



FI000089943B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****89943**G (17) Patentti ja rekisteri
Patent published 10 10 1986

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12P 19/04, C 08B 37/10, C 12M 1/34

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	871909
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	29.04.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	29.04.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	31.10.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.93
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
30.04.86 DK 1968/86 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Nielsen, Joergen Ilum, Gedebacken 9, 3520 Farum, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Pienimolekyyliipainoisen hepariinin valmistusmenetelmä
Förfarande för framställning av heparin med låg molekylvikt**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 2945595 (C 08B 37/10), US A 4351938 (C 08B 37/10), US A 4396762 (C 08B 37/10)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä oleva keksintö koskee pienimolekyyliipainoisen hepariinin (LMW-hepariinin) valmistamista heparinaasilla suoritettavan hepariinin entsymaattisen depolymeroinnin avulla, jossa menetelmässä hepariinia syötetään jatkuvasti depolymerointivyöhykkeeseen, depolymeroitu LMW-hepariini ultrasuodatetaan, pidättynyt jae kierrätetään uudelleen depolymerointivyöhykkeeseen ja LMW-hepariini kerätään suodoksesta. Menetelmä tekee mahdolliseksi LMW-hepariinin valmistamisen, jolla hepariinilla on haluttu molekyylipaino ja alhainen polydispergoituminen kapeissa rajoissa, siten että käytetään LMW-hepariinivalmisteen molekyylipainon ja polydispergoitumisen jatkuvaa tai usein suoritettavaa mittausta sekä depolymerointireaktion menetelmäparametrien korjausta, niin että estetään molekyylipainon ja polydispergoitumisen poikkeamat halutuista arvoista.

Föreliggande uppfinning avser framställningen av heparin med låg molekylvikt (LMW-heparin) medelst enzymatisk depolymerisering av heparin med heparinas, i vilket förfarande heparin kontinuerligt inmatas i en depolymeriseringszon, det depolymeriserade LMW-heparinet ultrafiltreras, retentatet återcirkuleras till depolymeriseringszonen och LMW-heparinet tillvaratas från filtratet. Processen möjliggör framställning av LMW-heparin med önskad molekylvikt och låg polydispersitet inom snäva gränser, så att kontinuerlig och ofta förekommande mätning av molekylvikten och polydispersiteten av LMW-heparinprodukten och korrektion av processparametrarna av depolymeriseringsreaktionen utförs för att motverka avvikelser i molekylvikten och polydispersiteten från önskade värden.

Pienimolekyyllipainoisen hepariinin valmistusmenetelmä

esillä oleva keksintö koskee pienimolekyyllipainoisen hepariinin (LMW-hepariinin) valmistusmenetelmää, jossa käytetään hepariinin entsymaattista depolymerointia.

Tavanomainen hepariini on mukopolysakkaridien heterogeeninen seos, jonka molekyyllipainoalue on 5000-50000 daltonia ja lukukeskimääräinen molekyyllipaino on noin 10-14000 daltonia.

Hepariini vaikuttaa suoraan tai epäsuorasti joukkoon proteiineja, erityisesti hyytymisjärjestelmän entsyymeihin.

Monet tekijät vaikuttavat hepariinin tehoon, kuten esimerkiksi toiminnallisten ryhmien jakaantuminen molekyyllissä ja molekyyllipaino. On varmasti todettu, että viimeksi mainitulla seikalla on tärkeä osuus hepariinin aktiivisuudessa, erityisesti antitrombiini III:n välittämässä trombiinin ja tekijä Xa:n inaktivaatiossa.

Antitrombiiniaktiivisuus edellyttää hepariinin vähimmäismolekyyllipainoa, joka vastaa noin 18 monosakkaridia, se on noin 5400 daltonia, kun taas tekijä Xa:ta estävä aktiivisuus voidaan osoittaa hepariinimolekyyleillä, jotka ovat 5-6 sakkaridiyksikön mittaisia, kooltaan 1500-1800 daltonia.

Hepariinin molekyyllipaino vaikuttaa voimakkaasti hepariinin muiden vaikutusten sarjaan, esimerkiksi antitromboottiseen tehoon (hepariinin oligosakkarideilla, jotka sisältävät monosakkarideja 18 tai sitä vähemmän, näyttää olevan heikko antitromboottinen aktiivisuus), vaikutukseen, joka kohdistuu ADP:n indusoimaan trombosyyttien aggregaatioon, biologiseen hyväksikäytettävyyteen ihon alle suoritettun annostelun jäl-

keen, PF⁴:n ja HRG:n inhiboitumiseen sekä aktiivisuuteen sisäisen järjestelmän hyytymisentsyymeitä kohtaan, jotka entsyymit vastaavat tekijä Xa:n muodostumisesta.

Viime vuosina mielenkiinto on kohdistunut hepariinifragmentteihin tai -jakeisiin, joilla on korkea XaI/antitrombiiniaktiivisuus ja joiden molekyylipaino on 4000 daltonista ylöspäin 6000 daltoniin saakka, koska sellaisilla aineilla on ilmoitettu olevan hyvä antitromboottinen teho ja samanaikaisesti vähän tai ei ollenkaan taipumusta aiheuttaa vuotokomplikaatiota. Niiden biologinen hyväksikäytettävyys on myös kohonnut, erityisesti ihonalaisen annostelun jälkeen.

Koska hepariinin vaikutuksen selektiivisyys korreloi molekyylipainon kanssa, on todennäköistä, että on olemassa suhteellisen kapea molekyylipainon alue, jolla hepariinin aktiivisuus on suotuisin.

Sen tähden menetelmä LMW-hepariinin valmistamiseksi, jolla on spesifinen, haluttu molekyylipaino ja kapea molekyylipainon jakauma, esimerkiksi alhainen polydispergoituminen, olisi edullinen.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä tekee mahdolliseksi saada hepariinista depolymerointituotteen mikä tahansa haluttu molekyylipainon alue.

LMW-hepariinia voidaan valmistaa alhaisin saannoin fraktioimalla tavanomaista hepariinia (DOS-2 944 792 ja 2 945 595). Melkein kaikki LMW-hepariinista valmistetaan kuitenkin hepariinin depolymeroinnin avulla, joka suoritetaan kemiallisin tai entsyymaattisin menetelmin, minkä jälkeen suoritetaan fraktiointi, jos se on tarpeen (vrt. A. Horner, Heparin, Kakkar, julkaisija Thomas, 1976, ja Perlin et al. Carbohydrate Res. 18 185 (1971)).

Hepariinin kemiallista depolymerointia kuvataan julkaistuissa EP-patenttihakemuksissa 0 037 319, 0 076 279 ja 0 014 184, US-patentissa 4 351 938 sekä GB-patentissa 2 002 406.

