

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, bản mô tả này liên quan đến lĩnh vực hóa học polysacarit và cụ thể hơn, là liên quan đến heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn; các phương pháp tạo ra heparin sinh tổng hợp; các chất trung gian, mà có thể được dùng trong các phương pháp tạo ra; và các phương pháp sử dụng heparin sinh tổng hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Heparin được sử dụng rộng rãi làm chất chống đông, cả trong dung dịch và cả trên các thiết bị cấy ghép. Quy trình hóa học tổng hợp heparin thường được xem là không khả thi, và do đó heparin loại được phẩm đã thu được từ nhiều loại mô động vật trong toàn bộ lịch sử sản xuất heparin. Tuy nhiên, việc dựa vào các nguồn động vật khiến nảy sinh vấn đề về kiểm soát chất lượng và nguồn cung.

Nguồn heparin chính là ruột của con lợn, nhưng heparin từ phổi và ruột của con bò, và heparin từ ruột của con cừu cũng sẵn có. Chất lượng của sản phẩm có thể thay đổi theo các yếu tố của môi trường và phân loài động vật, gây ra thêm khó khăn đối với quy định về thuốc. Các mối lo ngại đáng kể về các bệnh prion (bệnh thoái hóa não xốp) như bệnh viêm não xốp ở bò (bovine spongiform encephalopathy - BSE, “bệnh bò điên”), mà gây ra bệnh Creutzfeldt-Jakob ở người, và bệnh Scrapie (bệnh ngứa) ở cừu làm giảm mức sử dụng mô bò và mô cừu làm nguồn heparin.

Vào năm 2008, chondroitin sulfat đã được sulfat hóa quá mức (oversulfated chondroitin sulfate - OSCS) được đưa vào heparin tạo ra được từ lợn ở Trung Quốc, dẫn đến việc gần 100 người Mỹ tử vong và giảm đáng kể nguồn cung heparin. Cách trộn lẫn cố ý này là rất khó phát hiện vì dây chuyền cung cấp mô để lấy heparin ở các lò mổ thiếu giám sát thực tiễn sản xuất tốt hiện hành (current good manufacturing practices - cGMP).

Gần đây, việc trộn heparin thu được từ các loài động vật khác nhau đã bị nghi ngờ.

Heparin từ phổi bò, heparin từ ruột bò, heparin từ ruột cừu và heparin từ ruột lợn có thể được phân biệt với nhau theo phân bố khác nhau của chúng về các biến thể cấu trúc của vị trí liên kết pentasacarit kháng trombin cũng như các khác biệt về các thành phần disacarit của chúng. Tuy nhiên, rất khó phát hiện sự có mặt của lượng ít heparin từ ruột bò hoặc heparin từ ruột cừu ở sản phẩm heparin từ ruột lợn ngay cả khi áp dụng các phương pháp phân tích mới nhất hiện có.

Nguồn cung cũng là một vấn đề nghiêm trọng. Mặc dù 1,2 tỷ con lợn hoặc nhiều hơn được giết mổ mỗi năm trên toàn thế giới, dẫn đến 100 tấn heparin/năm, các nguồn cung cấp thương mại không thể theo kịp với nhu cầu gia tăng trên toàn thế giới, đặc biệt là ở các nước đang phát triển. Phân tích thị phần gần đây cho thấy rằng đại đa số heparin thô có nguồn gốc từ Trung Quốc, mà cung cấp khoảng 57% thị trường thế giới. Tính miễn cảm của quần thể động vật đối với bệnh nhiễm khuẩn, như các bệnh dịch ở lợn ở Trung Quốc, thu hoạch quá mức, hoặc mối quan ngại về mặt môi trường có thể làm giảm đáng kể nguồn cung cấp động vật mà từ đó có thể điều chế được heparin. Hiện tượng thiếu heparin theo điểm (nơi) dẫn đến cân nhắc thận trọng về việc đưa của heparin của bò trở lại thị trường Mỹ. Tuy nhiên, heparin từ ruột bò không thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật của heparin theo USP, và điều này hạn chế ứng dụng thương mại của nó. Việc chấp nhận heparin từ ruột bò còn làm tăng nguy cơ trộn lẫn heparin của lợn và của bò, mà là khó khăn để phát hiện và làm thay đổi các tính chất của thành phẩm.

Vì nhu cầu về các nguồn thay thế đáng tin cậy về heparin tương đương về mặt sinh học, các nhà nghiên cứu đã cố gắng tổng hợp heparin từ heparosan. Tổ hợp các bước hóa học và enzym tạo ra sản phẩm mà hướng tới heparin nhưng, theo hiểu biết của các tác giả sáng chế, heparin sinh tổng hợp tổng hợp được theo phương pháp hóa học dùng enzym vẫn chưa thỏa mãn được tiêu chuẩn USP. Sau khi nghiên cứu kỹ về nhiều ví dụ, thử nghiệm, các tác giả sáng chế đã tổng hợp được heparin mà có thể thỏa mãn tất cả các yêu cầu của USP. Các tác giả sáng chế đã làm sáng tỏ ba chất trung gian với các dấu hiệu cụ thể mà có thể là cần thiết để thu được heparin tương đương về mặt sinh học đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do vậy, mục đích của sáng chế là phát triển heparin sinh tổng hợp, mà có thể tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, phương pháp tạo ra heparin sinh tổng hợp; các chất trung gian, mà có thể được sử dụng trong phương pháp tạo ra heparin sinh tổng hợp, và phương pháp sử dụng heparin sinh tổng hợp.

Một phương án là glycosaminoglycan chứa một lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, mà lượng này là hữu hiệu để tạo ra heparin sinh tổng hợp. Lượng nhóm NS của nhóm disacarit có thể nằm trong khoảng từ 78% đến 99% hoặc nằm trong khoảng từ 81% đến 97% hoặc nằm trong khoảng từ 83% đến 95% hoặc nằm trong khoảng từ 85% đến 93%.

Phương án khác là glycosaminoglycan chứa lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N và sulfat hóa ở vị trí 2 (NS2S), mà lượng này là hữu hiệu để tạo ra heparin sinh tổng hợp. Lượng nhóm disacarit NS2S có thể nằm trong khoảng từ 44% đến 80% hoặc nằm trong khoảng từ 50% đến 78% hoặc nằm trong khoảng từ 55% đến 77% hoặc nằm trong khoảng từ 60% đến 76%.

Phương án khác nữa là glycosaminoglycan chứa lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, 2 và 6 (NS2S6S) và nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N và 6 (NS6S), trong đó lượng này là hữu hiệu để tạo ra heparin sinh tổng hợp. Lượng tương ứng của nhóm NS6S và các nhóm disacarit NS2S6S có thể nằm trong khoảng từ 6% đến 40% nhóm NS6S và nằm trong khoảng từ 31% đến 73% nhóm NS2S6S; nằm trong khoảng từ 6% đến 32% nhóm NS6S và nằm trong khoảng từ 36% đến 70% nhóm NS2S6S; nằm trong khoảng từ 6% đến 26% nhóm NS6S và nằm trong khoảng từ 40% đến 67% nhóm NS2S6S; hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 22% nhóm NS6S và nằm trong khoảng từ 43% đến 64% nhóm NS2S6S.

Phương án khác nữa là phương pháp sản xuất heparin sinh tổng hợp, bao gồm các bước: a. thu nhận glycosaminoglycan chứa 31% đến 73% nhóm disacarit NS2S6S, 6% đến 40% nhóm disacarit NS6S, 0% đến 27% nhóm NS2S và 1% đến 22% nhóm NS; và b. xử

lý glycosaminoglycan bằng enzym, mà là dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1), với sự có mặt của chất cho sulfat để tạo ra mẽ heparin sinh tổng hợp.

Phương án khác nữa là phương pháp tạo ra chất trung gian glycosaminoglycan thứ hai chứa 44% đến 80% nhóm NS2S và 13% đến 39% nhóm NS. Phương pháp có thể bao gồm việc a. chuyển hóa lượng các gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra glycosaminoglycan thứ nhất chứa 78% đến 99% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, trong đó lượng các gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian glycosaminoglycan thứ nhất; và b. xử lý chất trung gian glycosaminoglycan thứ nhất bằng hai enzym, mà là C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat để tạo ra chất trung gian glycosaminoglycan thứ hai.

Và phương án khác nữa là phương pháp tạo ra chất trung gian glycosaminoglycan thứ ba chứa 31% đến 73% nhóm đisacarit NS2S6S, 6% đến 40% nhóm đisacarit NS6S, 0% đến 27% nhóm NS2S và 1% đến 22% nhóm NS. Phương pháp có thể bao gồm xử lý chất trung gian glycosaminoglycan thứ hai chứa 44% đến 80% nhóm NS2S và 13% đến 39% nhóm NS bằng enzym, mà là các dạng đồng chức năng 1 và/hoặc 3 của 6-O-sulfotransferaza (6OST-1/3), với sự có mặt của chất cho sulfat chuyển hóa chất trung gian glycosaminoglycan thứ hai thành chất trung gian glycosaminoglycan thứ ba.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ thể hiện chu trình từ heparosan thành heparin sinh tổng hợp (BSH), mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn.

Hình 2 là sơ đồ minh họa các phương pháp phân tích các chất trung gian và heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn.

Hình 3 thể hiện phổ 1D ^1H -NMR đối với heparosan, các chất trung gian NS, NS2S, NS6S, NS2S6S, heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, và heparin USP của lợn.

Hình 4 thể hiện khoảng thành phần làm ví dụ, của các cấu trúc trung gian của heparin sinh tổng hợp, mà có thể đem lại các tính chất tương đương với heparin USP của lợn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Nhằm các mục đích của đơn yêu cầu đăng ký sáng chế này, các thuật ngữ sau được định nghĩa dưới đây:

Thuật ngữ “một” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là một hoặc nhiều, trừ khi được thể hiện rõ ràng có nghĩa chỉ là một.

Thuật ngữ “khoảng” chỉ nhằm bao hàm dao động điển hình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được là tương đương với trị số đã nêu. Khi một trị số được sử dụng, “khoảng” bao hàm $\pm 20\%$ hoặc $\pm 15\%$ hoặc $\pm 10\%$ hoặc $\pm 8\%$ hoặc $\pm 7\%$ hoặc $\pm 6\%$ hoặc $\pm 5\%$ hoặc $\pm 3\%$ hoặc $\pm 2\%$ hoặc $\pm 1\%$ trị số đã nêu.

Khi % được nêu liên quan đến hàm lượng disacarit, nó thường chỉ mol/phần trăm mol, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ BSH được dùng trong bản mô tả này chỉ heparin sinh tổng hợp, tức là heparin tạo ra được thông qua một hoặc nhiều quy trình hóa học; quy trình enzym; quy trình hóa học và enzym kết hợp; quy trình nuôi cấy tế bào vi sinh vật và tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, heparin sinh tổng hợp có thể bao gồm heparin mà là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, tức là heparin natri của lợn, ví dụ, “heparin tương đương về mặt sinh học”.

Thuật ngữ “heparin tương đương về mặt sinh học” được dùng trong bản mô tả này (BEqH) là tương đương với heparin natri USP của lợn về mức độ hoạt tính và phân bố phân tử lượng. Theo một số phương án, heparin tương đương về mặt sinh học có thể chứa các nhóm disacarit NS, NS2S, NS6S và NS6S2S với lượng tương đương với heparin USP

của lợn như được bộc lộ trong bảng 2 dưới đây.

Thuật ngữ “mẻ” được dùng trong bản mô tả này có thể chỉ lượng cụ thể của thuốc hoặc nguyên liệu khác, như heparin, mà nhằm để có tính chất và chất lượng đồng đều, trong các giới hạn cụ thể, và được tạo ra theo trình tự sản xuất duy nhất trong cùng chu kỳ sản xuất.

Heparin và heparosan

Heparosan là nhóm bao gồm các polysacarit mạch thẳng có chiều dài không đồng nhất với đơn vị đisacarit lặp lại [axit $\rightarrow 4$) β -D-glucuronic (GlcA) (1 $\rightarrow$ 4) *N*-axetyl- α -D-glucosamin (GlcNAc) (1 $\rightarrow$)]_n.

Heparin là nhóm không đồng nhất bao gồm các glycosaminoglycan anion mạch thẳng có các tính chất chống đông. Heparin có thể được tiêu thành các nhóm đisacarit khác biệt (Yang, B., Chang, Y., Weyers, A. M., Sterner, E., & Linhardt, R. J. (2012) và phân tích được thực hiện theo phương pháp sắc ký lỏng-phổ cực tím (liquid chromatography-ultraviolet spectrometry - LC-UV). (P. Mourier *et al. Analytical Chemistry Research* 3 (2015) 46-53). Dữ liệu thu được theo phương pháp LC-UV là tương đương với dữ liệu thu được theo phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) thường được sử dụng. Sau khi tiêu bằng hỗn hợp bao gồm ba heparin lyaza, heparin tạo ra các đisacarit dưới đây:

0S	[ΔUA–GlcNAc]
NS:	[ΔUA–GlcNS]
6S	[ΔUA–GlcNAc6S]
2S	[ΔUA2S–GlcNAc]
NS2S	[ΔUA2S–GlcNS]
NS6S	[ΔUA–GlcNS6S]
2S6S	[ΔUA2S–GlcNAc6S]
TriS (NS2S6S)	[ΔUA2S–GlcNS6S]

trong đó ΔUA tương ứng với axit 4-đeoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyl uronic. GlcN tương ứng với D-glucosamin, Ac tương ứng với axetyl và S tương ứng với sulfo. Trong

bản mô tả này, hàm lượng đisacarit có thể được tính trên cơ sở tổng hàm lượng của cả tám đisacarit nêu trên.

Do heparin và heparosan và các chất dẫn xuất liên quan là các phân tử phức, nên chúng còn có thể được xác định tính chất theo trọng lượng phân tử lượng trung bình (M_w) của chúng và phân bố phân tử lượng. Heparin còn có thể được xác định tính chất theo hoạt tính chống đông của nó.

Tiêu chuẩn theo Dược điển Mỹ (United States Pharmacopeia), phiên bản 39 (USP39), về “Heparin natri, USP” đòi hỏi heparin có mức hoạt tính và phân bố phân tử lượng cụ thể. Theo USP, heparin có trọng lượng trung bình nằm trong khoảng từ 15.000Da đến 19.000Da; tỷ lệ phần trăm của mạch heparin với phân tử lượng cao hơn 24.000Da là không nhiều hơn 20% tổng; và tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000Da đến 16.000Da so với các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 16.000Da đến 24.000Da không thấp hơn 1,0.

Theo sáng chế, tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000Da đến 16.000Da so với các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 16.000Da đến 24.000Da không thấp hơn 1,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,5, 1,0 đến 2,0, 1,2 đến 1,8, 1,4 đến 1,7, 1,5, hoặc 1,6. Hiệu lực được xác định theo thử nghiệm sinh học bằng cách sử dụng chuẩn tham chiếu USP trên cơ sở đơn vị hoạt tính heparin mỗi miligam. Các đặc điểm kỹ thuật này đòi hỏi hoạt tính chống đông của heparin đối với yếu tố IIa (tức là kháng-IIa) không thấp hơn 180U/mg, và tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với hoạt tính đối với yếu tố IIa (tức là kháng-Xa/kháng-IIa) nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1.

Chuyên khảo hiện nay của USP (USP 39) về heparin natri của lợn không có yêu cầu về thành phần đisacarit. Tuy nhiên, thật là hợp lý là các tính chất của heparin tuân theo cấu trúc. Do đó, các tác giả sáng chế đã làm sáng tỏ một số dấu hiệu cấu trúc của heparin USP của lợn. Bảng 1 thể hiện khoảng thống kê của các nhóm đisacarit thu được từ heparin USP của lợn sau khi xử lý bằng ba heparin lyaza. Tổng cộng 15 lô heparin USP của lợn được đo. Trung bình số học (trung bình) và dao động chuẩn là (SD) của các mẫu được tính. Dao

động chuẩn của sai số phân tích thu được trên cơ sở dữ liệu mà các tác giả sáng chế gom được. Phương trình ở cột ngoài cùng bên trái của Bảng 1 dưới đây được áp dụng để tính cho từng disacarit.

Bảng 1. Phân tích thành phần của các mẻ USP-heparin của lợn và xác định khoảng đích đối với heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học đối với heparin USP của lợn.

(mol %)		0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS
Trung bình của 15 mẻ USP heparin (=A)		3,8	3,1	3,2	1,7	10,7	7,3	1,3	68,9
SD của 15 mẻ USP heparin (=B)		0,99	0,55	0,32	0,15	0,92	0,61	2,0	1,4
SD của tổng sai số phân tích (N=12) (=C)		0,33	0,13	0,10	0,10	0,26	0,28	0,15	1,0
Tối thiểu khoảng đích BEqH (3sd)	$(=A - 3*(B+C))$	0,0	1,1	2,0	0,9	7,1	4,6	0,4	59,8
Tối đa khoảng đích BEqH (3sd)	$(=A + 3*(B+C))$	7,8	5,1	4,5	2,4	14,2	9,9	2,2	78,0
Tối thiểu khoảng đích BEqH (2sd)	$(=A - 2*(B+C))$	1,2	1,7	2,4	1,2	8,3	5,5	0,7	62,8
Tối đa khoảng đích BEqH (2sd)	$(=A + 2*(B+C))$	6,5	4,5	4,1	2,2	13,0	9,0	1,9	75,0
Tối thiểu khoảng đích BEqH (1sd)	$(=A - *(B+C))$	2,5	2,4	2,8	1,4	9,5	6,4	1,0	65,9
Tối đa khoảng đích BEqH (1sd)	$(=A + *(B+C))$	5,2	3,8	3,7	1,9	11,8	8,1	1,6	72,0

Giả sử rằng 15 mẫu heparin là tiêu biểu, 3 dao động chuẩn bao trùm 99,7% dao động mong đợi.

Theo một số phương án, hàm lượng của mỗi disacarit trong heparin sinh tổng hợp, mà là tương đương về mặt sinh học với heparin natri USP của lợn, nằm trong khoảng 3 dao động chuẩn của trung bình đã dự tính thu được từ USP heparin, như được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên và được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần của USP-heparin của lợn theo 3 độ biến thiên của dao động chuẩn.

%mol	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS
Heparin USP	0 - 7,8	1,1 - 5,1	2,0 - 4,5	0,9 - 2,4	7,1 - 14,2	4,6 - 9,9	0,4 - 2,2	59,8 - 78,0

Theo một số phương án, hàm lượng mỗi disacarit trong heparin sinh tổng hợp nằm trong khoảng 2,5, 2,0, 1,5 hoặc 1,0 dao động chuẩn của trung bình đã dự tính thu được từ USP heparin. Theo một số phương án, hàm lượng của từng disacarit chính, NS, NS6S, NS2S, và TriS, nằm trong khoảng 3,0, 2,5, 2,0, 1,5 hoặc 1,0 dao động chuẩn của trung bình đã dự tính tương ứng thu được từ USP heparin.

Mulloy *et al.* “*USP compendial methods for analysis of heparin: chromatographic determination of molecular weight distributions for heparin sodium*” *Anal Bioanal Chem* (2014) 406: 4815–4823, đã xem xét phân bố kích cỡ của heparin natri USP của lợn. Theo Hình 3, các loại nằm trong khoảng từ 8kDa đến 16kDa nhiều nhất là 55%, và các loại nằm trong khoảng từ 16kDa đến 24kDa không ít hơn 25%. Do đó, tỷ lệ giữa 18 đến 16/16 đến 24 là 2,2 (tức là 55/25) theo thử nghiệm này.

Tổng hợp heparin từ heparosan

Heparosan là polysacarit với đơn vị disacarit lặp lại [axit →4) β-D-glucuronic (GlcA) (1→4) *N*-axetyl-α-D-glucosamin (GlcNAc) (1→)]_n. Heparosan được sinh tổng hợp ở dạng viên nang polysacarit trong vi khuẩn bao gồm *Escherichia coli* và *Pasteurella multocida*. Lindahl U *et al.* (1998) “*Regulated diversity of heparan sulfate*” *J Biol Chem* 273(39):24979-24982. Các nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm đã cho thấy rằng heparosan có phân tử lượng trung bình (M_w) > 10.000, thu được từ chủng *E. coli* K5 có thể được chuyển hóa theo phương pháp hóa học dùng enzym thành chất chống đông polysacarit được gọi là neoheparin, mà là không tương đương về mặt sinh học với heparin natri USP của lợn. Lindahl *et al.* (2005) *J Med Chem* 48(2):349-352; Zhang *et al.* (2008) *Journal of the American Chemical Society* 130(39):12998-13007; patent Mỹ số 6,162,797; US 2014/0349962.

Các tài liệu tham khảo dưới đây bộc lộ các heparin sinh tổng hợp, mà là không tương đương về mặt sinh học với heparin natri USP của lợn. Không tài liệu nào mô tả quy trình sản xuất các chất trung gian có các tính chất được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc heparin nào sản xuất được là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn. Theo thông báo, hàm lượng disacarit của các heparin này không nằm trong khoảng 1, 2 hoặc 3 dao động chuẩn so với trung bình đã dự tính từ heparin USP của lợn, hoặc chất trung gian bất kỳ phù hợp với các chất trung gian cần thiết cho heparin tương đương về mặt sinh học.

Các khác biệt khác nữa giữa sáng chế và tình trạng kỹ thuật bao gồm, trong số nhiều thứ, chất trung gian thứ ba NS2S6S, còn được gọi TriS. Một số phương pháp nhất định trước đây mà áp dụng các phương pháp sulfat hóa theo cách hóa học không thể tạo ra chất trung gian NS2S6S mà thiếu disacarit 3S. Một số phương pháp hóa học enzym nhất định không kiểm soát hàm lượng của nhóm disacarit chính ở từng bước hóa enzym đủ để thu được chất trung gian NS2S6S.

Theo tài liệu: Bhaskar, U., *et al* (2015). *Carbohydrate Polymers*, 122, 399-407, thành phần disacarit chính như NS6S, NS2S, NS2S6S của chất trung gian trước 3OST lần lượt là 7,8, 15,7, và 67,9% (trọng lượng). “Heparin” thu được là không tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, và thành phần disacarit của chất trung gian trước 3OST trong tài liệu tham khảo này không giống chất trung gian thứ ba NS2S6S/TriS cần thiết cho heparin tương đương về mặt sinh học. Hoạt tính kháng IIa cao nhất đã thông báo cho “heparin” điều chế được theo tài liệu tham khảo này là 151U/mg, mà là thấp hơn mức cần thiết 180U/mg, khiến nó không tương đương với heparin USP của lợn. Ngoài ra, phân tử lượng của sản phẩm điều chế được theo Bhaskar và các đồng tác giả là >25.000dal.

