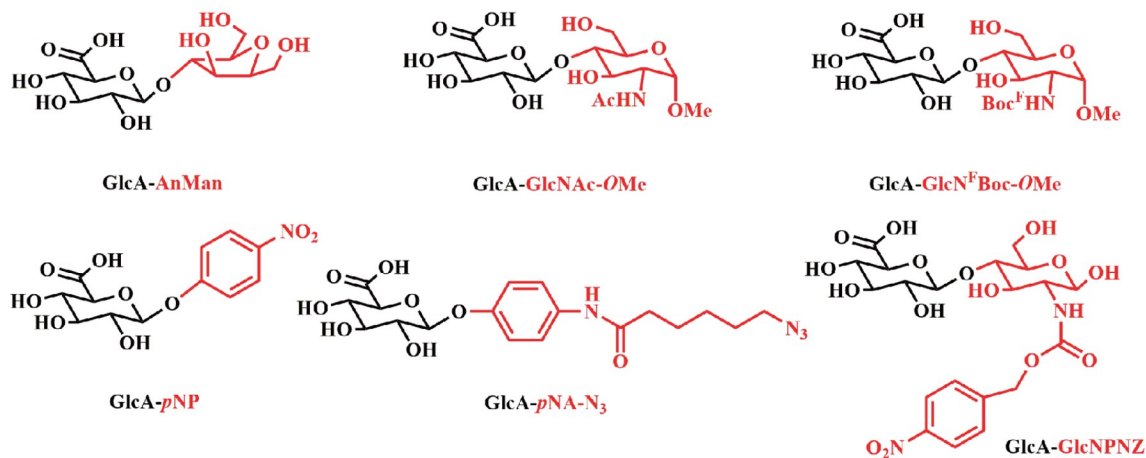


图2 起始受体结构

表 1 起始受体部分结构名称

起始受体	中文全称	英文全称
AnMan	2,5-脱水甘露醇	2,5-anhydromannose
GlcNAc-OMe	N-乙酰葡萄糖胺-O-甲基糖苷	N-acetyl-glucosamine-O-methylglycoside
^F Boc	氟碳酸叔丁基二碳酸酯	Fluorous tert-butyl decarbonate
pNP	对硝基苯酚	Para-nitrophenol
pNA-N ₃	N-(6-叠氮基己酰胺)对氨基苯酚	N-(6-azidohexanamidyl)-para-aminophenol
PNZ	对硝基苄氧羰基	Para-nitrobenzyloxycarbonyl

氮化物的特异性反应进行进一步修饰^[39]。由于pNP (表1)和pNA-N₃与C18色谱柱的高亲和力，可以使用C18填料进行检测和纯化。然而，对硝基苯基在体内可能代谢为有害的对硝基苯酚，潜在的毒性问题限制了其在临床上的使用。

Zhang等^[40]合成了带有PNZ基团(表1)标记的二糖受体GlcA-GlcNPNZ。PNZ是一种疏水性紫外发色团，可以通过氢解选择性地去除。该二糖受体具有糖基化效率高、紫外检测灵敏、与C18亲和力强等优点。GlcA-GlcNPNZ的合成是以GlcA-pNP为起始物，经四步反应，并在肝素酶Ⅲ的催化下完成的，总产率达到了87.5%。

3 化学酶法合成类肝素寡糖

体外化学酶法合成类肝素寡糖，模拟了肝素的生物合成过程，需要多种酶的参与(表2)，融合了化学衍生化的灵活性与酶促反应的精细立体及区域选择性。同时，该方法充分利用了酶的高催化活性，使得活性类肝素寡糖的合成过程既高效又

精准。更重要的是，这一合成策略可以在温和且环保的条件下进行，为肝素类药物的研发和生产提供了一个绿色可持续的途径。

3.1 类肝素寡糖骨架的延伸

类肝素寡糖的合成过程通常以单糖或双糖受体为起始，借助天然或非天然的供体底物，在酶的催化作用下进行糖链的逐步延伸。这一过程主要通过重组表达的KfiA/大肠杆菌K5葡萄糖醛酸转移酶(*Escherichia coli* K5 glucuronyltransferase, KfiC)和PmHS2来实现^[41]。KfiA和KfiC均来源于大肠杆菌K5菌株，其中KfiA负责将GlcNAc引入肝素骨架；而KfiC作为一种葡萄糖醛酸转移酶，负责引入GlcA残基。研究表明，KfiC与KfiA的相互作用对于KfiC的GlcA转移酶活性至关重要，但对于KfiA的活性则不是必需的^[42]。