Entsymaattista depolymerointia kuvataan US-patentissa 3 766 167, GB-patentissa 2 002 406, julkaistussa EP-patenttihakemuksessa 0 014 184 sekä US-patentissa 4 396 762.

Pääasiallinen ongelma, joka on luonteenomainen kaikille erinä suoritetuille depolymerointimenetelmille, on polymerointi-reaktion pysäyttäminen oikean keskimääräisen molekyylipainon kohdalla. Ennen kaikkea, depolymerointireaktio antaa tulokseksi hepariinifragmentteja, jotka ovat pienempiä tai suurempia kuin haluttu molekyylipaino, vieläpä sivureaktioiden puuttuessa.

Hepariinin depolymerointiin käytetyissä, tunnetuissa depolymerointireaktioissa, joissa käytetään epäorgaanisia depolymerointireagensseja (typpihappoa, vetyperoksidia, jne.), ei ole mitään etusijaa käsiteltävän molekyylin koon tai pilkottavan sidoksen sijainnin suhteen molekyylin sisällä. R.J. Linhardtin et al. mukaan, Biochem. Biophys. Acta 702 (1982) 197-203, ei edes heparinaasientsyymi tee mitään eroa toimintatansa suhteen, vaan se on satunnaisesti endolyyttinen.

Tämä tarkoittaa, että hepariinin jokaisen depolymerointiseoksen polydispergoituminen kehittyy statistisesti ennustettavissa olevalla tavalla depolymeroitumisasteen funktiona. Eri-tyisesti ajankohtana, jolloin keskimääräinen molekyylipaino on juuri halutun arvon yläpuolella, suurella osalla fragmentteja on haluttu molekyylipaino, mutta depolymeroinnin satunnaisen endolyyttisen luonteen vuoksi niillä on myös suhteellisesti suurempi mahdollisuus depolymeroitua edelleen, jolloin muodostuu fragmentteja, joiden koko on optimi koon alapuolella.

Jos halutaan kapeampaa molekyylipainon jakaumaa LMW-hepariinivalmisteissa, depolymerointiseos täytyy fraktioida, esimerkiksi fragmentit, joilla on suurempi tai pienempi molekyylipaino, erotetaan ja heitetään pois. Tämä merkitsee saantotappiota ja kalliin hepariinilähtöaineen hukkaa.

Esillä olevan keksinnön eräänä kohteena on antaa käyttöön menetelmä, jolla saadaan LMW-hepariinin depolymerointiseoksen kapea molekyylipainojakauma ilman saantotappiota ja lähtöaineen hukkaa.

LMW-hepariinivalmiste, jolla on kapea molekyylipainon jakauma, saatetaan saada jatkuvan menetelmän avulla, jossa poistetaan fragmentit, joilla on haluttu molekyylipaino, niin nopeasti kuin mahdollista, jotta estetään niiden lisädepolymeroituminen. Tämä voidaan suorittaa depolymerointireaktioseoksen jatkuvan fraktioinnin avulla depolymeroinnin aikana, suodatuksen avulla, käyttämällä selektiivistä suodatuksen väliainetta, joka sallii molekyylien, joilla on haluttu molekyylipaino, läpäistä suodattimen, kun taas suurimolekyylisempi materiaali (entsyymi mukaanluettuna) kierrätetään uudelleen lisädepolymerointia varten.

Monissa kokeissa on kuitenkin havaittu, että molekyylipaino hepariinifragmenteilla, jotka pystyvät läpäisemään ultrasuodatusmembraanin, riippuu voimakkaasti pidätyvän nesteen hepariinikonsentraatiosta. Pidätyvän nesteen hepariinikonsentraation ollessa korkeampi, fragmenttien molekyylipaino saadussa suodoksessa on suurempi.

Myös muut parametrit, kuten esimerkiksi pidätyneen jakeen keskimääräinen molekyylipaino ja polydispergoituminen, reaktioseoksen pH, ionivahvuus ja orgaanisten muuntajien pitoisuus sekä suodattimen pinta-ala tuotteeseen verrattuina vaikuttavat suodoksen molekyylipainon jakaumaan.

Tämä tarkoittaa, että ei ole mahdollista luottaa yksinään suodatinväliaineen ominaisuuksiin haluttaessa varmistaa suodoksen sisältämän LMW-hepariinivalmisteen haluttu, vakio molekyyllipaino. Pidättyvässä jakeessa (esimerkiksi depolymerointireaktioseoksessa) täytyy suuri joukko parametrejä pitää vakioina, jotta saadaan tuotesuodos, jolla on vakiot, halutut molekyyllipaino-ominaisuudet, esimerkiksi keskimääräinen molekyyllipaino ja polydispergoituminen.

Sen tähden, että tuote poistetaan suodattamalla jatkuvan depolymerointireaktion aikana, olisi monimutkaista laskea, vaikiinnuttaa ja pitää yllä välttämättömiä vakio-olosuhteita tai steady state -tilannetta depolymerointireaktioseoksessa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti tämä ongelma on ratkaistu mittaamalla suodoksesta jatkuvasti tai toistuvasti M_n tai polydispergoitumisen D poikkeamat halutuista arvoista, jonka jälkeen depolymerointireaktion helposti säädettäviä reaktioparametrejä, varsinkin substraatin konsentraatiota, substraatin syöttönopeutta, entsyymin aktiivisuutta, reaktiolämpötilaa, paineen putoamista membraanisuodattimen toisella puolella ja pidättyneen jakeen uudelleen kierrätyksen virtausta muutetaan jatkuvasti tai usein, niin että poikkeamat halutuista arvoista vähenevät tai ne pysyvät tarkalleen määrätyissä rajoissa.

Esillä olevan keksinnön kokeissa on havaittu, että käyttämällä nopeana vasteanalyysinä A_{235} :ssä, suoritettavaa mittausta, voidaan saavuttaa hepariinin depolymeroitumisen steady state ja pitää sitä yllä jonkin aikaa. Samoin on selvitetty, mitä toimintaparametrejä voidaan säätää helposti.

On havaittu, että on mahdollista saada aikaan suodokseen vakio, kapea molekyyllipainon jakauma suorittamalla hepariinin jatkuva depolymerointi heparinaasin avulla.