Theo tài liệu: Zhang, Z., *et al* (2008) *Journal of the American Chemical Society*, 130(39), 12998-13007, “Heparin”, bản đối chiếu của chất trung gian thứ ba NS2S6S, không chứa nhóm N-acetyl mà thể hiện 0S, 2S, 6S, và 2S6S. “Heparin” thu được là không tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, và các disacarit của chất trung gian trước 3OST trong tài liệu tham khảo này không thể thỏa mãn được các yêu cầu của chất trung gian thứ ba NS2S6S cần thiết cho heparin tương đương về mặt sinh học. Hoạt tính của heparin này xác định được là 180U/mg theo thử nghiệm thời gian thromboplastin bán

phần được hoạt hóa (activated partial thromboplastin time - APTT) dựa trên cục khối. Thử nghiệm này là không tương đương với hoạt tính kháng IIa đã được bộc lộ trong USP hiện tại nên không rõ liệu nó có thỏa mãn các đặc điểm về hoạt tính đối với heparin USP của lợn hay không. Hơn thế nữa, không thử nghiệm kháng Xa nào được thực hiện trong thử nghiệm này nên tỷ lệ kháng Xa/kháng II của “heparin” này không được xác định. Tóm lại, khi không có nhóm N-acetyl và các hoạt tính kháng IIa và kháng Xa không xác định được, heparin này là không tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn.

J Med Chem 48(2):349-352 (2005) thể hiện phân tử “neoheparin” với phân tử lượng khoảng 8.000; kháng Xa 162; kháng IIa 62; kháng Xa/kháng IIa 2,6, tức là không tương đương về mặt sinh học. Xem xét khoảng cách về phân tử lượng và hoạt tính chống đông của phản ứng sau 3OST theo quy trình hóa enzym giữa neoheparin và heparin tương đương về mặt sinh học, chất trung gian trước 3OST của neoheparin không giống chất trung gian thứ ba NS2S6S cần thiết cho heparin tương đương về mặt sinh học.

Patent Mỹ số 6,162,797 đề xuất chất dẫn xuất của heparin thu được bằng cách sulfat hóa hóa học từng bước đối với heparosan đã được epime hóa, N-deacetyl hóa, N-sulfat hóa. Tuy nhiên, chất dẫn xuất này có kháng Xa nằm trong khoảng từ 500 đến 600, kháng IIa nằm trong khoảng từ 250 đến 320 (mặc dù trong bản mô tả này “APTT” được sử dụng thay cho kháng IIa, và rất có khả năng “APTT” hẳn là kháng IIa), tức không là tương đương về mặt sinh học. Từ đó suy ra rằng tài liệu này không bộc lộ hoặc ám chỉ rằng chất trung gian tương đương với chất trung gian thứ ba NS2S6S cần cho heparin tương đương về mặt sinh học. Patent cũng không bộc lộ chất trung gian thứ nhất (NS) hoặc chất trung gian thứ hai bộc lộ dưới đây.

US 2014/0349962 A1 thể hiện chất dẫn xuất của heparin, “Mitrin”, thu được theo phương pháp chức hóa bằng cách hóa enzym đối với heparosan. “Mitrin” là hexasacarit không chứa nhóm axit 2-O sulfatđiđuronic với hoạt tính kháng Xa cao hơn heparin của Mỹ. Do đó, tài liệu này không bộc lộ hoặc gợi ý về chất trung gian thứ hai (NS2S) hoặc chất trung gian tương đương với chất trung gian thứ ba (NS2S6S).

Do đó, trong khi các “heparin sinh tổng hợp” đã được bộc lộ trong các tài liệu tham

khảo nêu trên có một số tính chất chung với heparin USP của lợn, chúng không tương đương về mặt hóa học hoặc tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn. Các tài liệu tham khảo nêu trên cũng không bộc lộ hoặc gợi ý yếu tố nào còn thiếu, bước nào cần thay đổi hoặc thay đổi chúng bằng cách nào, để tạo ra heparin sinh tổng hợp. Các chất trung gian của heparin sinh tổng hợp được bộc lộ trong bản mô tả này không được tìm thấy ở các chất trung gian của quá trình sản xuất heparin *in vivo*. Cụ thể, các chất trung gian của heparin tự nhiên liên kết với nhóm liên kết proteoglycan, (Sugahara K, Kitagawa H. (2002) *Heparin and heparan sulfate biosynthesis. IUBMB Life*, 54(4):163-75), và do đó, không tồn tại trong ở dạng tự do với các đặc tính nêu trong bản mô tả này. Do đó, heparin sinh tổng hợp không là sản phẩm tự nhiên.

Các tác giả sáng chế đã tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn. Các tác giả sáng chế đã làm sáng tỏ ba chất trung gian, mà có thể là thiết yếu đối với quy trình tổng hợp heparin, mà là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, thông qua các quy trình hóa enzym từ heparosan. Các chất trung gian này, mà được đánh dấu dưới đây theo các nhóm disacarit trội của chúng là chất trung gian NS, chất trung gian NS2S, và chất trung gian NS2S6S (hoặc chất trung gian TriS), được đặc trưng bởi các khoảng của các loại đường thay đổi cụ thể, như nhóm disacarit. Chúng còn có thể được xác định tính chất bởi tính chất phân tử lượng và phân bố. Các chất trung gian này có thể không có hoạt tính chống đông gián tiếp qua kháng trombin.

Bản mô tả này liên quan đến quy trình tổng hợp heparin sinh tổng hợp từ heparosan, như thu được từ exopolysacarit heparosan của vi khuẩn, và làm sáng tỏ các tính chất của các chất trung gian then chốt, mà có thể là cần thiết để thu được heparin tương đương về mặt sinh học. Theo một số phương án, heparin sinh tổng hợp có thể thỏa mãn các yêu cầu về hoạt tính Dược điển Mỹ (US Pharmacopeia - USP), đặc biệt là hoạt tính chống đông của heparin đối với yếu tố IIa (tức là kháng IIa) không thấp hơn hoặc cao hơn 180U/mg, và tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa (tức là kháng Xa/kháng IIa) nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc từ 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0. Heparin sinh tổng hợp cũng có thể thỏa mãn các yêu cầu theo USP về phân bố phân tử lượng: trọng lượng trung

bình nằm trong khoảng từ 15.000Da đến 19.000Da; tỷ lệ phần trăm của mạch heparin với phân tử lượng cao hơn 24.000Da là không nhiều hơn 20% tổng (kể cả 0% đến 15%, 0% đến 10%, và 5% đến 10%); và tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000Da đến 16.000Da so với các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 16.000Da đến 24.000Da không thấp hơn 1,0 (kể cả nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,5; 1,0 đến 2,0, 1,2 đến 1,8, 1,4 đến 1,7, 1,5, hoặc 1,6). Do đó, heparin sinh tổng hợp có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn.

Theo một phương án, chất trung gian thứ nhất NS có thể là chất liệu glycosaminoglycan chứa lượng hữu hiệu của nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Ví dụ, các nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS) có thể chiếm 78% đến 99,5% hoặc 78% đến 99% hoặc 81% đến 97% hoặc 83% đến 95% hoặc 84% đến 94% hoặc 85% đến 93% hoặc 84% đến 87% hoặc 85% đến 86% hoặc 87,5% đến 94% hoặc 90% đến 93,5% hoặc 90,5% đến 93% hoặc 90,3% đến 91,3% hoặc 92,2% đến 93,2%, hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này, của chất trung gian thứ nhất NS. Theo một số phương án liên quan, phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-acetyl hóa (NAc) phụ (OS). Trong mọi trường hợp, NS phải chứa một vài nhóm NAc đo được.

Các đặc tính về phân tử lượng của chất trung gian thứ nhất có thể là thích hợp để tạo ra heparin sinh tổng hợp mà có thể thỏa mãn các đặc tính về phân tử lượng đối với heparin natri USP của lợn bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất NS là chất liệu glycosaminoglycan chứa 84,7% đến 93,8% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, phần còn lại là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-acetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất NS có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 83,4% đến 87,4% hoặc 83,9% đến 86,9% hoặc 84,4% đến 86,4% hoặc 84,9% đến 85,9% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng

này. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS này có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất NS có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 87,9% đến 92,9% hoặc từ 88,4% đến 92,4% hoặc từ 88,9% đến 91,9% hoặc từ 89,4% đến 91,4% hoặc từ 89,9% đến 90,9% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS này có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất NS có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 88,8% đến 94,7% hoặc 89,3% đến 94,2% hoặc 89,8% đến 93,7% hoặc 90,3% đến 93,2% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS này có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất NS có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 88,8% đến 92,8% hoặc 89,3% đến 92,3% hoặc 89,8% đến 91,8% hoặc 90,3% đến 91,3% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS này có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ nhất có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 90,1% đến 94,7% hoặc 90,6% đến 94,2% hoặc 91,1% đến 93,7% hoặc 91,6% đến 93,2% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS này có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS).

Phương án khác có thể là chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S, mà có thể là chất liệu glycosaminoglycan chứa lượng hữu hiệu của nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S). Ví dụ, theo một số phương án, nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) có thể chiếm 44% đến 80% hoặc 45% đến 79% hoặc 50% đến 78% hoặc 50% đến 77% hoặc 55% đến 78%

hoặc 55% đến 76% hoặc 58% đến 77% hoặc 59% đến 76% hoặc 60% đến 75% hoặc 58% đến 62% hoặc 59% đến 61% hoặc 65% đến 77% trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S.

Chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S còn có thể bao gồm nhóm NS disacarit ngoài nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S). Ví dụ, nhóm NS disacarit có thể chiếm 12% đến 40% hoặc 13% đến 39% hoặc 15% đến 34% hoặc 15% đến 29% hoặc 16% đến 29% hoặc 16% đến 26% hoặc 17% đến 25% hoặc 16% đến 18% hoặc 19% đến 26% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S. Mỗi khoảng trong số các khoảng đối với nhóm NS disacarit có thể được dùng với mỗi khoảng trong số các khoảng đối với nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S).

Ngoài nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) và nhóm NS disacarit, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể còn bao gồm một hoặc nhiều nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-acetyl hóa (NAc) phụ (0S) và nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Theo các phương án nhất định, các thành phần duy nhất của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S ngoài nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) và nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-acetyl hóa (NAc) phụ (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Theo một số phương án, lượng kết hợp các nhóm disacarit 0S và 2S có thể chiếm 0,4% đến 25% hoặc 4% đến 24% hoặc 5% đến 24% hoặc 6% đến 20% hoặc 6% đến 18% hoặc 6% đến 16% hoặc 7% đến 23% hoặc 7% đến 20% hoặc 7% đến 17% hoặc 7% đến 15% chất trung gian thứ hai NS2S.

Các đặc tính về phân tử lượng của chất trung gian thứ hai có thể là thích hợp để tạo ra heparin sinh tổng hợp mà có thể thỏa mãn các đặc tính về phân tử lượng đối với heparin natri USP của lợn bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm 73,8% đến 75,3% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S), và 18,5% đến 20,2% trọng lượng nhóm disacarit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S) và nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S).

Theo một số phương án, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm disacarit NS2S với lượng nằm trong khoảng từ 57,5% đến 62,5% hoặc 58% đến 62% hoặc 58,5% đến 61,5% hoặc 59% đến 61% hoặc 59,5% đến 60,5% hoặc trị số hoặc khoảng trong các khoảng này. Ngoài ra, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 23,2% đến 27,2% hoặc 23,7% đến 26,7% hoặc 24,2% đến 26,2% hoặc 24,7% đến 25,7% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Lượng kết hợp các nhóm 0S và 2S có thể chiếm từ 13,3% đến 16,3% hoặc 13,8% đến 15,8% hoặc 14,3% đến 15,3% chất trung gian thứ hai.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm disacarit NS2S với lượng nằm trong khoảng từ 65,8% đến 77,4% hoặc 66,3% đến 76,9% hoặc 66,8% đến 76,4% hoặc 67,3% đến 75,9% hoặc trị số hoặc khoảng trong các khoảng này của. Ngoài ra, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 14,8% đến 26% hoặc 15,3% đến 25,5% hoặc 15,8% đến 25% hoặc 16,3% đến 24,5% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Lượng các nhóm 0S và 2S kết hợp có thể chiếm từ 5,6% đến 10,8% hoặc 6,1% đến 10,3% hoặc 6,6% đến 9,8% chất trung gian thứ hai.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm disacarit NS2S với lượng nằm trong khoảng từ 65,8% đến 74,4% hoặc 66,3% đến 73,9% hoặc 66,8% đến 73,4% hoặc 67,3% đến 72,9% hoặc trị số hoặc khoảng trong các khoảng này. Ngoài ra, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 17,9% đến 26% hoặc 18,4% đến 25,5% hoặc 18,9% đến 25% hoặc 19,4% đến 24,5% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Lượng các nhóm 0S và 2S kết hợp có thể chiếm từ 5,6% đến 10,8% hoặc 6,1% đến 10,3% hoặc 6,6% đến 9,8% chất trung gian thứ hai.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm disacarit NS2S với lượng nằm trong khoảng từ 73,4% đến 77,4% hoặc 73,9% đến 76,9% hoặc 74,4% đến 76,4% hoặc 74,9% đến 75,9% hoặc trị số hoặc khoảng trong các khoảng này. Ngoài ra, chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm nhóm NS disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 14,8% đến 18,8% hoặc 15,3% đến 18,3% hoặc 15,8% đến 17,8% hoặc 16,3% đến 17,3% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này. Phần còn lại của chất trung gian thứ hai của glycosaminoglycan NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Lượng các nhóm 0S và 2S kết hợp có thể chiếm từ 5,8% đến 9,8% hoặc 6,3% đến 9,3% hoặc 6,8% đến 8,8% chất trung gian thứ hai.

Chất trung gian thứ hai có thể là thích hợp để tạo ra heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn. Nói cách khác, chất trung gian thứ hai có thể là chất sao cho heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin natri USP của lợn có thể được tạo thành bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây. Ví dụ, chất trung gian thứ hai có thể có phân tử lượng trung bình thích hợp để tạo ra sản phẩm heparin cuối cùng với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin natri USP của lợn. Lượng hữu hiệu của các nhóm

disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) ở chất trung gian thứ hai có thể là lượng sao cho heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin natri USP của lợn có thể được tạo thành bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây.

Phương án khác là chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S mà có thể là chất liệu glycosaminoglycan chứa lượng hữu hiệu của nhóm disacarit nhóm đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa, đã được 6-O-sulfat hóa (NS2S6S hoặc còn được gọi là TriS) và nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 6-O-sulfat hóa (NS6S). Ví dụ, nhóm disacarit NS2S6S có thể chiếm 30% đến 74% hoặc 31% đến 73% hoặc 36% đến 70% hoặc 40% đến 67% hoặc 40% đến 66% hoặc 42% đến 65% hoặc 44% đến 64% hoặc 42% đến 45% hoặc 48% đến 65%, hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này, của chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S. Nhóm disacarit NS6S có thể chiếm 5% đến 40% hoặc 5% đến 32% hoặc 5% đến 26% hoặc 5% đến 23% hoặc 5% đến 7% hoặc 8% đến 16% hoặc 18% đến 23% hoặc 6% đến 69% hoặc 6% đến 32% hoặc 6% đến 26% hoặc 6% đến 21%, hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này, của chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S. Mỗi khoảng nhóm disacarit NS6S có thể được dùng với mỗi khoảng nhóm disacarit NS2S6S.

Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S không chứa nhóm disacarit 3S.

Ngoài các nhóm disacarit NS2S6S và NS6S, chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S còn có thể bao gồm nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S) và/hoặc nhóm disacarit NS. Nhóm disacarit NS2S có thể chiếm 1% đến 28% hoặc 1% đến 27% hoặc 4% đến 28% hoặc 8% đến 28% hoặc 10% đến 28% hoặc 11% đến 28% hoặc 12% đến 27% hoặc 11% đến 22% hoặc 19% đến 27% hoặc 3% đến 23% hoặc 5% đến 19% hoặc 7% đến 16% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này của chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S. Nhóm NS disacarit có thể chiếm 0,5% đến 23% hoặc 0,5% đến 20% hoặc 0,5% đến 19% hoặc 0,5% đến 18% hoặc 0,5% đến 17% hoặc 1% đến 21% hoặc 1% đến 19% hoặc 1% đến 18% hoặc 1% đến 17% hoặc 1% đến 15% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng

này của chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S.

Bên cạnh các nhóm đisacarit NS2S6S, NS6S, NS2S và NS, chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S có thể bao gồm một hoặc nhiều nhóm đisacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) và nhóm đisacarit đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Theo các phương án nhất định, các thành phần duy nhất của chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S có thể là (a) 0S; (b) 6S; (c) 2S; và/hoặc (d) 2S6S. tổng lượng (a) 0S; (b) 6S; (c) 2S; và/hoặc (d) 2S6S ở chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S có thể, ví dụ, là 28% hoặc thấp hơn hoặc 27% hoặc thấp hơn hoặc 23% hoặc 19% hoặc 16%. Theo một số phương án, lượng kết hợp (a) 0S; (b) 6S; (c) 2S; và (d) 2S6S ở chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S có thể nằm trong khoảng từ 0,5% đến 28% hoặc 1% đến 27% hoặc 2% đến 24% hoặc 3% đến 23% hoặc 4% đến 20% hoặc 5% đến 19% hoặc 8% đến 17% hoặc 7% đến 16% hoặc trị số hoặc khoảng bất kỳ trong các khoảng này.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ ba có thể bao gồm 57,4% đến 62,0% trọng lượng (53,3% mol đến 59,4% mol) nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa, đã được 6-O-sulfat hóa (NS2S6S hoặc còn được gọi là TriS), 17,7% đến 22,2% trọng lượng (10,6% mol đến 15,1% mol) nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 6-O-sulfat hóa (NS6S), 8,4% đến 10,9% trọng lượng (12,0% mol đến 13,8% mol) nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S), và 3,1% đến 8,1% trọng lượng (5,0% mol đến 12,2% mol) nhóm đisacarit NS. Theo các phương án liên quan, phần còn lại có thể bao gồm, hoặc chứa, nhóm đisacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) và nhóm đisacarit đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Theo một phương án khác nữa, chất trung gian thứ ba (NS2S6S) không chứa nhiều hơn 10% trọng lượng tổng các trình tự đisacarit phụ được chọn trong số (a) 0S; (b) 6S; (c) 2S; và/hoặc (d) 2S6S. Tốt hơn là, chất trung gian thứ ba này không chứa nhóm đisacarit 3S.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ ba có thể bao gồm 41,5% đến 45,5% hoặc 42% đến 45% hoặc 42,5% đến 44,5% hoặc 43% đến 44% nhóm đisacarit NS2S6S, 8,5% đến 12,5% hoặc 9% đến 12% hoặc 9,5% đến 11,5%, 10% đến 11% nhóm đisacarit

NS6S, 12% đến 15% hoặc 12,5% đến 14,5% hoặc 13% đến 14% nhóm đisacarit NS2S và 14,6% đến 18,6% hoặc 15,1% đến 18,1% hoặc 15,6% đến 17,6% hoặc 16,1% đến 17,1% nhóm đisacarit NS. Phần còn lại có thể bao gồm hoặc gồm một hoặc nhiều 0S; (b) 6S; (c) 2S; và (d) 2S6S. Lượng kết hợp của các nhóm 0S, 6S, 2S và/hoặc 2S6S ở chất trung gian thứ ba có thể chiếm 14,4% đến 17,4% hoặc 14,9% đến 16,9% hoặc 15,4% đến 16,4% chất trung gian thứ ba. Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba này không chứa nhóm đisacarit 3S.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ ba có thể bao gồm 51,3% đến 60,3% hoặc 51,8% đến 59,8% hoặc 52,3% đến 59,3% hoặc 52,8% đến 58,8% nhóm đisacarit NS2S6S, 8,6% đến 13,5% hoặc 9,1% đến 13% hoặc 9,6% đến 12,5% hoặc 10,1% đến 12% nhóm đisacarit NS6S, 10% đến 15,8% hoặc 10,5% đến 15,3% hoặc 11% đến 14,8% hoặc 11,5% đến 14,3% nhóm đisacarit NS2S và 7,4% đến 15,2% hoặc 7,9% đến 14,7% hoặc 8,4% đến 14,2% hoặc 8,9% đến 13,7% hoặc 8,9% đến 9,9% hoặc 11,7% đến 13,7% nhóm đisacarit NS. Phần còn lại có thể bao gồm hoặc gồm một hoặc nhiều 0S; (b) 6S; (c) 2S; và (d) 2S6S. Theo một số phương án, các nhóm 2S6S có thể không có mặt ở chất trung gian thứ ba. Lượng kết hợp của các nhóm 0S, 6S, 2S và/hoặc 2S6S ở chất trung gian thứ ba có thể chiếm 7,3% đến 11,6% hoặc 7,8% đến 11,1% hoặc 8,3% đến 10,6% chất trung gian thứ ba. Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba này không chứa nhóm đisacarit 3S.

Theo một số phương án, chất trung gian thứ ba có thể bao gồm 41,5% đến 65,7% hoặc 42% đến 65,2% hoặc 42,5% đến 64,7% hoặc 43% đến 64,2% nhóm đisacarit NS2S6S, 4,1% đến 23,3% hoặc 4,6% đến 22,8% hoặc 5,1% đến 22,3% hoặc 5,6% đến 21,8% nhóm đisacarit NS6S, 10% đến 28,6%, 10,5% đến 28,1% hoặc 11% đến 27,6% hoặc 11,5% đến 27,1% hoặc 11,1% đến 17,8% hoặc 19% đến 27,6% nhóm đisacarit NS2S và 0,4% đến 15,9% hoặc 0,7% đến 15,4% hoặc 1% đến 14,9% hoặc 1% đến 14,4% hoặc 0,4% đến 5,5% hoặc 10,2% đến 14,9% nhóm đisacarit NS. Phần còn lại có thể bao gồm hoặc gồm một hoặc nhiều 0S; (b) 6S; (c) 2S; và (d) 2S6S. Theo một số phương án, các nhóm 2S6S có thể không có mặt ở chất trung gian thứ ba. Lượng kết hợp của các nhóm 0S, 6S, 2S và/hoặc 2S6S ở chất trung gian thứ ba có thể chiếm 5,3% đến 9,7% hoặc 5,8% đến 9,2% hoặc 6,3% đến 8,7% chất trung gian thứ ba. Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba này không chứa nhóm đisacarit 3S.

