



2012第三届肝素钠360°高峰论坛
2012.6.28-29, 上海



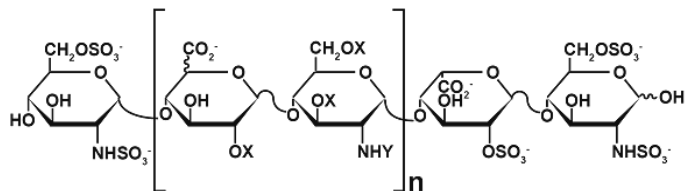
组合多糖裂解酶清洁制备 低分子量肝素技术研究进展

邢新会、张翀、吴敬君、梅祥、李梅、苏楠
清华大学化工系生物化工研究所
工业生物催化教育部重点实验室

肝素及低分子肝素

肝素：结构高度复杂的粘多糖

由己糖醛酸和D-氨基葡萄糖以 α 糖苷键连接而成的重复双糖单位的粘多糖。重均分子量3-37kD，平均分子量15kD。

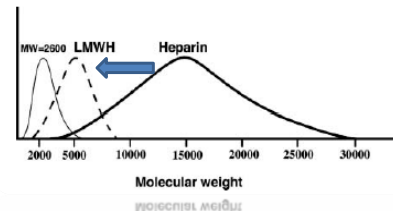


一个双糖单元
有48种可能的结构



低分子量肝素 (LMWH)：

从普通肝素中衍生出来的片断。其长度约为普通肝素的1/3。重均分子量 $M_w < 8kD$ ，平均分子量5kD左右。



肝素的功能：

主要作为抗凝药物使用。

肝素的副作用：

血小板减少，骨质疏松，甚至颅内出血。

抗血栓作用强，出血副作用小；
不易引起血小板减少；分子量小，生物利用度高；不与肝素结合蛋白结合，量效关系稳定。

中国市场排名前十位的抗血栓药物

排名	药品名称
1	氯吡格雷
2	低分子肝素钙
3	蚓激酶
4	低分子肝素钠
5	奥扎格雷钠
6	阿替普酶
7	依诺肝素钠
8	氯苯吡啶
9	西洛他唑
10	肝素钠

欧洲药典定义：

低分子量肝素为重均分子量小于8000的硫酸化粘多糖，且混合物中至少60%的级分分子量小于8000。

每mg干重药品的抗凝血因子Xa活性效价不得小于70IU，抗Xa活性/抗IIa活性比值不得小于1.5。



我国肝素产业的现状及技术发展需求：

- 1、首屈一指的肝素原料药生产及出口大国（占世界原料的60%以上），但其收益不到LMWH的1/10。
- 2、由于缺乏自主知识产权，持续以低价出口肝素、以高价进口LMWH以满足国内病人需求。
- 3、自20世纪90年代开始研制低分子肝素产品，目前能生产的企业有限，都采用传统化学裂解法，缺乏自主知识产权，市场占有率只有3%左右。
- 4、在国际上缺乏产品标准的发言权，一直处于受制于人的状况。

具有自主知识产权的LMWH及相关产品的高效清洁生产技术的基础研究和应用开发具有重要意义。

中国医药平台
www.ciyao.com

设为首页 加入收藏

首页 | 求购信息 | 供应信息 | 招商信息 | 代理信息 | 合作信息 | 招标信息 | 新药转让 | 产品展示
药交会 | 网上药店 | 新药报批 | 新特药 | OTC | 处方药 | 保健品 | 医疗器械 | 医保目录
管理机构 | 名医名院 | 企业名录 | 医药书店 | 政策法规 | 展会动态 | 行业动态 | 学术研讨 | 健康指南
消费资讯 | 医药营销 | 招标资讯 | 行业精英 | 医药社区 | 行业论坛 | 在线爱问 | 行业搜索 | 流通市场

抗血栓药物市场增长 洋品占优势国货当自强

www.Ciyao.com 2005-10-20 00:00:00 来源：中国医药报

【字体：大 中 小】 【打印本稿】 【查看评论】 【关闭】

密码
验证码 8079

[找回密码](#) [帮助中心](#)

中华人民共和国中央人民政府
The Central People's Government of the People's Republic of China

网站首页 | 今日中国 | 中国概况 | 法律法规 | 公文公报 | 政务互动 | 政府建设 | 政务要闻 | 人事任免 | 新闻发布

当前位置： 首页 >> 今日中国 >> 中国要闻

药监部门公布“肝素钠”药品不良事件最新调查情况

中央政府门户网站 www.gov.cn 2008年03月14日 来源：新华社

低分子量肝素的制备方法

■ 控制裂解法

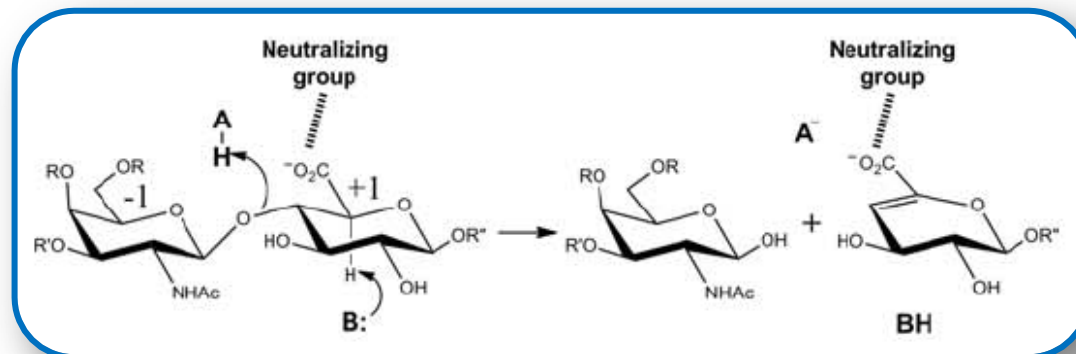
➤ 亚硝酸降解法、过氧化氢降解法、高碘酸氧化降解法、 β -消除裂解法

工业上常用的方法，收率25%–80%，解聚肝素反应剧烈，反应控制要求高，生产周期较长，环境污染严重。

➤ 酶控制降解法

反应条件温和、特异性高、反应效率高，环境友好，检测方便，适于低分子量及超低分子量肝素的制备，但市售酶的成本太高，难以产业化应用。

- 肝素多糖裂解酶——肝素酶 I (EC 4.2.2.7)、肝素酶 II (no EC number)、肝素酶 III (EC 4.2.2.8)