Esillä oleva keksintö koskee näin ollen menetelmää pienimolekyyllipainoisen hepariinin (LMW-hepariinin) valmistamiseksi hepariinin entsyymaattisen depolymeroinnin avulla, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että hepariinin vesiliuosta syötetään jatkuvasti heparinaasia sisältävään reaktioastiaan, jossa hepariinille suoritetaan entsyymaattinen depolymerointi; depolymeroitua hepariiniliuosta poistetaan jatkuvasti reaktioastiasta ja sille suoritetaan ultrasuodatus, jolloin saadaan pidähtynyt jae ja suodos; ainakin osa pidähtyneestä jakeesta uudelleenkierrätetään reaktioastiaan; ja LMW-hepariininvalmiste kerätään suodoksesta, jolloin suodoksen valoabsorption nousu, jonka saa aikaan tyydyttämättömien pilkkoutumistuotteiden muodostuminen, mitataan jatkuvasti tai usein koko prosessin aikana, ja suodoksen lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n ja polydispergoituminen D määritetään jatkuvasti tai usein, edullisesti alkuvaiheessa kunnes depolymerointireaktio on stabiloitunut pysyvälle tasolle, ja jolloin mahdolliset poikkeamat halutuista arvoista korjataan säätämällä entsyymaattisen depolymerointireaktion prosessiparametreja.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan edelleen viittaamalla liitteenä seuraaviin piirroksiin, joissa:

- kuvio 1 esittää hepariinin jatkuvan depolymerointimenetelmän edullisen muodon virtauskaaviota;
- kuvio 2 esittää eri jakeiden HPLC-mittauksia, jotka on saatu esimerkin 1 mukaisen jatkuvan depolymeroinnin kuluessa; ja
- kuvio 3 esittää esimerkin 2 mukaisen jatkuvan depolymeroinnin kuluessa saatujen eri jakeiden molekyylipainoa.

Hepariinin keskimääräinen molekyylipaino eli LMW-hepariini voidaan esittää lukukeskimääräisenä molekyylipainona (M_n), esimerkiksi painona/moolien lukumäärä tai painokeskimääräisenä molekyylipainona (M_w) tai molekyylipainohuippuna (M_{huippu}). M_w :a tai M_{huippu} :a käytetään tavallisesti luonnehtimaan hepariinia tai LMW-hepariininvalmisteita.

Valmisteen molekyylipaino voidaan määrittää monin eri menetelmin, esim. geelipermeaatiokromatografian avulla (GPC/HPLC) (N. Sugisaka, F.J. Petracek: Rapid molecular size characterization of heparins by high pressure liquid chromatography, Fed.Proc. 36(1), 89-92, 1977), pienessä kulmassa saapuvan laservalon sironnan avulla (LALLS) (D. Lecacheux, R. Panams, G. Brigand, G. Martin: Molecular weight distribution of carageenans by size exclusion chromatography and low angle laser light scattering, Carbohydrate Polymers 5, 423-440, 1985), pienessä kulmassa saapuvan X-säteen sironnan avulla (S.S. Stivala, M. Herbst, O. Kratky, I. Pilz: Physicochemical studies of fractionated bovine heparin V, Arch. Biochem. Biophys. 127, 795-802, 1968), viskositeettimittausten perusteella ja tasapainosentrifugoinnin avulla (S.E. Lasker, S.S. Stivala: Physicochemical studies of fractionated bovine heparin I, Arch. Biochem. Biophys. 115, 360-372, 1966), sekä osmoottisen paineen mittausten sekä dialyysitasapainon avulla (K.E. van Holde: Physical Biochemistry, osa 2.3, sivut 39-47, Prentice Hall, Inc., New Jersey, 1971). Kuitenkin edullisempi olisi menetelmä, jossa viiveaika olisi mahdollisimman lyhyt, kuten esimerkiksi depolyointimenetelmässä muodostuneiden toiminnallisten ryhmien määrittäminen.

Entsyaattinen depolymerointimenetelmä, jossa käytetään heparinaasia, soveltuu spektrofotometriseen lukukeskimääräisen molekyylipainon määrittämiseen, koska entsyaattinen menetelmä on poistava menetelmä, jossa muodostuu yksi pelkistävä pääte-ryhmä ja yksi pääte-ryhmä, joka sisältää 4,5-tyydyttymättömän iduronihappojohdannaisen, jolla on selvä UV-absorptio 230-235 nm:ssä. Molaarisen absorptiokertoimen Linker ja Hovingh (Biochem. 11 (1972), 563-568) ovat julkaisseet joukolle di-, tetra-, heksa- sekä oligosakkaridien LMW-hepariinifragmentteja. Julkaistujen molaaristen absorptiokertoimien keskimääräinen arvo on 5500.

Voidaan helposti johtaa yhtälö, kuten esimerkiksi

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n,u}} + \frac{\Delta A_{235}}{c \cdot \epsilon} \quad (1)$$

joka antaa suhteen, joka vallitsee lukukeskimääräisen molekyyli-
lipainon (M_n) ja 235 nm:ssä mitatun absorptioon nousun välillä.

Kaavassa (1) M_n on depolymeroidun tuotteen lukukeskimääräinen
molekyylipaino, $M_{n,u}$ on hepariinisubstraatin lukukeski-
määräinen molekyylipaino, c on substraatin konsentraatio
(g/l), ΔA_{235} on absorptioon lisäys 235 nm:ssä mitattuna ja
 ϵ on molaarinen absorptiokerroin.

M_n :n laskeminen on mahdollista, kun hepariinisubstraatin
($M_{n,u}$) M_n , substraatin konsentraatio (c , g/l) ja tyydyt-
tymättömien depolymerointituotteiden absorptiokerroin (ϵ)
ovat tunnetut ja ΔA_{235} mitataan.

Monissa kokeissa hepariini depolymeroitiin heparinaasilla,
joka oli osittain puhdistettu hydroksyyliapatiittikromatogra-
fiaa käyttämällä Linkerin ja Hovinghin mukaisesti (Methods in
Enzymology 28 (1972), 902-911).

Lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n laskettiin yhtälön (1)
mukaan sekä käyttäen julkaistua ϵ_n arvoa 5500, ja M_n :n ar-
voa verrattiin GPC-HPLC:llä määritettyyn M_n :n arvoon.

Täten havaittiin kuitenkin, että M_n :n ($M_n(\Delta A)$) laskettu
arvo erosi aina 20 %:iin saakka M_n :n arvosta, joka määri-
tettiin HPLC:n avulla.

Muuntamalla kaava (1) muotoon

$$\Delta A_{235} = c \cdot \epsilon \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_{n,u}} \right) \quad (2)$$

on mahdollista laskea absorption lisäys ΔA_{235} , joka vastaa haluttua lukukeskimääräistä molekyylipainoa M_n . Mutta kokeet osoittivat jälleen, että jos depolymerointi pysäytettiin ΔA_{235} :n laskettuun arvoon, todellinen M_n , joka oli määritetty HPLC:n avulla, oli merkittävästi suurempi kuin haluttu M_n :n arvo, jos käytettiin Hovinghin ja Linkerin määrittämää ϵ :n arvoa 5500.

Pääteltiin, että huono vastaavuus $M_n(\Delta A)$:n ja $M_n(\text{HPLC})$:n välillä johtui arvon $\epsilon = 5500$ käytöstä.

