

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224855**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **391043**

(51) Int.Cl.
A61K 31/717 (2006.01)
A61K 31/721 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.04.2010**

(54) **Zastosowanie modyfikowanych polisacharydów do neutralizacji heparyny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
24.10.2011 BUP 22/11

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.02.2017 WUP 02/17

(73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MARIA NOWAKOWSKA, Kraków, PL
KRZYSZTOF SZCZUBIAŁKA, Krzywaczka, PL
KAMIL KAMIŃSKI, Zawoja, PL

(74) Pełnomocnik:
rzec. pat. Grażyna Padée

PL 224855 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie modyfikowanych polisacharydów do neutralizacji heparyny bezpośrednio we krwi i innych płynach fizjologicznych.

Heparyna, substancja odkryta przez McLeana prawie wiek temu, znajduje kliniczne zastosowanie od 1937 i jest pierwszym opartym na polisacharydach lekiem, który znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu ludzi. Heparyna jest złożoną mieszaniną glukozaminoglikanów (GAG) o wysokim stopniu sulfonowania (posiada największą wśród cząsteczek biologicznych gęstość ładunku ujemnego ze średnio 2.7 ładunkami ujemnymi na jednostkę powtarzalną, którą stanowią dwie jednostki glukozy), która jest wytwarzana i przechowywana w komórkach tłuszczowych tkanek zwierzęcych (np. w jelitach wieprzowych lub płucach wołowych). Wykazuje bardzo silne działanie hamujące krzepnięcie krwi, chociaż zaledwie jedna trzecia cząsteczek heparyny posiada właściwości przeciwkrzepliwe. Jej działanie polega na zwiększeniu zdolności antytrombiny (AT) do dezaktywowania trombiny i czynnika Xa, enzymów odpowiedzialnych za krzepnięcie krwi. Dlatego heparyna jest lekiem z wyboru w sytuacjach, w których konieczne jest osiągnięcie szybkiego efektu antykoagulacyjnego, np. podczas operacji chirurgicznych, w szczególności w celu zapobiegania tworzeniu się skrzepów w urządzeniach stosowanych w terapii pozaustrojowej takich jak dializatory lub oksygenatory. Posiada ona również wiele innych zastosowań terapeutycznych, np. w leczeniu niestabilnej dusznicy bolesnej lub ostrego zawału serca.

Jednakże podawanie heparyny wiąże się z wieloma efektami ubocznymi, wśród których najczęściej spotykane są krwawienia, trombocytopenia indukowana heparyną (*heparin induced thrombocytopenia*, HIT) i osteoporoza.

W związku z tym często zachodzi potrzeba neutralizacji lub usunięcia heparyny z krwioobiegu po uzyskaniu pożądanego działania antykoagulacyjnego. Opracowano szereg metod jej neutralizacji. Najczęściej stosowane jest podawanie siarczanu protaminy, białka wprowadzonego do praktyki klinicznej jako antagonistę heparyny prawie jednocześnie z heparyną (Fischer, A *Biochem Zeit.* 278, 133, 1935) Charakteryzuje się ono niezwykle wysoką zawartością aminokwasów zasadowych (takich jak arginina, lizyna i histydyna), mogącą osiągać 80%. Innym polimerem stosowanym do usuwania heparyny jest poli-L-lizyna (Ma, X., Mohammad, S.F., Kim, S.W. *Biotechnology and Bioengineering Volume 40, Issue 4, 1992, Pages 530–536*), którą stosuje się również do wzmacniania działania siarczanu protaminy. Jeszcze innym podejściem do problemu neutralizacji heparyny jest jej enzymatyczna degradacja za pomocą immobilizowanej heparynazy (Kolde, H.-J., Pelzer, H., Borzhenskaya, L., Russo, A., Rose, M., Tejdor, L. *Hamostaseologie Volume 14, Issue 1, 1994, Pages 37–43*).