PmHS2能够催化GlcNAc和GlcA的添加，Na等^[43]发现，去除PmHS2 N末端的80个氨基酸残基可以显著提高酶的稳定性和表达水平，同时保留其底物混杂性。此外，还有研究发现，PmHS2中

表2 类肝素寡糖合成中使用的酶

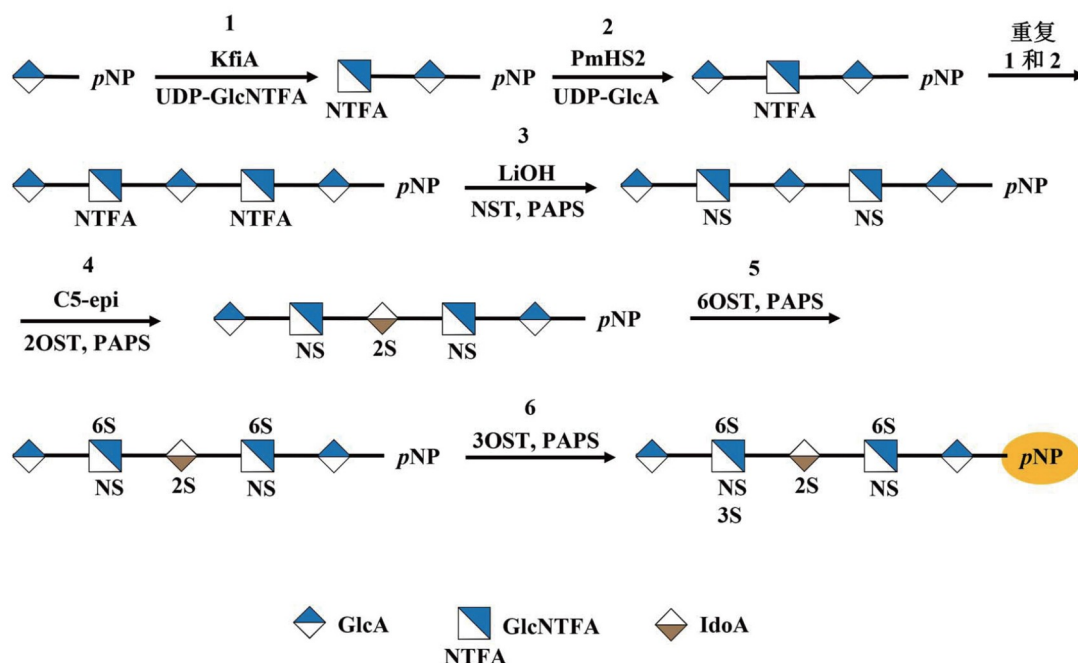
酶	缩写	功能
<i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖基转移酶	KfiA	将GlcNAc转移到肝素骨架上进行合成
多杀性巴氏杆菌肝素酶2	PmHS2	将GlcA和GlcNAc转移到肝素骨架上进行合成
<i>N</i> -脱乙酰基酶/ <i>N</i> -硫酸基转移酶	NDST	将GlcNAc转化为GlcNS
C5-差向异构酶	C5-epi	将GlcA转化为IdoA
2- <i>O</i> -硫酸基转移酶	2OST	对IdoA或GlcA进行2- <i>O</i> -硫酸化修饰
6- <i>O</i> -硫酸基转移酶	6OST	对GlcNS/GlcNAc进行6- <i>O</i> -硫酸化修饰
3- <i>O</i> -硫酸基转移酶	3OST	对GlcNS±6S进行3- <i>O</i> -硫酸化修饰, 不同亚型的底物特异性不同

两个活性催化结构域(GlcNAc-T和GlcA-T)的共存会导致降解活性, 合成较长产物的催化效率和纯度受到这种双功能酶的反向糖基化活性限制, 这表明天然的单功能糖基转移酶是类肝素寡糖合成的更好选择^[44]。

Stancanelli等^[45]发现, PmHS2的截短体PmHS2(98-651)和PmHS2(98-644)均能使用UDP-GlcNH₂作为七糖[GlcA-(GlcNAc-GlcA)₃-pNP]的供体, 而PmHS2的突变体F529A能够利用非天然的糖供体UDP-GlcNS, 从而将GlcNS直接引入类肝素寡糖骨架中。尽管PmHS2突变体使用这些非天然的糖基供体的活性极低, 需要比野生型高约7倍的底物浓

度才能进行催化反应, 但这为我们提供了新的思路, 除了发掘新的非天然糖基供体外, 还可以通过改造相应的酶, 增强其对现有底物的适用性, 从而显著提高化学酶法合成类肝素寡糖的效率。