Yhtälön (1) muuntaminen uudelleen seuraavaan muotoon

$$\epsilon = \frac{A_{235}}{c} \cdot \frac{M_n \cdot M_{n,u}}{(M_{n,u} - M_n)} \quad (3)$$

ilmaisee, että voidaan laskea käyttämällä c :n ja M_n :n tunnettuja arvoja sekä samanaikaisesti määritettyjä $\Delta A_{235}^{n,u}$:n ja $M_n(\text{HPLC})$:n arvoja.

Tällä tavalla saatiin arvo $\epsilon = 7600$, joka antoi hyvän korrelaation lasketun $M_n(\Delta A)$:n ja havaitun $M_n(\text{HPLC})$:n arvojen välillä monissa kokeissa.

Vaikka yllä esitettyä yhtälöä (1) käytetään erädepolymerointimenetelmään, on havaittu, että jatkuvasta depolymerointireaktiosta saadun valmistesuodoksen M_n voidaan laskea käyttämällä yhtälöä (1) sekä arvoa $\epsilon = 7600$, edellyttäen, että järjestelmä on lähellä steady state -tilaa. Poikkeamat steady statesta

vähentävät M_n :n laskemisen tarkkuutta, mutta antavat vielä tietoa tarpeellisten muutosten suunnasta. Yhtälössä (1) $M_{n,u}$ on tunnettu, ΔA_{235} mitataan käyttämällä "on-line"-spektrofotometriä, ja c :n arvo voidaan saada mittaamalla suodoksen taitekerroin RI käyttämällä "on-line"-kalibroitua RI-ilmaisinta tai mittaamalla UV-absorptio kahdella eri aallonpituudella, esimerkiksi 197 ja 235 nm:ssä.

Koska suodoksen RI ja A_{235} :n mittaus antaa välitöntä informaatiota menetelmän tilasta, menetelmäparametrien tarpeelliset korjaukset voidaan tehdä välittömästi, kun havaitaan poikkeamat halutuista molekyylipainon ja polydispergoitumisen arvoista.

Aiheeseen perehtyneelle henkilölle on selvää, että UV-absorption nousu, jonka saa aikaan tyydyttämättömien hajoamistuotteiden muodostuminen heparinaasin vaikuttaessa hepariiniin, voidaan mitata muilla aallonpituuksilla kuin 235 nm:ssä. Absorptiokerroin kuitenkin mitataan 235 nm:ssä, koska sillä on maksimi tässä aallonpituudessa.

Depolymerointireaktiota voidaan valvoa säätelemällä substraatin syöttönopeutta, substraatin syöttökonsentraatiota substraatin virtausnopeussuhteeseen nähden sekä entsyymin aktiivisuutta. Substraatin syöttönopeuden muutokset voidaan saada muuttamalla substraatin virtausnopeutta tai substraatin syöttökonsentraatiota tai molempia. Substraatin syöttökonsentraation muutokset substraatin virtausnopeussuhteeseen nähden voidaan saada muuttamalla substraatin syöttökonsentraatiota tai substraatin virtausnopeutta tai molempia. "Substraatin virtausnopeus" tässä yhteydessä käytettynä tarkoittaa substraatin tilavuutta aikayksikköä kohti (esim. litra/tunti).

"Substraatin syöttökonsentraatio" tarkoittaa hepariinin konsentraatiota järjestelmään suoritettussa substraatin syötössä (esim. mg/ml). "Substraatin syöttönopeudella" tarkoitetaan hepariinin painomäärää, joka on syötetty järjestelmään aikayksikössä (esim. g/tunti). "Substraatin virtausnopeus" $\times$ "substraatin syöttökonsentraatio" = "substraatin syöttönopeus".

Entsyymien aktiivisuutta voidaan lisätä lisäämällä entsyymiä tai nostamalla reaktiolämpötilaa, tai aktiivisuutta voidaan vähentää laskemalla reaktiolämpötilaa tai poistamalla entsyymiä reaktioastiasta (esimerkiksi, jos se on tehty liikkumattomaksi). Muut parametrit, joita voidaan käyttää depolymerointireaktion säätelyssä, ovat paineen pudotus membraanisuolettimen toisella puolella tai pidättyneen jakeen uudelleenkierrätys.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti menetelmäparametrien korjaukset voidaan suorittaa seuraavasti:

- a) Jos suodoksen M_n on suurempi kuin haluttu M_n :n arvo, substraatin syöttönopeutta voidaan vähentää pienentämällä substraatin virtausnopeutta tai substraatin syöttökonsentraatiota tai molempia tai lisätä entsyymien aktiivisuutta. Jos M_n on alhaisempi kuin haluttu M_n :n arvo, menetellään vastakkaisella tavalla.
- b) Jos suodoksen polydispergoituminen on voimakkaampaa kuin on toivottavaa, substraatin syöttökonsentraatiota substraatin virtausnopeussuhteeseen nähden voidaan pienentää vähentämällä substraatin syöttökonsentraatiota tai lisäämällä substraatin virtausnopeutta tai molempia. Jos polydispergoituminen on haluttua määrää vähäisempää, menetellään vastakkaisella tavalla.
- c) Jos M_n sekä polydispergoituminen poikkeavat halutuista arvoista, voidaan suorittaa yllä mainittujen korjausten yhdistelmä. Korjaukset voidaan suorittaa seuraavissa esimerkeissä kuvatulla tavalla, joista esimerkki 1 valaisee ainoastaan

M_n :n säätelyä ja esimerkki 2 valaisee M_n :n säätelyä ja M_n polydispergoitumista mainitussa järjestyksessä.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti käytetty heparinaasi valmistettiin tunnetulla tavalla, jota Hovingh ja Linker ovat kuvanneet (Methods in Enzymology 28 (1972), 902-911 ja J. Biol. Chem. 245 (1970), 6170-6175), kasvattamalla Flavobacterium hepariumia hepariinia sisältävällä substraatilla, kokoamalla solut ja rikkomalla solut äänikäsittelyn avulla sekä puhdistamalla heparinaasi mm. suorittamalla kromatografia hydroksiapatiitilla.

LMW-hepariinituote voidaan saostaa lisäämällä alkoholia (mieluummin 0,6-10 tilav./tilav.), ja depolymeroitu tuote voidaan puhdistaa hyvin tunnetuin menetelmin, esimerkiksi valkaisun avulla, steriilisuodatuksen avulla sekä alkoholisaostuksella.

Hepariinin depolymerointireaktio suoritetaan mieluummin 25-40°C:n lämpötilassa ja pH:ssa 6-8.

Yksi heparinaasiyksikkö määritellään Hovinghin ja Linkerin mukaisesti, Methods in Enzymol., 28 (1972), 902-911.