Niestety, wymienione metody neutralizacji heparyny mogą same powodować efekty uboczne. Siarczan protaminy, jeśli nie zostanie zneutralizowany lub usunięty z krwioobiegu, może powodować niepożądane reakcje u około 10% pacjentów. Mogą one być bardzo poważne, a często nawet śmiertelne i obejmują nadciśnienie płucne, niedociśnienie tętnicze, wstrząs anafilaktyczny, trombocytopenię, granulocytopenię, aktywację układu dopełniacza i uwolnienie cytokin. Neutralizacja heparyny poprzez zastosowanie siarczanu protaminy jest niekompletna i towarzyszą jej reakcje alergiczne. Z drugiej strony poli-L-lizyna jest nadal dość drogim polimerem.

Podjęto wiele prób skonstruowania urządzeń do fizycznego usuwania heparyny, w większości opartych na zastosowaniu immobilizowanej poli-L-lizyny (Joseph B. Zwischenberger, MD, Roger A. Vertrees, BA, CCP, Robert L. Brunston, Jr., MD, Weike Tao, MD, Scott K. Alpard, MD, and Paul S. Brown, Jr., MD, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1998 Volume 115, Number 3; Zwischenberger, J.B., Tao, W., Deyo, D.J., Vertrees, R.A., Alpard, S.K., Shulman, G. *Annals of Thoracic Surgery* Volume 71, Issue 1, 2001, Pages 270–277). Urządzenie do usuwania heparyny (HRD, *heparin removal device*), opisane w powyższych publikacjach, włączone jest w krwioobieg pacjenta pozaustrojowo poprzez połączenie żyłno-żylnie. Dokonuje się w nim separacji osocza, które po usunięciu z niego heparyny przez kontakt z poli-L-lizyną, jest zwracane do krwi pacjenta. Pomimo obiecujących wyników eksperymentalnych, doświadczenia z zastosowaniem tego typu urządzeń są ograniczone i jak dotąd żadne z nich nie zostało wdrożone do praktyki klinicznej. Metodą często stosowaną w celu uniknięcia komplikacji spowodowanych przez niezwiązane związki będące antagonistami heparyny jest ich immobilizacja na podłożach polimerowych znajdujących się w urządzeniu do usuwania heparyny. Na przykład protaminę osadzono na matrycy otrzymanej przez naszczepienie polimeru akrylowego na celulozie (Hou, K.C., Roy, S., Zaniewski, R., Shumway, E. *Artificial Organs* Volume 14, Issue 6, 1990, Pages 436–442) lub wewnątrz włókien celulozowych (Wang, T., Byun, Y., Kim, J.-S.,

Liang, J., Yang, V.C. *International Journal of Bio-Chromatography* Volume 6, Issue 2, 2001, Pages 133–149). Wykazano, że przy przepływie krwi 100 mL/min skonstruowany bioreaktor usuwał ponad 50% podanej heparyny w ciągu 10 minut. Podczas gdy szybkie wstrzyknięcie protaminy u psów powoduje silne niedociśnienie, zastosowanie bioreaktora zawierającego immobilizowaną protaminę nie spowodowało żadnych statystycznie istotnych zmian w monitorowanych parametrach hemodynamicznych. Inne doniesienie opisuje skuteczne usuwanie heparyny przy pomocy kulek otrzymanych z alginianu i poli-L-lizyny (M. Sunil Varghese, D. Hildebrandt, D. Glasser, N. J. Crowther, D. M. Rubin, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 34: 419–432, 2006).