Các đặc tính về phân tử lượng của chất trung gian thứ ba có thể là thích hợp để tạo ra heparin sinh tổng hợp mà có thể thỏa mãn các đặc tính về phân tử lượng đối với heparin USP của lợn bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây.

Chất trung gian thứ ba có thể là thích hợp để tạo ra heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn. Nói cách khác, chất trung gian thứ ba có thể là chất sao cho heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn có thể được tạo ra. Ví dụ, chất trung gian thứ ba có thể có trọng lượng phân tử lượng trung bình thích hợp để tạo ra sản phẩm heparin cuối cùng với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn. Nói cách khác, chất trung gian thứ ba có thể là chất sao cho heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn có thể được tạo ra. Lượng hữu hiệu của các nhóm đisacarit NS2S6S và NS6S ở chất trung gian thứ ba có thể là lượng sao cho heparin với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với USP heparin có thể được tạo ra.

Có thể có khả năng là tất cả các chất trung gian thứ nhất, thứ hai và thứ ba đều không có hoạt tính chống đông. Không chất nào trong số các chất trung gian này có thể được tìm thấy trong tự nhiên. Các tác giả sáng chế có khả năng thu được heparin, mà có thể là heparin USP tương đương về mặt sinh học với các yêu cầu về kích thước và hoạt tính phù hợp với heparin USP của lợn bằng cách sử dụng ba chất trung gian nêu trên.

Các phương pháp tạo ra heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, cũng được đề xuất.

Một phương án có thể là phương pháp sản xuất heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, từ chất trung gian thứ ba NS2S6S. Theo các phương án nhất định, phương pháp có thể bao gồm các bước:

- (a) thu nhận chất trung gian thứ ba của glycosaminoglycan NS2S6S như được bộc lộ nêu trên; và
- (b) xử lý chất trung gian thứ ba NS2S6S bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-

phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin natri USP của lợn.

Theo một số phương án, việc xử lý chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể được thực hiện với sự có mặt của hệ quay vòng PAPS, mà có thể bao gồm *p*-nitrophenylsulphat (PNPS) và PAPS. Hệ quay vòng PAPS có thể còn bao gồm chất xúc tác, như aryl sulfotransferaza IV (AST-IV), mà có thể được sử dụng để xúc tác bước chuyển hóa PAP thành PAPS bằng cách sử dụng *p*-nitrophenylsulfat (PNPS) làm chất cho sulfat với đủ PNPS trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ ba NS2S6S nhờ enzym 3OST-1. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện không có hệ quay vòng PAPS với đủ PAPS trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ ba NS2S6S nhờ enzym 3OST-1. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện trong dung dịch đệm phản ứng axit 2-(*N*-morpholino)etan-sulfonic (MES) với sự có mặt của enzym 3OST-1. Các dung dịch đệm thích hợp khác và nồng độ của dung dịch đệm mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, như dung dịch đệm phosphat, có thể được sử dụng. Chất cho sulfat, như PAPS hoặc PAP cộng với PNPS, có thể có mặt. Dung dịch đệm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4, như khoảng 7,2. Việc xử lý có thể được thực hiện ở nhiệt độ cao thích hợp, như nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C hoặc 33°C đến 42°C hoặc 35°C đến 40°C. Tốt hơn là, đối với việc xử lý, các enzym mới, như 3OST-1 được sử dụng. Các enzym có thể được cố định hoặc trong dung dịch. Sau bước xử lý, sản phẩm của việc xử lý chứa heparin sinh tổng hợp có thể được tinh chế để loại bỏ các hợp chất sau phản ứng, như PAP, PAPS, PNPS và/hoặc PNP. Theo một số phương án, heparin sinh tổng hợp tạo ra được có thể được tinh chế bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký như sắc ký trao đổi anion mạnh, mà có thể chứa nhựa trao đổi anion, như ví dụ, nhựa Q Sepharose. Heparin sinh tổng hợp tạo ra được có thể liên kết với nhựa đó trong dung dịch muối, mà có thể ví dụ, là dung dịch NaCl. Tiếp đó, heparin sinh tổng hợp tinh chế được có thể được loại muối và cô.

Theo một số phương án, nếu hoạt tính mong muốn, hoạt tính chống đông và/hoặc hoạt tính kháng IIa, không đạt được ở heparin tạo ra được, thì việc xử lý có thể được lặp lại

để tạo ra heparin với hoạt tính mong muốn. Ví dụ, heparin tạo ra được ban đầu có thể có tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa (tức là kháng Xa/kháng IIa) thấp hơn 0,9, như trị số nằm trong khoảng từ 0,6 đến 0,9 hoặc 0,7 đến 0,9, hoặc cao hơn 1,1, như trị số nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 hoặc 1,1 đến 1,4 hoặc 1,1 đến 1,3 hoặc 1,1 đến 1,2, thì việc xử lý bằng 3OST-1 có thể được lặp lại để tạo ra heparin với tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa (tức là kháng Xa/kháng IIa) nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0.

Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp có thể bao gồm các bước:

- (a) thu nhận glycosaminoglycan, mà tốt hơn nếu không chứa nhóm disacarit 3S, trong khi chứa:
 - (i) 57,4% đến 62,0% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí 2, đã được sulfat hóa ở vị trí 6 (TriS);
 - (ii) 17,7% đến 22,2% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí 6 (NS6S);
 - (iii) 8,4% đến 10,9% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí 2 (NS2S); và
 - (iv) 3,1% đến 8,1% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N; và
 - (v) một cách tùy ý, kết hợp gốc glucosamin đã được N-axetyl hóa ở vị trí N chứa các nhóm disacarit phụ 0S, 2S, 6S, và 2S6S đến vừa đủ;
- (b) xử lý glycosaminoglycan bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP. Ở bước (b), đủ gốc glucosamin có thể được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin để thu được heparin, mà có thể có hoạt tính kháng IIa không thấp hơn hoặc cao hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng II nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc 0,9 đến 1,1 hoặc

khoảng 1,0.

Theo một số phương án, phương pháp có thể bao gồm các bước:

(a) thu nhận glycosaminoglycan, mà tốt hơn nếu không chứa nhóm disacarit 3S, trong khi chứa:

- (i) 30% đến 74% hoặc 31% đến 73% hoặc 36% đến 70% hoặc 40% đến 67% hoặc 40% đến 66% hoặc 42% đến 65% hoặc 44% đến 64% hoặc 42% đến 45% hoặc 48% đến 65% nhóm disacarit NS2S6S,
- (ii) 5% đến 40% hoặc 5% đến 32% hoặc 5% đến 26% hoặc 5% đến 23% hoặc 5% đến 7% hoặc 8% đến 16% hoặc 18% đến 23% hoặc 6% đến 39% hoặc 6% đến 32% hoặc 6% đến 26% hoặc 6% đến 21% nhóm disacarit NS6S,
- (iii) 1% đến 28% hoặc 1% đến 27% hoặc 4% đến 28% hoặc 4% đến 27% hoặc 8% đến 28% hoặc 8% đến 27% hoặc 10% đến 28% hoặc 11% đến 28% hoặc 12% đến 27% hoặc 11% đến 22% hoặc 19% đến 27% nhóm disacarit NS2S,
- (iv) 0,5% đến 23% hoặc 0,5% đến 20% hoặc 0,5% đến 19% hoặc 0,5% đến 18% hoặc 0,5% đến 17% hoặc 1% đến 21% hoặc 1% đến 19% hoặc 1% đến 18% hoặc 1% đến 17% hoặc 1% đến 15% nhóm NS disacarit, và
- (v) một cách tùy ý, một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, 6S, và 2S6S chứa phần còn lại của glycosaminoglycan;

(b) xử lý glycosaminoglycan bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP. Ở bước (b) đủ gốc glucosamin có thể được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin để thu được heparin, mà có thể có hoạt tính kháng IIa không thấp hơn hoặc cao hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng II nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0.

Theo một số phương án, phương pháp có thể bao gồm:

- (a) thu nhận glycosaminoglycan, mà tốt hơn nếu không chứa nhóm disacarit 3S, trong khi chứa:
- (i) 41,5% đến 45,5% hoặc 42% đến 45% hoặc 42,5% đến 44,5% hoặc 43% đến 44% nhóm disacarit NS2S6S,
 - (ii) 8,5% đến 12,5% hoặc 9% đến 12% hoặc 9,5% đến 11,5%, 10% đến 11% nhóm disacarit NS6S,
 - (iii) 12% đến 15% hoặc 12,5% đến 14,5% hoặc 13% đến 14% nhóm disacarit NS2S,
 - (iv) 14,6% đến 18,6% hoặc 15,1% đến 18,1% hoặc 15,6% đến 17,6% hoặc 16,1% đến 17,1% nhóm NS disacarit và
 - (v) một cách tùy ý, một hoặc nhiều nhóm 0S, 2S, 6S, và 2S6S chứa phần còn lại của glycosaminoglycan;
- (b) xử lý glycosaminoglycan bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP. Ở bước (b), đủ gốc glucosamin có thể được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin để thu được heparin, mà có thể có hoạt tính kháng IIa không thấp hơn hoặc cao hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng II nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0.

Theo một số phương án, phương pháp có thể bao gồm các bước:

- (a) thu nhận glycosaminoglycan, mà tốt hơn nếu không chứa nhóm disacarit 3S, trong khi chứa:
- (i) 51,3% đến 60,3% hoặc 51,8% đến 59,8% hoặc 52,3% đến 59,3% hoặc 52,8% đến 58,8% nhóm disacarit NS2S6S,

- (ii) 8,6% đến 13,5% hoặc 9,1% đến 13% hoặc 9,6% đến 12,5% hoặc 10,1% đến 12% nhóm disacarit NS6S,
 - (iii) 10% đến 15,8% hoặc 10,5% đến 15,3% hoặc 11% đến 14,8% hoặc 11,5% đến 14,3% nhóm disacarit NS2S,
 - (iv) 7,4% đến 15,2% hoặc 7,9% đến 14,7% hoặc 8,4% đến 14,2% hoặc 8,9% đến 13,7% hoặc 8,9% đến 9,9% hoặc 11,7% đến 13,7% nhóm NS disacarit và
 - (v) một cách tùy ý, một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, 6S, và 2S6S chứa phần còn lại của glycosaminoglycan;
- (b) xử lý chất trung gian thứ ba NS2S6S bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP. Ở bước (b), đủ gốc glucosamin có thể được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin để thu được heparin, mà có thể có hoạt tính kháng IIa không thấp hơn hoặc cao hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng II nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0.

Theo một số phương án, phương pháp có thể bao gồm các bước:

- (a) thu nhận glycosaminoglycan, mà tốt hơn nếu không chứa nhóm disacarit 3S, trong khi chứa:
 - (i) 41,5% đến 65,7% hoặc 42% đến 65,2% hoặc 42,5% đến 64,7% hoặc 43% đến 64,2% nhóm disacarit NS2S6S,
 - (ii) 4,1% đến 23,3% hoặc 4,6% đến 22,8% hoặc 5,1% đến 22,3% hoặc 5,6% đến 21,8% nhóm disacarit NS6S,
 - (iii) 10% đến 28,6% 10,5% đến 28,1% hoặc 11% đến 27,6% hoặc 11,5% đến 27,1% hoặc 11,1% đến 17,8% hoặc 19% đến 27,6% nhóm disacarit NS2S,

- (iv) 0,4% đến 15,9% hoặc 0,7% đến 15,4% hoặc 1% đến 14,9% hoặc 1% đến 14,4% hoặc 0,4% đến 5,5% hoặc 10,2% đến 14,9% nhóm NS đisacarit và
- (v) một cách tùy ý, một hoặc nhiều nhóm đisacarit 0S, 2S, 6S, và 2S6S chứa phần còn lại của glycosaminoglycan;
- (b) xử lý glycosaminoglycan bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra heparin sinh tổng hợp, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP. Ở bước (b), đủ gốc glucosamin có thể được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin để thu được heparin, mà có thể có hoạt tính kháng IIa không thấp hơn hoặc cao hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng II nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15 hoặc 0,9 đến 1,1 hoặc khoảng 1,0.

Phương án khác có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS như được bộc lộ nêu trên. Phương pháp có thể bao gồm việc thu nhận heparosan và sau đó chuyển hóa lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Lượng đã được chuyển hóa của các gốc N-axetyl glucosamin có thể tương ứng với lượng nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N ở chất trung gian thứ nhất NS. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa, như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit, trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa các gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo một phương án khác, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với bazơ trong dung dịch nước, như dung dịch nước natri hydroxit hoặc dung dịch nước kali hydroxit, và sulfonat hóa ở vị trí N bằng phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS) bằng cách sử dụng chất xúc tác N-sulfotransferaza. Lượng đã được chuyển hóa của các gốc N-axetyl glucosamin có thể tương ứng với lượng nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N ở chất trung gian thứ nhất NS. Theo một phương án khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đeacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) thành các gốc N-

axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Lượng đã được chuyển hóa của các gốc N-axetyl glucosamin có thể tương ứng với lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N ở chất trung gian thứ nhất NS. Theo mỗi phương pháp trong số các phương pháp này, có thể tốt hơn nếu số nhóm amin không được thể còn lại sau bước sulfonat hóa ở vị trí N theo cách hóa học hoặc dùng enzym nên cao hơn số nhóm amin không được thể tìm thấy ở heparin natri USP của lợn, một hoặc ít hơn mỗi mạch (T. Toida, H. Yoshida, H. Toyoda, I. Koshiishi, T. Imanari, R.E. Hileman, J.R. Fromm, R.J. Linhardt, *Biochemical Journal*, 322, 499-506, 1997). Số nhóm NS của chất trung gian thứ nhất tạo ra được có thể được kiểm soát bằng cách kiểm soát các quy trình hóa học hoặc enzym. (Z. Wang, *et al.* (2011), *Journal of Biotechnology*, 156, 188-196; A. Onishi (2015), *Detailed physicochemical and biological analyses of heparins from various sources*, Luận án Tiến sĩ, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA).

Các đặc tính về phân tử lượng của chất trung gian thứ nhất tạo ra được có thể là các tính chất sao cho chúng là thích hợp để tạo ra heparin sinh tổng hợp mà có thể thỏa mãn các đặc tính về phân tử lượng đối với heparin USP của lợn bằng cách áp dụng, ví dụ, một trong số các phương pháp được bộc lộ dưới đây.

Heparosan được dùng trong các phương pháp theo sáng chế có thể, ví dụ, là heparosan tạo ra được bằng cách sử dụng vi khuẩn, như *Escherichia coli* (*E. coli*) hoặc *Pasteurella multocida*. Ví dụ, heparosan có thể được tạo ra từ *E. coli* K5 hoặc *E. coli* Nissle 1917. Trước khi tạo ra chất trung gian thứ nhất, heparosan có thể được deaxetyl hóa ở vị trí N và được giải trùng hợp như được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu: Z. Wang *et al* (2011), *Journal of Biotechnology*, 156, 188-196.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 84,7% đến 93,8% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa 84,7% đến 93,8% trọng lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra heparosan đã được khử deaxetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể

được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa 84,7% đến 93,8% trọng lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đeacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa 84,7% đến 93,8% trọng lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 78% đến 99,5% hoặc 78% đến 99% hoặc 81% đến 97% hoặc 83% đến 95% hoặc 84% đến 94% hoặc 85% đến 93% hoặc 84% đến 87% hoặc 85% đến 86% hoặc 87,5% đến 94% hoặc 90% đến 93,5% hoặc 90,5% đến 93% hoặc 90,3% đến 91,3% hoặc 92,2% đến 93,2% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm đisacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử ðeacetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-ðeacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 83,4% đến 87,4% hoặc 83,9% đến 86,9% hoặc 84,4% đến 86,4% hoặc 84,9% đến 85,9% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất

trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử deaxetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức triethylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-deaxetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Chất trung gian thứ nhất tạo ra được NS có thể có phân tử lượng trung bình đủ để được chuyển hóa thông qua quy trình này để tạo ra BSH với các tính chất phân tử lượng thích hợp.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 87,9% đến 92,9% hoặc 88,4% đến 92,4% hoặc từ 88,9% đến 91,9% hoặc từ 89,4% đến 91,4% hoặc từ 89,9% đến 90,9% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm disacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (0S). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử deaxetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức triethylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo

ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đeacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Chất trung gian thứ nhất NS tạo ra được có thể có phân tử lượng trung bình đủ để được chuyển hóa thông qua quy trình này để tạo ra BSH với các tính chất phân tử lượng thích hợp.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 88,8% đến 94,7% hoặc 89,3% đến 94,2% hoặc 89,8% đến 93,7% hoặc 90,3% đến 93,2% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm đisacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử ðeacetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đeacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 88,8% đến 92,8% hoặc 89,3% đến 92,3% hoặc 89,8% đến 91,8% hoặc 90,3% đến 91,3% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm đisacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển

hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử đēaxetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đēaxetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS.

Theo một số phương án, việc chuyển hóa heparosan thành chất trung gian thứ nhất có thể bao gồm việc thu nhận hoặc điều chế dung dịch chứa heparosan. Dung dịch này có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05% đến 12% hoặc 0,1% đến 10% hoặc 0,1% đến 5% hoặc 0,1% đến 3% hoặc 0,5% đến 2% heparosan. Dung môi này có thể, ví dụ, là nước hoặc dung môi trên cơ sở nước. Do đó, dung dịch này có thể là dung dịch nước. Dung dịch này có thể được cho phản ứng với bazơ, như natri hydroxit hoặc kali hydroxit. Phản ứng này có thể được thực hiện ở nhiệt độ tăng cao, ví dụ, nằm trong khoảng từ 30°C đến 70°C hoặc 40°C đến 65°C hoặc 50°C đến 55°C. Tiếp đó, axit, ví dụ, HCl, có thể được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng để điều chỉnh độ pH đến 7. Sản phẩm có thể được cho tiếp cận với phản ứng sulfonat hóa ở vị trí N, mà có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất phản ứng sulfonat hóa ở vị trí N, mà có thể, ví dụ, là lưu huỳnh trioxit hoặc phức lưu huỳnh lưu huỳnh trioxit, như phức lưu huỳnh amin. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các phức lưu huỳnh amin bao gồm phức lưu huỳnh trialkylamin, ví dụ, phức lưu huỳnh trimetylamin, phức lưu huỳnh trioxit đimetyletylamin, và phức lưu huỳnh trioxit metyl dietylamin, cũng như phức lưu huỳnh trioxit-amin chứa aryl, như phức lưu huỳnh trioxit-pyridin. Tiếp đó, sản phẩm của bước sulfonat hóa ở vị trí N có thể được phân đoạn để tạo ra tính chất phân tử lượng mong muốn.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 90,1% đến 94,7% hoặc 90,6% đến 94,2% hoặc 91,1% đến 93,7% hoặc 91,6% đến 93,2% nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N. Phần còn lại của chất trung gian thứ nhất NS có thể là nhóm đisacarit của glucosamin không được cải biến không được N-axetyl hóa (NAc) phụ (OS). Phương pháp này có thể bao gồm việc chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra heparosan đã được khử đēaxetyl ở vị trí N, đã được sulfat hóa ở vị trí N. Theo các phương án liên quan, chất trung gian thứ nhất NS có thể được tạo ra từ heparosan bằng cách cho heparosan phản ứng với các chất phản ứng hóa học, dung dịch nước natri hydroxit và chất phản ứng sulfonat hóa như phức trietylamin-lưu huỳnh trioxit trong các điều kiện thích hợp để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, thành gốc N-sulfo glucosamin để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS. Theo cách khác, heparosan có thể được cho phản ứng với N-đēaxetylaza, N-sulfotransferaza (NDST) để chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan, mà lượng này tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất, để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS.

Phương án khác có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS₂S như được bộc lộ nêu trên. Phương pháp có thể bao gồm các bước (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm đisacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N ở chất trung gian thứ nhất NS) và sau đó (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và/hoặc 2-O-sulfotransferaza (2OST), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS₂S. Theo một số phương án, chiều dài của mạch hoặc chất trung gian thứ hai có thể là khác biệt không đáng kể so với chiều dài của mạch của chất trung gian thứ nhất. Tốt hơn, nếu việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Bước chuyển hóa heparosan thành chất trung gian thứ nhất có thể được thực hiện như đã nêu trên.

Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện với sự có mặt của hệ quay vòng PAPS, mà có thể bao gồm *p*-nitrophenylsulphat (PNPS) và PAPS. Hệ quay vòng PAPS có thể còn bao gồm chất xúc tác, như aryl sulfotransferaza IV (AST-IV), mà có thể được sử dụng để xúc tác bước chuyển hóa PAP thành PAPS bằng cách sử dụng PNPS làm chất cho sulfat trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ nhất nhờ các enzym C5-epi và 2OST. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện không có hệ quay vòng PAPS nhưng với lượng PAPS đủ trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ nhất NS2S6S. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện, ví dụ, trong dung dịch đệm, như dung dịch đệm phản ứng axit 2-(N-morpholino)etansulfonic (MES). Các dung dịch đệm thích hợp khác và nồng độ của dung dịch đệm mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết có thể được dùng khi có mặt các enzym C5 epi và 2OST. Chất cho sulfat, như PAPS hoặc PAP cộng với PNPS, có thể có mặt. Dung dịch đệm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4, như khoảng 7,2. (Việc xử lý có thể được thực hiện ở nhiệt độ cao thích hợp, như nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C hoặc 33°C đến 42°C hoặc 35°C đến 40°C. Tốt hơn là, các enzym mới, như C5 epi và/hoặc 2OST được sử dụng để xử lý. Các enzym này có thể được cố định hoặc trong dung dịch. Sau bước xử lý, sản phẩm của việc xử lý chứa chất trung gian thứ hai có thể được tinh chế để loại bỏ các hợp chất sau phản ứng, như PAP, PAPS, PNPS và/hoặc PNP. Chất trung gian thứ hai đã được tinh chế có thể được gom và được cô để dùng tiếp, như phân tích và/hoặc tạo ra chất trung gian thứ ba.