三种肝素酶的相似性

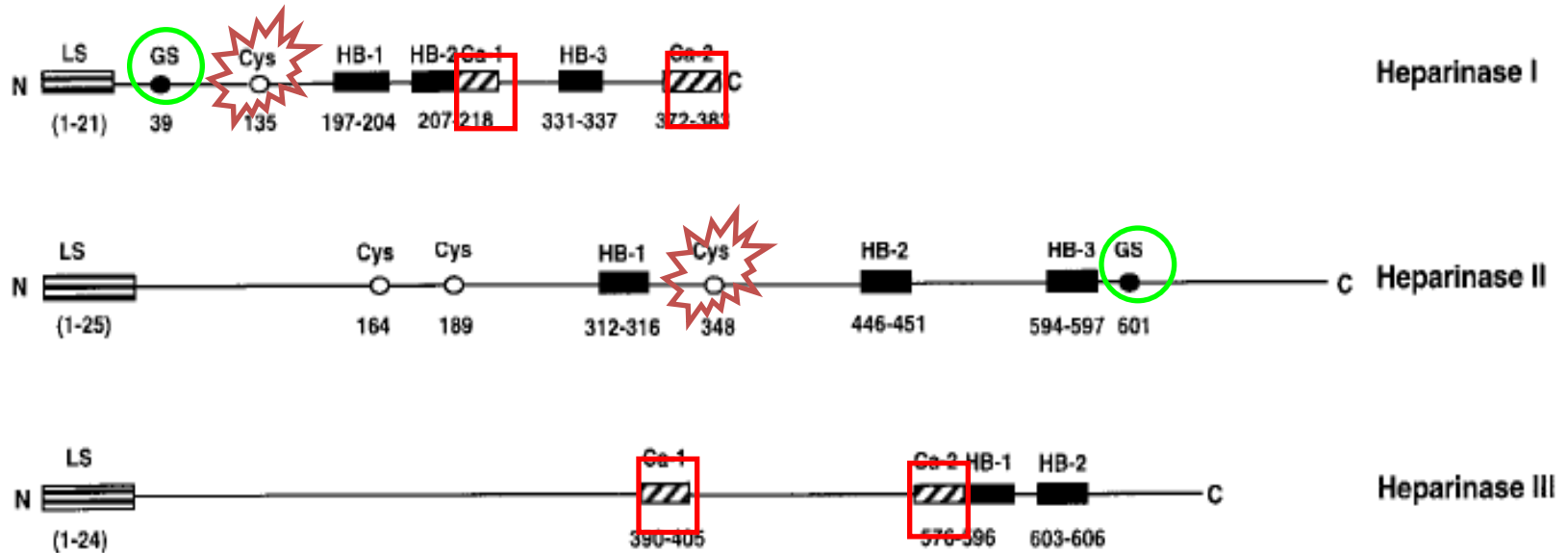


图1 来自肝素黄杆菌的肝素酶I, II, III的功能区域。

LS: 信号肽; GS: 糖基化位点; Cys: 半胱氨酸; Ca: 钙离子结合位点; HB: 肝素结合位点。

I, III 存在钙离子激活位点

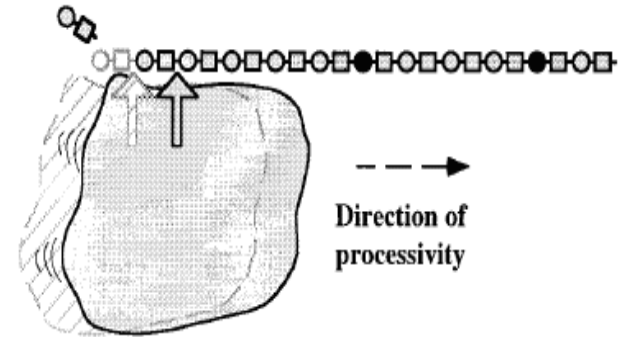
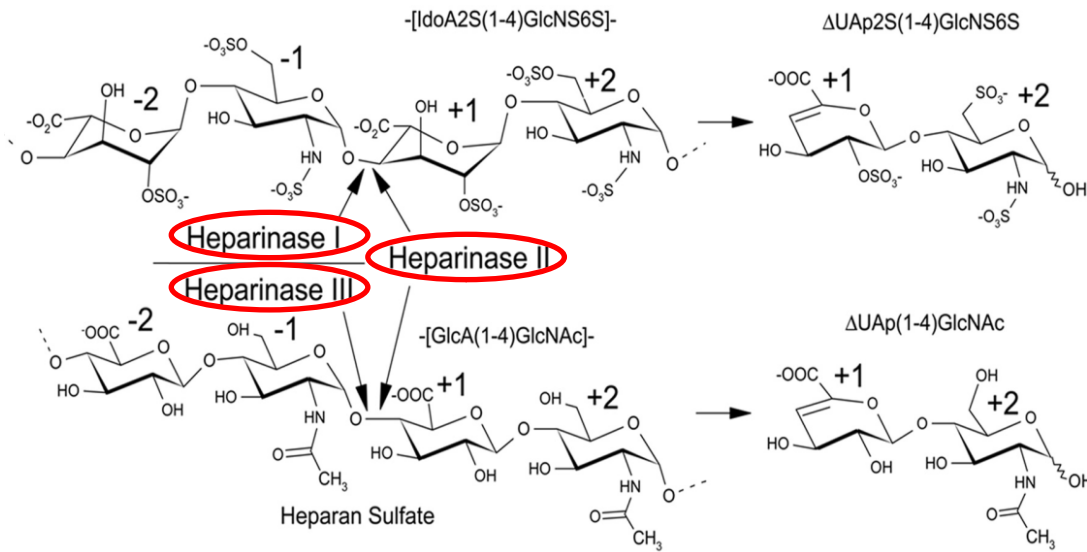
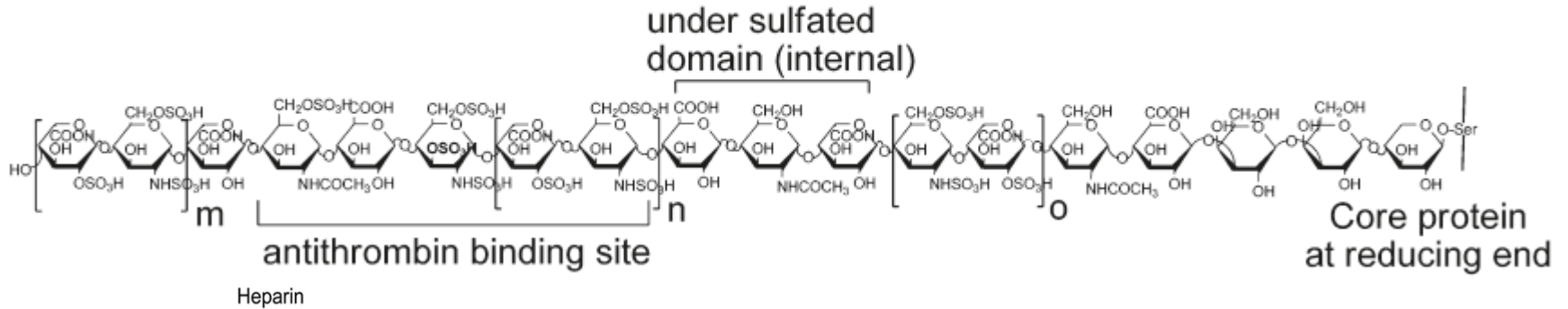
半胱氨酸可能是I, II催化活性所必需的氨基酸

I, II 存在糖基化位点

三种酶都存在底物肝素结合域

三种肝素酶的催化位点

Heparin ($m + n + o = 3 - 73$)



Ernst S, Rhomberg A J, Biemann K, et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, 98: 4182-4187

David shaya, et al. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(26): 20051-20061

Pojasek et al., Histidine 295 and histidine 510 are crucial for the enzymatic degradation of heparan sulfate by heparinase III [J]. Biochemistry, 2000, 39, 4012-4019

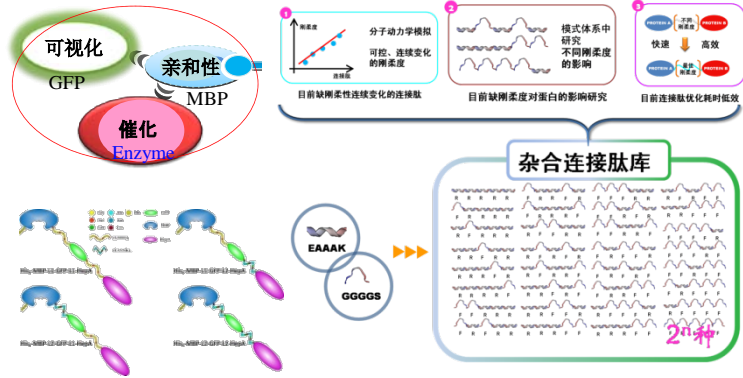
肝素酶 I、II、III 的裂解底物的示意图



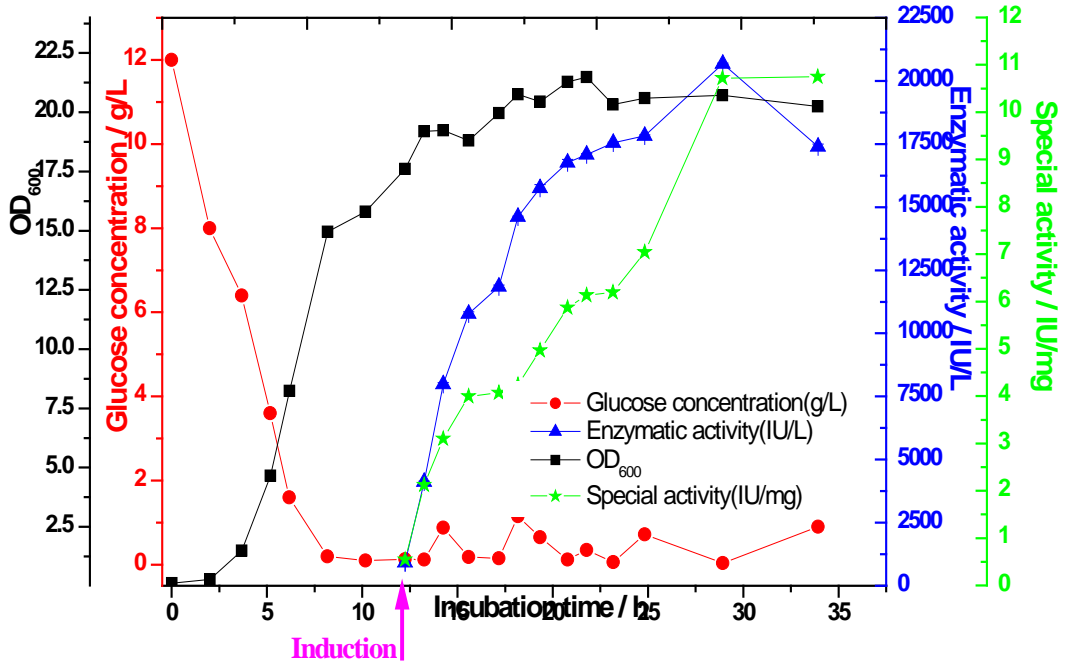
酶法生产低分子及超低分子量肝素存在的 关键问题及研究进展

- 肝素酶价格昂贵，制约LMWH生产经济性；
- 现有酶法制备工艺仅采用单一酶，产品活性控制困难；
 丹麦Leo Pharma采用单一肝素酶I降解肝素，非选择性降解肝素活性结构单元，影响LMWH活性；
- 缺乏酶法制备uLMWH的工艺过程及相关机理研究
- 尚无国际认可的酶法LMWH等效评估体系及质量标准。

清华大学拥有自主高活性融合肝素酶生产及其应用技术



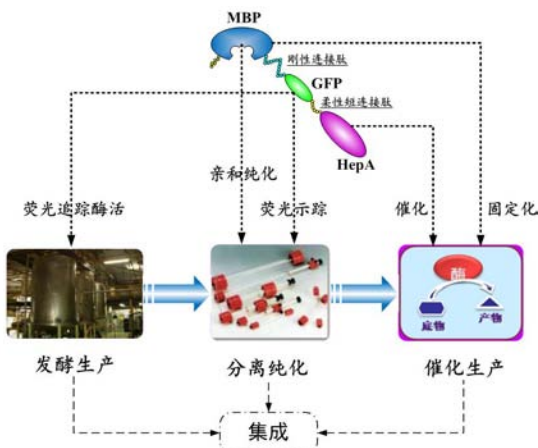
融合酶技术



融合肝素酶I酶活: **20652 IU/L** (纯化后140 IU/mg)

研制出和肝素产业相关的系列融合酶制剂:

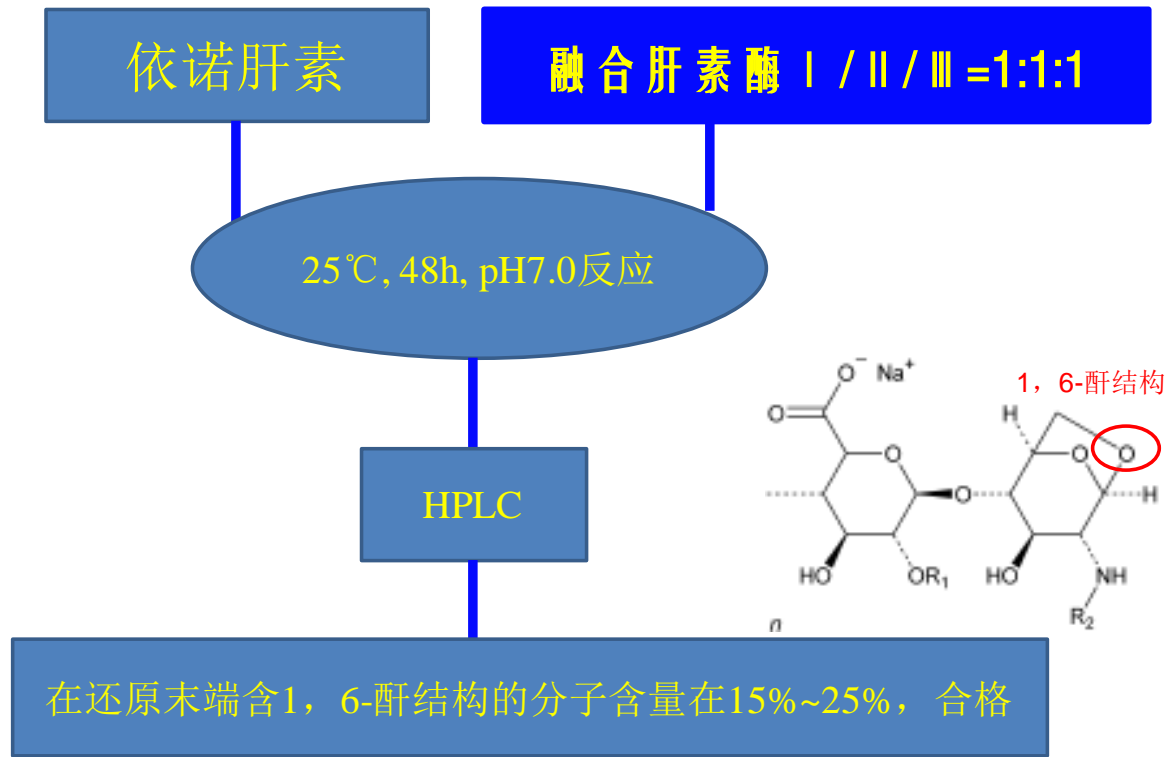
- 融合肝素酶I、II、III
- 融合硫酸软骨素酶AC和B
- 解决了热稳定性差的问题, 建立了大规模生产酶技术



李晔: 清华大学博士后出站报告 (2011)
叶逢春, 清华大学博士学位论文 (2010)
Yin Chen and Xin-Hui Xing, Fengchun Ye, Ying Kuang, and Mingfang Luo, Production of MBP-HepA fusion protein in recombinant *Escherichia coli* by optimization of culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 114-121 (2007)
叶逢春, 陈银, 邢新会, 重组大肠杆菌生产可溶性MBP融合肝素酶的培养条件优化. *生物加工过程*, 4 (3), 28-32 (2006)

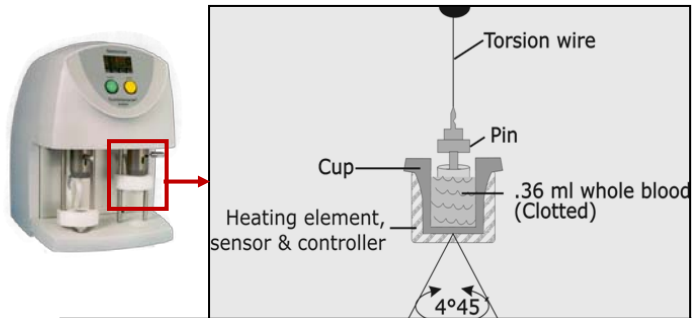
融合肝素酶在依诺肝素质量检测中的应用

国内主要肝素厂家质量控制均在使用本课题组的融合肝素酶，实现了系列肝素酶制剂的自主供给。

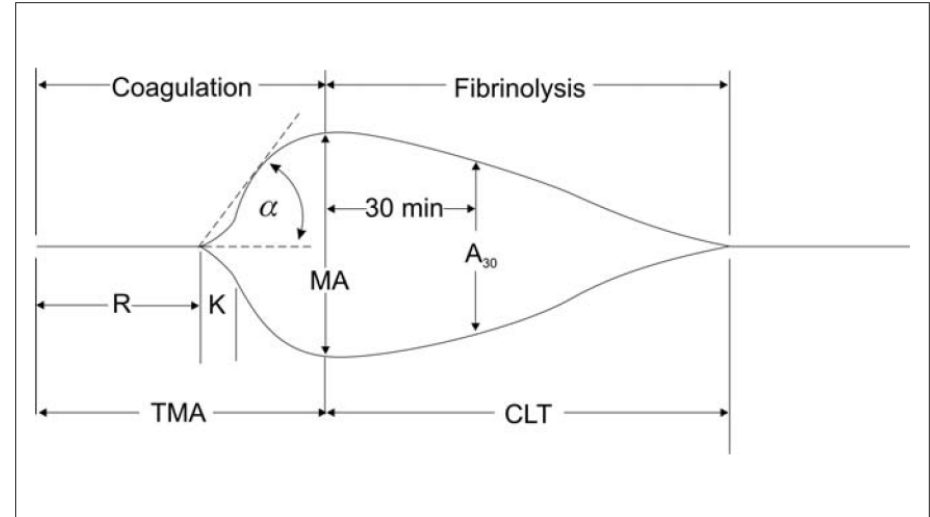


融合肝素酶在血液检测中的应用

TEG monitoring for blood

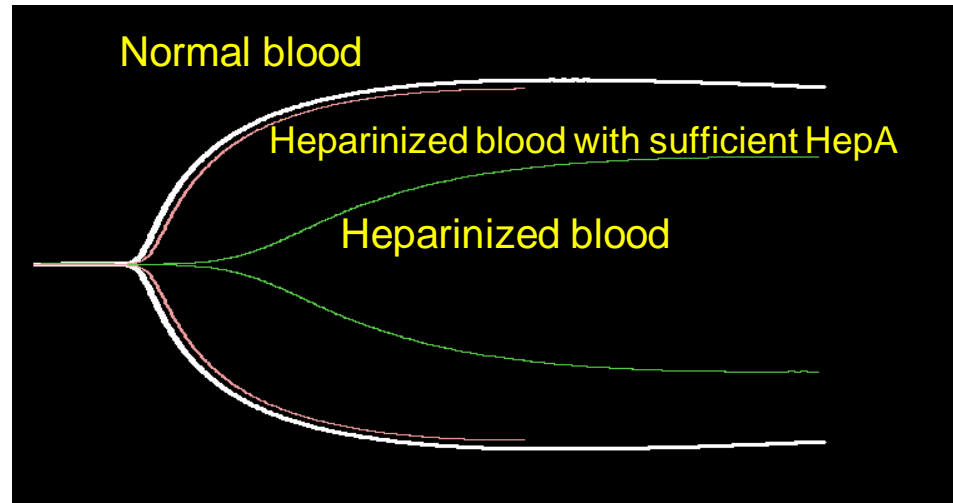


Hep A needed for removal of heparin in the blood

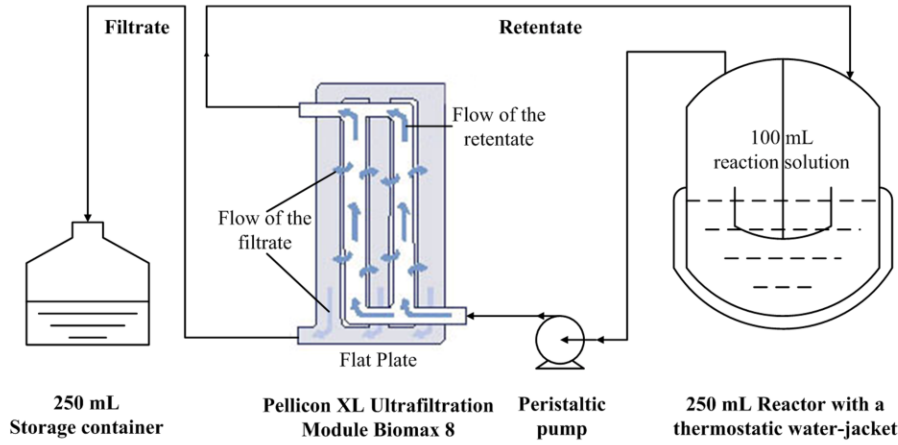


Monitoring of patient hemostasis is based on the two facts:

1. The end result of the hemostasis is a single product –the clot.
2. The clot's physical properties (rate, strength, and stability) will determine whether the patient will have normal hemostasis, will hemorrhage or will develop thrombosis.