Wiadomo, że polisacharydy są wykorzystywane w różnych zastosowaniach medycznych. Na przykład dekstran, który jest polimerem glukozy o wysokim ciężarze cząsteczkowym, jest stosowany jako płyn krwiozastępczy. Chityna, polisacharyd pochodzenia zwierzęcego, dzięki swojej biodegradowalności, nietoksyczności, brakowi działania fizjologicznego, właściwościom antybakteryjnym, zdolności do tworzenia żeli i powinowactwu do białek stosowana jest do immobilizacji enzymów. Innym zastosowaniem chityny jest leczenie ran. Do tego celu jest również stosowany otrzymywany z chityny chitozan. Kwas hialuronowy jest jeszcze innym przykładem polisacharydu o bardzo licznych zastosowaniach medycznych. Obejmują one na przykład wiskosuplementację stawów, wygładzanie zmarszczek, nawilżanie skóry. Jest to polisacharyd bardzo często stosowany w okulistyce, np. w zabiegach katarakty, do przyspieszania gojenia się rogówki i zwiększania stabilności preparatów atropiny. Żele otrzymane z alginianu, polisacharydu otrzymywanego z glonów morskich, są stosowane do enkapsulacji enzymów oraz hodowli komórek. Wiele innych polisacharydów, np. pektyny, glukomannany, galaktomannany, ksantany również posiada zastosowania medyczne. Ostatnio stwierdzono, że do usuwania heparyny z roztworów wodnych można wykorzystać polimer chitozanowy usieciowany genipiną (Kamil Kamiński, Karolina Zazakowny, Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska *Biomacromolecules* **2008**, 9(11), 3127–3132). Polimer ten stosuje się w formie mikrosfer lub w formie filmu i w tych postaciach może być potencjalnie wykorzystany w urządzeniach do pozaustrojowego usuwania heparyny. Polimer w formie usieciowanych mikrosfer lub filmu nie może być jednak stosowany dożylnie, w celu osiągnięcia natychmiastowego efektu antykoagulacyjnego. W tym celu stosuje się dotychczas siarczan protaminy, ze wszystkimi negatywnymi konsekwencjami opisanymi wyżej.

Celem wynalazku było opracowanie metody neutralizacji antykoagulacyjnego działania heparyny w krwi i płynach ustrojowych.

Istotą wynalazku jest zastosowanie polisacharydów wybranych spośród dekstranu lub hydroksypropylocelulozy modyfikowanych kationowo za pomocą dopuszczalnych farmaceutycznie halogenków amoniowych i/albo przez szczepienie poliwiniloaminą, do wytwarzania preparatu do bezpośredniej neutralizacji heparyny we krwi i płynach fizjologicznych u ssaka, w postaci roztworu do podawania dożylnego i/albo roztworu do bezpośredniego podawania do krwi lub płynu fizjologicznego pobranego od dawcy.

Korzystnie jako halogenki amoniowe stosuje się chlorki amoniowe.

Korzystnie jako chlorek amoniowy stosuje się chlorek glicydylotrimetyloamoniowy lub chlorek (3-akryloamidopropyl)trimetyloamoniowy.

Korzystnie stosuje się dekstran modyfikowany chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym, hydroksypropylocelulozę szczepioną chlorkiem (3-akryloamidopropyl)trimetyloamoniowym, hydroksypropylocelulozę szczepioną poliwiniloaminą, hydroksypropylocelulozę szczepioną poliwiniloaminą i modyfikowaną chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym.

Polisacharydy, dzięki modyfikacji kationowej, uzyskały zdolność silnego oddziaływania z heparyną, która jest polianionem, i tworzenia z nią kompleksów. Kompleksowanie heparyny prowadzi do utraty przez nią właściwości antykoagulacyjnych. Jako polimery kompleksujące heparynę wybrane zostały polisacharydy ze względu na ich korzystne właściwości biomedyczne – biodegradowalność i nietoksyczność. Do polisacharydu można wprowadzać małą cząsteczkowe ugrupowania kationowe lub, alternatywnie, szczepić polisacharyd polimerem zawierającym ugrupowania kationowe, dzięki czemu wprowadza się całe boczne łańcuchy polimerowe zawierające wiele grup kationowych. Bardzo korzystne jest połączenie tych dwóch sposobów modyfikacji, ponieważ stosowane do modyfikacji małą cząsteczkowej wiązki amoniowe łatwo reagują z grupami aminowymi obecnymi w polimerze użytym do szczepienia polisacharydu. Przykładowo, szczepienie poliwiniloaminy na hydroksypropylocelulozie pozwoliło na łatwą kationową modyfikację za pomocą chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC) otrzymanego polimeru, ponieważ GTMAC łatwo reaguje z grupami aminowymi obecnymi w poliwiniloaminie.