Jotta varmistutaan depolymerointireaktion nopeasta takaisinsyötön säädöstä, joka riippuu keskimääräisen molekyylipainon ja polydispergoitumisen poikkeamasta halutuista arvoista, voidaan menetelmä suorittaa kuvassa 1 esitetyllä tavalla. Kuva 1 kuvaa esillä olevan keksinnön erityistä suoritusmuotoa, joka nimenomaan on käyttökelpoinen depolymeroitaessa hepariinia entsyymaattisesti LMW-hepariiniksi, jonka polydispergoituminen on alhainen, käyttämällä liikkumattomaksi tehtyä heparinaasia pääasiallisena entsyymin lähteenä. Kuitenkin esitetään myös tapa hepariiniliuoksella suoritettavaa täydennystä varten.

Hepariinisubstraattia, jolla on ennalta määritetty, haluttu konsentraatio, käytetään siten, että hepariinin varastoliuos-

ta 16 sekoitetaan puskurin 17 kanssa sekoittajassa 1 ja seos syötetään annostelupumpun 2 avulla suljettuun kierto-reaktiovyöhykkeeseen. Reaktiovyöhyke koostuu pidätyntä jaetta kierrättävästä pumpusta 4, ultrasuotimesta 5, entsyymireaktioastiasta 3 ja tämän kanssa rinnan kytketystä venttiilistä 6. Koska reaktiovyöhyke on suljettu substraatin syöttölinjaa ja ultrasuodatusmembraania lukuunottamatta, suodoksen virtaus tulee olemaan yhtä suuri kuin substraatin virtaus. Pidätyvän jakeen nopea virtaus on toivottavaa, jotta estetään polaroituminen ultrasuodatusmembraanilla. Tämä saattaa kuitenkin vaurioittaa liikkumattomaksi tehdyn entsyymikerroksen, mikä johtuu paineen pudotuksesta, joka tapahtuu kerroksen toisella puolella. Pidätyneen jakeen päävirta kiertää sen tähden rinnakkain kytketyn linjan ja venttiilin 6 kautta, jota avataan tai suljetaan paineen pudotuksen säätämiseksi entsyymikerroksen toisella puolella.

Ultrasuodatusmembraanin toisella puolella suodatuksen painetta, joka mitataan manometrillä 14, voidaan lisätä, jos se on tarpeen sulkemalla venttiili 15 osittain. Entsyymireaktion lämpötilaa voidaan säätää vedenkiertovaipan (reaktioastian 3 ympärillä (ei kuvattu)) avulla. LMW-hepariiniä, joka poistuu ultrasuodoksessa sijaitsevasta depolymerointivyöhykkeestä, analysoidaan keskimääräisen molekyylipainon ja polydispergoitumisen suhteen. Näytteenottolaite 7, joka on esitetty skemaattisesti, ottaa näytteitä automaattisesti, ennen kuin suodos kulkee mittareihin 8, 9, 10.

Esillä olevan keksinnön suoritusmuodossa mitataan kolme parametria: taitekerroin (RI), UV-absorptio 235 nm:ssä (A_{235}) ja polydispergoituminen (D). RI ja A_{235} mitataan jatkuvasti tai lyhyin välein vastaavasti RI-ilmaisimen ja spektrofotometrin 9 avulla. D määritetään satunnaisesti kromatografialaittein 10 suoritetun M_n ja M_n GPL-HPLC-määrityksen avulla. Näytteistä saadut tulokset syötetään tietojenkäsittely-yksikköön 12, joka laskee LMW-hepariinin konsentraation c

(g/litra) RI:stä, lukukeskimääräisen molekyylipaino M (Dalton) c:stä absorption lisäyksen 235 nm:ssä (ΔA_{235}^n), entsyymiaktiivisuuden (NE) kaavasta $NE = \Delta A_{235} \times \text{virtausnopeus}$, sekä polydispergoitumisen D HPLC-tuloksista. Käsittely-yksikkö säätelee prosessia laskettujen parametrien M , D , c sekä NE:n perusteella säätämällä substraattikonsentraatiota sekoittajan 1 avulla, virtausnopeutta (SEV) pumpun 2 avulla, entsyymiaktiivisuutta varastoliuoksesta 18 entsyymilisäysventtiilin 13 avulla ja/tai reaktiolämpötilan säädön (ei esitetty kaaviossa) avulla, paineenpudotusta membranisuodattimen toisella puolella venttiilin 15 avulla ja pidätyneen jakeen kiertovirtausta kierrätyspumpun 4 avulla. Ohjausvirtapiirit sekä automaattisesti toimiva laitteisto, joka on kaaviomaisesti esitetty kuvan 1 juoksukaaviossa, ovat tavanomaisia järjestelmiä ja laitteita, eikä niitä tarvitse kuvata tässä yhteydessä.

Hepariinin jatkuvasti tapahtuva depolymerointi kuvan 1 mukaisesti, laboratoriomittakaavassa, esitetään alla esimerkkinä.

Esimerkki 1

Flavobacterium heparinumia kasvatettiin hepariinia sisältävällä substraatilla, ja heparinaasi valmistettiin homogenoidusta solukonsentraatista suodattamalla se 100 KD:n sekä väkevöimällä 30 KD:n ultrasuodattimien avulla. Entsyymi tehtiin liikkumattomaksi CNBr:llä aktivoituneen Sepharose 4B:n avulla hepariinin läsnäollessa.

750 yksikköä liikkumattomaksi tehtyä heparinaasia, jonka laskettu depolymerointikapasiteetti ympäristön lämpötilassa oli 5-600 mg/h hepariinia, jonka $M_{n,u} \sim 11500$, LMW-hepariiniksi,

jonka $M \sim 4000$ daltonia, asetettiin entsyymireaktioastiaan 3. Järjestelmä täytettiin hepariinisubstraattiliuoksella (10 mg/ml 0,1 M Na-asetaatissa, 0,005 M Ca-asetaatissa, pH 7,0), josta oli poistettu pidätyneyt ilma, ja hepariinisubstraat-

tia syötettiin järjestelmään alkunopeudella 60 ml/h, ympäristönlämpötilassa.

Joidenkin minuuttien jälkeen suodoksen virtausnopeus vastasi täsmälleen substraatin virtausnopeutta. Kokeen aikana koottiin jakeet, joiden suuruus oli 10 ml. Taitekerrointa RI tarkkailtiin jatkuvasti, ja absorptio 235 nm:ssä, A_{235}^n , mitattiin usein, ainakin kerran jaetta kohti, sen jälkeen kun näytteet oli laimennettu 1,7-M perkloorihapolla.

Valmisteiden lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n laskettiin RI- ja A_{235}^n -arvoista ja sijoitettiin jakeen numeroa vastaan graafiseen esitykseen, kuvan 2 osoittamalla tavalla.