融合肝素酶制备LMWH工艺放大



“十二五” 863项目入库



公斤级规模酶法制备LMWH中试装置



清华大学持有的融合肝素酶及其应用系列专利



1. 一种肝素酶I融合蛋白及其编码基因与表达方法
ZL200410038098.6
2. 一种表达肝素酶的方法及其专用表达载体
ZL200510090872.2
3. 一种制备低分子量肝素的方法 ZL200510088970.2
4. 一种制备超低分子量肝素的方法
ZL200910092339.8
5. 融合肝素酶及其编码基因与制备方法
ZL200910090166.6
6. 一种融合肝素酶及其编码基因 ZL200910090169.X
7. 融合肝素酶及其编码基因 ZL200910090167.0
8. 用于培养微生物表达肝素酶的培养基
ZL200810113259.1
9. 一种制备低分子量肝素的方法 ZL200810112768.2
10. 一种肝素酶II融合蛋白及其编码基因与表达方法
201010259905.2
11. 一种肝素酶III融合蛋白及其编码基因与表达方法
201010259913.7
12. 融合肝素酶及其编码基因与应用
PCT/CN2009/001152
13. 控制生产低分子量肝素的方法
201110303597.3



发表学术论文: 40余篇, 其中SCI论文10篇



清华大学技术成果鉴定

科学技术成果鉴定证书

报告编号: 201136000L110181

签字 [教SW2011] 第 008 号

科技查新报告

成果名称: 融合肝素酶及肝素酶生产低分子量肝素工艺



鉴定形式: 会议鉴定
组织鉴定单位: 教育部
鉴定日期: 2011年5月17日
鉴定批准日期: 2011年5月24日

(盖章)

项目名称: 融合肝素酶及肝素酶生产低分子量肝素工艺

委托人: 清华大学化学工程系 邢新会

委托日期: 2011年4月23日

查新机构(盖章): 教育部科技查新工作站 L11

查新完成日期: 2011年5月6日

中华人民共和国科学技术部

二〇〇〇年制

国家科学技术委员会

一九九四年制

鉴定会结论:

该项目历经八年研究与应用,在融合肝素酶分子设计、热稳定性机理研究和制备低分子量肝素等各个方面,取得了一系列创新性成果;开发了基于麦芽糖结合蛋白(MBP)的肝素酶I、II和III的可溶表达体系及制剂化技术,实现了融合肝素酶在肝素产品质量控制中的应用,突破了国外对肝素酶制剂的长期垄断,并证明了融合酶制备低分子量肝素的清洁工艺的实用性和应用潜力。本项目技术具有自主知识产权,整体达到了国际先进水平。

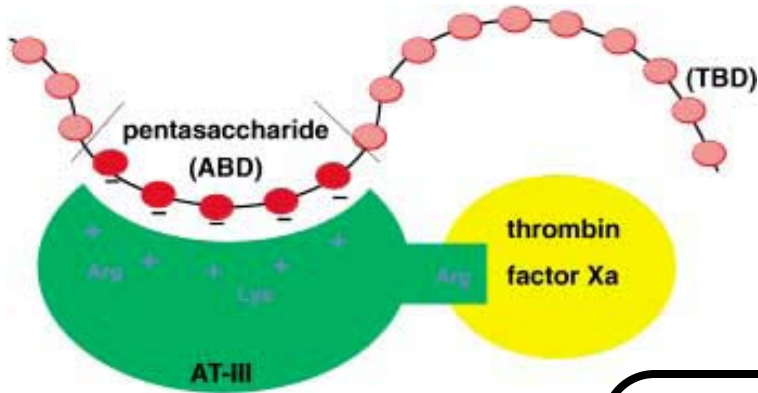
建议利用本项目的技术优势,集中应用领域,组织好推广应用。



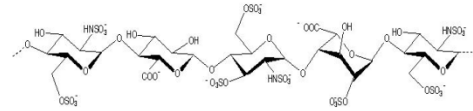
如何利用酶法制备出可控的高性能LMWH?

单一肝素酶vs组合肝素酶

LMWH的抗凝机制对酶解的要求



肝素抗凝机制



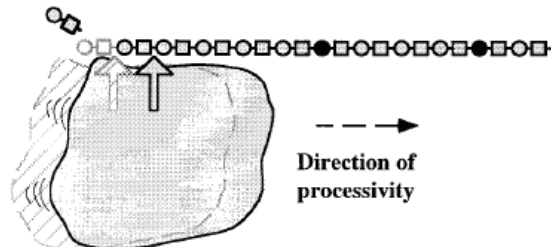
Structure of AT-III binding heparin pentasaccharide

1、对凝血活性因子Xa (FXa)的抑制作用

2、对凝血酶 (IIa) 的抑制作用

需要肝素五糖序列与FXa直接接触，对肝素无最低分子量上的要求。

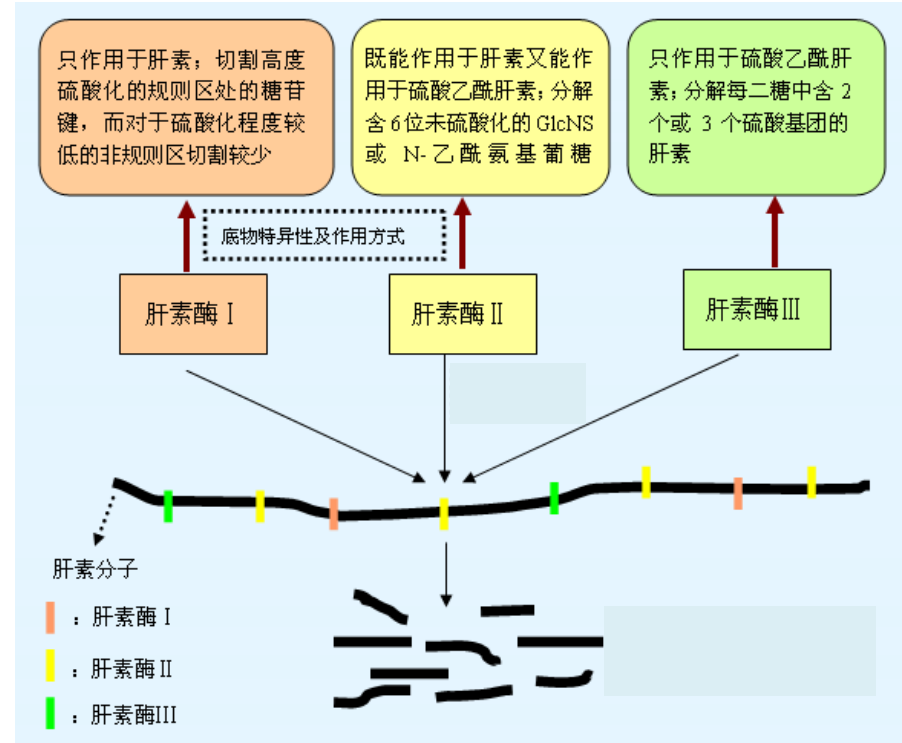
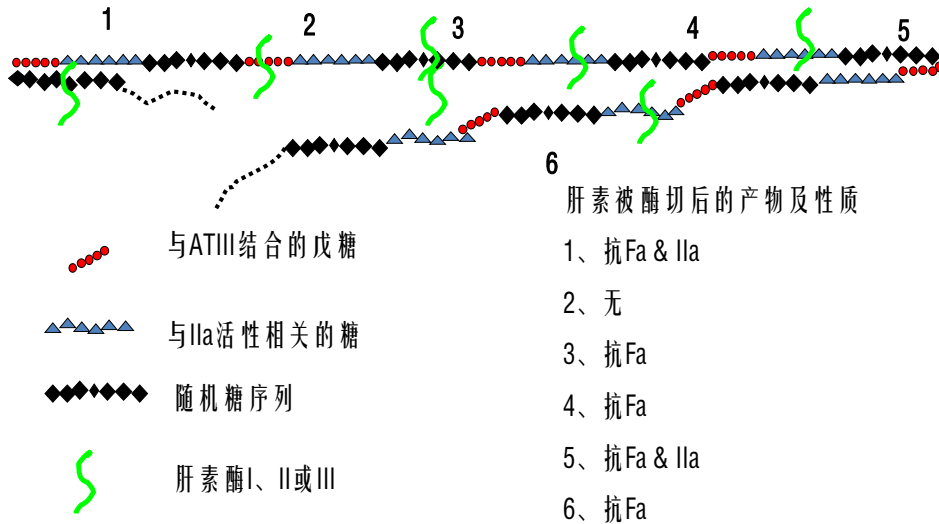
要求肝素五糖序列与AT-III的结合，还同时要求肝素与凝血酶的直接结合，需要肝素分子有足够的长度(至少18个单糖的长度，分子量为5000D左右)。



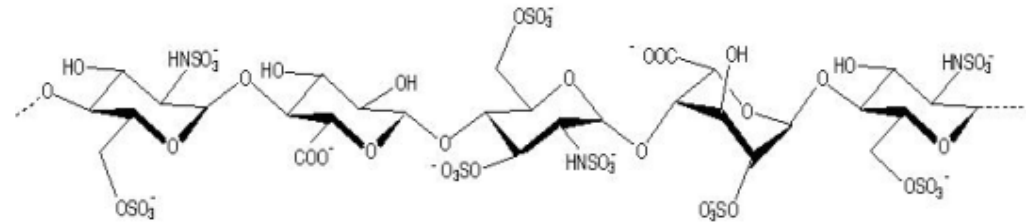
但国际上主要采用单一肝素酶I降解肝素，非选择性降解肝素活性结构单元，会影响LMWH活性

肝素酶解制备uLMWH的过程机理及工艺有待深入研究

不同肝素酶降解产物分布预测图



- 肝素酶 III 不会裂解五糖结构（可以保护抗FXa因子位点），但是能够达到使肝素分子量降低的目的
- 肝素酶 I、II 会裂解肝素的五糖结构，肝素酶 II 的裂解位点更多，所以肝素酶 I 更容易保护抗 IIa 因子位点