Dzięki kationowym modyfikacjom według wynalazku polisacharydy uzyskały zdolność do kompleksowania heparyny, a przez to i neutralizacji jej antykoagulacyjnego działania.

Jako polisacharydy najkorzystniej stosuje się dekstran i hydroksypropylocelulozę, ale możliwe jest także zastosowanie innych polisacharydów, z wyłączeniem chitozanu. Z kolei do modyfikacji małącząstkowej można użyć dowolnego związku amoniowego zawierającego grupę funkcyjną mogącą reagować z grupami funkcyjnymi danego polisacharydu. Przykładowo w przypadku GTMAC grupa glicydylowa może reagować z grupami NH_2 chitozanu lub OH dekstranu, prowadząc do ich podstawienia przez GTMAC. W ogólnym przypadku związki, które mogą być zastosowane do kationowej modyfikacji polisacharydu mogą być bardzo różnej natury, zatem reakcje modyfikowania nimi polisacharydu mogą być prowadzone w bardzo różnych warunkach eksperymentalnych, ogólnie znanych z literatury chemicznej.

Z kolei do szczepienia polisacharydu można użyć dowolnego związku amoniowego zdolnego do polimeryzacji, np. polimeryzacji rodnikowej, kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, polimeryzacji z otwarciem pierścienia, polikondensacji lub poliaddycji. Może to być np. związek amoniowy zawierający grupę winylową lub hydroksykwasy zawierający grupę amoniową. W przypadku polimeryzacji rodnikowej szczepienie polega na wytworzeniu rodników wzdłuż łańcucha polisacharydu (np. poprzez dodanie BPO albo KMnO_4), które inicjują wzrost łańcuchów bocznych w obecności odpowiedniego monomeru winylowego.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach stosowania.

Przykład 1.

Otrzymywanie dekstranu modyfikowanego chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym (GTMAC).

W 100 ml wody destylowanej rozpuszczono 2 g dekstranu o masie molowej 100 000 Da, następnie dodano NaOH i GTMAC w ilości podanej w Tabeli 1. Mieszaninę reakcyjną podgrzano do 60°C . Reakcję prowadzono przez 4 godziny. Roztwór zawierający produkt dializowano względem wody destylowanej tak długo, aż przewodnictwo spadło do wartości $2 \mu\text{S}$. Otrzymane polimery wyizolowano poprzez wymrażanie pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano dwa polimery o różnym stopniu modyfikacji, oznaczone odpowiednio jako Dex-GTMAC-1 i Dex-GTMAC-2.

Tabela 1.
Ilości katalizatora i GTMAC użyte podczas syntezy polimerów

Nazwa polimeru	Dex-GTMAC-1	Dex-GTMAC-2
Ilość katalizatora NaOH [mg]	400	400
Ilość GTMAC [ml]	12	24

Dla obydwu otrzymanych polimerów wyznaczono stopień modyfikacji na podstawie analizy elementarnej. Wyniki oznaczania składu pierwiastkowego obydwu otrzymanych polimerów przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2.
Skład pierwiastkowy zmodyfikowanych dekstranów

	C%	H%	N%
Dex-GTMAC-1	43,605	7,223	2,02
Dex-GTMAC-2	43,61	7,29	2,86

Obliczony na podstawie otrzymanych wyników analizy elementarnej stopień podstawienia dekstranu przez GTMAC (zdefiniowany jako liczba cząsteczek GTMAC przyłączonych do jednostki glukozowej) wynosi 0,48 i 0,67 odpowiednio dla Dex-GTMAC-1 i Dex-GTMAC-2.