以市售的GlcA-pNP为起始受体, KfiA和PmHS2分别催化UDP-GlcNTFA/UDP-GlcNAc和UDP-GlcA转化为GlcNTFA/GlcNAc和GlcA, 糖链不断延伸(图3)。引入的三氟乙酰基可以在温和的碱性条件下去除, 以便进行后续硫酸化修饰, 利用UDP-GlcNTFA能够在寡糖的特定位置精确引入GlcNS残基, 成功合成了结构均一的ULMWH^[34]和



GlcA: 葡萄糖醛酸; GlcNTFA: 三氟乙酰葡萄糖胺; IdoA: 艾杜糖醛酸; PAPS: 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐, 作为硫酸基供体

图3 化学酶法合成ULMWH

LMWH^[37]。

此外, 也可以使用UDP-GlcNAcN₃在PmHS2的催化下进行糖链延伸, 叠氮基转化为氨基后, 通过化学方法选择性进行*N*-硫酸化, 合成了在GlcN的C2、C6位含有*N*-硫酸基团的HS类似物寡糖。由于具有非天然的*N*-硫酸化修饰, 这些产物可能对肝素酶和溶酶体降解具有抗性, 从而可能增加这些寡糖的生物半衰期^[18]。

3.2 类肝素寡糖骨架的酶顺序修饰

类肝素寡糖的化学酶法合成涉及一系列有序的酶促修饰反应。这些酶仅作用于具有特定硫酸化修饰的底物。一个精心设计的酶促修饰顺序不仅可以显著提升酶的催化效率, 还能有效减少副产物的生成, 从而实现活性类肝素寡糖的高效、精准合成。

氨基葡萄糖残基的*N*-硫酸化对于下游酶促修饰反应的发生至关重要。NDST是肝素生物合成过程中负责修饰整个糖链的酶, 被认为可以指导所有后续硫酸化反应的位置。NDST具有四种亚型, 其中NDST1因其重要的生理功能而备受关注, 多种真核表达系统包括哺乳动物系统^[46]和杆状病毒表达系统^[47]已被用于NDST1的表达。Zhang等^[48]使用毕赤酵母表达系统成功实现了NDST1的活性表达。然而, 与原核表达系统相比, 这些真核表达系统的成本偏高, 且NDST1催化的脱乙酰基反应效率较低。因此, 目前化学酶法合成类肝素寡糖主要采用UDP-GlcNTFA作为供体, 在碱性条件下除去三氟乙酰基, 随后利用大肠杆菌表达系统重组表达得到的NST进行后续硫酸化修饰。Xi等^[49]通过多种策略构建了组合突变体Mut02, 与野生型MBP-hNST相比, 在37 °C下的半衰期提高了105倍, 催化活性增加了1.35倍。Deng等^[50]借助PROSS-FRISM平台得到了工程化的NST-M8突变体, 显著提高了其稳定性(11.32倍)和活性(2.53倍)。

在类肝素寡糖的合成中, C5-epi是唯一负责将GlcA转化为IdoA的酶, 这一转化对于肝素与蛋白质之间的相互作用至关重要^[51]。C5-epi只能在*N*-硫酸化后使用, 因为它仅能作用于两侧均为GlcNS残基的GlcA残基, 目前斑马鱼源^[52]和人源^[13]的C5-epi已在大肠杆菌表达系统中实现了可溶性表达。然

而, 原核表达系统中缺乏适当的折叠辅助蛋白和翻译后修饰, 这可能导致C5-epi的可溶表达量和活性降低。王兵兵等^[53]通过一系列改造, 获得了斑马鱼来源的C5-epi突变体V153R, 其酶活与比酶活分别是野生型的2.41倍和2.28倍。Cui等^[54]采用慢病毒介导的表达策略, 在哺乳动物细胞中实现了具有适当蛋白质折叠的重组C5-epi的高产量表达, 比酶活高达1.6 IU/mg。

IdoA2S结构的合成不但是后续硫酸化修饰的基础, 而且IdoA2S的存在也很大程度上决定了肝素的药理活性。2OST能够识别具有-GlcNS-GlcA-GlcNS-或-GlcNS-IdoA-GlcNS-结构的三糖基序^[55], 由于C5-epi催化的异构化反应是可逆的, 且GlcA残基在热力学上优于IdoA, 但2OST对IdoA的选择性高于GlcA, 因此C5-epi与2OST联用生成IdoA2S时效率最高。这是因为一旦形成, IdoA2S就不能再被C5-epi转化为GlcA2S。Xu等^[56]用中国仓鼠2OST在大肠杆菌表达系统中表达, 鉴定出两个对2OST的催化功能至关重要的组氨酸残基(His140和His142)。之后, 有研究发现了来自鸡的2OST与3'-磷酸腺苷5'-磷酸复合物的同源三聚体晶体结构, 并确定了负责底物特异性的关键氨基酸残基, 突变体R189A将硫酸基供体转移到糖链的GlcA附近, 而突变体Y94A和H106A则优先将硫酸基供体转移到IdoA附近^[57]。