Theo một số phương án, nếu các đặc tính mong muốn của disacarit, như tỷ lệ phần trăm của NS2S, không đạt được ở glycosaminoglycan tạo ra được nhờ việc xử lý, thì việc xử lý có thể được lặp lại để tạo ra glycosaminoglycan với các đặc tính của disacarit, như tỷ lệ phần trăm NS2S mong muốn đối với chất trung gian thứ hai.

Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 73,8% đến 75,3% trọng lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S), và 18,5% đến 20,2% trọng lượng nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm

disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa 84,7% đến 93,8% trọng lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS; và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn là, việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 44% đến 80% hoặc 45% đến 79% hoặc 50% đến 78% hoặc 50% đến 77% hoặc 55% đến 78% hoặc 55% đến 76% hoặc 58% đến 77% hoặc 59% đến 76% hoặc 60% đến 75% hoặc 58% đến 62% hoặc 59% đến 61% hoặc 65% đến 77% nhóm disacarit NS2S và 12% đến 40% hoặc 13% đến 39% hoặc 15% đến 34% hoặc 15% đến 29% hoặc 16% đến 29% hoặc 17% đến 25% hoặc 16% đến 26% hoặc 16% đến 18% hoặc 19% đến 26% nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 78% đến 99,5% hoặc 78% đến 99% hoặc 81% đến 97% hoặc 83% đến 95% hoặc 84% đến 94% hoặc 85% đến 93% hoặc 84% đến 87% hoặc 85% đến 86% hoặc 87,5% đến 94% hoặc 90% đến 93,5% hoặc 90,5% đến 93% hoặc 90,3% đến 91,3% hoặc 92,2% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn là, việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 57,5% đến 62,5% hoặc 58% đến 62% hoặc 58,5% đến 61,5% hoặc

59% đến 61% hoặc 59,5% đến 60,5% các nhóm disacarit NS2S và 23,2% đến 27,2% hoặc 23,7% đến 26,7% hoặc 24,2% đến 26,2% hoặc 24,7% đến 25,7% nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 83,4% đến 87,4% hoặc 83,9% đến 86,9% hoặc 84,4% đến 86,4% hoặc 84,9% đến 85,9% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn, nếu việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 65,8% đến 77,4% hoặc 66,3% đến 76,9% hoặc 66,8% đến 76,4% hoặc 67,3% đến 75,9% nhóm disacarit NS2S và 14,8% đến 26% hoặc 15,3% đến 25,5% hoặc 15,8% đến 25% hoặc 16,3% đến 24,5% nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa từ 88,8% đến 94,7% hoặc 89,3% đến 94,2% hoặc 89,8% đến 93,7% hoặc 90,3% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn là, việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 65,8% đến 74,4% hoặc 66,3% đến 73,9% hoặc 66,8% đến 73,4%

hoặc 67,3% đến 72,9% nhóm disacarit NS2S và 17,9% đến 26% hoặc 18,4% đến 25,5% hoặc 18,9% đến 25% hoặc 19,4% đến 24,5% nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa từ 88,8% đến 92,8% hoặc 89,3% đến 92,3% hoặc 89,8% đến 91,8% hoặc 90,3% đến 91,3% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn, nếu việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 73,4% đến 77,4% hoặc 73,9% đến 76,9% hoặc 74,4% đến 76,4% hoặc 74,9% đến 75,9% nhóm disacarit NS2S và 14,8% đến 18,8% hoặc 15,3% đến 18,3% hoặc 15,8% đến 17,8% hoặc 16,3% đến 17,3% nhóm disacarit NS. Phần còn lại ở chất trung gian thứ hai NS2S có thể bao gồm, hoặc gồm nhóm disacarit phụ không được cải biến NAc (0S) và/hoặc nhóm disacarit đã được 2-O-sulfat hóa, NAc (2S). Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa từ 90,1% đến 94,7% hoặc 90,6% đến 94,2% hoặc 91,1% đến 93,7% hoặc 91,6% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); và (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S. Tốt hơn, nếu việc xử lý bao gồm cả hai enzym C5-epi và 2OST.

Phương án khác có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S như được bộc lộ nêu trên. Phương pháp này có thể bao gồm các bước (a) chuyển hóa một

lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N ở chất trung gian thứ nhất NS); (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và/hoặc 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS₂S và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS₂S bằng enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3), với sự có mặt của chất cho sulfat, như phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ ba NS₂S₆S.

Việc chuyển hóa heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất và việc xử lý chất trung gian thứ nhất có thể được thực hiện như được bộc lộ nêu trên.

Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện với sự có mặt của hệ quay vòng PAPS, mà có thể bao gồm *p*-nitrophenylsulphat (PNPS) và PAPS. Hệ quay vòng PAPS có thể còn bao gồm chất xúc tác, như aryl sulfotransferaza IV (AST-IV), mà có thể được sử dụng để xúc tác bước chuyển hóa PAP thành PAPS bằng cách sử dụng PNPS làm chất cho sulphat với lượng vừa đủ PNPS trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ hai nhờ enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3). Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện không có hệ quay vòng PAPS nhưng với lượng vừa đủ PAPS trong phản ứng dựa trên mức chuyển hóa phân tử gam chất trung gian thứ hai nhờ enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3). Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện trong dung dịch đệm, như dung dịch đệm phản ứng axit 2-(N-morpholino)etansulfonic (MES) với sự có mặt của các enzym 6OST-1 và 6OST-3. Chất cho sulfat, như PAPS hoặc PAP cộng với PNPS, có thể có mặt. Dung dịch đệm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4, như khoảng 7,2. Việc xử lý có thể được thực hiện ở nhiệt độ cao thích hợp, như nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C hoặc 33°C đến 42°C hoặc 35°C đến 40°C. Tốt hơn là, các enzym mới, như 6OST-1 và/hoặc 6-OST-3, được sử dụng để xử lý. Các enzym có thể được cố định hoặc trong dung dịch. Sau bước xử lý, sản phẩm của việc xử lý chứa chất trung gian thứ ba có thể được tinh chế để loại bỏ các hợp chất sau phản ứng, như PAP, PAPS, PNPS và/hoặc PNP. Chất trung

gian thứ ba đã được tinh chế có thể được cô và gom để sử dụng tiếp, như phân tích và/hoặc tạo ra heparin sinh tổng hợp.

Theo một số phương án, nếu các đặc tính được mong muốn của disaccharit, như tỷ lệ phần trăm của NS2S6S và NS6S, không đạt được ở glycosaminoglycan thu được nhờ xử lý chất trung gian thứ hai NS, thì việc xử lý có thể được lặp lại để tạo ra glycosaminoglycan với các đặc tính của disaccharit, như các tỷ lệ phần trăm NS2S6S và NS6S được mong muốn đối với chất trung gian thứ ba.

Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S chứa 57,4% đến 62,0% trọng lượng nhóm disaccharit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa, đã được 6-O-sulfat hóa (NS2S6S), 17,7% đến 22,2% trọng lượng nhóm disaccharit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 6-O-sulfat hóa (NS6S), 8,4% đến 10,9% trọng lượng nhóm disaccharit đã được sulfat hóa ở vị trí N, đã được 2-O-sulfat hóa (NS2S), và 3,1% đến 8,1% trọng lượng nhóm disaccharit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể bao gồm, hoặc gồm một hoặc nhiều nhóm disaccharit OS, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba không chứa nhóm disaccharit 3S. Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa 84,7% đến 93,8% trọng lượng gốc N-acetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS; (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S; và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS2S bằng enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3), với sự có mặt của chất cho sulfat, như phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S chứa 30% đến 74% hoặc 31% đến 73% hoặc 36% đến 70% hoặc 40% đến 67% hoặc 40% đến 66% hoặc 42% đến 65% hoặc 44% đến 64% hoặc 42% đến 45% hoặc 48% đến 65% nhóm disaccharit NS2S6S, 5% đến 40% hoặc 5% đến 32% hoặc 5% đến

26% hoặc 5% đến 23% hoặc 5% đến 7% hoặc 8% đến 16% hoặc 18% đến 23% hoặc 6% đến 39% hoặc 6% đến 32% hoặc 6% đến 26% hoặc 6% đến 21% nhóm disacarit NS6S, 1% đến 28% hoặc 1% đến 27% hoặc 4% đến 28% hoặc 4% đến 27% hoặc 8% đến 28% hoặc 8% đến 27% hoặc 10% đến 28% hoặc 11% đến 28% hoặc 12% đến 27% hoặc 11% đến 22% hoặc 19% đến 27% nhóm disacarit NS2S; và 0,5% đến 23% hoặc 0,5% đến 20% hoặc 0,5% đến 19% hoặc 0,5% đến 18% hoặc 0,5% đến 17% hoặc 1% đến 21% hoặc 1% đến 19% hoặc 1% đến 18% hoặc 1% đến 17% hoặc 1% đến 15% nhóm disacarit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể bao gồm, hoặc gồm một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba không chứa nhóm disacarit 3S. Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian NS chứa 78% đến 99,5% hoặc 78% đến 99% hoặc 81% đến 97% hoặc 83% đến 95% hoặc 84% đến 94% hoặc 85% đến 93% hoặc 84% đến 87% hoặc 85% đến 86% hoặc 87,5% đến 94% hoặc 90% đến 93,5% hoặc 90,5% đến 93% hoặc 90,3% đến 91,3% hoặc 92,2% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 44% đến 80% hoặc 45% đến 79% hoặc 50% đến 78% hoặc 50% đến 77% hoặc 55% đến 78% hoặc 55% đến 76% hoặc 58% đến 77% hoặc 59% đến 76% hoặc 60% đến 75% hoặc 58% đến 62% hoặc 59% đến 61% hoặc 65% đến 77% nhóm disacarit NS2S và 12% đến 40% hoặc 13% đến 39% hoặc 15% đến 34% hoặc 15% đến 29% hoặc 16% đến 29% hoặc 16% đến 26% hoặc 17% đến 25% hoặc 16% đến 18% hoặc 19% đến 26% nhóm NS disacarit; và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS2S bằng enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3), với sự có mặt của chất cho sulfat, như phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S chứa 41,5% đến 45,5% hoặc 42% đến 45% hoặc 42,5% đến 44,5%

hoặc 43% đến 44% nhóm disacarit NS2S6S, 8,5% đến 12,5% hoặc 9% đến 12% hoặc 9,5% đến 11,5%, 10% đến 11% nhóm disacarit NS6S, 12% đến 15% hoặc 12,5% đến 14,5% hoặc 13% đến 14% nhóm disacarit NS2S và 14,6% đến 18,6% hoặc 15,1% đến 18,1% hoặc 15,6% đến 17,6% hoặc 16,1% đến 17,1% nhóm disacarit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể bao gồm, hoặc gồm một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba không chứa nhóm disacarit 3S. Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 83,4% đến 87,4% hoặc 83,9% đến 86,9% hoặc 84,4% đến 86,4% hoặc 84,9% đến 85,9% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 57,5% đến 62,5% hoặc 58% đến 62% hoặc 58,5% đến 61,5% hoặc 59% đến 61% hoặc 59,5% đến 60,5% nhóm disacarit NS2S và 23,2% đến 27,2% hoặc 23,7% đến 26,7% hoặc 24,2% đến 26,2% hoặc 24,7% đến 25,7% nhóm NS disacarit; và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS2S bằng enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3), với sự có mặt của chất cho sulfat, như phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S chứa 51,3% đến 60,3% hoặc 51,8% đến 59,8% hoặc 52,3% đến 59,3% hoặc 52,8% đến 58,8% nhóm disacarit NS2S6S, 8,6% đến 13,5% hoặc 9,1% đến 13% hoặc 9,6% đến 12,5% hoặc 10,1% đến 12% nhóm disacarit NS6S, 10% đến 15,8% hoặc 10,5% đến 15,3% hoặc 11% đến 14,8% hoặc 11,5% đến 14,3% nhóm disacarit NS2S và 7,4% đến 15,2% hoặc 7,9% đến 14,7% hoặc 8,4% đến 14,2% hoặc 8,9% đến 13,7% hoặc 8,9% đến 9,9% hoặc 11,7% đến 13,7% nhóm disacarit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể bao gồm, hoặc gồm một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc

(2S6S). Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba không chứa nhóm disacarit 3S. Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 88,8% đến 94,7% hoặc 89,3% đến 94,2% hoặc 89,8% đến 93,7% hoặc 90,3% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST) với sự có mặt của chất cho sulfat, như 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 65,8% đến 74,4% hoặc 66,3% đến 73,9% hoặc 66,8% đến 73,4% hoặc 67,3% đến 72,9% nhóm disacarit NS2S và 17,9% đến 26% hoặc 18,4% đến 25,5% hoặc 18,9% đến 25% hoặc 19,4% đến 24,5% nhóm NS disacarit; và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS2S bằng enzym, như các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3), với sự có mặt của chất cho sulfat, như phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S.

Theo một số phương án, phương pháp này có thể là phương pháp tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S chứa 41,5% đến 65,7% hoặc 42% đến 65,2% hoặc 42,5% đến 64,7% hoặc 43% đến 64,2% nhóm disacarit NS2S6S, 4,1% đến 23,3% hoặc 4,6% đến 22,8% hoặc 5,1% đến 22,3% hoặc 5,6% đến 21,8% nhóm disacarit NS6S, 10% đến 28,6% hoặc 10,5% đến 28,1% hoặc 11% đến 27,6% hoặc 11,5% đến 27,1% hoặc 11,1% đến 17,8% hoặc 19% đến 27,6% nhóm disacarit NS2S và 0,4% đến 15,9% hoặc 0,7% đến 15,4% hoặc 1% đến 14,9% hoặc 1% đến 14,4% hoặc 0,4% đến 5,5% hoặc 10,2% đến 14,9% nhóm disacarit NS. Phần còn lại của chất trung gian thứ ba NS2S6S có thể bao gồm, hoặc gồm một hoặc nhiều nhóm disacarit 0S, 2S, đã được 6-O-sulfat hóa, NAc (6S) đã được 2-O-sulfat hóa, 6-O-sulfat hóa, NAc (2S6S). Tốt hơn, nếu chất trung gian thứ ba không chứa nhóm disacarit 3S. Phương pháp này có thể bao gồm các bước: (a) chuyển hóa một lượng gốc N-axetyl glucosamin ở heparosan để tạo ra chất trung gian thứ nhất NS chứa 90,1% đến 94,7% hoặc 90,6% đến 94,2% hoặc 91,1% đến 93,7% hoặc 91,6% đến 93,2% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (lượng gốc N-axetyl glucosamin đã được chuyển hóa có thể tương ứng với lượng nhóm NS ở chất trung gian thứ nhất); (b) xử lý chất trung gian thứ nhất NS bằng

enzym, như C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), với sự có mặt của chất cho sulfat, 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), để tạo ra chất trung gian thứ hai NS2S chứa 65,8% đến 77,4% hoặc 66,3% đến 76,9% hoặc 66,8% đến 76,4% hoặc 67,3% đến 75,9% nhóm disacarit NS2S và 14,8% đến 26% hoặc 15,3% đến 25,5% hoặc 15,8% đến 25% hoặc 16,3% đến 24,5% nhóm NS disacarit; và (c) xử lý chất trung gian thứ hai NS2S bằng các 6-O-sulfotransferaza 1 và 3 (6OST-1,3) với sự có mặt của phosphoadenosyl phosphosulfat (PAPS) để tạo ra chất trung gian thứ ba NS2S6S.

Phương án khác có thể là phương pháp tạo ra heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin UPS, bao gồm việc xử lý chất trung gian thứ ba NS2S6S như được bộc lộ nêu trên bằng enzym, như dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1), khi có chất cho sulfat, như PAPS, chuyển hóa các nhóm 3-hydroxyl của gốc glucosamin thành gốc 3-O-sulfoglucosamin theo cách đó tạo ra heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin natri của lợn UPS.

Trong các phản ứng sulfotransferaza nêu trên với 2OST, 3OST-1, một hoặc cả hai 6OST-1 hoặc 6OST-3, các enzym có thể cần chất cho sulfat, mà thường là PAPS, và hệ thống phục hồi. Một hoặc nhiều enzym, như 2OST, 3OST-1, một hoặc cả hai 6OST-1 hoặc 6OST-3, và chất cho sulfat, như PAPS, có thể là trong dung dịch. Các enzym này có thể được cố định. Theo một số phương án, các phản ứng được thực hiện *in vitro*. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều bước xảy ra bên trong vi sinh vật chủ mã hóa gen cho một hoặc nhiều NDST, C5-Epi, 2OST, 3OST-1, một trong số 6OST-1 hoặc 6OST-3, và nguồn PAPS.

Mặc dù trên đây đã nêu các phương pháp có thể tạo ra heparin, mà là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, theo một số phương án, heparin tạo ra được có thể là chất mà không thỏa mãn một hoặc nhiều yêu cầu về tính tương đương sinh học với heparin USP của lợn.

Theo một số phương án, mẽ heparin tạo ra được có thể thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về phân tử lượng và hoạt tính chống đông, trong khi không thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về hoạt tính kháng IIa. Ví dụ, mẽ heparin tạo

ra được có thể thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về phân tử lượng và hoạt tính chống đông, trong khi có tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa (tức là kháng Xa/kháng IIa) thấp hơn 0,9, như trị số nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9 hoặc 0,6 đến 0,9 hoặc 0,7 đến 0,9, hoặc cao hơn 1,1, như trị số nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 hoặc 1,1 đến 1,4 hoặc 1,1 đến 1,3 hoặc 1,1 đến 1,2. Mẻ này có thể được chuyển hóa thành mẻ heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, nhờ xử lý thêm bằng enzym, như xử lý bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1), mà có thể được thực hiện với sự có mặt của chất cho sulfat, như PAPS.

Theo một số phương án, mẻ heparin tạo ra được có thể thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về hoạt tính chống đông, trong khi không thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về hoạt tính kháng IIa và phân tử lượng. Ví dụ, mẻ tạo ra được có thể có tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa (tức là kháng Xa/kháng IIa) thấp hơn 0,9, như trị số nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9 hoặc 0,6 đến 0,9 hoặc 0,7 đến 0,9, hoặc cao hơn 1,1, như trị số nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 hoặc 1,1 đến 1,4 hoặc 1,1 đến 1,3 hoặc 1,1 đến 1,2 và bằng cách áp dụng thêm việc xử lý bằng enzym, như xử lý bằng dạng đồng chức năng 1 của 3-O-sulfotransferaza (3OST-1), mà có thể được thực hiện với sự có mặt của chất cho sulfat, như PAPS, để tạo ra tỷ lệ giữa hoạt tính đối với yếu tố Xa so với yếu tố IIa, mà thỏa mãn các yêu cầu đối với heparin USP của lợn về hoạt tính kháng IIa.

Mặc dù heparin tạo ra được có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, theo một số phương án, heparin tạo ra được có thể là khác về mặt vật lý heparin tạo ra được trong tự nhiên, như heparin của bò hoặc lợn, mà vẫn là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn. Ví dụ, các phương pháp này có thể cho phép tạo ra các mẻ heparin, mà có thể là tương đương về mặt sinh học với heparin USP của lợn, sao cho các mẻ tạo ra được là đều hoặc đồng nhất hơn với nhau về một hoặc nhiều đặc tính bao gồm a) thành phần hóa học, b) phân tử lượng, như trọng lượng phân tử lượng trung bình, và c) phân bố phân tử lượng so với heparin tạo ra được trong tự nhiên các mẻ, như các mẻ heparin từ ruột của con bò.

Các phương pháp này có thể tạo ra các mẻ heparin nặng ít nhất là 50mg hoặc ít nhất

là 80mg hoặc ít nhất 100mg hoặc ít nhất 200mg hoặc ít nhất 1 g hoặc ít nhất 2g.

Các mẻ tạo ra được có thể là đồng đều với nhau về phân tử lượng, thành phần disacarit và hoạt tính sinh học. Các mẻ tạo ra được theo quy mô nêu trên có thể thỏa mãn tất cả các yêu cầu đối với heparin USP của lợn, như phân tử lượng, thành phần disacarit và các yêu cầu về hoạt tính sinh học. Lượng các mẻ đồng đều có thể ít nhất là 2 hoặc ít nhất là 3 hoặc ít nhất là 5 hoặc ít nhất là 7 hoặc ít nhất là 10 hoặc ít nhất là 12 hoặc ít nhất là 15 hoặc ít nhất là 20.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được bằng cách áp dụng các phương pháp nêu trên. Dược phẩm này có thể còn chứa một hoặc nhiều chất mang được dụng hoặc tá dược. Theo một số phương án, heparin có thể, ví dụ, được bào chế trong nước hoặc trong nước muối đẳng trương hoặc glucoza. Theo một số phương án, dược phẩm heparin có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, như bisulfit hoặc chất diệt vi khuẩn, như rượu benzylic.

Theo một số phương án, heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được theo bản mô tả này có thể được dùng ở dạng muối được dụng, mà có thể, ví dụ, là muối natri hoặc muối của kali. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các muối được dụng bao gồm lithi, natri, canxi, bari, kali, magie, và amoni.

Theo một số phương án, heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được theo nội dung bộc lộ nêu trên có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để điều chế heparin phân tử lượng thấp. Việc này có thể được thực hiện, ví dụ, đơn giản bằng cách thay thế heparin từ ruột lợn bằng heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được theo bản mô tả này và sau đó bằng cách áp dụng một trong số các phương pháp đã biết cho quy trình tổng hợp heparin phân tử lượng thấp. Theo một phương án, muối, như ví dụ, muối natri hoặc muối của kali, của heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được theo bản mô tả này có thể được chuyển hóa thành muối benzthoni mà tiếp đó có thể được benzyl hóa và xử lý bằng bazơ, như natri hydroxit hoặc kali hydroxit, để giải trùng hợp một phần. Sản phẩm heparin phân tử lượng thấp tạo ra được sẽ được chuyển hóa thành muối, như muối natri hoặc muối của kali, và tinh chế. Quy trình này có thể tạo ra heparin phân tử lượng thấp, là enoxaparin.

Các quy trình khác có thể được áp dụng để chuyển hóa heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được theo bản mô tả này thành các heparin khác phân tử lượng thấp, ví dụ, daltaparin hoặc tinzaparin.

Bản mô tả này còn bao gồm phương pháp làm loãng máu ở đối tượng, như người, chứa tạo ra heparin tương đương về mặt sinh học bằng cách áp dụng một trong số các phương pháp đã nêu trên và dùng lượng hữu hiệu của heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được cho đối tượng.