Kompleksowanie heparyny niefrakcjonowanej (UFH) przez Dex-GTMAC.

Zbadano zależność stężenia UFH od stężenia dodanego Dex-GTMAC stosując metodę spektrofotometryczną opartą na zastosowaniu barwnika Azuru A. Na Fig. 1 przedstawiono zależność stężenia UFH w wodnym roztworze od masy dodanego a) Dex-GTMAC-1 i b) Dex-GTMAC-2. Obliczona na podstawie Fig. 1 masa polimeru potrzebna do związania 90% mg UFH wynosi odpowiednio 3,15 i 1,95 mg odpowiednio dla Dex-GTMAC-1 i Dex-GTMAC-2.

Kompleksowanie heparyny niskocząsteczkowej (LMWH) przez Dex-GTMAC-2.

Przeprowadzono analogiczne badania nad wiązaniem LMWH przez Dex-GTMAC-2. Wykazały one, że związanie 90% LMWH obecnej w roztworze wymaga dodania około 19 μ g Dex-GTMAC-2. Na Fig. 2. przedstawiono zależność stężenia LMWH w wodnym roztworze od masy Dex-GTMAC-2.

Przykład 2

Synteza hydroksypropylocelulozy szczepionej chlorkiem (3-akrylamidopropyl)trimetyloamoniowym.

W 15 ml dimetyloformamidu (DMF) rozpuszczono 1,5 g (~5 mmol) hydroksypropylocelulozy (HPC). Roztwór odtleniono przepuszczając przez niego azot przez 30 minut. W analogiczny sposób odtleniono 7,5 ml DMF, do którego następnie dodano 1,35 g inicjatora – nadtlenu benzoilu (BPO). Roztwory połączono w kolbie trójszyjnej, która umożliwiała przepuszczanie azotu przez ciecz znajdującą się w naczyniu w trakcie reakcji. Po 5 minutach dodano 17,72 g (~85,75 mmoli) około 75% wodnego roztworu chlorku (3-akryloamidopropyl)trimetyloamoniowego (APTMAC). Mieszaninę reakcyjną o temperaturze 70°C mieszano przez 3 godziny na mieszadle magnetycznym ciągle przepuszczając przez nią azot. Następnie po ochłodzeniu przeniesiono ją do tuby dializacyjnej i dializowano najpierw przez 2 dni wobec DMF, następnie przez tydzień wobec mieszanin DMF/woda stopniowo zwiększając zawartość wody aż do osiągnięcia czystej wody i przez kolejne dwa tygodnie wobec wody destylowanej. Otrzymany polimer, oznaczony symbolem HPC-APTMAC, wyizolowano poprzez wymrażanie pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wyniki przeprowadzonej analizy składu pierwiastkowego HPC-APTMAC przedstawia Tabela 3.

Tabela 3.
Skład pierwiastkowy HPC i HPC-APTMAC

Polimer	Procentowy udział pierwiast			ców[%]
	C	H	N	C/N
HPC	53,15	8,45	0	0
HPC-APTMAC	50,33	9,078	9,29	0,18

Na podstawie zawartości azotu w zsyntetyzowanym polimerze otrzymanej w wyniku analizy elementarnej obliczono stopień szczepienia (DG) HPC przez APTMAC zdefiniowany jako liczba przyłączonych cząsteczek APTMAC na 100 jednostek glukozowych. Obliczona średnia liczba merów APTMAC przyłączonych do 100 jednostek glukozowych wynosi 411.

Kompleksowanie heparyny przez HPC-APTMAC.

Zbadano zależność stężenia heparyny od stężenia dodanego HPC-APTMAC stosując metodę spektrofotometryczną opartą na zastosowaniu barwnika Azuru A. Obliczona na podstawie wykresu masa HPC-APTMAC potrzebna do związania 1 mg heparyny wynosi 1,20 mg. Zależność stężenia heparyny w wodnym roztworze od masy dodanego HPC-APTMAC przedstawiono na Fig. 3.