进一步研究表明, 受体糖还原侧的6-*O*-硫酸化能够抑制2OST的硫酸化修饰^[55]。此外, 下游HS产物对2OST表现出比2OST底物和2OST反应产物更高的亲和力^[58]。这些结果表明, 2-*O*-硫酸化必须发生在6-*O*-硫酸化之前, 且2OST必须在时间和/或空间上与下游产物分离, 以利于糖链的进一步修饰。人源6OST有三种亚型, 表现出相似的底物特异性, 常有6OST1和6OST3组合用于催化6-*O*-硫酸化。Xu等^[59]报告了斑马鱼6OST的三元复合晶体结构, 与三种人类亚型有超过70%的序列相似性。基于此, 设计了突变体6OST Mt-4, 它仅硫酸化修饰非还原末端的氨基葡萄糖残基^[60], 利用该突变体可以通过化学酶法实现对6-*O*-硫酸化位点的精细控制, 用于类肝素寡糖的精准合成。

3-*O*-硫酸基团是肝素抗凝活性五糖与AT结合的关键组分, 这种五糖与AT的高亲和力结合引起

蛋白质的构象变化,增强了与凝血因子的相互作用,从而抑制血液凝固^[61]。人类基因组中存在七种不同的3OST亚型,包括1、2、3A、3B、4、5和6,对这些3OST亚型的底物特异性已有了广泛的研究^[62]。3OST1催化含有6-*O*-硫酸化的底物,对缺少6-*O*-硫酸化的寡糖底物表现出非常低的活性;而3OST3则优先硫酸化不含有6-*O*-硫酸化的寡糖,Wang等^[63]利用3OST3合成了具有抗凝血活性的类肝素寡糖。3OST1和3OST3需要用不同的化学酶法来制备不同的3-*O*-硫酸化寡糖,提示我们可以通过使用不同的3OST亚型进行化学酶法合成,从而获得具有更广泛硫酸化修饰的更复杂的类肝素寡糖。

3.3 获得天然肝素寡糖结构

为了便于检测和纯化,体外化学酶法合成的类肝素寡糖通常使用GlcA-*p*NP作为起始受体,其还原端的对硝基苯基在体内可能代谢为有害的对硝基苯酚,因此需要去除*p*NP以确保临床用药的安全性。

Cai等^[64]采用硝酸铈铵作为氧化试剂去除*p*NP基团,可以选择性地去除相邻的GlcA残基,得到更小的寡糖,或者保留GlcA残基,为合成更长的肝素寡糖提供了可能。Zhang等^[65]还采用高碘酸氧化处理合成的还原端和非还原端都含有GlcA残基的七糖,通过Smith降解或碱性消除,实现了附近含二醇的GlcA残基的选择性裂解,获得了具有完全天然结构的高度硫酸化的肝素五糖。

4 总结与展望

作为糖胺聚糖家族中的重要成员,肝素展现出了巨大的开发潜力和广泛的应用前景。然而,当前主要依赖的动物源性肝素存在结构异质性,且伴随着掺假和污染的风险,这些问题引发了人们对其安全性和可靠性的担忧。此外,全化学合成肝素的方法虽然可行,但其高昂的成本和复杂的合成步骤限制了大规模合成。相比之下,化学酶法凭借酶的高选择性和高催化效率,结合化学合成的多样性和灵活性,已成为合成具有生物活性类肝素寡糖的有效策略。

近年来,化学酶法合成类肝素寡糖的策略不断改进,从新型糖基供体、硫酸基供体的开发,到其合成效率的显著提升,再到对参与肝素寡糖合成的酶的底物特异性和催化机制的深入研究,发掘出了更多、更好的高活性、高表达的酶。这些研究成果极大地推动了化学酶法合成类肝素寡糖的发展。迄今为止,已经成功合成了超过25种具有不同硫酸化修饰的肝素寡糖(表3),其中部分类肝素寡糖的抗凝血活性与已上市的肝素类药物相当,甚至更优,显示出作为候选药物的潜力。

随着对肝素寡糖合成相关酶的底物特异性和催化机制认识的不断深入,我们可以实现结构确定的类肝素寡糖的精准合成。这不仅为合成具有抗凝血潜力的肝素候选药物提供了可能,也为开发具有其他生物活性的肝素类药物开辟了新的道路。尽管化学酶法在合成活性类肝素寡糖方面已