Bản mô tả này còn bao gồm phương pháp điều trị và/hoặc phòng bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, mà nhạy cảm đối với heparin, bao gồm việc tạo ra heparin tương đương về mặt sinh học bằng cách áp dụng một trong số các phương pháp đã nêu trên và dùng lượng hữu hiệu của heparin tương đương về mặt sinh học tạo ra được cho đối tượng, như người. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về bệnh hoặc tình trạng bệnh lý bao gồm tĩnh mạch sâu, chứng huyết khối, nghẽn mạch phổi và bệnh huyết khối tắc động mạch.

Heparin tương đương về mặt sinh học còn có thể được dùng trong việc điều trị ngoài thân kể cả thẩm tách thận cho các bệnh nhân bị suy thận hoặc nạp oxy vào máu cho các bệnh nhân trải qua thủ thuật nối tắt tim phổi trong phẫu thuật tim mở.

Lượng hữu hiệu của heparin tương đương về mặt sinh học có thể là lượng mà có thể là đủ để tạo ra tác dụng mong muốn, như pha loãng máu hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, mà nhạy cảm đối với heparin.

Liều lượng heparin tương đương về mặt sinh học có thể chính là liều được áp dụng cho heparin UPS, mà được tạo ra trong tự nhiên, như heparin của lợn hoặc bò.

Heparin tương đương về mặt sinh học có thể được dùng theo nhiều cách dùng. Theo một số phương án, heparin tương đương về mặt sinh học có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, heparin tương đương về mặt sinh học có thể được tiêm qua đường tĩnh mạch, dưới da hoặc tiêm bắp.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa chất trung gian thứ nhất NS như được bộc lộ nêu trên. Chế phẩm này có thể bao gồm ít nhất là 50% hoặc ít nhất là 60% hoặc ít nhất là 70% hoặc ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% hoặc ít nhất là 96% hoặc ít nhất là 97% hoặc ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% hoặc ít nhất là 99,5% chất trung gian thứ nhất NS. Chế phẩm này có thể không chứa hoặc hầu như không chứa bất kỳ polysacarit nào ngoài chất trung gian thứ nhất NS. Thuật ngữ “hầu như không chứa” có thể có nghĩa là không phát hiện được polysacarit bất kỳ nào khác với lượng đo được. Các phương pháp phát hiện có thể bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) hoặc việc xử lý bằng ba heparin lyaza phá vỡ heparin hoặc chất trung gian của heparin thành các disacarit mà có thể được loại bỏ theo cách thẩm tách hoặc sắc ký loại trừ theo cỡ. Các chất không là heparin hoặc các chất trung gian không là heparin khác sẽ kháng việc xử lý bằng heparin lyaza và có thể tìm lại và phát hiện được bằng cách áp dụng các phương pháp thông thường, như phổ NMR.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa chất trung gian thứ hai NS2S như được bộc lộ nêu trên. Chế phẩm có thể chứa ít nhất là 50% hoặc ít nhất là 60% hoặc ít nhất là 70% hoặc ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% hoặc ít nhất là 96% hoặc ít nhất là 97% hoặc ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% hoặc ít nhất là 99,5% chất trung gian thứ hai NS2S. Kit hoặc chế phẩm này có thể không chứa hoặc hầu như không chứa bất kỳ polysacarit nào ngoài chất trung gian thứ hai NS2S.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa chất trung gian thứ ba NS2S6S như được bộc lộ nêu trên. Kit hoặc chế phẩm này có thể chứa ít nhất là 50% hoặc ít nhất là 60% hoặc ít nhất là 70% hoặc ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% hoặc ít nhất là 96% hoặc ít nhất là 97% hoặc ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% hoặc ít nhất là 99,5% chất trung gian thứ ba NS2S6S. Kit này hoặc chế phẩm có thể không chứa hoặc hầu như không chứa bất kỳ polysacarit nào ngoài chất trung gian thứ ba NS2S6S. Ví dụ, theo một số phương án, kit này hoặc chế phẩm này có thể không chứa hoặc hầu như không chứa heparin.

Các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này được minh họa tiếp, mặc dù không bị giới hạn theo bất kỳ khía cạnh nào, ở các Ví dụ, thực hiện sáng chế dưới đây.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra heparosan

Escherichia coli K5 (Seroovar O10:K5:H4; ATCC #23506) hoặc *Escherichia coli* Nissle 1917 (Seroovar O6:K5:H1) được sử dụng để tạo ra heparosan (Cress, B. F., Toparlak, O. D., Guleria, S., Lebovich, M., Stieglitz, J. T., Englaender, J. A., Jones, J. A., Linhardt, R. J., and Koffas, M. A. G. (2015) CRISPathBrick: Modular Combinatorial Assembly of Type II-A CRISPR Arrays for dCas9-Mediated Multiplex Transcriptional Repression in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*. **4**, 987–1000; Wang, Z., Ly, M., Zhang, F., Zhong, W., Suen, A., Hickey, A. M., Dordick, J. S., and Linhardt, R. J. (2010) *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor. *Biotechnology and Bioengineering*. **107**, 964–973; Wang, Z., Dordick, J. S., và Linhardt, R. J. (2011) *Escherichia coli* K5 heparosan fermentation and improvement by genetic engineering. *Bioengineered bugs*. **2**, 63–67). Việc lên men mẻ nạp ở mật độ tế bào cao được thực hiện ở mức 5 lit hoặc 45 lit đến 90 lit bằng cách sử dụng lần lượt thùng lên men Eppendorf BioFlo 320 hoặc Biostat. Các tế bào sinh trưởng trong môi trường xác định glucoza (độ pH = 6,8±0,01), chứa glucoza (thông thường 20g/l), kali phosphat monobazo (thông thường 13,5g/l), amoni phosphat (thông thường 4,0g/l), magie sulfat heptahydrat (thông thường 1,4g/l), axit xitric (thông thường 1,7g/l), và dung dịch chứa vết kim loại (thông thường 10,0ml/l). Dung dịch chứa vết kim loại trong dung dịch HCl 5M (1,5 lit) được cấu thành bởi FeSO₄·7H₂O (15g), CaCl₂ (3,0g), ZnSO₄·7H₂O (3,3g), MnSO₄·H₂O (568mg), CuSO₄·5H₂O (1,5g), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0,15g), và Na₂B₄O₇·10H₂O (0,03g). Bình thót cổ đưng giống (giống I), chứa môi trường xác định glucoza (độ pH = 6,8±0,01) được ủ nguyên liệu gốc glyxerol và ủ trong khoảng thời gian từ 8 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ 37°C trên máy lắc quay với tốc độ từ 200 đến 250 vòng/phút. Tiếp theo, bình thót cổ đưng giống (giống II), chứa môi trường xác định glucoza (độ pH = 6,8±0,01) được ủ ở mật độ

gieo mầm 10% từ giống I và ủ trong khoảng thời gian từ 8 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ 37°C trên máy lắc quay với tốc độ 200 đến 250 vòng/phút. Tiếp theo, các tế bào từ giống II được ủ ở mật độ gieo mầm nằm trong khoảng từ 5% đến 10% trong thùng lên men chứa môi trường xác định glucoza đã được tiệt trùng (độ pH = $6,8 \pm 0,01$). Tế bào được cho sinh trưởng ở 30% oxy hòa tan, 37°C và độ pH được duy trì ở mức $6,8 \pm 0,01$ bằng cách sử dụng 2N HCl/5M NH₄OH. Nồng độ oxy hòa tan, độ pH và mức sinh trưởng của tế bào (đo được theo mật độ quang học, OD_{600nm}) được theo dõi trong toàn bộ quá trình lên men. Các tế bào được nạp theo bậc mũ và tốc độ nạp được kiểm soát để duy trì mức nồng độ glucoza và oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy, với dịch nạp cô đặc đã được tiệt trùng chứa glucoza (700g/l), có bổ sung kali phosphat monobazơ (47g/l) magie sulfat heptahydrat (20g/l), thiamin (0,4g/l) và dung dịch chứa vết kim loại (20ml/l). Quá trình lên men được dừng khi OD₆₀₀ đạt đến khoảng 135 đến 200 (thông thường 140). Dịch nổi (chứa heparosan) được thu gom ở nhiệt độ 4°C bằng cách ly tâm. Quy trình tinh chế heparosan từ dịch nổi nuôi cấy bao gồm bước tẩy trắng bằng natri hypoclorit với 1,2 (% trọng lượng) và bước làm kết tủa bằng amoni sulfat thường ở mức bão hòa 60%. Chất kết tủa được hòa tan trong nước và được thẩm tách để thu được heparosan (Bhaskar, U. *Chemoenzymatic Synthesis Heparin for a Safer Bioengineered Alternative*. Luận án tiến sĩ, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA (2014)).

Ví dụ 2: Tạo ra chất trung gian #1 (NS).

Heparosan thu được từ ví dụ 1 được khử axetyl tại vị trí N theo cách hóa học và được giải trùng hợp như đã thông báo trước đây (Z. Wang, J. Li, S. Cheong, U. Bhaskar, A. Onishi, F. Zhang, J. S. Dordick, R. J. Linhardt (2011), *Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin*, *Journal of Biotechnology*, 156, 188-196). Heparosan ở nồng độ 1% được cho phản ứng với dung dịch natri hydroxit 1M ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 55°C trong khoảng thời gian từ 18 giờ đến 28 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được điều chỉnh đến độ pH=7 bằng HCl, tiếp theo là 48 giờ N-sulfon hóa theo cách hóa học bằng lượng dư phức lưu huỳnh trioxit trimetylamin. Sau đó, áp dụng cách làm kết tủa bằng etanol để phân đoạn chất trung

gian thứ nhất NS với tính chất phân tử lượng mong muốn (A. Onishi (2015), *Detailed physicochemical and biological analyses of heparins from various sources*, Luận án tiến sỹ, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA). Hàm lượng của nhóm NS đisacarit của chất trung gian thứ nhất NS nằm trong khoảng từ 78,3% mol đến 99,3% mol. Phân tử lượng nằm trong khoảng từ 15.100Da đến 18.100Da, tỷ lệ phần trăm của các mạch heparin polysacarit với phân tử lượng cao hơn 24.000 nằm trong khoảng từ 7,0 đến 17,4; tỷ lệ phần trăm của các mạch với phân tử lượng nằm trong khoảng từ 16.000Da đến 24.000Da nằm trong khoảng từ 1,1 đến 2,3.

Ví dụ 3: Phân tích đisacarit, và phân tích phân tử lượng, và phân tích hoạt tính

Tổng phân tích đisacarit

Phân tích đisacarit được áp dụng để đo thành phần đisacarit của heparin USP của lợn hoặc các chất trung gian heparin đã được xử lý về mặt sinh học. Mẫu được phân giải thành tám đisacarit cấu thành nhờ xử lý bằng heparinaza I, II và III. Tiếp đó, các đisacarit tạo ra được tách và được đo theo phổ sắc ký lỏng-cực tím cao áp (HPLC-UV). Đối với NS (chất trung gian thứ nhất), phổ ^1H -cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) cũng có thể được dùng để định lượng hai đisacarit cấu thành (tức là OS và NS). Trong khi thành phần đisacarit theo sáng chế được bộc lộ theo %mol, trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết còn có thể được mô tả theo % diện tích dưới đường cong (AUC), như % trọng lượng, hoặc theo thuật ngữ khác đã biết trong phạm vi của sáng chế.

Cần lưu ý rằng theo sáng chế, AUC% đisacarit bằng % mol đisacarit với giả thiết rằng tất cả tám đisacarit có cùng hệ số dập tắt phân tử gam ở 232nm, mà được tin là giả thiết thích hợp vì một vài lý do. Trước hết, đã biết rõ rằng mỗi đisacarit trong số tám đisacarit này có đúng một axit uronic không no Δ -4-5 (Δ UA) trong cấu trúc. Thứ hai, một tài liệu gần đây về phân tích đisacarit ở heparin chỉ ra rằng định lượng đisacarit được dựa trên giả thiết phù hợp với dữ liệu rằng hệ số dập tắt phân tử gam ở 232nm đối với các oligosacarit không no Δ -4-5 là không đổi” (P. Mourier *et al.* *Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange*

chromatography. Anal. Chem. Res. 3, 46-53 (2015)). Thứ ba, hệ số dập tắt phân tử gam ở 232nm là ổn định ở năm oligosaccharit khác nhau có nguồn gốc từ heparin (5063 $\pm$ 10%, 5331 $\pm$ 0,6%, 5066 $\pm$ 3,7%, 5657 $\pm$ 1,4% và 5275 $\pm$ %, $M^{-1}cm^{-1}$) (K.G. Rice and R.J. Linhardt. *Study of structurally defined oligosaccharide substrates of heparin and heparan monosulfate lyases. Carbohydr. Res.* 190, 219-233 (1989)). Cuối cùng, giả thiết về cơ bản là đồng nhất được áp dụng trên thực tế ở heparin USP của lợn hiện nay; phương pháp phân tích heparin USP của lợn giả thiết rằng tất cả tám disacarit này có cùng hệ số dập tắt phân tử gam ở bước sóng rất gần 234nm (USP40 Chemical Tests, <207> *Test for 1,6-Anhydro Derivative for Enoxaparin Sodium*, pp 261-266. (United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, 2017)). Theo 1H -NMR, % AU tương đối là tương đương với % mol.

Phân tích các chất trung gian theo 1H -NMR

$1D$ 1H -NMR được thực hiện ở các điều kiện sau: nhiệt độ 298 K, thời gian trễ quay vòng ít nhất 2-giây, thời gian đạt được ít nhất 0,75 giây, số lần quét ít nhất 16, dung môi là D_2O . Phổ $1D$ 1H -NMR của heparosan đã được tinh chế, từng chất trung gian, heparin sinh tổng hợp và heparin USP của lợn được thể hiện như Hình 3. Với bốn bước cải biến hóa enzym từ tiền chất heparosan thành thành phẩm, heparin sinh tổng hợp tạo ra được có công thức hóa học rất giống heparin USP của lợn.

Về phân tích disacarit đối với chất trung gian thứ nhất theo 1H -NMR, diện tích pic của H-1 proton của gốc glucosamin được sử dụng để định lượng. H-1 proton của N-acetyl glucosamin (disacarit OS) xuất hiện ở khoảng 5,31ppm trong khi H-1 proton của N-sulfo glucosamin (disacarit NS) xuất hiện ở khoảng 5,55ppm. Thành phần disacarit được thể hiện theo %mol; %AUC là tương đương với %mol.

Phân tích disacarit theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC)-UV

Một cách vắn tắt, mẫu phân tích được phân giải bằng heparinaza, và sau đó các disacarit tạo ra được tách và được đo theo trao đổi anion mạnh (SAX)-HPLC-UV.

Các điều kiện phân tích điển hình là như dưới đây; cần lưu ý rằng các thay đổi không đáng kể không thiết yếu mà không tác động đến thành phần disacarit, như việc tăng/giảm tuyến tính quy mô của phản ứng phân giải bằng heparinaza, thay đổi nhiệt độ của cột SAX đến 50°C, có thể được áp dụng.

Mẫu phân tích (100µg) được trộn với dung dịch phân giải đặc (nồng độ cuối cùng là 50mM NH₄OAc, 2mM CaCl₂), heparinaza I, II, và III từ *Flavobacterium heparinum* (mỗi heparinaza > 100mIU, điều chế được ở phòng thí nghiệm của các tác giả sáng chế như được bộc lộ trong tài liệu (Zhang, F., *et al. Structural characterization of heparins from different commercial sources. Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 2793-2803 (2011)., Zhang Z, X.J., Liu H, Liu J, Linhardt RJ. *Quantification of Heparan Sulfate Disaccharides Using Ion-Pairing Reversed-Phase Microflow High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Trap Mass Spectrometry. Anal. Chem.* **81**, 4349-4355 (2009)), và nước sao cho tổng thể tích là 200µl. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi ủ, các disacarit tạo ra được tách ra khỏi heparinaza bằng cách áp dụng (a) siêu lọc bằng cột xoáy ngưỡng phân tử lượng 3kDa (bộ lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5 với màng Ultracel-3, do EMD Millipore, Billerica, MA, Mỹ cung cấp), hoặc, (b) ủ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian ít nhất là 5 phút, tiếp theo ly tâm. Nghiên cứu so sánh trực tiếp bằng cách sử dụng chất trung gian thứ hai NS2S, chất trung gian thứ ba NS2S6S và heparin USP, cho thấy rằng khác biệt giữa (a) và (b) cao nhất là 2,6% trọng lượng. 20µl disacarit tạo ra được được nạp vào cột sắc ký SAX (cột sắc ký Spherisorb-SAX, 4,0 × 250mm, 5µm, do Waters, Pháp cung cấp). Nhiệt độ của cột là 40°C. Pha động A là 1,8mM NaH₂PO₄ được điều chỉnh đến độ pH = 3,0 nhờ axit phosphoric và pha động B là 1,8mM NaH₂PO₄ được điều chỉnh đến độ pH=3,0 nhờ NaClO₄ 1M. Gradient tuyến tính của pha động B (0 phút, 3% B; 20 phút, 35% B; 50 phút, 100% B; 60 phút, 3% B, 80 phút, 3% B) được áp dụng với lưu tốc = 0,45ml/phút. Việc dò bằng tia cực tím được thực hiện ở 232nm vì axit uronic không no (ΔUA) của từng disacarit có mức hấp thụ cực tím (UV) ở bước sóng này. Các chuẩn disacarit đều được mua từ Iduron (Manchester, UK) để xác định các pic của từng disacarit ở 232nm. Để đảm bảo phân tích đúng và chính xác, thành phần có được tính heparin natri thương phẩm (do Celsus, Cincinnati, OH, Mỹ cung cấp) cũng được phân giải và phân tích

trong từng phân tích. Để đảm bảo tính tuyến tính của diện tích pic theo sắc ký lỏng cao áp, một loạt dịch pha loãng của các chuẩn disacarit được phân tích trong từng phân tích.

Thành phần disacarit được thể hiện theo % trọng lượng và/hoặc % mol. Trị số % trọng lượng được tính trên cơ sở đường cong chuẩn theo một loạt chuẩn thương mại. Trị số % mol được tính theo công thức sau:

$$\text{Disacarit } i \text{ mol } \% = (100 \times A_i) / (\sum x A_x),$$

trong đó A_i là diện tích pic ở 232nm của disacarit i . A_x là diện tích pic; tổng liên quan đến tất cả tám disacarit xuất hiện trong phần Định nghĩa của bản mô tả này. Một lần nữa, theo sáng chế, %AUC của disacarit bằng %mol của disacarit với giả thiết rằng tất cả 8 disacarit có cùng hệ số dập tắt phân tử gam ở 232nm.

Phân tích disacarit theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp-phổ khối (HPLC-MS)

Phân tích này được thực hiện như được bộc lộ trong tài liệu (Bhaskar, U. *Chemoenzymatic Synthesis Heparin for a Safer Bioengineered Alternative*. Luận án Tiến sỹ, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY (2014).

Một cách chi tiết, 10µg mẫu phân tích trong 25µl nước được trộn với heparinaza I, II, và III từ *Flavobacterium heparinum* (mỗi heparinaza > 10mIU) trong 5µl dung dịch đậm đặc (25mM Tris, 500mM NaCl, 300mM imidazol, độ pH=7,4). Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 10 giờ. Sau khi ủ, các disacarit tạo ra được thu hồi bằng cách lọc ly tâm với cột xoáy ngưỡng phân tử lượng 10kDa (YM-10 thiết bị cô cỡ micro, do EMD Millipore, Billerica, MA, Mỹ cung cấp). Phần chảy qua được hòa tan trong nước đến nồng độ nằm trong khoảng từ 50ng đến 100ng/2µl để phân tích sắc ký lỏng (LC)-đo phổ khối (MS).

Phân tích LC-MS được thực hiện trên dụng cụ Agilent 1200 LC/MSD (Agilent Technologies, Inc. Wilmington, DE, Mỹ) có lắp bẫy ion 6300 và bơm nhị phân tiếp theo bộ dò UV. Cột được dùng là cột C18 Poroshell 120 (2,1 × 100mm, 2,7µm, do Agilent, Mỹ cung cấp). Dung môi rửa giải A là nước/axetonitril theo tỷ lệ thể tích (85:15), và dung môi rửa giải B là nước/axetonitril theo tỷ lệ thể tích (35:65). Cả hai dịch rửa giải đều chứa 12mM tributylamin và 38mM amoni axetat với độ pH được điều chỉnh đến 6,5 bằng axit

axetic. Gradient của dung dịch A trong thời gian 5 phút tiếp theo gradient tuyến tính từ 5 phút đến 15 phút (0% đến 40% dung dịch B) được áp dụng với lưu tốc 150µl/phút.

Xác định phân tử lượng và nồng độ

Phân tử lượng được xác định thông qua sắc ký thẩm gel (GPC), theo phương pháp của chuyên khảo USP 37 Heparin, với các thay đổi không đáng kể không quan trọng. Cột bảo vệ TSK SWXL 6mm x 4cm, đường thủy tinh 7µm được sử dụng liên tiếp nhau với hai cột phân tích: TSK G4000 SWXL 7,8mm x 30cm, 8µm liên tiếp nhau với TSK G3000 SWXL 7,8mm x 30cm, 5µm (do Tosoh Corporation, Minato-Ku, Tokyo, Nhật bản cung cấp). Các cột này được liên kết với hệ thống sắc ký lỏng cao áp bao gồm bơm Shimadzu LC-20AD, bộ điều chỉnh Shimadzu CBM-20A, bộ phận lấy mẫu tự động Shimadzu SIL-20AHT, lò kiểu cột Shimadzu CTO-20AC, và bộ dò chỉ số khúc xạ Shimadzu RID-20A (do Shimadzu, Kyoto, Nhật bản cung cấp). Các cột và bộ dò RID được duy trì ở nhiệt độ 30°C. Pha động là amoni axetat 0,1M với 0,02% trọng lượng natri azit và lưu tốc là 0,6ml/phút. Thể tích nạp mẫu là 20µl. Sắc phổ GPC được ghi nhận với phần mềm LC Solution phiên bản 5.73 (do Shimadzu, Kyoto, Nhật bản cung cấp), và phân tích theo chức năng “GPC Postrun” của nó. Để xác định phân tử lượng, bộ định cỡ phân tử lượng của heparin natri USP RS (chuẩn tham chiếu) được dùng làm bộ định cỡ và bộ xác định heparin natri USP RS (USP, MD, US) được sử dụng để xác nhận tính thích hợp hệ thống. Ngoài ra, bộ xác định heparin natri USP RS chuẩn bị được theo một số nồng độ được nạp để nhận được đường cong chuẩn để tính nồng độ của các mẫu phản ứng bằng cách sử dụng diện tích dưới đường cong (AUC). Tất cả dữ liệu đều thỏa mãn các yêu cầu về tính phù hợp hệ thống như nêu trong chuyên khảo USP. Để tính toán, phương trình đa thức bậc ba được áp dụng. Định nghĩa về các thông số phân tử lượng được nêu dưới đây.