Badanie wielkości cząstek kompleksu HPC-APTMAC z heparyną przy pomocy pomiarów DLS.

Za pomocą dynamicznego rozpraszania światła zmierzono wielkość kompleksów HPC-APTMAC z heparyną otrzymanych poprzez zmieszanie roztworu heparyny (0,2 g/l) i HPC-APTMAC (0,6 g/l). Proporcja ta odpowiada ilości polimeru wystarczającej do całkowitego związania heparyny wyznaczonej spektrofotometrycznie. Na Fig. 4 przedstawiono rozkład rozmiarów kompleksu heparyna/HPC-APTMAC w różnych temperaturach. Jak widać na Fig. 4 kompleksy HPC-APTMAC i heparyny są mniejsze niż kompleksy heparyny z protaminą (odpowiednio 148 nm i 1300 nm), a ich dyspersja rozmiarów stosunkowo niewielka. Kompleksy o tak niewielkich rozmiarach są łatwo usuwane z krwiobiegu. W temperaturze powyżej LCST średnica kompleksów jest tylko nieco większa (171 nm) niż w temperaturze pokojowej, zatem nawet w temperaturze powyżej LCST kompleksy te są na tyle małe, że mogą być łatwo usuwane przez organizm.

Przykład 3

Synteza hydroksypropylocelulozy szczepionej poliwiniloaminą i modyfikowanej kationowo chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym

3 g hydroksypropylocelulozy (HPC) rozpuszczono w 30 ml dimetyloformamidu (DMF) i umieszczono w zamkniętej kolbie trójszyjnej o pojemności 250 ml mieszając mieszadłem magnetycznym.

Roztwór odtleniono przepuszczając przez 30 minut azot. Następnie dodano 2,7 g (11,16 mM) nadtlenu benzoilu (BPO) rozpuszczonego w 15 ml DMF. Po 5 minutach dodano 12,19 g (171,50 mM) N-winyloformamidu (NVF). Temperaturę podwyższono do 70°C i prowadzono reakcję przez trzy godziny ciągle mieszając i odtleniając roztwór azotem. Po trzech godzinach mieszaninę reakcyjną ochłodzono i dializowano przez tydzień najpierw względem DMF, a następnie względem wody destylowanej. Otrzymany roztwór polimeru zagęszczono na wyparce, następnie usunięto resztę wody poprzez wymrażanie pod zmniejszonym ciśnieniem. Po wysuszeniu 460 mg otrzymanego polimeru rozpuszczono w 40 ml wody destylowanej i umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml zawierającej 20 ml stężonego kwasu solnego. Mieszaninę reakcyjną odtleniono przepuszczając azot przez 2 h. Roztwór pozostawiono na mieszadle magnetycznym na 72 godziny, po czym dializowano względem wody aż do obojętnego pH. Do 50 ml dializowanego roztworu (około 50% całego roztworu otrzymanego w wyniku dializy) dodano 50 mg NaOH i 5 ml roztworu GTMAC. Tak otrzymaną mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle przez 24 godziny. Po upływie tego czasu otrzymany roztwór dializowano względem wody przez 2 tygodnie.

W wyniku analizy elementarnej otrzymano skład pierwiastkowy HPC stosowanej podczas syntezy (Tabela 4).

Tabela 4.
Skład pierwiastkowy HPC stosowanej podczas syntezy

C%	H%	O%
53,147	8,455	38,398

Obliczona na podstawie składu pierwiastkowego liczba grup hydroksypropylowych przypadających na jedną jednostkę glukozową wynosi 3,034.

Skład pierwiastkowy HPC szczepionej poli(N-winyloformamidem) przedstawia Tabela 5.

Tabela 5.
Skład pierwiastkowy HPC szczepionej poli(N-winyloformamidem)

C%	H%	N%	O%
49,989	8,279	2,039	39,692

Na podstawie otrzymanych wyników analizy elementarnej obliczono, że na jedną jednostkę glukozową przypada 0,64 jednostek N-winyloformamidowych.