表3 使用化学酶法合成的活性类肝素寡糖总结

化合物	结构	规模	抗凝活性	特点
1-3 ^[26]	(GlcA-GlcNS3S6S) _n -GlcA-AnMan (1: n=4, 2: n=5) 3: (GlcA-GlcNS6S) ₅ -GlcA-AnMan	mg	K _d : 1: 515±40 nmol/L 2: 145±24 nmol/L 3: > 100000 nmol/L	证明了KfiA能够高效地使用UDP-GlcNTFA作为供体底物
4-5 ^[34]	GlcNR6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-AnMan (4: R=Ac, 5: R=SO ₃ H)	mg	K _d : 4: 5.2±0.2 nmol/L 5: 9.1±0.2 nmol/L IC ₅₀ (抗FXa): 4: 2.8 nmol/L 5: 3.6 nmol/L	合成了两种结构均一的ULMWH,并显示出优异的体外抗凝活性
6-9 ^[66]	GlcNS-(GlcA-GlcNS) _n -(GlcA-GlcNAc) ₂ -(GlcA-GlcNS) ₂ -GlcA-AnMan (6: n=2, 7: n=3, 8: n=4, 9: n=5)	mg	化合物6-9经过异构化反应和 <i>O</i> -硫酸化修饰后生成的化合物均可以有效地与抗凝血酶结合,表现出与磺达肝癸钠相似的抗FXa活性;19糖显示出较弱的抗FIIa活性,21糖表现出更强的抗FIIa活性	合成了具有抗FXa和抗FIIa活性的大小明确的肝素寡糖,但这些寡糖具有不同程度的硫酸化修饰

(续表3)

表3 使用化学酶法合成的活性类肝素寡糖总结

化合物	结构	规模	抗凝活性	特点
10-14 ^[37]	GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-(IdoA2S-GlcNS6S) _n -GlcA- <i>p</i> NP(10: <i>n</i> =1, 11: <i>n</i> =2, 12: <i>n</i> =3)	mg	化合物10-14均具有较强的抗凝血酶结合亲和力(<i>K_d</i> 值5~30 nmol/L); IC ₅₀ (抗FXa)值比UFH和依诺肝素的低; 没有检测到抗FⅡa活性	合成了一种结构均一的LMWH——化合物14, 其对鱼精蛋白具有均匀的高亲和力, 有良好的开发前景
	13: GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S-(IdoA2S-GlcNS6S) ₄ -GlcA- <i>p</i> NP			
	14: GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S-(IdoA2S-GlcNS6S) ₂ -IdoA2S-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA- <i>p</i> NP			
15-17和18-21 ^[67]	GlcNR ₁ 6R-GlcA-GlcNS6R-GlcA2S-GlcNS6R-GlcA- <i>p</i> NP(15: R=R ₁ =H, 16: R=H, R ₁ =SO ₃ H, 17: R=R ₁ =SO ₃ H)	—	含IdoA2S的六糖表现出与抗凝血酶的高亲和力, <i>K_d</i> 值为12 nmol/L; 含GlcA2S的六糖不与抗凝血酶结合	合成了三种含GlcA2S的六糖, 证明了IdoA2S结构对抗凝活性至关重要
	GlcNR ₁ 6R-GlcA-GlcNS6R-IdoA2S-GlcNS6R-GlcA- <i>p</i> NP(18: R=R ₁ =H, 19: R=H, R ₁ =SO ₃ H, 20: R=R ₁ =SO ₃ H)			
	21: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA- <i>p</i> NP			
22-24 ^[63]	22: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS3S6S-GlcA- <i>p</i> NP	—	<i>K_d</i> : 22: 未测定 23: 5.1±1.4 nmol/L 24: 5.6±2.6 nmol/L IC ₅₀ (抗FXa): 22: 11.0 nmol/L 23: 7.7 nmol/L 24: 10.9 nmol/L	使用3OST3合成了化合物23, 不含-GlcA-GlcNS3S6S-二糖单元, 但可以与抗凝血酶结合并显示出抗凝血活性, 且在动物体内可以快速清除
	23: GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA- <i>p</i> NP			
	24: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA- <i>p</i> NP			
25-27 ^[60]	25: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S-IdoA2S-GlcNS-GlcA- <i>p</i> NP	mg	<i>K_d</i> : 25: 840 nmol/L 26: 429 nmol/L 27: 508 nmol/L IC ₅₀ (抗FXa): 25: 11.5 nmol/L 26: 8.6 nmol/L 27: 8.7 nmol/L	合成了化合物25, 其抗FXa活性可以被安得赛奈完全逆转, 降低了出血风险
	26: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA- <i>p</i> NP			
	27: GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS-GlcA- <i>p</i> NP			
28 ^[40]	GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S-GlcA-GlcN	mg	IC ₅₀ (抗FXa): 9.5 nmol/L	开发了一种化学酶法结合肝素酶Ⅲ的裂解作用合成二糖受体GlcA-GlcNPNZ的策略, 并应用于肝素寡糖的合成