Structure of AT-III binding heparin pentasaccharide



MBP-Hep I 裂解

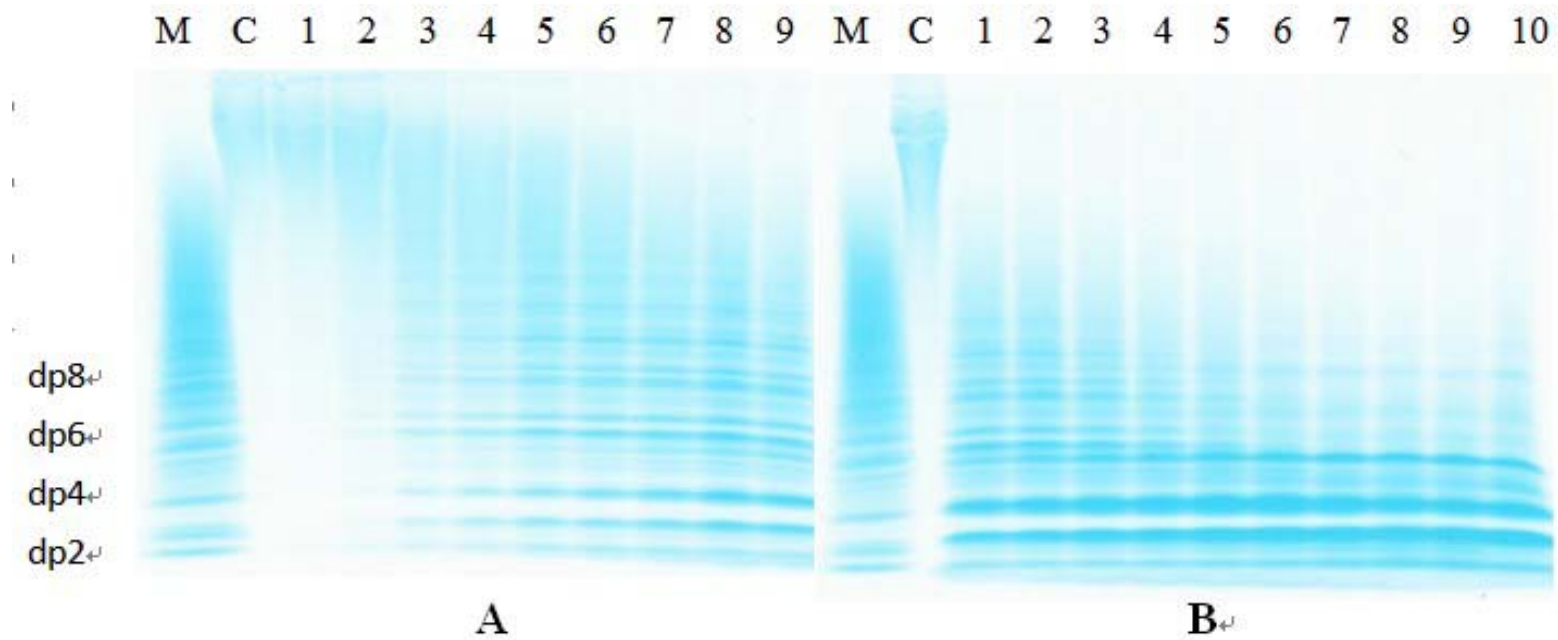
样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
1-1	9501	6738	1.41	40.000	186.97	11.274	176.97	3.5883	1.06
1-2	9135	6332	1.443	45.000					
1-3	8487	5729	1.481	53.000					
1-4	6856	4453	1.54	73.000	153.06	6.6085	87.618	3.8183	1.75
1-5	6018	3901	1.543	82.000					
1-6	5443	3559	1.529	87.000					
1-7	4871	3223	1.512	92.000	70.42	8.244	28.53	6.973	2.47
1-8	4237	2859	1.482	96.000					
1-9	4026	2727	1.472	97.000					
1-10	3867	2608	1.483	98.000	40.25	8.3474	5.3784	4.1493	7.48
1-11	3730	2552	1.462	98.000					
1-12	3232	2405	1.344	100.000					
1-13	3147	2361	1.333	100.000					
1-14	3131	2347	1.333	100.000					
1-15	2994	2290	1.308	100.000					
1-16	2976	2272	1.31	100.000					
1-17	2547	2097	1.215	100.000					
1-18	2399	2027	1.184	100.000					
1-19	2288	1976	1.158	100.000					
1极限					49.22	5.1944	0.4759	13.169	103.41

EP7.0规定：重均分子量（Mw）小于8000，其中分子量低于8000的肝素所占的质量分数不少于60%，抗Xa活性大于70U/mg，且抗Xa与抗IIa活性之比大于1.5。所以**1-4到1-7**满足要求



MBP-Hep I 裂解

多糖PAGE图谱



肝素用肝素酶 I 控制降解PAGE图。A: M为marker, C为精品肝素 (即样品1-1), 1-9分别为样品1-2到1-10; B: M为marker, C为精品肝素, 1-9分别为样品1-11到1-19, 10为肝素酶 I 彻底降解。



MBP-Hep II 裂解

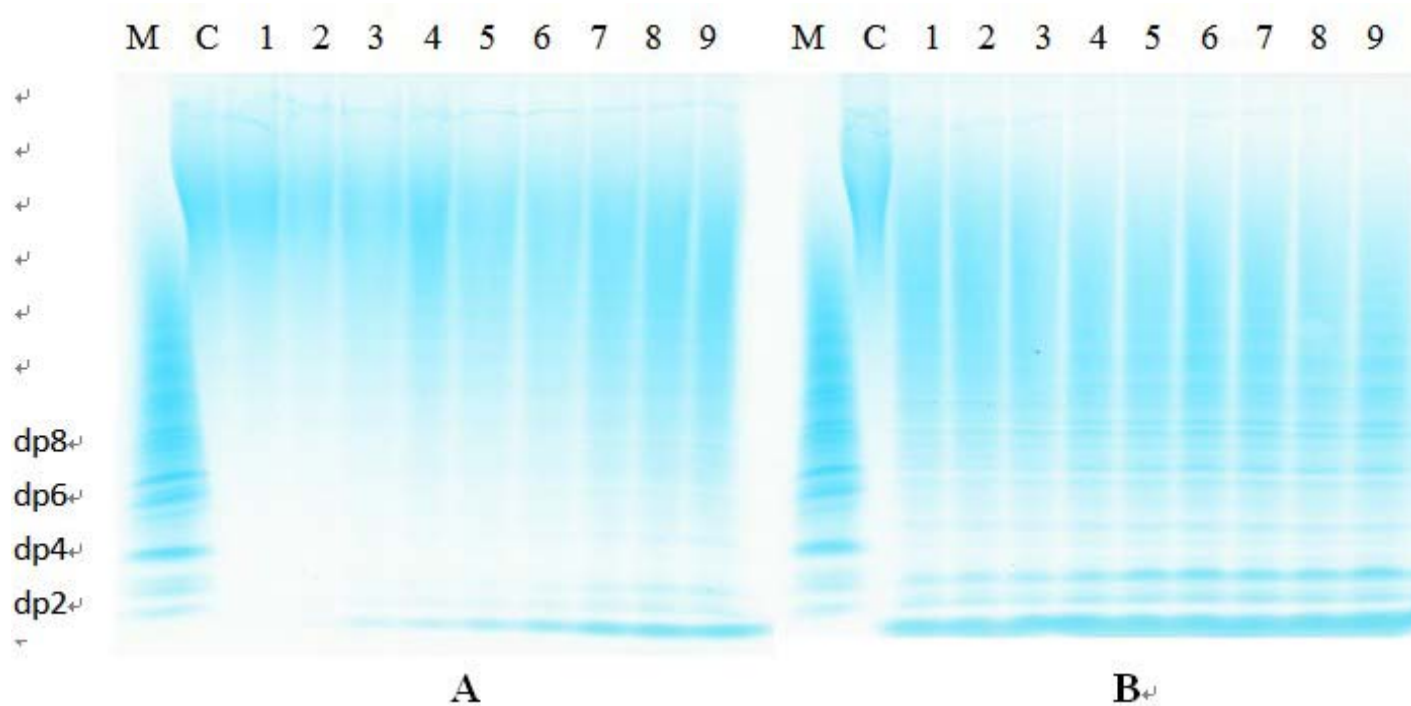
样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
2-1	9501	6738	1.41	40.00					
2-2	9425	6647	1.418	41.00					
2-3	9276	6482	1.431	43.00					
2-4	8685	5923	1.466	50.00					
2-5	8377	5644	1.484	54.00					
2-6	7958	5267	1.511	60.00	172.87	8.7466	114.2	10.932	1.51
2-7	7577	4963	1.527	65.00					
2-8	7087	4603	1.54	71.00					
2-9	6821	4429	1.54	74.00					
2-10	6442	4187	1.539	78.00	142.01	6.4469	75.449	11.216	1.88
2-11	6193	4015	1.543	81.00					
2-12	5993	3875	1.547	84.00					
2-13	5783	3743	1.545	86.00					
2-14	5147	3389	1.519	91.00	85.092	7.2691	30.3	11.274	2.81
2-15	4977	3310	1.504	92.00					
2-16	4952	3298	1.502	93.00					
2-17	4924	3284	1.5	93.00					
2-18	4874	3227	1.51	93.00					
2-19	4575	3080	1.485	95.00					

EP7.0规定：重均分子量（Mw）小于8000，其中分子量低于8000的肝素所占的质量分数不少于60%，抗Xa活性大于70U/mg，且抗Xa与抗IIa活性之比大于1.5。所以2-6到2-14满足要求



MBP-Hep II 裂解

多糖PAGE图谱



肝素用肝素酶 II 控制降解PAGE图。A: M为marker, C为精品肝素 (即样品2-1), 1-9分别为样品2-2到2-10; B: M为marker, C为精品肝素, 1-9分别为样品2-11到2-19。