W oparciu o widma $^1\text{H-NMR}$ (relatywnie niewielka zmiana w składzie procentowym nie pozwala posłużyć się tu analizą elementarną) stwierdzono, że stopień hydrolizy grup formamidowych naszczepionych na polimerze wynosi 50%, dlatego liczba grup NH_2 przypadających na jednostkę glukozową wynosi 0,32. Ostateczny stopień modyfikacji cząsteczkami GTMAC grup NH_2 obecnych w polimerze obliczono posługując się wynikami z analizy elementarnej i przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6.
Skład pierwiastkowy HPC szczepionej poli(N-winyloformamidem) poddanej hydrolizie a następnie modyfikacji GTMAC

C%	H%	N%
48,259	8,352	2,692

W oparciu o otrzymane wyniki obliczono, że stopień przyłączenia cząsteczek GTMAC do grup NH_2 wynosi 0,95 cząsteczek GTMAC na grupę NH_2 . W oparciu o wcześniejsze wyniki stwierdzono, że na 100 jednostek glukozowych przypada średnio 30 grup NH_2 , podstawionych GTMAC.

Kompleksowanie heparyny przez HPC-PVA-GTMAC.

a) Heparyna niefrakcjonowana

Badanie kompleksowania heparyny przez HPC-PVA i HPC-PVA-GTMAC przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu Azuru A jako barwnika (Fig. 5 – widma absorpcyjne roztworu Azuru A ($c=4 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) w buforze PBS o pH 7,4 zawierającym UFH (200 µg/ml) w obecności różnych stężeń HPC-PVA-GTMAC). Wykazano, że w miarę wzrostu stężenia HPC-PVA-GTMAC i HPC-PVA w roztworze heparyny niefrakcjonowanej (UFH) stężenie wolnej (nieskompleksowanej) heparyny malało. Na podstawie widm przedstawionych na Fig. 5 obliczono zawartość wolnej UFH przy danym

stosunku masy HPC-PVA i HPC-PVA-GTMAC do masy UFH (Fig. 6 – zależność stężenia heparyny w roztworze PBS od masy dodanego HPC-PVA i HPC-PVA-GTMAC w przeliczeniu na 1 mg heparyny niefrakcjonowanej).

Obydwa te polimery powodują więc kompleksowanie UFH, przy czym silniej kompleksuje ją polimer HPC-PVA-GTMAC. Ilości tych polimerów potrzebne do związania 1 mg UFH przedstawia Tabela 7.

Tabela 7.
Masa polimeru potrzebna do związania 1 mg UFH

Polimer	Masa polimeru potrzebna do związania 1 mg UFH (mg)
HPC-PVA	4,61
HPC-PVA-GTMAC	3,64

b) Kompleksowanie heparyny niskocząsteczkowej (LMWH)

W celu wyznaczenia masy HPC-PVA-GTMAC potrzebnej do skompleksowania LMWH przeprowadzono analogiczne pomiary jak w przypadku UFH. Na Fig. 7 przedstawiono widma absorpcyjne roztworu Azuru A w buforze PBS o pH 7,4 zawierającym LMWH (28,5 jednostki /ml) w obecności różnych stężeń HPC-PVA-GTMAC, a na Fig. 8 przedstawiono procentową zawartość wolnej LMWH w zależności od stosunku masy dodanego HPC-PVA-GTMAC do masy LMWH obecnej w roztworze. Ilość HPC-PVA-GTMAC potrzebna do usunięcia 100 jednostek LMWH to 2,35 mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie polisacharydów wybranych spośród dekstranu lub hydroksypropylocelulozy modyfikowanych kationowo za pomocą dopuszczalnych farmaceutycznie halogenków amoniowych i/lub przez szczepienie poliwiniloaminą, do wytwarzania preparatu do bezpośredniej neutralizacji heparyny we krwi i płynach fizjologicznych u ssaka, w postaci roztworu do podawania dożylnego i/albo roztworu do bezpośredniego podawania do krwi lub płynu fizjologicznego pobranego od dawcy.