Phân tử lượng trung bình theo trọng lượng (MW) được tính theo công thức

$$M_W = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i},$$

trong đó N_i là số phân tử có phân tử lượng M_i . M24000 là tỷ lệ phần trăm của mạch

heparin với phân tử lượng cao hơn 24.000Da. M8000 đến 16000/ M16000 đến 24000 là tỷ lệ giữa tỷ lệ phần trăm của heparin với phân tử lượng trong khoảng từ 8.000Da đến 16.000Da, so với tỷ lệ phần trăm của heparin với phân tử lượng trong khoảng từ 16.000Da đến 24.000Da.

Đo hoạt tính chống đông *in vitro*

Hoạt tính kháng Xa và kháng IIa của heparin được xác định bằng cách sử dụng kit BIOPHEN Heparin kháng Xa (hai giai đoạn) và Kháng IIa (hai giai đoạn) (do Aniaya, West Chester, Ohio cung cấp). ATIII của người 40mU trong 80 μ l dung dịch đệm R1 (Tris 0,05M, NaCl 0,175M, EDTA 0,0075M, ở độ pH 8,40 chứa polyetylen glycol ở nồng độ 0,1% trọng lượng, và 0,02% trọng lượng natri azit làm chất bảo quản) được sử dụng cho thử nghiệm kháng Xa. ATIII của người 10mU trong 80 μ l dung dịch đệm R2 (Tris 0,05M, NaCl 0,175M, EDTA 0,0075M, ở độ pH 8,40 chứa albumin huyết thanh bò ở nồng độ 0,2% trọng lượng, và 0,02% trọng lượng natri azit làm chất bảo quản) đã được trộn với lượng khác nhau của heparin (nằm trong khoảng từ 0ng, 5ng, 10ng, 15ng, và 20ng) được ủ trong thời gian 2 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, yếu tố Xa của bò đã được tinh chế (320ng trong 40 μ l dung dịch đệm R1) hoặc trombin của người đã được tinh chế (960mU trong 40 μ l trong dung dịch đệm R2) được ủ sơ bộ ở nhiệt độ 37°C được bổ sung vào và ủ trong thời gian 2 phút trước khi bổ sung nền tạo sắc tố đặc hiệu với yếu tố Xa (CS-01(65), 1,2mM, 40 μ l) hoặc nền tạo sắc tố đặc hiệu với trombin (CS-01(38), 1,25mM, 40 μ l). Hỗn hợp phản ứng này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 phút đối với thử nghiệm kháng Xa và 1 phút đối với thử nghiệm kháng IIa và sau đó được dừng bằng axit xitric (20mg/ml, 80 μ l). Mức hấp thụ được đo ở 405nm. hoạt tính kháng Xa và kháng IIa được tính bằng cách sử dụng đường cong chuẩn của nồng độ khác nhau của heparin (0 đến 1U/ml).

Ví dụ 4: Tạo ra các enzym (C5-epimeraza, 2OST, 6OST-1, 6OST-3, 3OST-1, AST-IV)

Viên tế bào (10g trọng lượng ướt) chứa các enzym đã được gắn nhãn bằng dấu MBP (C5 epi, 2OST, 6OST-1, và 6OST-3) được phân tán trong 50ml dung dịch đệm tinh chế (25mM Tris-HCl (do BioRad, Mỹ cung cấp), 500mM NaCl (do Sigma, Mỹ cung cấp), độ pH=7,5) chứa chất ức chế proteaza (do Sigma, Mỹ cung cấp) và 8000kU/L ADNaza I

(do Sigma, Mỹ cung cấp). Huyền phù tế bào thu được được cho qua thiết bị dẫn vi lưu (Microfluidics LM20, Mỹ) ở 15000psi để phân giải tế bào. Mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 13000g trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Enzym hòa tan được tinh chế bằng cách sử dụng 10ml nhựa amyloza (do NEB, Mỹ cung cấp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Viên tế bào (10g trọng lượng ướt) chứa các enzym đã được gắn nhãn bằng dấu His6 (3OST-1 và AST-IV) được phân tán trong 50ml dung dịch đệm tinh chế (25mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 30mM Imidazol, độ pH=7,5) chứa chất ức chế proteaza và 8000kU/L ADNza I. Việc phân giải tế bào được thực hiện như đã được bộc lộ trước đây và enzym hòa tan được tinh chế bằng cách sử dụng 10ml Ni-NTA Sepharosa (do GE Healthcare, Thụy điển cung cấp) theo quy trình của nhà sản xuất. Các enzym đã được tinh chế được phân tích theo phân tích gel SDS-PAGE (do BioRad, Mỹ cung cấp).

Ví dụ 5: Điều chế và xác định hoạt tính của các chất xúc tác enzym đã được cô định.

Các enzym đã được gắn nhãn bằng dấu His6 (3OST-1 và AST-IV) được rửa giải bằng 25mM Tris-HCl (độ pH=7,5) dung dịch đệm chứa 500mM NaCl và 500mM imidazol từ hạt sepharosa Ni-NTA và các enzym đã được gắn nhãn bằng dấu MBP (C5 epi, 2OST, 6OST-1, và 6OST-3) được rửa giải khỏi nhựa amyloza bằng dung dịch đệm Tris-HCl 25mM (độ pH=7,5) chứa 500mM NaCl và 40mM maltoza. Dung dịch đệm của các enzym đã được rửa giải ra được thể bằng dung dịch đệm ngẫu hợp (dung dịch đệm natri phosphat (do Alfa Aesar cung cấp, Mỹ), 100mM; NaCl, 150mM; độ pH=7,5) bằng cách sử dụng béc lọc ly tâm 10kDa (do Millipore, Mỹ cung cấp). Để cố định cộng hóa trị các enzym, 30mg đến 40mg hạt thương mại, ví dụ, CNBr Sepharosa (do GE Healthcare, Thụy điển cung cấp), Ultralink Biosupport dựa trên Azlacton (do ThermoFisher, Mỹ cung cấp) và NHS-agarosa (do Thermo Fisher, Mỹ cung cấp) được ủ với 1mg đến 2mg enzym riêng lẻ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng có bung nhẹ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Sau khi cố định cộng hóa trị, hạt tương ứng được rửa bằng dung dịch đệm ngẫu hợp và các nhóm chức còn lại trên hạt được tiêu bằng cách sử dụng dung dịch đệm tiêu (100mM Tris-HCl và 1M NaCl ở độ pH 8,0) (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Hiệu quả ngẫu hợp của

các enzym trên hạt tương ứng được tính bằng cách đo enzym được bổ sung vào ban đầu và enzym không liên kết trong dịch nổi, nước rửa và dung dịch tôi. Lượng enzym được tính bằng cách áp dụng phân tích gel SDS-PAGE theo phần mềm ImageLab (do BioRad, Mỹ cung cấp) và thử nghiệm BCA (do Thermo Fisher, Mỹ cung cấp). Albumin huyết thanh bò (BSA) (do ThermoFisher, Mỹ cung cấp) được dùng làm chuẩn để tính hiệu quả ngẫu hợp.

Ví dụ 6: Tạo ra chất trung gian #2 (NS2S)

Bước sulfat hóa này có thể được thực hiện có hoặc không có hệ quay vòng PAPS chứa PNPS, PAPS và AST-IV đã được cố định. Chất trung gian thứ nhất NS được xử lý bằng 2OST và C5-epi đã được cố định. Các điều kiện chi tiết của phản ứng enzym là như sau trong dung dịch đệm phản ứng MES (50mM, độ pH=7,2): 1mg/ml NS, 0,25mg/ml C5 epi, 0,5mg/ml 2OST, 10mM *p*-nitrophenylsulfat (PNPS) và 1mM PAP (chỉ nếu hệ quay vòng được áp dụng), nhiệt độ phản ứng ở nhiệt độ 37°C và thời gian phản ứng 24 giờ. Đối với các phản ứng không quay vòng, cùng các điều kiện như nêu trên được áp dụng trừ khi không có PAP, PNPS và AST-IV, 1,2mM lượng dư nồng độ PAPS tùy thuộc vào tỷ lệ chuyển hóa NS2S đích. Enzym tươi mới được điều chế và được cố định trước phản ứng như được bộc lộ trong các ví dụ, 4 và 5. Để tinh chế, bước siêu lọc qua màng MWCO cỡ 5kDa được áp dụng để loại bỏ các hợp chất sau phản ứng như PAP và PAPS (cùng với PNP và PNPS nếu bước quay vòng được áp dụng). Các dịch còn lại được cô và gom cho phân tích disacarit. Bước này có thể được lặp lại nếu NS2S% không đạt đến đích.

Ví dụ 7: Tạo ra chất trung gian #3 (NS2S6S và NS6S)

Bước phản ứng để tạo ra chất trung gian #3 được thực hiện theo phương pháp được áp dụng cho chất trung gian #2 trừ NS2S thay thế cho NS và đã được cố định 6OST-1 và 6OST-3 (cả hai đều ở nhiệt độ 0,5mg/ml) thay thế cho C5-epi và 2OST. Phản ứng này có thể được lặp lại nếu NS2S6S (TriS)% không đạt đến đích.

Ví dụ 8: Tạo ra heparin sinh tổng hợp

Enzym 3OST-1 tái tổ hợp đã được cố định được điều chế theo cùng một cách như

đã nêu ở ví dụ 5. Các phản ứng được thực hiện trong cùng các điều kiện như được sử dụng cho các chất trung gian thứ hai và thứ ba trừ các enzym được thế bằng 3OST-1 đã được cố định. Heparin sinh tổng hợp cuối cùng được tinh chế bằng cách áp dụng sắc ký trao đổi anion mạnh (strong anion exchange - SAX) với nhựa Q Sepharose. Một cách vắn tắt, heparin sinh tổng hợp được liên kết với nhựa trong dung dịch NaCl 40mM, tiếp theo rửa bằng dung dịch NaCl 400mM. Heparin sinh tổng hợp đã được tinh chế được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch NaCl 4M, tiếp theo là loại muối và cô. Heparin sinh tổng hợp đã được tinh chế được gom để phân tích tiếp thành phần disacarit, phân tích phân tử lượng và các thử nghiệm về hoạt tính chống đông *in vitro* như được thể hiện trong ví dụ 3. Bước này có thể được lặp lại nếu hoạt tính chống đông không đạt đến mức theo mô tả trong USP.

Ví dụ 9: Các phương pháp chính xác để tổng hợp hai heparin sinh tổng hợp (BSH) có các tính chất về hoạt tính và phân tử lượng mà thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật của heparin USP của lợn và hai heparin sinh tổng hợp (BSH) mà không thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật về hoạt tính và phân tử lượng của heparin USP của lợn

Sản xuất heparin sinh tổng hợp mẽ h

Tổng cộng 40mg NS (85,4% hàm lượng NS) được xử lý bằng 2OST và C5-epi trong các điều kiện được bộc lộ trong ví dụ, 6. Các điều kiện phản ứng là như sau trong dung dịch đệm phản ứng MES (50mM, độ pH=7,2): 1mg/ml NS, 0,25mg/ml C5 epi, 0,5mg/ml 2OST, và 1,45mm PAPS. Hỗn hợp phản ứng được ủ trên trục quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Hạt enzym được lấy ra khỏi dung dịch và rửa bằng 3 lần thể tích cột (column volume - CV) dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2) để thu hồi polysacarit. Dung dịch phản ứng và 3 CV dung dịch rửa đệm được kết hợp và nạp vào cột xoay màng MWCO 5kDa để cô và loại bỏ các hợp chất sau phản ứng. Dịch còn lại được gom và lấy mẫu để phân tích disacarit như đã nêu ở ví dụ 3. Thành phần disacarit của chất trung gian NS2S thu được là như được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Tóm tắt lịch sử thành phần disacarit và hoạt tính chống đông đối với heparin sinh tổng hợp mề h.

Mề h	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng-Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	14,6	<u>85,4</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	13,8	25,2	0,0	1,0	0,0	<u>60,0</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S 6OST thứ 1	12,7	20,8	1,2	0,9	<u>4,9</u>	22,3	0,1	<u>37,2</u>			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S 6OST thứ 2	11,8	16,6	3,2	0,8	<u>10,5</u>	13,5	0,1	<u>43,5</u>			
BSH mề h 3OST thứ 1	12,6	16,1	1,7	0,7	<u>9,1</u>	14,8	0,0	<u>44,9</u>	/	163	/
BSH mề h 3OST thứ 2	15,1	17,1	0,7	0,5	<u>5,7</u>	12,5	0,0	<u>48,4</u>	365	396	0,92

Ở bước enzyme thứ hai, 3mg chất trung gian NS2S thu được với hàm lượng NS2S 60% được xử lý bằng đã được cố định 6OST-1 và 6OST-3 để tạo ra chất trung gian NS2S6S. Phương pháp cố định là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa là giống như đã nêu ở ví dụ 7. Sau khi phản ứng hoàn thành, polysacarit được thu hồi, được tinh chế và phân tích như nêu trên đối với quá trình sản xuất NS2S. Thành phần disacarit của chất trung gian NS2S6S này sau bước thứ nhất xử lý bằng 6OST là như được thể hiện trong Bảng 3. Để làm tăng %TriS đến cao hơn 40%, bước xử lý bằng 6OST được lặp lại bằng cách áp dụng cùng một phương pháp. Chất trung gian NS2S6S thu được sau lần xử lý thứ 2 thu được 43,5% NS2S6S disacarit và 10,5%NS6S disacarit.

Chất trung gian NS2S6S này sau khi bước thứ 2 xử lý bằng 6OST (85,4 đến 60,0 đến 43,5) được xử lý tiếp bằng 3OST-1 đã được cố định để tạo ra mề heparin sinh tổng hợp h. Việc cố định 3OST-1 được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa và các phương pháp tinh chế heparin sinh tổng hợp mề h là giống như đã được mô tả trong ví dụ 8, và tiếp theo là xác định phân tử lượng, disacarit và các thử nghiệm về hoạt tính *in vitro* như đã nêu ở ví dụ 3. Heparin sinh tổng hợp mề h, sau thử nghiệm thứ 1 về 3OST-1, chỉ đạt đến hoạt tính kháng IIa bằng 160U/mg mà là thấp hơn mức hoạt tính 180U/mg ở heparin USP của lợn (Bảng 3). Do đó, chất trung gian này được xử lý lại bằng 3OST-1, tiếp theo là sử dụng cùng cách tinh chế và phân tích như nêu trên. Heparin sinh tổng hợp mề h sau lần thứ 2 xử lý bằng 3OST-1 có mức kháng IIa 396U/mg, kháng-Xa 365U/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng IIa bằng 0,92 với phân tử lượng trung bình

17.500Da, tỷ lệ phần trăm của các phân đoạn có Mw cao hơn 24.000 bằng 16,8, và tỷ lệ giữa các phân đoạn có Mw nằm trong khoảng từ 8.000 đến 16.000 và Mw nằm trong khoảng từ 16.000 đến 24.000 bằng 1,3. Cả hoạt tính chống đông và các đặc tính về phân tử lượng của heparin sinh tổng hợp mẻ h đều nằm trong khoảng đặc tính của heparin USP của lợn.

Sản xuất heparin sinh tổng hợp mẻ w

Tổng cộng 25mg NS (hàm lượng NS 92,7%) được xử lý bằng 2OST và C5 epi trong các điều kiện được bộc lộ trong ví dụ 6. Một cách vắn tắt, các điều kiện phản ứng là như sau: 1mg/ml (2,23mM) NS, 0,25mg/ml C5-epi, 0,5mg/ml 2OST, 0,5mg/ml AST-IV, 10mM PNPS và 1,61mM PAPS trong dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2). Hỗn hợp phản ứng được ủ trên trục quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Hạt enzym được lấy ra khỏi dung dịch và rửa bằng 3 thể tích cột (column volume - CV) bằng cách sử dụng dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2) để thu hồi toàn bộ polysacarit. Dung dịch phản ứng và 3 CV dung dịch rửa đệm được kết hợp và được nạp vào cột xoay màng MWCO 5kDa để cô và loại bỏ các hợp chất sau phản ứng. Dịch còn lại được gom và được lấy mẫu để phân tích đisacarit như đã nêu ở ví dụ 3. Thành phần đisacarit của chất trung gian NS2S thu được là như được thể hiện trong Bảng 4. Nền này sau lần xử lý thứ 1 bằng 2OST/C5-epi chỉ đạt đến NS2S% 68,9%. Do đó, phản ứng 2OST-1/C5 được lặp lại hai lần để tăng NS2S% đến 75% bằng cách áp dụng cùng một phương pháp (Bảng 4).

Tổng cộng 3mg chất trung gian NS2S thu được với 75,4% nhóm đisacarit NS2S được xử lý tiếp bằng 6OST-1 và 6OST-3 đã được cố định để tạo ra chất trung gian NS2S6S. Phương pháp cố định là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa là giống như đã nêu ở ví dụ 7 với hệ quay vòng PAPS. Sau khi phản ứng hoàn thành, polysacarit được thu hồi, được tinh chế và phân tích như nêu trên cho bước sản xuất NS2S tiếp theo. Thành phần đisacarit của chất trung gian NS2S6S này sau bước xử lý bằng 6OST-1&3 được thể hiện trong Bảng 4, và chứa 54,5% đisacarit NS2S6S (TriS) và 14,3% đisacarit NS6S.

Chất trung gian NS2S6S này được xử lý tiếp bằng 3OST-1 đã được cố định để tạo ra mẻ heparin sinh tổng hợp w. Việc cố định 3OST-1 là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa và các phương pháp tinh chế heparin sinh tổng hợp mẻ w là giống như ví dụ 8 có quay vòng PAPS, và tiếp theo là xác định phân tử lượng, đisacarit và các thử nghiệm về hoạt tính *in vitro* như đã nêu ở ví dụ 3. Heparin sinh tổng hợp mẻ w sau xử lý bằng 3OST-1 đạt đến hoạt tính kháng IIa bằng 343U/mg, kháng-Xa bằng 393U/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng IIa bằng 1,10, có phân tử lượng trung bình 15.500Da, tỷ lệ phần trăm của các phân đoạn với phân tử lượng cao hơn 24.000 là 6,6, và tỷ lệ giữa các phân đoạn có Mw nằm trong khoảng từ 8.000 đến 16.000 và Mw nằm trong khoảng từ 16.000 đến 24.000 bằng 1,7. Cả hoạt tính chống đông và Mw của heparin sinh tổng hợp mẻ w đều nằm trong khoảng thông số của heparin USP của lợn.

Bảng 4. Tóm tắt lịch sử thành phần đisacarit và hoạt tính chống đông đối với heparin sinh tổng hợp mẻ w.

Mẻ w	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NSH	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S lần thứ 1 bằng 2OST/C5	6,5	24,0	0,0	0,6	0,0	<u>68,9</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ hai NS2S lần thứ 2 bằng 2OST/C5	6,5	17,9	0,0	1,0	0,0	<u>74,5</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ hai NS2S lần thứ 3 bằng 2OST/C5	6,8	16,8	0,0	1,0	0,0	<u>75,4</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,5	2,5	4,9	0,4	<u>14,3</u>	21,4	0,6	<u>54,5</u>			
BSH mẻ w	1,5	2,7	1,8	0,4	<u>9,3</u>	23,5	0,3	<u>60,5</u>	393	343	1,10

Trong một vài trường hợp của các mẻ heparin sinh tổng hợp, một lần xử lý bằng enzym lần lượt đối với các chất trung gian thứ hai và thứ ba thỏa mãn các đặc tính kỹ thuật của heparin USP của lợn.

Sản xuất heparin sinh tổng hợp mẻ 1 mà không thỏa mãn các đặc tính kỹ thuật về phân tử lượng và hoạt tính heparin USP của lợn

Tổng cộng 140mg NS (92,7% hàm lượng NS) được xử lý bằng 2OST-1 và C5-epi

trong các điều kiện đã nêu ở ví dụ 6. Một cách vắn tắt, các điều kiện phản ứng là như sau: 1mg/ml (2,23mM) NS, 0,25mg/ml C5 epi, 0,5mg/ml 2OST, và 2mM PAPS trong dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2). Hỗn hợp phản ứng được ủ trên trục quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Hạt enzym được lấy ra khỏi dung dịch và rửa bằng 3 thể tích cột (column volume - CV) bằng cách sử dụng dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2) để thu hồi toàn bộ chất nền. Dung dịch phản ứng và 3 CV dung dịch rửa đệm được kết hợp và được nạp vào cột xoay màng MWCO 5kDa để cô và loại bỏ các hợp chất sau phản ứng. Dịch còn lại được gom và được lấy mẫu để phân tích disacarit như đã nêu ở ví dụ 3. Chất trung gian thứ hai NS2S đạt đến 72,4% disacarit NS2S theo phân tích disacarit (Bảng 5).

Tổng cộng 10mg chất trung gian NS2S thu được với hàm lượng disacarit NS2S 72,4% được xử lý tiếp bằng 6OST-1 và 6OST-3 cố định để tạo ra chất trung gian NS2S6S. Phương pháp cố định là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa là giống như đã nêu ở ví dụ 7. Sau khi phản ứng hoàn thành, polysacarit được thu hồi, được tinh chế và phân tích như nêu trên ở bước sulfat hóa NS2S. Thành phần disacarit của chất trung gian NS2S6S này sau xử lý bằng 6OST-1&3 được thể hiện trong Bảng 5 và bao gồm 41,0% disacarit NS2S6S (TriS) và 3,7% disacarit NS6S.

Chất trung gian NS2S6S này được xử lý tiếp bằng 3OST-1 đã được cố định. Việc cố định 3OST-1 là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa và phương pháp tinh chế là giống như ví dụ 8, và tiếp theo là trọng lượng phân tử lượng trung bình, thành phần disacarit và các thử nghiệm hoạt tính *in vitro* như đã nêu ở ví dụ 3. Mẻ này sau xử lý bằng 3OST-1 chỉ đạt đến hoạt tính kháng IIa bằng 112 U/mg, kháng-Xa bằng 93U/mg và kháng Xa/kháng IIa bằng 0,80. Để làm tăng hoạt tính kháng IIa nhằm đáp ứng đặc tính kỹ thuật của USP, mẻ 1 không tương đương này được xử lý lại bằng 3OST-1 đã được cố định bằng cách áp dụng cùng một phương pháp như đã nêu ở ví dụ 8. Tuy nhiên, hoạt tính kháng IIa vẫn là thấp (114U/mg) không đạt đến mức 180U/mg yêu cầu theo các đặc tính kỹ thuật của heparin USP của lộn.