MBP-Hep III 裂解

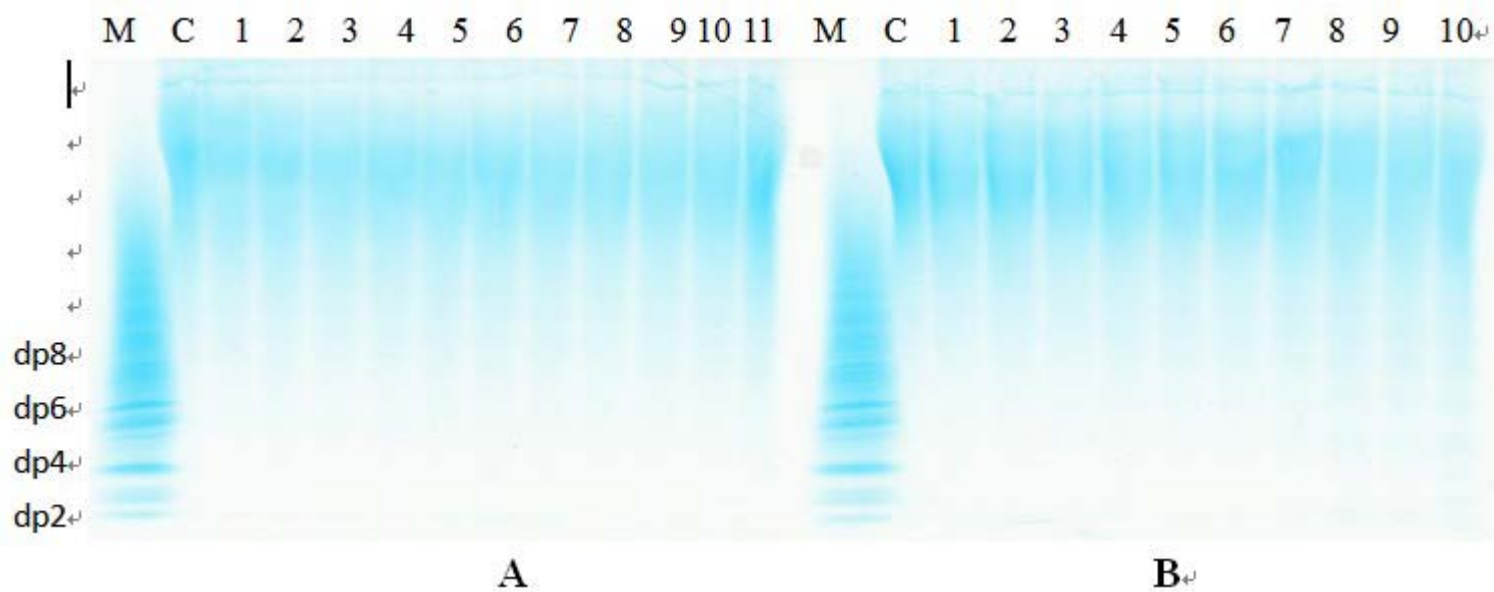
样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
3-1	8219	5806	1.416	46.75	170.10	6.1382	136.82	2.3378	1.24
3-2	8163	5613	1.454	48.26					
3-3	8239	5737	1.436	47.11					
3-4	8260	5858	1.41	46.39					
3-5	8344	5852	1.426	45.89	173.12	2.7302	139.98	3.269	1.24
3-6	8423	5957	1.414	44.98					
3-7	8523	6049	1.409	43.91					
3-8	8509	6041	1.409	44.09					
3-9	8541	6075	1.406	43.74	178.40	1.7144	142.37	6.1923	1.25
3-10	8371	5891	1.421	45.81					
3-11	8387	5916	1.418	45.63					
3-12	8384	5908	1.419	45.70					
3-13	8416	5938	1.417	45.40	185.21	7.3985	141.55	2.156	1.31
3-14	8475	5982	1.417	44.76					
3-15	8492	5988	1.418	44.66					
3-16	8490	5998	1.418	44.67					
3-17	8452	5959	1.418	45.19					
3-18	8413	5919	1.421	45.76					
3-20	7980	5315	1.501	51.96					
3-21	7938	5227	1.519	52.72					
3极限					218.91	5.0077	150.60	3.1501	1.45

EP7.0规定：重均分子量（Mw）小于8000，其中分子量低于8000的肝素所占的质量分数不少于60%，抗Xa活性大于70U/mg，且抗Xa与抗IIa活性之比大于1.5。所以单独用肝素酶III不能满足要求。



MBP-Hep III 裂解

多糖PAGE图谱



肝素用肝素酶 III 控制降解PAGE图。A: M为marker, C为精品肝素, 1-11分别为样品3-1到3-11; B: M为marker, C为精品肝素, 1-9分别为样品3-12到3-20,10为肝素酶 III 彻底降解



MBP-Hep III | 裂解

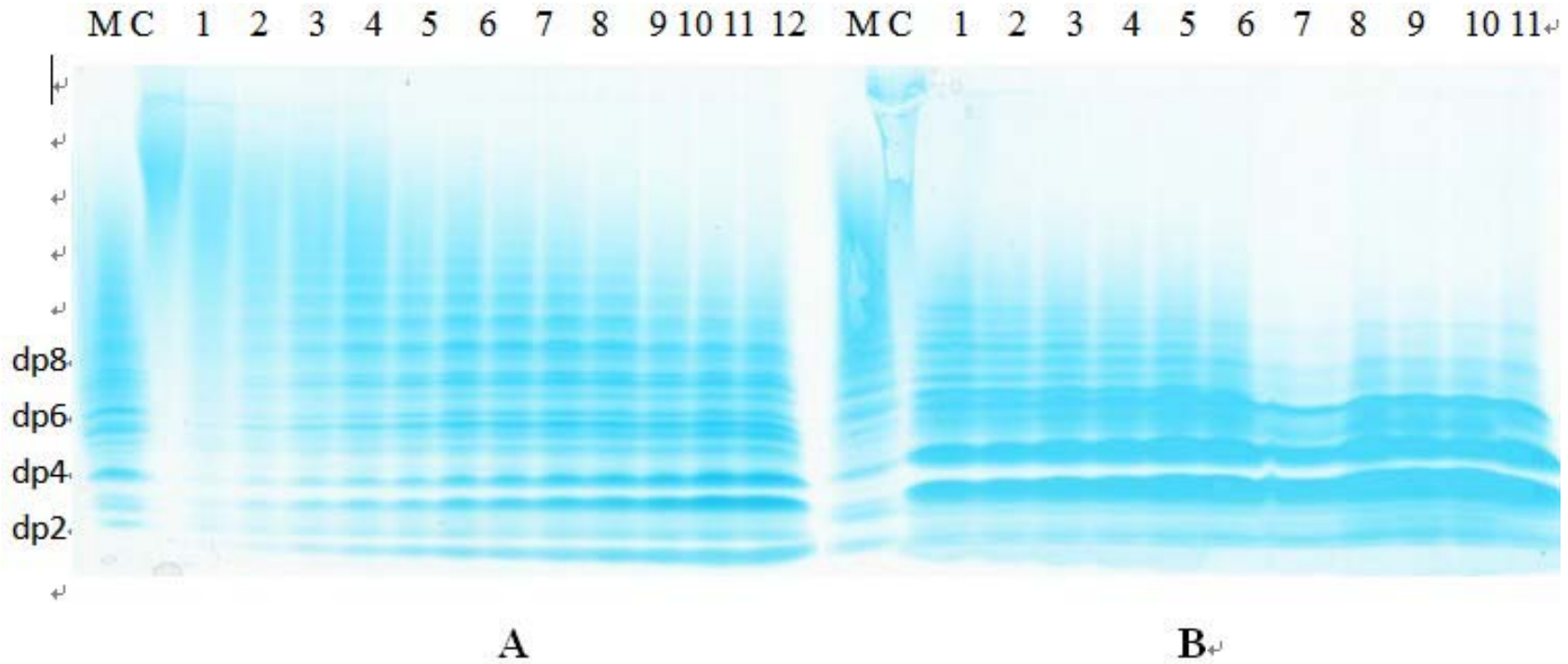
样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
31-0	7938	5227	1.519	52.72%					
31-1	6970	4107	1.697	65.41%	184.39	8.0488	115.10	4.822	1.60
31-2	5915	3127	1.892	78.05%	129.66	4.3799	75.78	5.5601	1.71
31-3	5240	2633	1.99	84.96%	117.44	5.7722	71.79	2.8076	1.64
31-4	4726	2313	2.043	85.52%	81.66	6.5917	52.36	3.474	1.56
31-5	4044	1938	2.087	94.20%	62.01	2.995			
31-6	3633	1728	2.102	96.17%	53.42	6.2379	22.08	7.0603	2.42
31-7	3091	1516	2.039	98.42%	44.93	4.9694			
31-8	2802	1392	2.012	99.02%	38.58	4.4752			
31-9	2666	1304	2.044	98.89%					
31-10	2376	1217	1.953	99.58%					
31-11	2095	1114	1.881	99.86%					
31-12	1969	1078	1.826	99.94%	23.87	5.4028	1.84	7.6035	13.01
31-13	1948	1060	1.838	99.94%					
31-14	1853	1018	1.82	99.96%					
31-15	1830	991	1.847	99.95%					
31-16	1583	943	1.678	100%					
31-17	1588	940	1.688	100%	15.05	6.7715	0.57	32.714	26.32
31-18	1531	907	1.688	100%					
31-19	1386	856	1.62	100%					
31-20	1196	805	1.487	100%					
31-21	1246	817	1.525	100%					
31-22	1236	812	1.522	100%	7.46	9.1311	0.42	27.743	17.61
极限					8.98	8.6306	0.28	36.418	32.08

样品31-1到31-4满足欧洲药典EP7的要求



MBP-Hep III | 裂解

多糖PAGE图谱



肝素先用用肝素酶 III 彻底降解，然后用肝素酶 I 控制降解PAGE图。

A: M为marker, C为精品肝素, 1-12分别为样品31-1到31-12;