HPLC-molekyylipainoanalyysi suoritettiin muutamista jakeista. Tulokset varmistavat lasketut M_n -arvot, kuten käy ilmi kuvasta 2, ja lisäksi tulokset antavat käyttöön painokeskimääräisen molekyylipainon M_w sekä polydispergoitumisen D (kaavasta $D = M_w / M_n$ laskettuna) lukuarvot. Koska laskettu M_n vastaa hyvin M_n -arvoa, joka on mitattu HPLC:llä, kyseessä oleva esimerkki näyttää toteen, että yhtälöä (1) voidaan käyttää jatkuvalla depolymerointireaktiolla saadun LMW-hepariinivalmisteen M_n :n määrittämiseen.

RI, A_{235}^n -menettely antaa lähes välitöntä tietoa menetelmän tilasta ja tekee mahdolliseksi korjausmittausten suorittamisen.

Esillä oleva esimerkki valaisee edelleen valmisteiden saamista, jolla on haluttu M_n , siten että substraatin virtausnopeus säädetään substraatin syöttökonsentraation ollessa kiinteä.

Koe suoritettiin kolmessa vaiheessa.

- 1) Virtausnopeus 60 ml/h: Tässä vaiheessa tuotteen M_n lisääntyi tasaisesti ja saavutti halutun 4000 daltonin arvon ~ 22 jakeen jälkeen.
- 2) Virtausnopeus 30 ml/h: Muutamien lisäjakeiden jälkeen virtausnopeus väheni 30 ml:aan/h jakeesta no 27 lähtien.

Kuten voidaan nähdä kuvasta 2, vaste oli tasainen M_n :n lasku.

3) Virtausnopeus 60 ml/h: Kun valmiste M_n saavutti arvon 3300 daltonia jakeessa 43 vielä vähentyen, aloitettiin uudelleen alkuvirtausnopeudella 60 ml/h. M_n :n arvon putoaminen pysähtyi, ja sitä seurasi uudelleen tasainen lisäys, joka tasoittui jakeen no 60 kohdalla. Tästä kohdasta lähtien ja kokeen koko loppuajan pienet vaihtelut havaituissa parametreissa ilmaisivat, että muuttumaton tila (steady state) oli saavutettu.

Vertailun vuoksi käytettiin liikkumattomaksi tehtyä heparinaasia hepariinin polymerointiin erätyyppisissä reaktioissa. Eräessä kokeessa hepariini depolymeroitiin lukukeskimääräiseen molekyylipainon arvoon $M_n \sim 4000$ daltonia, joka on vertailukelpoinen jatkuvalla menetelmällä saadun "steady state"-valmistesuodoksen M_n :n kanssa.

Eräessä toisessa kokeessa hepariini depolymeroitiin painokeskimääräiseen molekyylipainoon, joka on vertailukelpoinen jatkuvalla menetelmällä saadun "steady state"-valmistesuodoksen M_n :n kanssa.

M_n - ja M_w -jakaumat analysoitiin HPLC:n avulla. Kahden reaktiotyyppin tulokset annetaan alla sijaitsevassa taulukossa.

Taulukko I

Jatkuva reaktio	M _w	M _n	D	M _n
	(mitattu HPLC:llä)		(lask. RI:stä ja A ₂₃₅ :stä)	
Jae no				
65	6152	3734	1,65	3950
74	7365	4179	1,76	4120
83	6650	3979	1,67	3950
94	6823	4114	1,66	4120
keskiarvo	6748	4002	1,69	4035
	S.D. +500	S.D. +200	S.D. +0,05	S.D. +100

Eränä suoritettu reaktio 1 (M : n ~ 4000 saamiseksi)

Näyte no	M _w	M _n	D
1	7894	3996	1,98
2	7507	3937	1,91
3	7503	3897	1,93
keskiarvo	7635	3943	1,94
	S.D. +225	S.D. +50	S.D. +0,04

Eränä suoritettu reaktio 2 (M : n arvon 6700 saamiseksi)

	M _w	M _n	D
	6681	3175	2,10

Yllä esitetystä käy ilmi, että jatkuvasta menetelmästä saadun LMW-hepariinivalmisteen polydispergoituminen on huomattavasti vähentynyt eränä suoritettavaan depolymerointimenetelmään

verrattuna. Edelleen käy ilmi, että lasketut M_n -arvot pitävät hyvin yhtä jatkuvalle reaktiolle mitattujen M_n arvojen kanssa.

Esimerkki 2

Hepariini depolymeroitiin LMW-hepariiniksi liikkumattomaksi tehdyllä heparinaasilla, käyttämällä esimerkin 1 mukaista laitetta ja esimerkin 1 mukaisia ilmaisumenetelmiä.

Valmistusta säädettiin kahdessa vaiheessa.

Vaiheessa 1, kuten esimerkissä 1, käytettiin substraatin virtausnopeuden vastetta reaktion valmistesuodoksen M_n poikkeamaan halutusta, noin 4000 daltonin suuruisesta arvosta, jotta saatiin steady state, jossa substraatin virtausnopeus vastasi suodoksen haluttua M_n -arvoa.

Kuten voidaan nähdä taulukosta IV ja kuten on esitetty kuvassa 3, alkuperäistä substraatin virtausnopeutta, joka oli 60 ml tunnissa hepariinisubstraatille, jonka konsentraatio oli 10 mg/ml, vähennettiin asteittain 12 ml:ksi tunnissa, joka vastasi substraatin syöttönopeutta 120 mg tunnissa, jotta saatiin steady state (I) jakeesta no 78 lukien.

Steady state -tilassa LMW-hepariinin valmisteen lukukeskimääräinen molekyylipaino ja polydispergoituminen, jotka saatiin GPC-HPLC-analyysin perusteella, olivat vastaavasti $M_n = 4150$ ja $D = 1,71$ vastaten painokeskimääräistä molekyylipaino $M_w = 7100$.

Toisessa vaiheessa jakeesta no 114 lähtien substraatin syöttökonsentraatiota substraatin virtausnopeuden suhteen muutettiin 25-kertaisesti vähentämällä substraatin syöttökonsentraatiota viisinkertaisesti 2 mg:aan hepariinia millilitrassa sekä lisäämällä viisinkertaisesti substraatin virtausnopeutta aina 60 ml:aan tunnissa, jolloin substraatin syöttönopeus pysyi 120 mg:na tunnissa.

Muutosten johdosta syntyi uusi steady state -tila (II) jakeesta no 140 lähtien, kuten voidaan nähdä taulukosta II ja kuvasta 3.

Lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n säilyi käytännöllisesti katsoen muuttumattomana, mutta valmisteen polydispergoituminen väheni niin alhaiseen arvoon kuin $D = 1,55$, joka vastasi M_w :n arvoa 6450, kuten voidaan nähdä taulukosta IV ja kuvasta 3.