*K_d*值反映了肝素寡糖与抗凝血酶的结合亲和力, *K_d*值越小, 说明亲和力越强; IC₅₀表示中位抑制浓度, 反映了体外抗凝血因子活性, IC₅₀越小, 抗凝血因子活性越高

取得显著成就, 但在实现商业化大规模生产、降低副产物生成等方面仍面临挑战。尽管如此, 化学酶法合成类肝素寡糖的技术具有广阔的发展前景, 未来在该领域的研究和应用有望取得更多突破。

参考文献

[1] Douaisi M, Paskaleva EE, Fu L, et al. Synthesis of bioengineered heparin chemically and biologically similar to porcine-derived products and convertible to low MW heparin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(14): e2315586121

[2] Hogwood J, Mulloy B, Lever R, et al. Pharmacology of heparin and related drugs: an update. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(2): 328-379

[3] McCarthy CP, Vaduganathan M, Solomon E, et al. Running thin: implications of a heparin shortage. *Lancet*, 2020, 395(10223): 534-536

[4] Makarem A, Zareef R, Abourjeili J, et al. Low molecular weight heparin in COVID-19: benefits and concerns. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1159363

[5] Dulaney SB, Huang X. Strategies in synthesis of heparin/heparan sulfate oligosaccharides: 2000-present. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 2021, 80: 121-164

[6] Abdelfadiel EI, Gunta R, Villuri BK, et al. Designing smaller, synthetic, functional mimetics of sulfated glycosaminoglycans as allosteric modulators of coagulation factors. *J Med Chem*, 2023, 66(7): 4503-4531

[7] Dai X, Liu W, Zhou Q, et al. Formal synthesis of anticoagulant drug fondaparinux sodium. *J Org Chem*, 2023, 75(2): 328-379