Bảng 5. Tóm tắt lịch sử thành phần disacarit và hoạt tính chống đông cho heparin sinh tổng hợp mẻ 1.

Mẻ 1	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NSH	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,5	20,4	0,0	0,7	0,0	<u>72,4</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,3	17,2	0,5	0,8	<u>3,7</u>	30,6	0,0	<u>41,0</u>			
Non-BSH mẻ 1 (3OST thứ 1)	Không được thử								93	112	0,80
Non-BSH mẻ 1 (3OST thứ 2)	6,7	15,7	0,1	1,0	<u>3,5</u>	28,2	0,0	<u>44,8</u>	114	114	1,00

Sản xuất heparin sinh tổng hợp mẻ 2 mà không thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật của heparin USP của lợn về hoạt tính và phân tử lượng

Tổng cộng 40mg NS (hàm lượng NS 92,7%) được xử lý bằng 2OST và C5-epi trong điều kiện đã nêu ở ví dụ 6. Một cách vắn tắt, các điều kiện phản ứng là như sau: 1mg/ml (2,23mm) NS, 0,25mg/ml C5 epi, 0,5mg/ml 2OST, và 2mM PAPS trong dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2). Hỗn hợp phản ứng được ủ trên trục quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Hạt enzym được lấy ra khỏi dung dịch và rửa bằng 3 thể tích cột (column volume - CV) bằng cách sử dụng dung dịch đệm MES 50mM (độ pH=7,2) để thu hồi toàn bộ polysacarit. Dung dịch phản ứng và 3 CV dung dịch rửa đệm được kết hợp và được nạp vào cột xoay màng MWCO 5kDa để cô và loại bỏ các hợp chất sau phản ứng. Dịch còn lại được gom và được lấy mẫu để phân tích disacarit như đã nêu ở ví dụ 3. Chất trung gian thứ hai NS2S đạt 81,4% disacarit NS2S theo phân tích disacarit (Bảng 6).

Tổng cộng 3mg chất trung gian NS2S thu được với hàm lượng disacarit NS2S 81,4% được xử lý tiếp bằng 6OST-1 và 6OST-3 cố định để tạo ra chất trung gian NS2S6S. Phương pháp cố định là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa là giống như đã nêu ở ví dụ 7. Sau khi phản ứng hoàn thành, polysacarit được thu hồi, được tinh chế và phân tích như nêu trên ở bước sulfat hóa NS2S. Thành phần disacarit của chất trung gian NS2S6S này sau khi xử lý bằng 6OST-1&3 được thể hiện trong Bảng 6 và bao gồm 61,0% disacarit NS2S6S (TriS) và 2,5% disacarit NS6S.

Chất trung gian NS2S6S này được xử lý tiếp bằng 3OST-1 đã được cố định. Việc

cổ định 3OST-1 là như đã nêu ở ví dụ 5. Các điều kiện của phản ứng sulfat hóa và phương pháp tinh chế là giống như ví dụ 8, tiếp theo là trọng lượng phân tử lượng trung bình, hàm lượng đisacarit và các thử nghiệm về hoạt tính *in vitro* như đã nêu ở ví dụ 3. Mẻ này sau xử lý bằng 3OST-1 chỉ đạt đến hoạt tính kháng IIa bằng 49U/mg, mà còn cách xa đặc tính của USP là 180U/mg. Mẻ 2 không tương đương này đã được chứng minh là không tương đương với heparin USP của lợn.

Bảng 6. Tóm tắt lịch sử thành phần đisacarit và hoạt tính chống đông đối với heparin sinh tổng hợp mẻ 2.

Mẻ 2	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NSH	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	5,2	11,2	0,0	2,2	0,0	<u>81,4</u>	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	4,5	8,3	0,8	2,0	<u>2,5</u>	20,7	0,2	<u>61,0</u>			
Non-BEqH mẻ 2 (3OST thứ 2)	4,3	7,6	0,5	1,8	<u>2,0</u>	22,5	0,0	<u>61,3</u>	/	49	/

Tạo ra heparin sinh tổng hợp thông qua ba chất trung gian

Tổng quan

Dưới đây mô tả nhiều mẻ của heparin sinh tổng hợp mà đáp ứng các tiêu chuẩn USP về hoạt tính sinh học và, khi đo được, cả về phân tử lượng. Heparin sinh tổng hợp còn thể hiện hàm lượng đisacarit tương đương với heparin USP của lợn. Các thử nghiệm này được thực hiện nối tiếp với phương pháp sắc ký lỏng cao áp và phổ cộng hưởng từ hạt nhân để xác định định tính mức độ và bản chất của bước sulfat hóa.

Việc tạo ra heparin sinh tổng hợp đòi hỏi các chất trung gian tạo ra được ở từng bước của quy trình này gồm hàm lượng đisacarit cụ thể. Được mô tả dưới đây là thông tin cụ thể về: (a) hàm lượng đisacarit NS (tất cả các hàm lượng tính theo % tổng thành phần đisacarit) của chất trung gian thứ nhất NS; (b) hàm lượng đisacarit NS2S và NS của chất trung gian thứ hai NS2S; và (c) hàm lượng đisacarit NS2S6S, NS6S, NS2S, và NS của chất trung gian thứ ba NS2S6S/TriS theo quy trình tổng hợp heparin tương đương về mặt sinh học. Chất trung gian thứ nhất NS có trọng lượng phân tử lượng trung bình (Mw) thích

hợp và phân bố phân tử lượng để tạo ra chất trung gian thứ hai và thứ ba có phân tử lượng thích hợp để tạo ra heparin sinh tổng hợp trong khoảng đặc tính USP.

Tóm tắt các mẻ thỏa mãn các đặc tính kỹ thuật của heparin usp của lộn

Các mẻ a, b, c và d được bộc lộ ở đơn tạm thời đăng ký patent Mỹ số 62/384,341. Các dữ liệu về disacarit trong bảng này ở phần này tính theo % mol. Trị số % mol được thể hiện có thể được biểu thị theo % trọng lượng như ở đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 62/384,341.

Mẻ a	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,2	20,3	0,0	/	/	72,5	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	2,6	5,0	5,3	0,3	15,1	12,0	0,4	59,4			
Sản phẩm BSH mẻ a	3,2	4,5	2,1	0,4	12,9	7,1	0,4	69,5	300	320	0,94

Mẻ b	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,2	20,3	0,0	/	/	72,5	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	2,6	5,0	5,3	0,3	15,1	12,0	0,4	59,4			
Sản phẩm BSH mẻ b	2,9	4,3	2,3	0,4	12,6	7,1	0,4	69,9	320	300	1,07

Mẻ c	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,2	19,9	/	0,9	/	72,1	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3			
Sản phẩm BSH mẻ c	6,3	10,4	1,2	0,7	8,9	12,7	0,1	59,8	249	225	1,11

Mẻ d	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,2	19,9	/	0,9	/	72,1	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3			
Sản phẩm BSH mẻ d	6,2	10,3	0,8	0,7	8,9	12,5	0,0	60,5	254	232	1,09

Mề e	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	21,7	<u>78,3</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	19,3	31,9	/	3,8	/	<u>44,9</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	9,3	11,9	13,7	0,0	<u>28,0</u>	1,6	0,0	<u>35,5</u>			
Sản phẩm BSH mề e	15,9	13,1	11,5	0,8	<u>11,5</u>	2,2	0,0	<u>45,0</u>	369	346	1,07

Mề f	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	21,7	<u>78,3</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	18,4	30,1	/	2,6	/	<u>48,9</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	9,0	11,9	14,4	1,9	<u>28,5</u>	1,9	1,2	<u>31,3</u>			
Sản phẩm BSH mề f	16,9	14,9	11,8	0,9	<u>11,3</u>	2,0	0,0	<u>42,2</u>	454	456	1,00

Mề g	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	18,1	<u>81,9</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	15,2	30,8	/	1,6	/	<u>52,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	8,8	13,7	11,3	1,4	<u>29,5</u>	3,9	0,0	<u>31,5</u>			
Sản phẩm BSH mề g	13,9	19,0	5,9	0,5	<u>15,5</u>	3,3	0,0	<u>41,9</u>	355	307	1,16

Mề h	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	14,6	<u>85,4</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	/	1,0	/	<u>60,0</u>	/	/	/	1,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	11,8	16,6	3,2	0,8	<u>10,5</u>	13,5	0,1	<u>43,5</u>			
3OST thứ 1	12,6	16,1	1,7	0,7	<u>9,1</u>	14,8	0,0	<u>44,9</u>	/	163	/
Sản phẩm BSH mề h (3OST thứ 2)	15,1	17,1	0,7	0,5	<u>5,7</u>	12,5	0,0	<u>48,4</u>	365	396	0,92

Mề i	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	14,6	<u>85,4</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	10,7	16,7	/	3,7	/	<u>68,9</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	2,0	1,3	10,5	0,1	<u>17,1</u>	0,6	3,2	<u>65,2</u>			
Sản phẩm BSH mề i	1,6	1,5	4,3	0,3	<u>6,6</u>	0,9	1,3	<u>83,6</u>	712	855	0,83

Mề j	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	9,6	<u>90,4</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,2	13,2	/	3,2	/	<u>77,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	3,2	6,1	4,7	1,2	<u>10,0</u>	8,3	0,0	<u>66,5</u>			
Sản phẩm BSH mề j	3,5	5,5	1,2	0,7	<u>4,3</u>	5,3	0,0	<u>79,6</u>	389	451	0,86

Mẻ k	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	9,6	<u>90,4</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,2	13,2	/	3,2	/	<u>77,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,7	1,6	5,6	0,0	<u>13,2</u>	2,6	2,6	<u>72,7</u>			
Sản phẩm BSH mẻ k	1,0	1,8	2,1	0,4	<u>5,4</u>	3,6	0,8	<u>84,9</u>	503	599	0,84

Mẻ l	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	9,2	<u>90,8</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	8,8	22,9	/	0,5	/	<u>67,8</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,8	13,2	2,0	0,5	<u>11,2</u>	12,5	0,1	<u>53,7</u>			
Chất trung gian BEqH mẻ l	8,1	13,2	0,0	0,6	<u>8,9</u>	10,4	0,0	<u>58,9</u>	299	312	0,96

Mẻ m	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,8	21,4	/	1,9	/	<u>69,8</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	5,0	9,4	3,0	0,6	<u>11,5</u>	12,0	0,2	<u>58,3</u>			
3OST thứ 1	/								/	160	/
Sản phẩm BSH mẻ m (3OST thứ 2)	6,3	9,3	1,2	0,4	<u>10,4</u>	10,4	0,0	<u>62,1</u>	209	203	1,03

Mẻ n	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,9	<u>92,1</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,2	19,9	/	0,9	/	<u>72,1</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3			
Sản phẩm BSH mẻ n	6,5	11,2	0,6	0,9	8,8	13,5	0,0	58,5	220	244	0,90

Mẻ o	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	7,6	38,6	/	0,1	/	<u>53,6</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	4,3	11,4	4,8	0,0	<u>39,4</u>	2,1	0,0	<u>38,1</u>			
Sản phẩm BSH mẻ o	6,8	13,3	1,4	0,0	<u>21,8</u>	1,3	0,0	<u>55,5</u>	441	578	0,76

Mẻ p	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,9	30,1	/	0,3	/	<u>62,7</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,5	18,3	2,5	0,0	<u>20,8</u>	7,2	0,0	<u>44,7</u>			
Sản phẩm BSH mẻ p	8,9	19,2	0,3	0,0	<u>12,1</u>	6,5	0,0	<u>53,0</u>	407	448	0,91

Mề q	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,5	24,0	/	0,6	/	<u>68,9</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	2,3	4,5	4,3	0,4	<u>19,9</u>	24,8	0,3	<u>43,5</u>			
Sản phẩm BSH mề q	2,6	4,8	2,3	0,4	<u>14,9</u>	27,1	0,2	<u>47,7</u>	288	262	1,10

Mề r	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,5	24,0	/	0,6	/	<u>68,9</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,8	3,3	4,9	0,3	<u>21,3</u>	20,1	0,3	<u>47,9</u>			
3OST thứ 1	1,9	3,8	2,5	0,3	<u>15,5</u>	23,1	0,2	<u>52,6</u>	362	301	1,20
Sản phẩm BSH mề r (3OST thứ 2)	2,3	4,4	1,5	0,2	<u>12,5</u>	21,6	0,0	<u>57,5</u>	438	438	1,00

Mề s	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,8	21,5	/	0,7	/	<u>71,0</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	4,8	11,7	2,4	1,0	<u>10,2</u>	16,8	0,0	<u>53,0</u>			
Sản phẩm BSH mề s	3,9	6,5	1,1	1,1	<u>10,0</u>	12,3	0,5	<u>64,7</u>	280	301	0,93

Mề t	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,5	20,4	/	0,7	/	<u>72,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	5,6	13,9	1,1	0,9	<u>6,1</u>	20,0	0,0	<u>52,3</u>			
3OST thứ 1	/								132	148	0,89
Sản phẩm BSH mề t (3OST thứ 2)	5,8	12,2	0,3	1,1	<u>5,7</u>	15,1	0,0	<u>59,7</u>	220	231	0,95

Mề u	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,5	20,4	/	0,7	/	<u>72,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	4,7	11,2	1,2	0,9	<u>8,4</u>	14,2	0,0	<u>59,3</u>			
Sản phẩm BSH mề u	5,4	10,9	0,4	1,1	<u>6,8</u>	14,1	0,1	<u>61,3</u>	207	220	0,94

Mề v	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/			
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,8	16,8	/	1,0	/	<u>75,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	2,0	3,4	4,5	0,5	13,4	26,6	0,5	49,2			
Sản phẩm BSH mề v	2,0	3,4	1,9	0,5	9,3	28,0	0,3	54,6	331	303	1,09

Mẻ w	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,8	16,8	/	1,0	/	<u>75,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,5	2,5	4,9	0,4	<u>14,3</u>	21,4	0,6	<u>54,5</u>			
Sản phẩm BSH mẻ w	1,5	2,7	1,8	0,4	<u>9,3</u>	23,5	0,3	<u>60,5</u>	393	343	1,145

Mẻ x	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,8	16,8	/	1,0	/	<u>75,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,0	1,4	5,5	0,3	<u>15,4</u>	12,1	0,7	<u>63,7</u>			
3OST thứ 1	0,6	1,5	2,4	0,3	<u>10,2</u>	13,6	0,5	<u>70,9</u>	417	331	1,26
Sản phẩm BSH mẻ x (3OST thứ 2)	0,9	1,6	1,5	0,2	<u>8,3</u>	12,7	0,1	<u>74,7</u>	472	463	1,02

Mẻ y	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	7,3	<u>92,7</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	5,8	13,4	/	1,4	/	<u>79,4</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,4	3,5	5,5	0,0	<u>15,1</u>	4,9	0,0	<u>69,6</u>			
Sản phẩm BSH mẻ y	1,2	3,5	1,4	0,0	<u>4,0</u>	0,9	0,0	<u>89,0</u>	385	486	0,79

Mẻ z	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
Chất trung gian thứ nhất NS	0,7	<u>99,3</u>	/	/	/	/	/	/	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	0,5	30,5	/	0,0	/	<u>69,0</u>	/	/			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	0,4	21,1	0,4	0,0	<u>22,8</u>	7,5	0,0	<u>47,9</u>			
Sản phẩm BSH mẻ z	0,5	21,7	0,5	0,0	<u>12,6</u>	6,7	0,0	<u>58,0</u>	227	251	0,90

Tóm tắt thông tin:

Bảng 7. Tóm tắt về % NS ở chất trung gian thứ nhất NS

NSH	NS
Mẻ a	92,1
Mẻ b	92,1
Mẻ c	92,1
Mẻ d	92,1
Mẻ e	78,3
Mẻ f	78,3
Mẻ g	81,9
Mẻ h	85,4
Mẻ i	85,4
Mẻ j	90,4

Mẻ k	90,4
Mẻ l	90,8
Mẻ m	92,1
Mẻ n	92,1
Mẻ o	92,7
Mẻ p	92,7
Mẻ q	92,7
Mẻ r	92,7
Mẻ s	92,7
Mẻ t	92,7
Mẻ u	92,7
Mẻ v	92,7
Mẻ w	92,7
Mẻ x	92,7
Mẻ y	92,7
Mẻ z	99,3
Thấp nhất	78,3
Cao nhất	99,3
Khoảng	78,3 đến 99,3

Bảng 8. Tóm tắt % NS, NS2S ở chất trung gian thứ hai NS2S

NS2S	0S	NS	2S	NS2S	0S+2S
Mẻ a	7,2	20,3	0,0	72,5	7,2
Mẻ b	7,2	20,3	0,0	72,5	7,2
Mẻ c	7,2	19,9	0,9	72,1	8,1
Mẻ d	7,2	19,9	0,9	72,1	8,1
Mẻ e	19,3	31,9	3,8	44,9	23,1
Mẻ f	18,4	30,1	2,6	48,9	21,0
Mẻ g	15,2	30,8	1,6	52,4	16,8
Mẻ h	13,8	25,2	1,0	60,0	14,8
Mẻ i	10,7	16,7	3,7	68,9	14,5
Mẻ j	6,2	13,2	3,2	77,4	9,4
Mẻ k	6,2	13,2	3,2	77,4	9,4
Mẻ l	8,8	22,9	0,5	67,8	9,3
Mẻ m	6,8	21,4	1,9	69,8	8,7
Mẻ n	7,2	19,9	0,9	72,1	8,1
Mẻ o	7,6	38,6	0,1	53,6	7,7
Mẻ p	6,9	30,1	0,3	62,7	7,2
Mẻ q	6,5	24,0	0,6	68,9	7,1
Mẻ r	6,5	24,0	0,6	68,9	7,1
Mẻ s	6,8	21,5	0,7	71,0	7,5

Mê t	6,5	20,4	0,7	72,4	7,2
Mê u	6,5	20,4	0,7	72,4	7,2
Mê v	6,8	16,8	1,0	75,4	7,8
Mê w	6,8	16,8	1,0	75,4	7,8
Mê x	6,8	16,8	1,0	75,4	7,8
Mê y	5,8	13,4	1,4	79,4	7,2
Mê z	0,5	30,5	0,0	69,0	0,5
Thấp nhất	0,5	13,2	0,0	44,9	0,5
Cao nhất	19,3	38,6	3,8	79,4	23,1
Khoảng	0,5 đến 19,3	13,2 đến 38,6	0,0 đến 3,8	44,9 đến 79,4	0,5 đến 23,1

Bảng 9. Tóm tắt % NS, NS2S, NS6S, TriS ở chất trung gian thứ ba NS2S6S

TriS (NS2S6S)	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	0S+6S+2S+2S6S
Mê a	2,6	5,0	5,3	0,3	15,1	12,0	0,4	59,4	8,6
Mê b	2,6	5,0	5,3	0,3	15,1	12,0	0,4	59,4	8,6
Mê c	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3	10,1
Mê d	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3	10,1
Mê e	9,3	11,9	13,7	0,0	28,0	1,6	0,0	35,5	23,0
Mê f	9,0	11,9	14,4	1,9	28,5	1,9	1,2	31,3	26,5
Mê g	8,8	13,7	11,3	1,4	29,5	3,9	0,0	31,5	21,4
Mê h	11,8	16,6	3,2	0,8	10,5	13,5	0,1	43,5	15,9
Mê i	2,0	1,3	10,5	0,1	17,1	0,6	3,2	65,2	15,8
Mê j	3,2	6,1	4,7	1,2	10,0	8,3	0,0	66,5	9,1
Mê k	1,7	1,6	5,6	0,0	13,2	2,6	2,6	72,7	9,9
Mê l	6,8	13,2	2,0	0,5	11,2	12,5	0,1	53,7	9,4
Mê m	5,0	9,4	3,0	0,6	11,5	12,0	0,2	58,3	8,8
Mê n	6,5	12,2	2,5	0,9	10,6	13,8	0,2	53,3	10,1
Mê o	4,3	11,4	4,8	0,0	39,4	2,1	0,0	38,1	9,1
Mê p	6,5	18,3	2,5	0,0	20,8	7,2	0,0	44,7	9,0
Mê q	2,3	4,5	4,3	0,4	19,9	24,8	0,3	43,5	7,3
Mê r	1,8	3,3	4,9	0,3	21,3	20,1	0,3	47,9	7,3
Mê s	4,8	11,7	2,4	1,0	10,2	16,8	0,0	53,0	8,2
Mê t	5,6	13,9	1,1	0,9	6,1	20,0	0,0	52,3	7,6
Mê u	4,7	11,2	1,2	0,9	8,4	14,2	0,0	59,3	6,8
Mê v	2,0	3,4	4,5	0,5	13,4	26,6	0,5	49,2	7,5
Mê w	1,5	2,5	4,9	0,4	14,3	21,4	0,6	54,5	7,4
Mê x	1,0	1,4	5,5	0,3	15,4	12,1	0,7	63,7	7,5
Mê y	1,4	3,5	5,5	0,0	15,1	4,9	0,0	69,6	6,9
Mê z	0,4	21,1	0,4	0,0	22,8	7,5	0,0	47,9	0,8
Thấp nhất	0,4	1,3	0,4	0,0	6,1	0,6	0,0	31,3	0,8
Cao nhất	11,8	21,1	14,4	1,9	39,4	26,6	3,2	72,7	26,5
Khoảng	0,4 đến 11,8	1,3 đến 21,1	0,4 đến 14,4	0,0 đến 1,9	6,1 đến 39,4	0,6 đến 26,6	0,0 đến 3,2	31,3 đến 72,7	0,8 đến 26,5

Bảng 10. Tóm tắt về quy mô phản ứng và thể tích heparin sinh tổng hợp

BEqH	Quy mô (mg hoặc ml)
Mê a	3
Mê b	3
Mê c	3
Mê d	3
Mê e	3

Mẻ f	3
Mẻ g	3
Mẻ h	3
Mẻ i	3
Mẻ j	3
Mẻ k	3
Mẻ l	1000
Mẻ m	100
Mẻ n	100
Mẻ o	3
Mẻ p	3
Mẻ q	3
Mẻ r	3
Mẻ s	100
Mẻ t	3
Mẻ u	3
Mẻ v	3
Mẻ w	3
Mẻ x	3
Mẻ y	3
Mẻ z	3

Tóm lại, việc sử dụng chất trung gian thứ nhất NS với hàm lượng NS, Mw, và phân bố phân tử lượng cụ thể nêu trên có thể là quan trọng để thu được một cách thành công các chất trung gian thứ hai và thứ ba cụ thể, và cuối cùng để tạo ra BSH mà có thể thỏa mãn các tiêu chí về heparin theo USP.