Taulukko II

Jae no*)	Substr. kons. (mg/ml)	Virtaus- nopeus (ml/h)	M_n (laskettu)	M_n (GPC-HPLC-analyysi)	D	M_w
1	10	60	3850	4300	1,73	7450
6	-	-	4300	4500	1,73	7800
7	-	30	4500			
9	-	-	4700	4750	1,78	8450
10	-	18	4900	5000	1,76	8800
20	-	-	4560	4450	1,79	7950
50	-	-	4100	4350	1,76	7650
75	-	-	4350	4700	1,78	8350
80	-	12	4300	4150	1,71	7100
100	-	-		4150	1,69	7000
110	-	-		4050	1,74	7050
115	2	60		4100	1,67	6725
130	-	-		4250	1,65	7000
140	-	-		4050	1,58	6400
150	-	-		4150	1,55	6450
160	-	-		4200	1,55	6500
170	-	-	4500	4300	1,55	6650

*) Jakeen koko: 10 ml

Esimerkkien 1 ja 2 tuloksista ja vastavasti kuvien 2 ja 3 graafisista esityksistä voidaan nähdä, että esillä olevan keksinnön mukainen jatkuva depolymerointi toimii pitkiä jaksoja häiriöttä, mikä havainnollisti sitä seikkaa, että jatkuva depolymerointireaktiojärjestelmä on suhteellisen pysyvä. Niinpä kyseessä olevan keksinnön toteuttamisen avulla tutkitaan hepariinin jatkuvan depolymeroinnin suorittamista ilman sen säätöä A_{235} :n tai muiden vastaavien mittausten avulla, esimerkiksi HPLC-molekyylipainomittausten avulla. Kuitenkin, kuten jo mainittiin, A_{235} -mittauksen avulla suoritettu säätäminen muodostaa edullisen toimintatavan.

Kuten esimerkin 2 antamista tuloksista voidaan päätellä, esillä olevan keksinnön mukaisesti voidaan saada LMW-hepariinivalmiste, jonka polydispergoitumisaste on jokseenkin alhainen saavuttaen (katso jakeet 140-170) alueen 1-1,6, joka on edullinen kyseessä olevaa keksintöä toteutettaessa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä LMW-hepariinin valmistamiseksi hepariinin entsymaattisen depolymeroinnin avulla, **tunnettu** siitä, että hepariinin vesiliuosta syötetään jatkuvasti heparinaasia sisältävään reaktioastiaan, jossa hepariinille suoritetaan entsymaattinen depolymerointi;

depolymeroitua hepariiniliuosta poistetaan jatkuvasti reaktio-
astiasta ja sille suoritetaan ultrasuodatus, jolloin saadaan
pidähtynyt jae ja suodos;

ainakin osa pidähtyneestä jakeesta uudelleenkierrätetään reaktio-
astiaan; ja

LMW-hepariininvalmiste kerätään suodoksesta,

jolloin suodoksen valoabsorption nousu, jonka saa aikaan tyydyttämättömien pilkkoutumistuotteiden muodostuminen, mitataan jatkuvasti tai usein koko prosessin aikana, ja suodoksen lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n ja polydispergoituminen D määritetään jatkuvasti tai usein, edullisesti alkuvaiheessa kunnes depolymerointireaktio on stabiloitunut pysyväälle tasolle, ja jolloin mahdolliset poikkeamat halutuista arvoista korjataan säätämällä entsymaattisen depolymerointireaktion prosessiparametrejä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valoabsorptio mitataan 235 nm:ssä ja että lisäksi mitataan jatkuvasti tai usein suodoksen taitekerroin RI , ja että mittauksia käytetään LMW-valmisteen lukukeskimääräisen molekyylipainon M_n laskemiseen suodoksesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että substraatin syöttönopeutta alennetaan, jos suodoksen sisältämän depolymeroidun hepariinin lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n on suurempi kuin haluttu molekyylipaino.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että substraatin syöttönopeutta lisätään, jos suodoksen sisältämän depolymeroidun hepariinin lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n on alhaisempi kuin haluttu molekyylipaino.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että suhdetta hepariinisubstraatin syöttökonsentraation ja substraatin virtausnopeuden välillä alennetaan, kun depolymeroidun hepariinin suodoksen polydispergoituminen on suurempi kuin haluttu polydispergoituminen.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että suhdetta hepariinisubstraatin syöttökonsentraation ja substraatin virtausnopeuden välillä lisätään, kun depolymeroidun hepariinin suodoksen polydispergoituminen on alhaisempi kuin haluttu polydispergoituminen.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että heparinaasin entsyymiaktiivisuutta säädetään, jolloin sitä alennetaan, jos LMW-hepariinin depolymerointivalmisteen molekyylipainosta tulee liian alhainen, ja entsyymiaktiivisuutta lisätään, jos LMW-hepariinin depolymerointivalmisteen molekyylipainosta tulee liian korkea.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että heparinaasia käytetään liikkumattomassa muodossa.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että prosessiparametrejä säädetään siten, että valmistetun LMW-hepariininvalmisteen polydispergoituminen on noin 1-1,6.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av LMW-heparin genom enzymatisk depolymerisation av heparin, **kännetecknat** av att man kontinuerligt matar in en vattenlösning av heparin i en heparinas-innehållande reaktor och i denna utsätter heparinet för enzymatisk depolymerisation;
kontinuerligt avlägsnar depolymeriserad heparinlösning från reaktorn och utsätter densamma för ultrafiltrering för erhållande av ett retentat och ett filtrat;
recirkulerar åtminstone en del av retentatet till reaktorn;
och
uppsamlar LMW-heparinprodukten från filtratet;

varvid ökningen i filtratets ljusabsorption förorsakad av bildning av omättade nedbrytningsprodukter uppmättes kontinuerligt eller ofta under hela processen, och talmedelmolekylvikten M_n och polydispersiteten D för filtratet bestämmes kontinuerligt eller ofta, företrädesvis i ett inledande steg tills depolymerisationsreaktion har stabiliserats på en stabil nivå, och varvid eventuella avvikelser från de önskade värdena korrigeras genom att justera processparametrar för den enzymatiska depolymerisationsreaktionen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att ljusabsorptionen uppmättes vid 235 nm och att man därtill utför kontinuerliga eller ofta förekommande mätningar av filtratets brytningsindex RI , och att mätningresultaten användes för beräkning av talmedelmolekylvikten M_n för LMW-produkten i filtratet.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att substratmatningshastigheten minskas om talmedelmolekylvikten M_n för depolymeriserat heparin i filtratet är högre än den önskade molekylvikten.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att substratmatningshastigheten ökas om talmedelmolekylvikten M_n för depolymeriserat heparin i filtratet är lägre än den önskade molekylvikten.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att förhållandet heparinsubstratmatningskoncentration till substratflödes hastighet minskas när polydispersiteten för det depolymeriserade heparinfiltratet är högre än den önskade polydispersiteten.