B: M为marker, C为精品肝素, 1-11分别为样品31-13到31-22,11为肝素酶 III | 彻底降解。



MBP-Hep III II 裂解

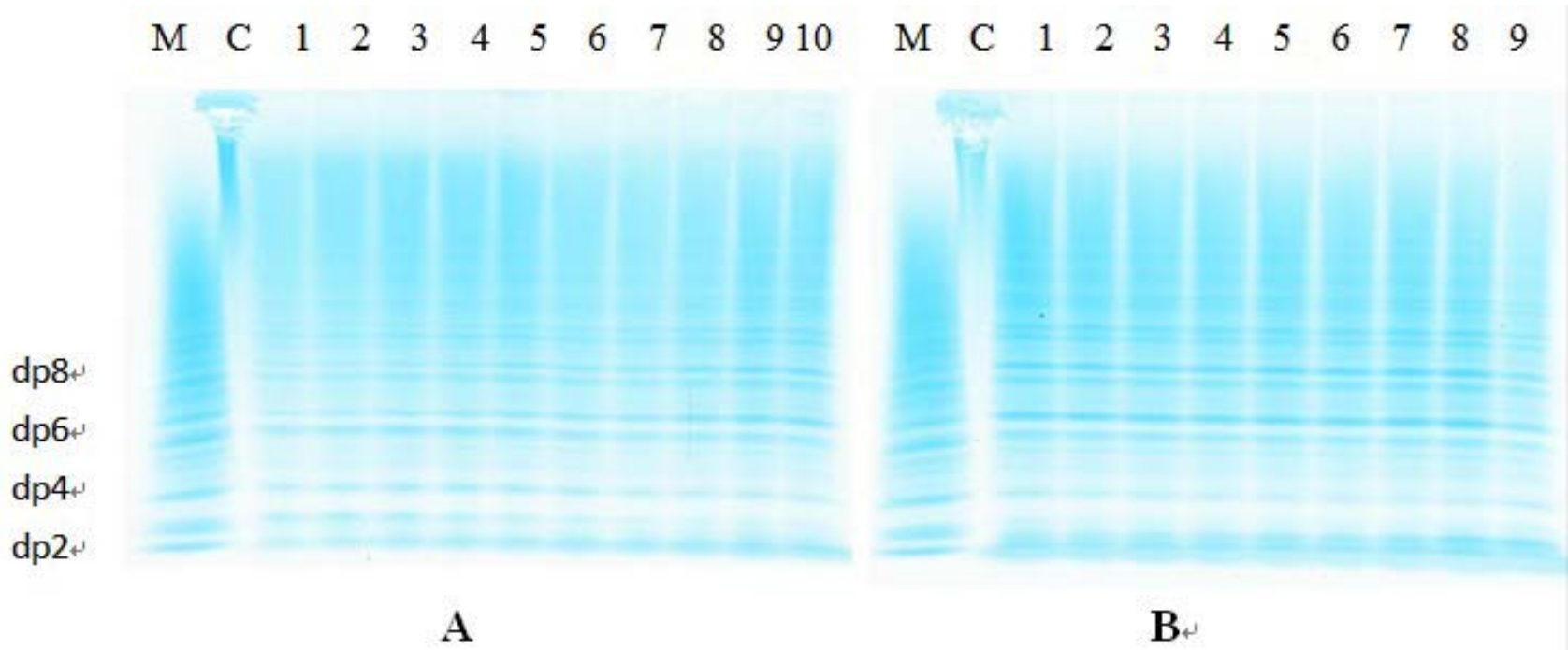
样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 800 0	抗Xa因子 (IU/mg)	平均可信 限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均可信限 率 (FL%)	抗Xa/抗 抗IIa
32-0	7938	5227	1.519	52.72%					
32-1	6309	4119	1.532	78.00%	169.94	9.2457	77.228	8.2169	2.20
32-2	6210	4052	1.533	80.00%					
32-3	6063	3959	1.531	81.00%					
32-4	5972	3903	1.53	82.00%					
32-5	5861	3835	1.528	83.00%	151.35	10.299	77.127	6.3126	1.96
32-6	5770	3772	1.53	84.00%					
32-7	5651	3706	1.525	85.00%					
32-8	5541	3646	1.52	87.00%					
32-9	5439	3581	1.519	88.00%	123.69	5.9866	51.091	6.7643	2.42
32-10	5365	3533	1.518	88.00%					
32-11	5287	3490	1.515	89.00%					
32-12	5143	3402	1.512	90.00%					
32-13	5066	3364	1.506	91.00%					
32-14	4956	3308	1.498	91.00%					
32-15	4928	3284	1.5	92.00%					
32-16	4884	3257	1.5	92.00%					
32-17	4789	3205	1.494	93.00%					
32-18	4490	3032	1.481	95.00%					

样品32-1到32-9满足欧洲药典EP7的要求



MBP-Hep III II 裂解

多糖PAGE图谱



肝素先用用肝素酶Ⅲ彻底降解，然后用肝素酶Ⅱ控制降解PAGE图。A：M为marker, C为精品肝素，1-10分别为样品32-1到32-10；B：M为marker, C为精品肝素，1-8分别为样品32-11到32-18,9为肝素酶ⅢⅡ彻底降解。



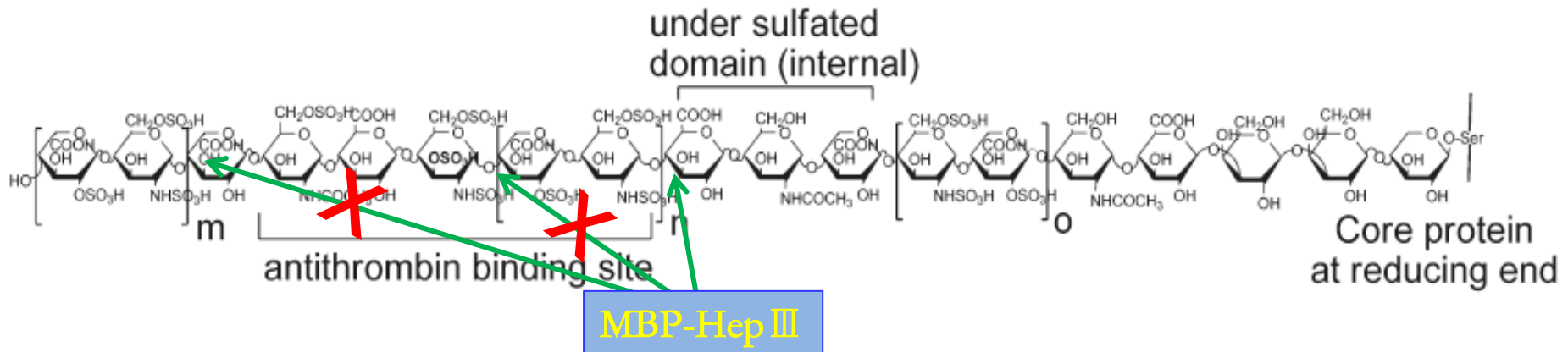
三种肝素酶降解过程分析

MBP-Hep III 裂解肝素分析

样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
3-5	8344	5852	1.426	45.89%	173.1223	2.7302	139.9844	3.269	1.236726
3-9	8541	6075	1.406	43.74%	178.4045	1.7144	142.3663	6.1923	1.253137
3-13	8416	5938	1.417	45.40%	185.2085	7.3985	141.5503	2.156	1.308429

随着MBP-Hep III 降解的进行，抗Xa/抗IIa比值缓慢增加，说明MBP-Hep III 会降解更有利于保护低分子肝素的抗Xa活性。

Heparin ($m + n + o = 3 - 73$)



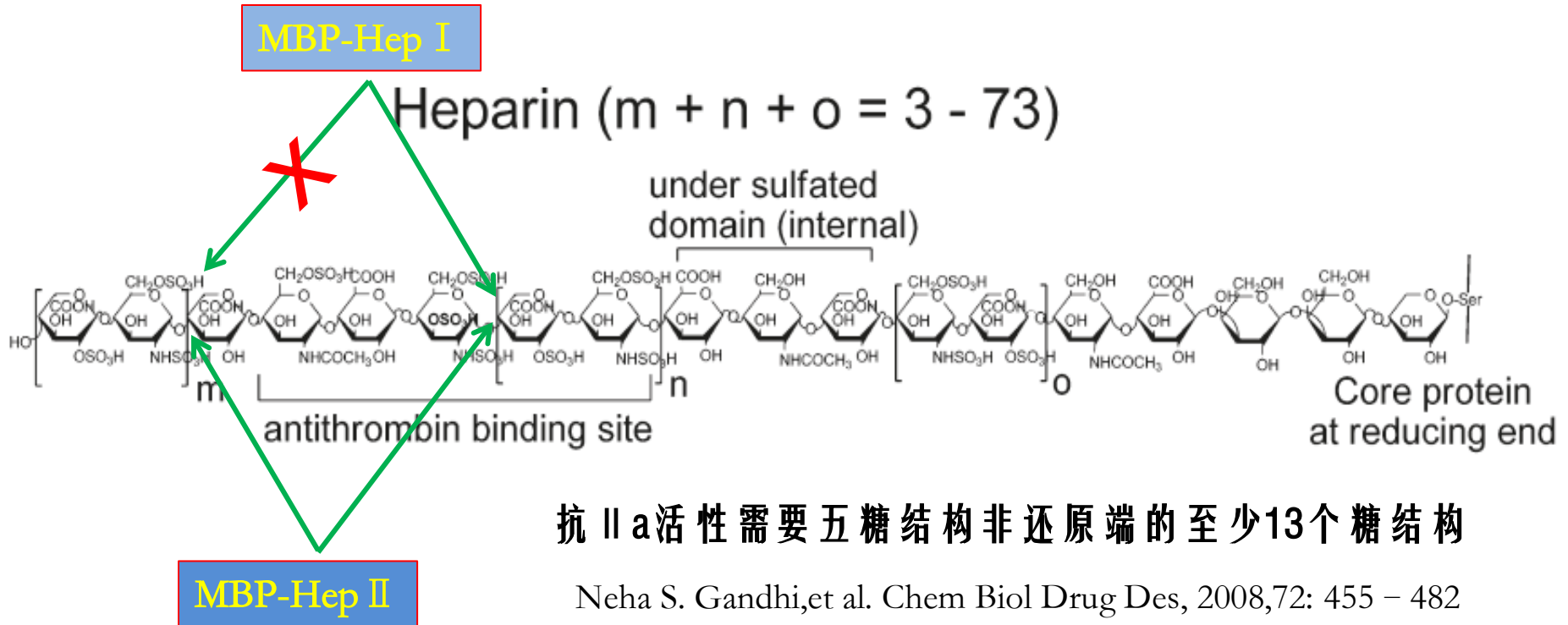
随着MBP-Hep III 逐渐裂解肝素，不破坏无糖结构，而且可能使五糖结构更容易与AT-III 结合而可能增强低分子肝素的抗Xa活性