Bảng 11. Dữ liệu về đisacarit theo % trọng lượng BSH các mẻ a, b, c và d. Các mẻ này được bộc lộ ở đơn tạm thời đăng ký patent Mỹ số 62/384,341 và cả BEqH

Mẻ a	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	% trọng lượng										
Chất trung gian thứ nhất NS	6,2	93,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,0	20,2	0,0	0,0	0,0	73,8	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,5	3,1	2,0	0,3	22,2	8,4	0,5	62,0			
Sản phẩm BSH mẻ a	1,7	2,6	0,8	0,2	18,6	5,1	0,4	70,6	300	320	0,94

Mê b	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	% trọng lượng										
Chất trung gian thứ nhất NS	6,2	93,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	6,0	20,2	0,0	0,0	0,0	73,8	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	1,5	3,1	2,0	0,3	22,2	8,4	0,5	62,0			
Sản phẩm BSH mê b	1,5	2,6	0,9	0,2	18,2	5,1	0,5	71,1	320	300	1,07

Mê c	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	% trọng lượng										
Chất trung gian thứ nhất NS	6,2	93,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	5,6	18,5	0,0	0,9	0,0	75,3	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	3,8	8,1	1,0	0,6	17,7	10,9	0,6	57,4			
Sản phẩm BSH mê c	3,5	5,9	0,4	0,4	14,5	9,4	0,1	65,6	249	225	1,11

Mê d	0S	NS	6S	2S	NS6S	NS2S	2S6S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	% trọng lượng										
Chất trung gian thứ nhất NS	6,2	93,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	/		
Chất trung gian thứ hai NS2S	5,6	18,5	0,0	0,9	0,0	75,3	0,0	0,0			
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	3,8	8,1	1,0	0,6	17,7	10,9	0,6	57,4			
Sản phẩm BSH mê d	3,5	5,9	0,3	0,4	14,5	9,3	0,1	66,1	254	232	1,09

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng dữ liệu disacarit có thể được biểu hiện theo % mol (như được sử dụng trong bản mô tả này) hoặc % trọng lượng (như được dùng trong đơn tạm thời).

Các mê heparin sinh tổng hợp mà xuất hiện trong đơn tạm thời đăng ký patent Mỹ số 62/384,341 và mà không thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật về hoạt tính và phân tử lượng của heparin USP của lộn

Đơn tạm thời bao gồm hai mê mà không thỏa mãn các đặc điểm kỹ thuật về hoạt tính và phân tử lượng của heparin USP của lộn. Bảng 12 và bảng 13 dưới đây tóm tắt các dữ liệu. Các trị số về disacarit được thể hiện theo cả % trọng lượng và % mol.

Bảng 12

Mê không tương đương 1	NS	NS6S	NS2S	TriS	NS	NS6S	NS2S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	(% trọng lượng)				(% mol)				(U/mg)	(U/mg)	/
Chất trung gian thứ nhất NS #	Không có dữ liệu	/	/	/	81,9	/	/	/	/	/	/
Chất trung gian thứ hai NS2S *	16,3	/	77,4	/	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	/	/	/
Chất trung gian thứ ba NS2S6S *	22,7	4,4	16,7	52,5	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	/	/	/
Mê BEH không đương lượng 1*	10,6	5,1	7,4	73,3	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	97	133	1,4

đo được theo $^1\text{H-NMR}$, * đo được theo phương pháp LC-MS

Mê không tương đương 2	NS	NS6S	NS2S	TriS	NS	NS6S	NS2S	TriS	Kháng Xa	Kháng IIa	Xa/IIa
	(% trọng lượng)				(% mol)				(U/mg)	(U/mg)	/
Chất trung gian thứ nhất NS #	Không có dữ liệu	/	/	/	95,1	/	/	/	/	/	/
Chất trung gian thứ hai NS2S	11,0	/	84,6	/	10,0	/	84,3	/	/	/	/
Chất trung gian thứ ba NS2S6S	6,2	5,3	19,0	64,8	7,2	3,1	22,6	60,8	/	/	/
Mê BEH không đương lượng 2	5,4	5,5	15,9	68,8	6,5	3,4	19,2	65,4	130	130	1,0

đo được theo $^1\text{H-NMR}$

Bảng 13. Tóm tắt phân tử lượng

		M _w	M ₂₄₀₀₀	M _{8000 đến 16000} /M _{16000 đến 24000}
Đặc tính theo USP		15.000 đến 19.000	Không cao hơn 20%	Không thấp hơn 1,0
Mê không tương đương 1	Chất trung gian ban đầu 1	21.400	31,5	0,6
	Mê BSH 1	30.300	59,0	0,6
Mê không tương đương 2	Chất trung gian ban đầu 1	18.400	22,0	1,3
	Mê BSH 2	19.000	22,3	1,2

Mặc dù phần mô tả trên đây đã bộc lộ các phương án ưu tiên cụ thể, cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng có thể tạo ra các cải biến khác nhau đối với các phương án đã được bộc lộ và các cải biến này được dự tính trong phạm vi của sáng chế.

Tất cả các tài liệu công bố, đơn đăng ký sáng chế và bằng sáng chế đã trích dẫn trong bản mô tả này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Glycosaminoglycan chứa 78% đến 99% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS) và có trọng lượng phân tử trung bình thích hợp để tạo nên sản phẩm heparin cuối cùng 15.000 đến 19.000 Da, phần trăm của mạch heparin có phân tử lượng cao hơn 24.000 Da không quá 20% tổng số, và tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000 Da đến 16.000 Da so với chuỗi có phân tử lượng nằm trong khoảng 16.000 Da đến 24.000 Da không thấp hơn 1,0.
2. Glycosaminoglycan theo điểm 1 chứa 81% đến 97% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS).
3. Glycosaminoglycan theo điểm 1 chứa 83% đến 95% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS).
4. Glycosaminoglycan theo điểm 1 chứa 85% đến 93% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS).
5. Glycosaminoglycan chứa 44% đến 80% nhóm NS2S và 13% đến 39% nhóm NS và có trọng lượng phân tử trung bình thích hợp để tạo nên sản phẩm heparin cuối cùng 15.000 Da đến 19.000 Da, phần trăm của mạch heparin có phân tử lượng cao hơn 24.000 Da không quá 20% tổng số, và tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000 Da đến 16.000 Da so với chuỗi có phân tử lượng nằm trong khoảng 16.000 Da đến 24.000 Da không thấp hơn 1,0.
6. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 44% đến 80% nhóm NS2S.
7. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 50% đến 78% nhóm NS2S.
8. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 55% đến 77% nhóm NS2S.

9. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 60% đến 76% nhóm NS2S.
10. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 14% đến 35% nhóm NS.
11. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 15% đến 30% nhóm NS.
12. Glycosaminoglycan theo điểm 5, chứa 16% đến 26% nhóm NS.
13. Glycosaminoglycan chứa 36% đến 70% nhóm disacarit NS2S6S, 6% đến 32% nhóm disacarit NS6S, 0% đến 27% nhóm NS2S và 1% đến 22% nhóm NS và có tính chất trọng lượng phân tử trung bình thích hợp để tạo nên sản phẩm heparin cuối cùng 15.000 Da đến 19.000 Da, phần trăm của mạch heparin có phân tử lượng cao hơn 24.000 Da không quá 20% tổng số, và tỷ lệ giữa các mạch có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8.000 Da đến 16.000 Da so với chuỗi có phân tử lượng nằm trong khoảng 16.000 Da đến 24.000 Da không thấp hơn 1,0.
14. Glycosaminoglycan theo điểm 13, chứa 40% đến 67% nhóm disacarit NS2S6S và 6% đến 26% nhóm disacarit NS6S.
15. Glycosaminoglycan theo điểm 13, chứa 43% đến 64% nhóm disacarit NS2S6S và 6% đến 22% nhóm disacarit NS6S.
16. Glycosaminoglycan theo điểm 13, chứa 12% đến 27% nhóm NS2S và 1% đến 17% nhóm NS.
17. Glycosaminoglycan theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16, mà nó không chứa nhóm disacarit 3S.

18. Phương pháp tạo ra heparin sinh tổng hợp, bao gồm các bước;
 - a. thu nhận glycosaminoglycan chứa 36% đến 70% nhóm disacarit NS2S6S, 6% đến 32% nhóm disacarit NS6S, 0% đến 27% of nhóm NS2S và 1% đến 22% nhóm NS;
 - b. xử lý glycosaminoglycan bằng enzym, mà là dạng đồng phân 3-O-sulfotransferaza 1 (3OST-1), khi có mặt chất cho sulfat để tạo ra mẻ heparin sinh tổng hợp.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó ở bước (b) đủ gốc glucosamin được chuyển hóa thành gốc 3-O-sulfoglucosamin sao cho mẻ tạo ra có hoạt tính kháng Xa và kháng IIa không thấp hơn 180 đơn vị/mg và tỷ lệ kháng Xa/kháng IIa nằm trong khoảng từ 0,85 đến 1,15.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó tỷ lệ kháng Xa/kháng IIa nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1.

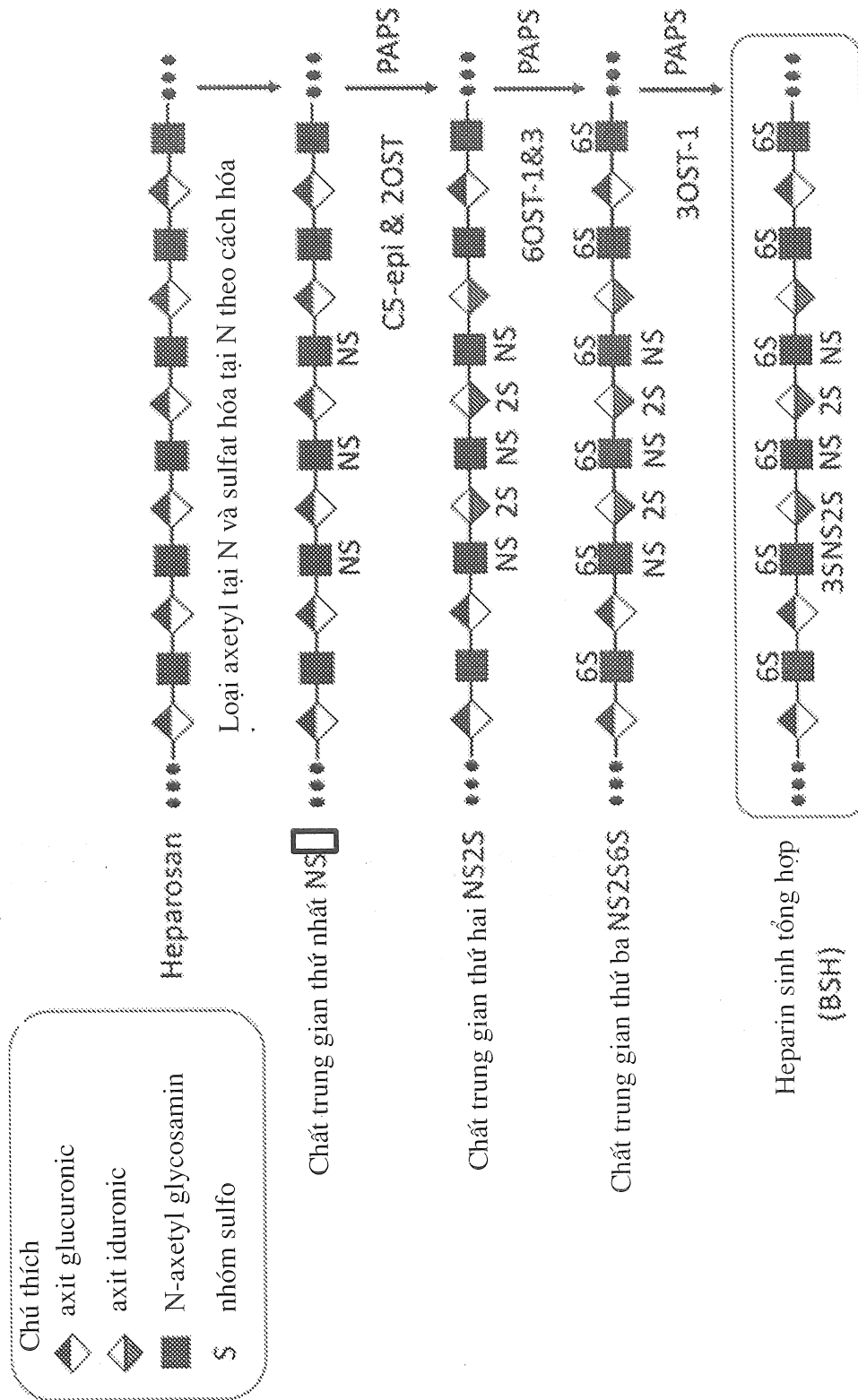
21. Phương pháp tạo ra sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ hai chứa 44% đến 80% nhóm NS2S và 13% đến 39% nhóm NS; phương pháp này bao gồm các bước:
 - a. chuyển hóa lượng gốc N-acetyl glucosamin thành heparosan để tạo ra glycosaminoglycan thứ nhất chứa 78% đến 99% nhóm disacarit đã được sulfat hóa ở vị trí N (NS), trong đó lượng của gốc N-acetyl glucosamin đã được chuyển hóa tương ứng với lượng của nhóm NS ở sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ nhất; và
 - b. xử lý sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ nhất bằng enzym, mà là C5-epimeraza (C5-epi) và 2-O-sulfotransferaza (2OST), khi có mặt chất cho sulfat để tạo ra sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ hai.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó bước chuyển hóa nêu trên bao gồm việc cho heparosan phản ứng với bazơ và chất phản ứng sulfonat hóa.

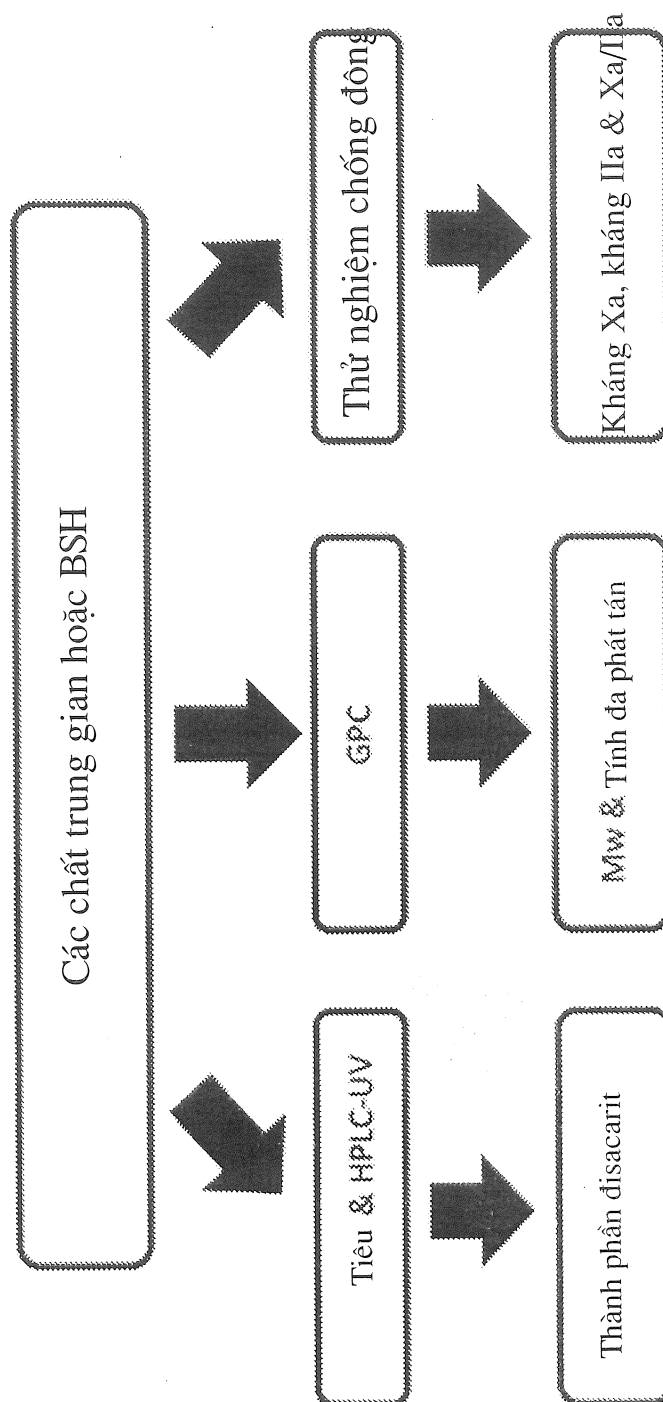
23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó bước chuyển hóa nêu trên bao gồm việc cho heparosan phản ứng với N-deacetylaza, N-sulfotransferaza (NDST).
24. Phương pháp tạo ra sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ ba chứa 36% đến 70% nhóm disacarit NS2S6S, 6% đến 32% nhóm disacarit NS6S, 0% đến 27% nhóm NS2S và 1% đến 22% nhóm NS:
phương pháp này bao gồm việc xử lý sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ hai chứa 44% đến 80% nhóm NS2S và 13% đến 39% nhóm NS bằng enzym, mà là dạng đồng phân 6-O-sulfotransferaza 1 và/hoặc 3 (6OST-1/3), khi có mặt chất cho sulfat, để chuyển hóa sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ hai thành sản phẩm trung gian glycosaminoglycan thứ ba.
25. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 24, trong đó chất cho sulfat chứa PAPS.
26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó PAPS ở trong dung dịch.
27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 24, trong đó chất cho sulfat chứa PAP và PNPS.
28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 24, trong đó việc xử lý nêu trên được thực hiện khi có hệ quay vòng chứa PAPS, PNPS và chất xúc tác.
29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó chất xúc tác là aryl sulfotransferaza IV (AST-IV).
30. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 29, trong đó enzym ở trong dung dịch.

31. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 29, trong đó enzym đã được cố định.
32. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18 đến 24, trong đó bước xử lý được thực hiện ở chủng vi khuẩn đã được xử lý chứa các gen mã hóa cho NDST, C5-Epi, 2OST, 3OST-1, một hoặc cả hai 6OST-1 lẫn 6OST-3, và nguồn PAPS.

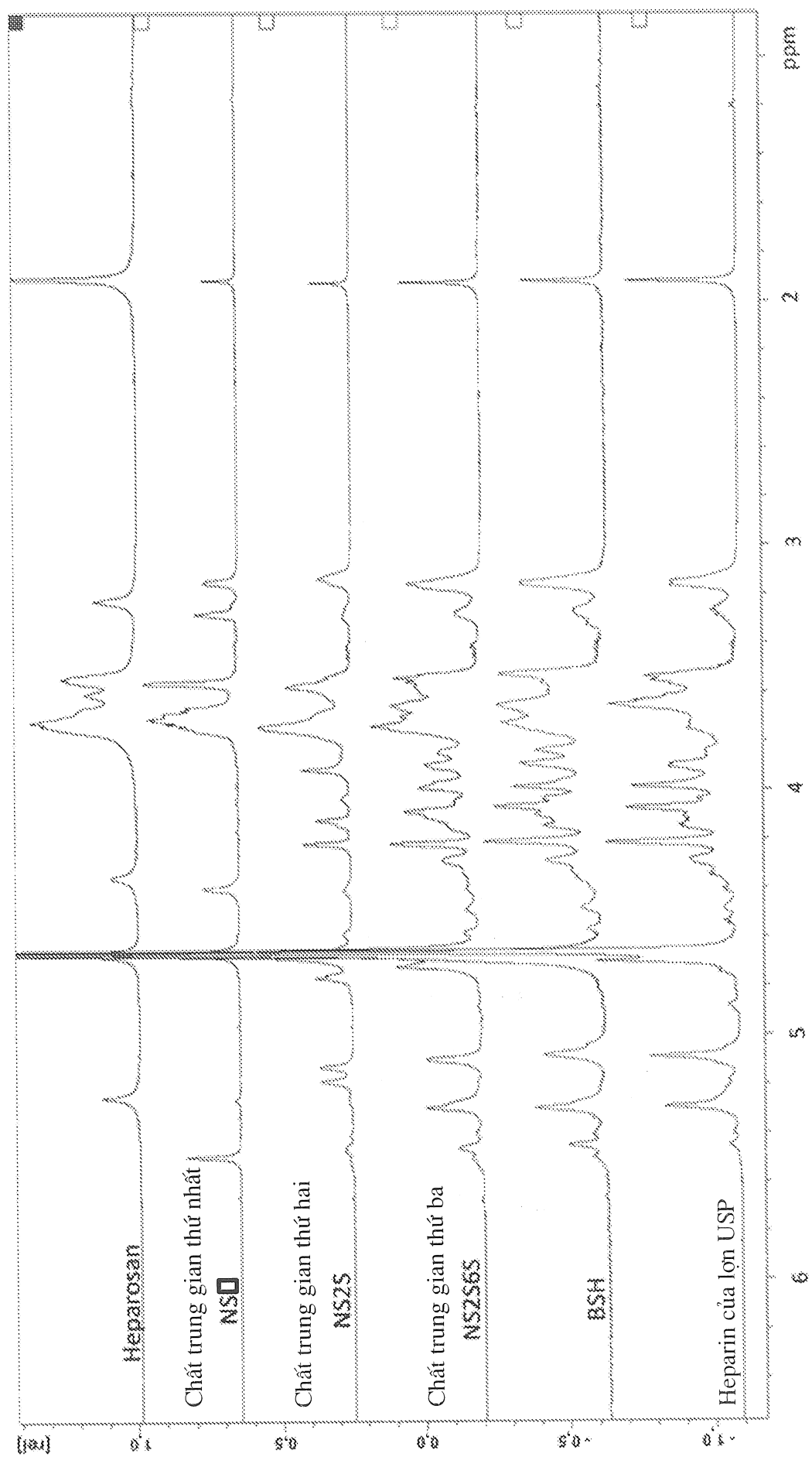
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