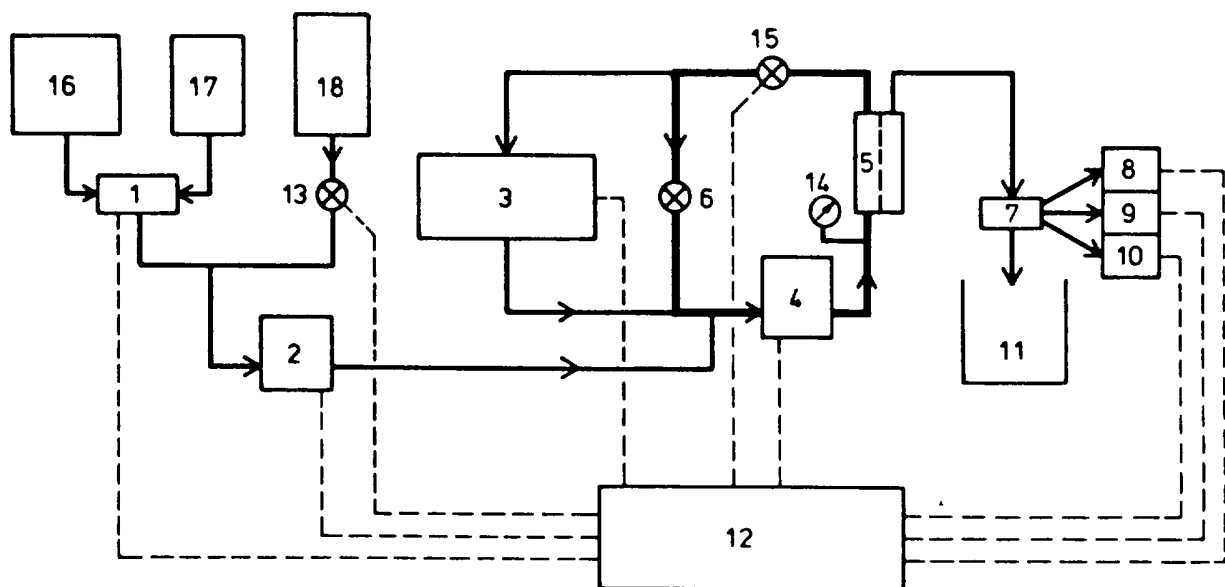
6. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att förhållandet heparinsubstratmatningskoncentration till substratflödes hastighet ökas när polydispersiteten för det depolymeriserade heparinfiltratet är lägre än den önskade polydispersiteten.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att enzymaktiviteten för heparinaset justeras, varvid den minskas om molekylvikten för LMW-heparindepolymerisationsprodukten blir alltför låg och enzymaktiviteten ökas om molekylvikten för LMW-heparindepolymerisationsprodukten blir alltför hög.

8. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att heparinaset användes i immobiliserad form.

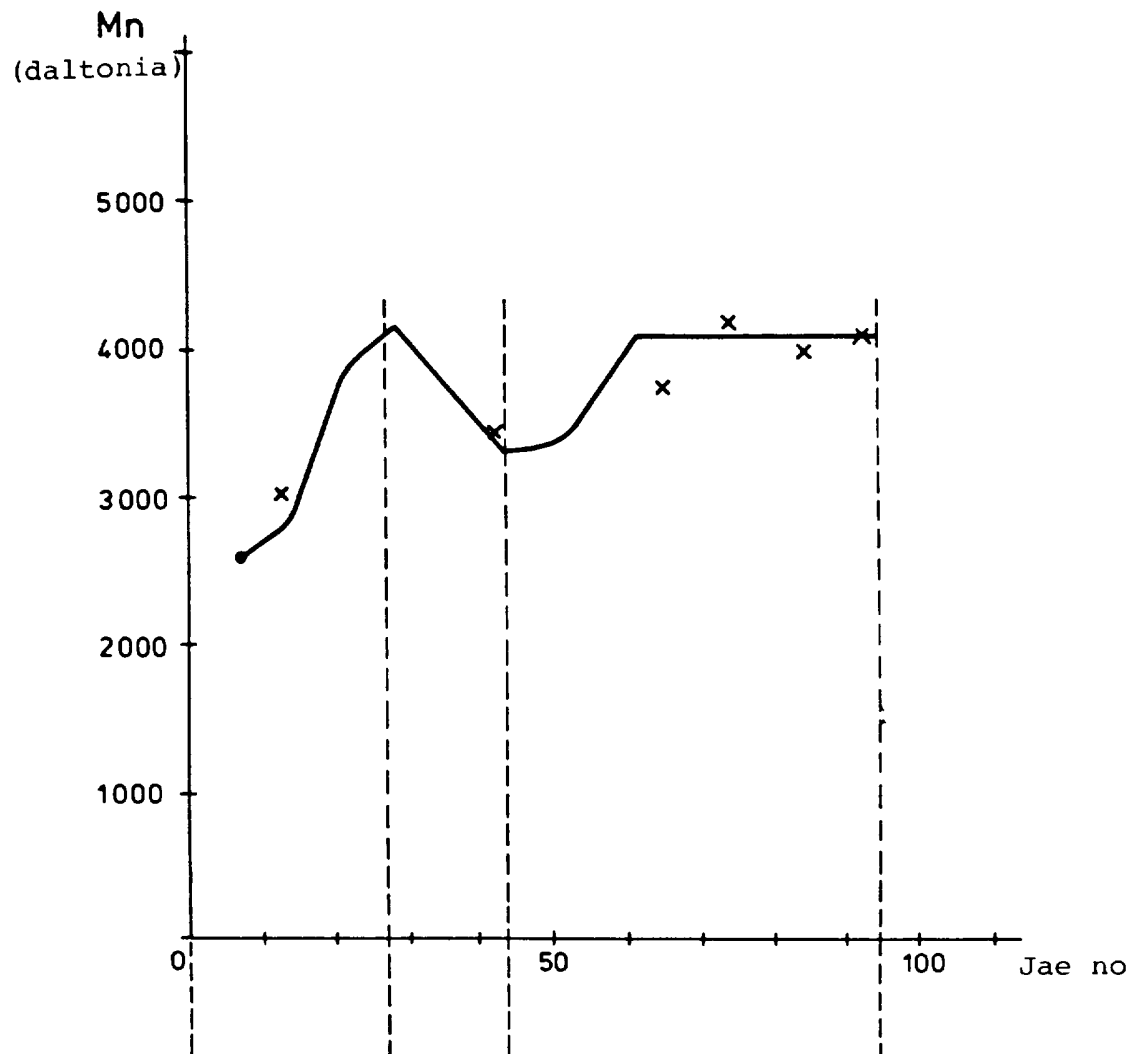
9. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att processparametrar justeras så att den framställda LMW-heparinprodukten har en polydispersitet på ca 1-1,6.

Fig. 1



89943

Fig. 2



x Mn mitattu HPLC:11ä

Fig. 3