MBP-Hep I 与MBP-Hep II 裂解肝素比较

样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均可信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
1-7	4871	3223	1.512	92.000	70.416	8.244	28.53	6.973	2.47
2-14	5147	3389	1.519	91.00	85.092	7.2691	30.3	11.274	2.81

样品1-7的分子量比2-14的分子量要小，但是1-7的抗Xa/抗IIa值也比2-14的抗Xa/抗IIa值也小，也就是说用MBP-Hep II 裂解抗Xa/抗IIa值增大的速度比MBP-Hep I 裂解要快，说明用MBP-Hep I 裂解更有利于保护低分子肝素的抗IIa活性。



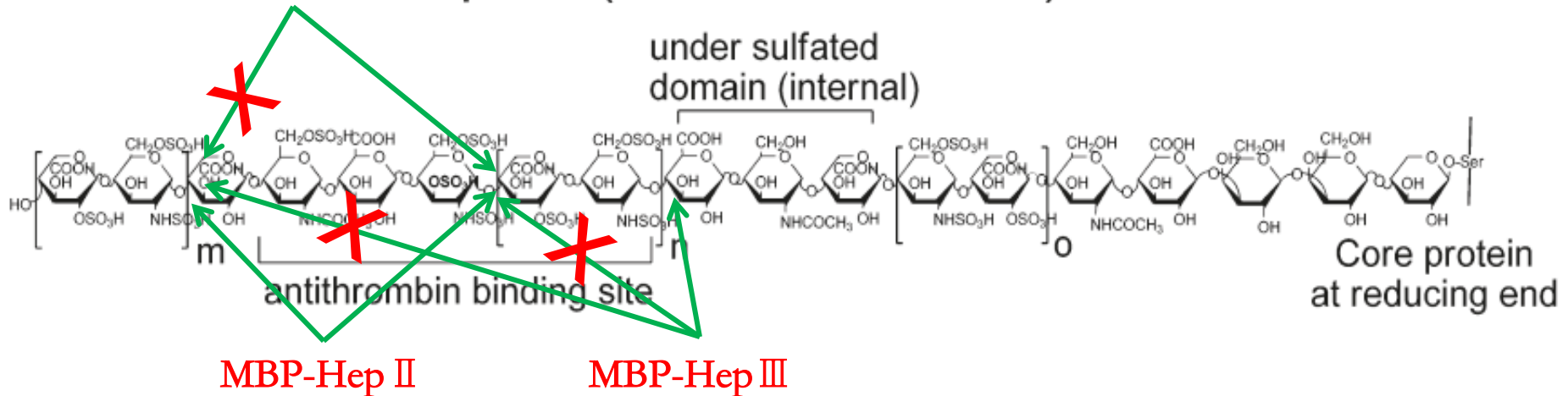


MBP-Hep III I 与 MBP-Hep III II 裂解肝素比较

样品	Mw	Mn	多分散性	Mw < 8000 (%)	抗Xa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗IIa因子 (IU/mg)	平均信限率 (FL%)	抗Xa/抗IIa
31-3	5240	2633	1.99	84.96%	117.4439	5.7722	71.78637	2.8076	1.63602
31-4	4726	2313	2.043	85.52%	81.66489	6.5917	52.35684	3.474	1.559775
31-6	3633	1728	2.102	96.17%	53.42431	6.2379	22.07946	7.0603	2.419638
32-5	5861	3835	1.528	83.00%	151.35	10.299	77.127	6.3126	1.962348
32-9	5439	3581	1.519	88.00%	123.69	5.9866	51.091	6.7643	2.420974

样品32-5与31-3、31-4的比较以及32-9与31-3、31-4、31-6的比较可以发现，前者的分子量大，但是抗Xa/抗IIa值也大，说明MBP-Hep III /MBP-Hep I 组合降解比MBP-Hep III /MBP-Hep II 组合降解对于保护低分子肝素的抗IIa活性要好，也就是说在同样的分子量情况下，抗Xa活性相同，但是MBP-Hep III /MBP-Hep I 组合降解的抗IIa活性要高

MBP-Hep I Heparin ($m + n + o = 3 - 73$)

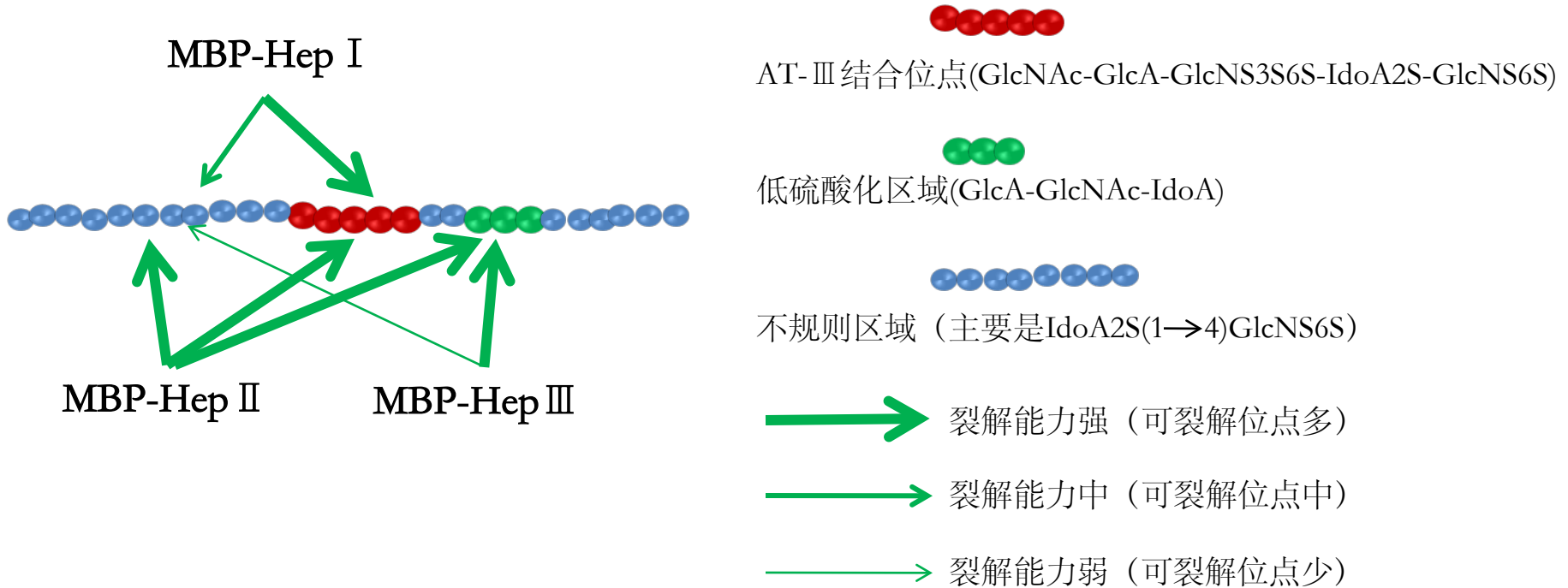




三种肝素酶及其组合制备LMWH总结

三种肝素酶降解肝素总结

MBP-Hep III 有利于保护低分子肝素的抗Xa活性，但是达不到低分子肝素的要求；MBP-Hep I 相对于MBP-Hep II 来说保护抗Xa活性能力相同，但是保护抗IIa活性要好，所以MBP-Hep III +MBP-Hep I 是生产低分子肝素的最好组合。



组合酶法裂解肝素制备低分子量肝素概念图



酶法制备LMWH/uLMWH技术总结与展望

- 组合肝素酶制备LMWH技术具有清洁性、可控性及高效性，结合拥有自主知识产权的高效肝素酶制备技术，组合肝素酶制备LMWH技术具有发展和推广应用的成熟条件。
- 针对酶法制备LMWH和uLMWH，国内外尚无可靠的等效评估体系及质量标准。
与中国海洋大学张丽娟教授和于广利教授合作研发等效评估方法，提出质量标准。
- 推动组合肝素酶法制备LMWH技术的发展，建立新的标准体系。

低分子量肝素：

- 欧洲药典7.0
- 美国药典33（于2008年6月18和2009年10月1号对USP进行了两次修订）
- 中国药典2010



致 谢

- 感谢中国海洋大学于广利教授在糖结构分析方面的大力支持
- 感谢中国海洋大学张丽娟老师的讨论和帮助
- 感谢国家自然科学基金重点项目[No.20336010和20836004]对本课题提供资助
- 感谢陈银、况莹、薛园、叶逢春、陈硕、黄子亮、吴敬君同学的刻苦努力
- 感谢张翀博士、李晔博士、蒋培霞博士、苏楠博士、梅祥研究助理
- 感谢相关合作企业给予的大力支持



谢谢！