- 2016, 81(1): 162-184
- [8] Banik N, Yang SB, Kang TB, et al. Heparin and its derivatives: challenges and advances in therapeutic biomolecules. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10524
- [9] Marques C, Reis CA, Vivès RR, et al. Heparan sulfate biosynthesis and sulfation profiles as modulators of cancer signalling and progression. *Front Oncol*, 2021, 11: 778752
- [10] Li H, Chapla D, Amos RA, et al. Structural basis for heparan sulfate co-polymerase action by the EXT1-2 complex. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(5): 565-574
- [11] Mycroft-West CJ, Abdelkarim S, Duyvesteyn HME, et al. Structural and mechanistic characterization of bifunctional heparan sulfate *N*-deacetylase-*N*-sulfotransferase 1. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1326
- [12] Cui H, Wang Z, Zhang T, et al. Re-expression of glucuronyl C5-epimerase in the mutant MEF cells increases heparan sulfate epimerization but has no influence on the Golgi localization and enzymatic activity of 2-*O*-sulfotransferase. *Glycobiology*, 2021, 31(8): 1018-1025
- [13] Préchoux A, Halimi C, Simorre JP, et al. C₅-epimerase and 2-*O*-sulfotransferase associate *in vitro* to generate contiguous epimerized and 2-*O*-sulfated heparan sulfate domains. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(4): 1064-1071
- [14] El Masri R, Seffouh A, Lortat-Jacob H, et al. The “in and out” of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. *Glycoconj J*, 2017, 34(3): 285-298
- [15] Higashi N, Waki M, Sue M, et al. Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices. *Biochem J*, 2014, 458(2): 291-299
- [16] Gray E, Hogwood J, Mulloy B. The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, (207): 43-61
- [17] Qiu M, Huang S, Luo C, et al. Pharmacological and clinical application of heparin progress: an essential drug for modern medicine. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111561
- [18] Chen Y, Li Y, Yu H, et al. Tailored design and synthesis of heparan sulfate oligosaccharide analogues using sequential one-pot multienzyme systems. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(45): 11852-11856
- [19] Muthana MM, Qu J, Xue M, et al. Improved one-pot multienzyme (OPME) systems for synthesizing UDP-uronic acids and glucuronides. *Chem Commun*, 2015, 51(22): 4595-4598
- [20] Xu H, Fu N, Zheng J, et al. Mn-doped bimetallic synergistic catalysis boosts for enzymatic phosphorylation of *N*-acetylglucosamine/*N*-acetylgalactosamine and their derivatives. *Bioorg Chem*, 2022, 128: 106041
- [21] Morrison ZA, Nitz M. Synthesis of C6-substituted UDP-GlcNAc derivatives. *Carbohydrate Res*, 2020, 495: 108071
- [22] Gottschalk J, Zaun J, Eisele J, et al. Key factors for a one-pot enzyme cascade synthesis of high molecular weight hyaluronic acid. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5664
- [23] Eisele A, Zaun H, Kuballa J, et al. *In vitro* one-pot enzymatic synthesis of hyaluronic acid from sucrose and *N*-acetylglucosamine: optimization of the enzyme module system and nucleotide sugar regeneration. *ChemCatChem*, 2018, 10(14): 2969-2981
- [24] Gottschalk J, Blaschke L, Aßmann M, et al. Integration of a nucleoside triphosphate regeneration system in the one-pot synthesis of UDP-sugars and hyaluronic acid. *ChemCatChem*, 2021, 13(13): 3074-3083
- [25] Zhai Y, Liang M, Fang J, et al. NahK/GlmU fusion enzyme: characterization and one-step enzymatic synthesis of UDP-*N*-acetylglucosamine. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(7): 1321-1326
- [26] Liu R, Xu Y, Chen M, et al. Chemoenzymatic design of heparan sulfate oligosaccharides. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 34240-34249
- [27] Datta P, Fu L, He W, et al. Expression of enzymes for 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) biosynthesis and their preparation for PAPS synthesis and regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(16): 7067-7078
- [28] Zhou X, Chandarajoti K, Pham TQ, et al. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in *Kluyveromyces lactis* and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Glycobiology*, 2011, 21(6): 771-780
- [29] An C, Zhao L, Wei Z, et al. Chemoenzymatic synthesis of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate coupling with an ATP regeneration system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(20): 7535-7544
- [30] Xu R, Wang Y, Huang H, et al. Closed-loop system driven by ADP phosphorylation from pyrophosphate affords equimolar transformation of ATP to 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *ACS Catal*, 2021, 11(16): 10405-10415
- [31] Xu R, Zhang W, Xi X, et al. Engineering sulfonate group donor regeneration systems to boost biosynthesis of sulfated compounds. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7297
- [32] Burkart MD, Izumi M, Wong CH. Enzymatic regeneration of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate using aryl sulfotransferase for the preparative enzymatic synthesis of sulfated carbohydrates. *Angew Chem Int Ed*, 1999, 38(18): 2747-2750
- [33] Bhaskar U, Li G, Fu L, et al. Combinatorial one-pot chemoenzymatic synthesis of heparin. *Carbohydrate Polym*, 2015, 122: 399-407
- [34] Xu Y, Masuko S, Takiyeddin M, et al. Chemoenzymatic

- synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins. *Science*, 2011, 334(6055): 498-501
- [35] Zhang X, Dickinson DM, Lin L, et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate tetrasaccharide from a *N*-acetyl- α -D-glucosamine-*O*-methylglycoside acceptor. *Tetrahedron Lett*, 2019, 60(13): 911-915
- [36] Cai C, Dickinson DM, Li L, et al. Fluorous-assisted chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate oligosaccharides. *Org Lett*, 2014, 16(8): 2240-2243
- [37] Xu Y, Cai C, Chandarajoti K, et al. Homogeneous low-molecular-weight heparins with reversible anticoagulant activity. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(4): 248-250
- [38] Zhang X, Pagadala V, Jester HM, et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiologists. *Chem Sci*, 2017, 8(12): 7932-7940
- [39] Bandi CK, Skalenko KS, Agrawal A, et al. Engineered regulon to enable autonomous azide ion biosensing, recombinant protein production, and *in vivo* glycoengineering. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(4): 682-689
- [40] Zhang G, Yang K, Wang L, et al. Facile chemoenzymatic synthesis of unmodified anticoagulant ultra-low molecular weight heparin. *Org Biomol Chem*, 2022, 20(42): 8323-8330
- [41] Yu YL, Song Y, Zhao YJ, et al. Quality control, safety assessment and preparation approaches of low molecular weight heparin. *Carbohydr Polym*, 2024, 339: 122216
- [42] Sugiura N, Baba Y, Kawaguchi Y, et al. Glucuronyltransferase activity of KfiC from *Escherichia coli* strain K5 requires association of KfiA. *J Biol Chem*, 2010, 285(3): 1597-1606
- [43] Na L, Yu H, McArthur JB, et al. Engineer *P. multocida* heparosan synthase 2 (PmHS2) for size-controlled synthesis of longer heparosan oligosaccharides. *ACS Catal*, 2020, 10(11): 6113-6118
- [44] Deng JQ, Lu Z, Liu J, et al. Heparosan oligosaccharide synthesis using engineered single-function glycosyltransferases. *Catal Sci Technol*, 2022, 12(12): 3793-3803
- [45] Stancanelli E, Krahn JA, Viverette E, et al. Structural and functional analysis of heparosan synthase 2 from *Pasteurella multocida* to improve the synthesis of heparin. *ACS Catal*, 2024, 14(9): 6577-6588
- [46] Atienza J, Tkachyova I, Tropak M, et al. Fluorometric coupled enzyme assay for *N*-sulfotransferase activity of *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST). *Glycobiology*, 2021, 31(9): 1093-1101
- [47] Dou W, Xu Y, Pagadala V, et al. Role of deacetylase activity of *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase 1 in forming *N*-sulfated domain in heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2015, 290(33): 20427-20437
- [48] Zhang Y, Wang Y, Zhou Z, et al. Synthesis of bioengineered heparin by recombinant yeast *Pichia pastoris*. *Green Chem*, 2022, 24(8): 3180-3192
- [49] Xi X, Hu L, Huang H, et al. Improvement of the stability and catalytic efficiency of heparan sulfate *N*-sulfotransferase for preparing *N*-sulfated heparosan. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 2023, 50(1): kuad012
- [50] Deng JQ, Li Y, Wang YJ, et al. Biosynthetic production of anticoagulant heparin polysaccharides through metabolic and sulfotransferases engineering strategies. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3755
- [51] Debarnot C, Monneau YR, Roig-Zamboni V, et al. Substrate binding mode and catalytic mechanism of human heparan sulfate^d-glucuronyl C5 epimerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(14): 6760-6765
- [52] Qin Y, Ke J, Gu X, et al. Structural and functional study of *D*-glucuronyl C5-epimerase. *J Biol Chem*, 2015, 290(8): 4620-4630
- [53] 王兵兵, 周正雄, 金学荣, 等. 肝素C5异构酶的表达优化及分子改造. *生物工程学报*, 2020, 36(7): 1450-1458
- [54] Cui H, Li Q, Wang P, et al. Characterization and expression of highly active recombinant human glucuronyl C5-epimerase in mammalian cells. *Glycobiology*, 2023, 33(5): 432-440
- [55] Liu C, Sheng J, Krahn JM, et al. Molecular mechanism of substrate specificity for heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase. *J Biol Chem*, 2014, 289(19): 13407-13418
- [56] Xu D, Song D, Pedersen LC, et al. Mutational study of heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-*O*-sulfotransferase. *J Biol Chem*, 2007, 282(11): 8356-8367
- [57] Bethea HN, Xu D, Liu J, et al. Redirecting the substrate specificity of heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase by structurally guided mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(48): 18724-18729
- [58] Thieker DF, Xu Y, Chapla D, et al. Downstream products are potent inhibitors of the heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11832
- [59] Xu Y, Moon AF, Xu S, et al. Structure based substrate specificity analysis of heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferases. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(1): 73-82
- [60] Yi L, Xu Y, Kaminski AM, et al. Using engineered 6-*O*-sulfotransferase to improve the synthesis of anticoagulant heparin. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(40): 8094-8102
- [61] Li J, Su G, Xu Y, et al. Synthesis of 3-*O*-sulfated heparan sulfate oligosaccharides using 3-*O*-sulfotransferase isoform 4. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(10): 2026-2035
- [62] Liu J, Pedersen LC. Emerging chemical and biochemical tools for studying 3-*O*-sulfated heparan sulfate. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 322(6): C1166-C1175

- [63] Wang Z, Hsieh PH, Xu Y, et al. Synthesis of 3-*O*-sulfated oligosaccharides to understand the relationship between structures and functions of heparan sulfate. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(14): 5249-5256
- [64] Cai C, Li L, Harvey C, et al. Toward the chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate oligosaccharides: oxidative cleavage of *p*-nitrophenyl group with ceric ammonium salts. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(33): 4471-4474
- [65] Zhang X, Xu Y, Hsieh PH, et al. Chemoenzymatic synthesis of unmodified heparin oligosaccharides: cleavage of *p*-nitrophenyl glucuronide by alkaline and Smith degradation. *Org Biomol Chem*, 2017, 15(5): 1222-1227
- [66] Xu Y, Pempe EH, Liu J. Chemoenzymatic synthesis of heparin oligosaccharides with both anti-factor Xa and anti-factor IIa activities. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 29054-29061
- [67] Hsieh PH, Xu Y, Keire DA, et al. Chemoenzymatic synthesis and structural characterization of 2-*O*-sulfated glucuronic acid-containing heparan sulfate hexasaccharides. *Glycobiology*, 2014, 24(8): 681-692