2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że jako halogenki amoniowe stosuje się chlorki amoniowe.

3. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że jako chlorek amoniowy stosuje się chlorek glicydylotrimetyloamoniowy lub chlorek (3-akryloamidopropyl)trimetyloamoniowy.

4. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 3, **znamiennie tym**, że stosuje się dekstran modyfikowany chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym.

5. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 3, **znamiennie tym**, że stosuje się hydroksypropylocelulozę szczepioną chlorkiem (3-akryloamidopropyl)trimetyloamoniowym.

6. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 3, **znamiennie tym**, że stosuje się hydroksypropylocelulozę szczepioną poliwiniloaminą.

7. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się hydroksypropylocelulozę szczepioną poliwiniloaminą i modyfikowaną chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym.

Rysunki

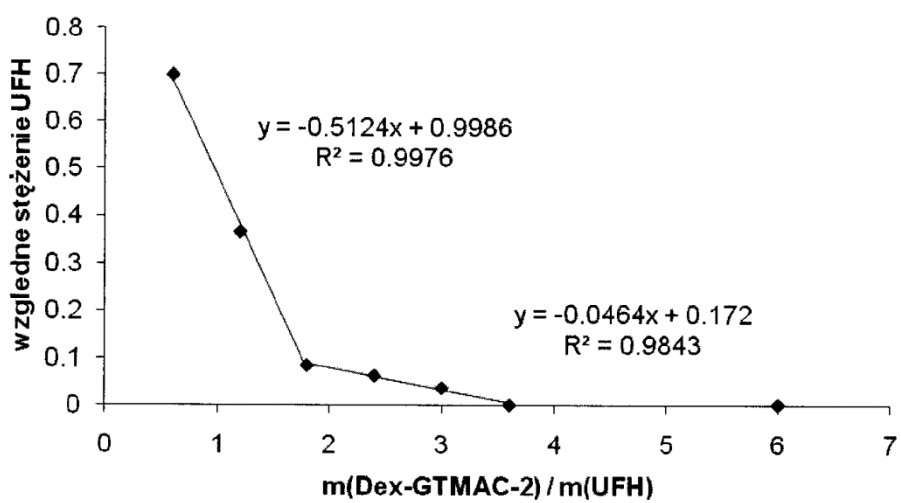
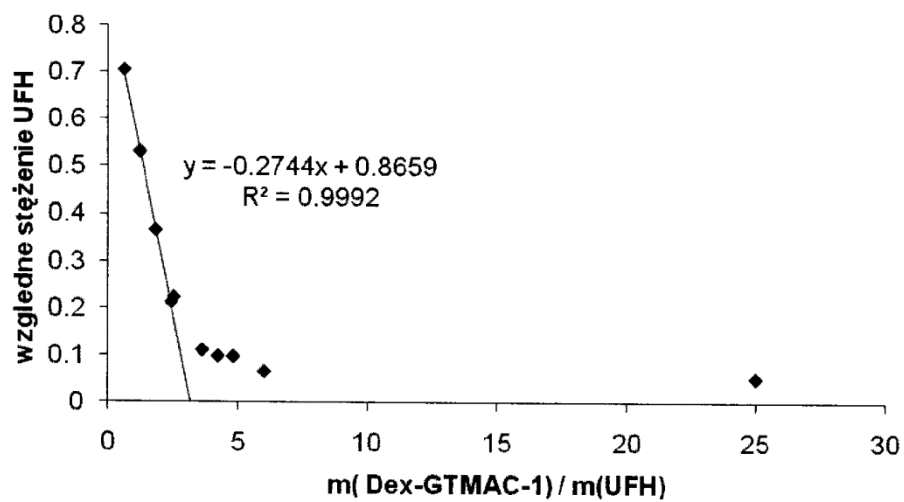


FIG.1

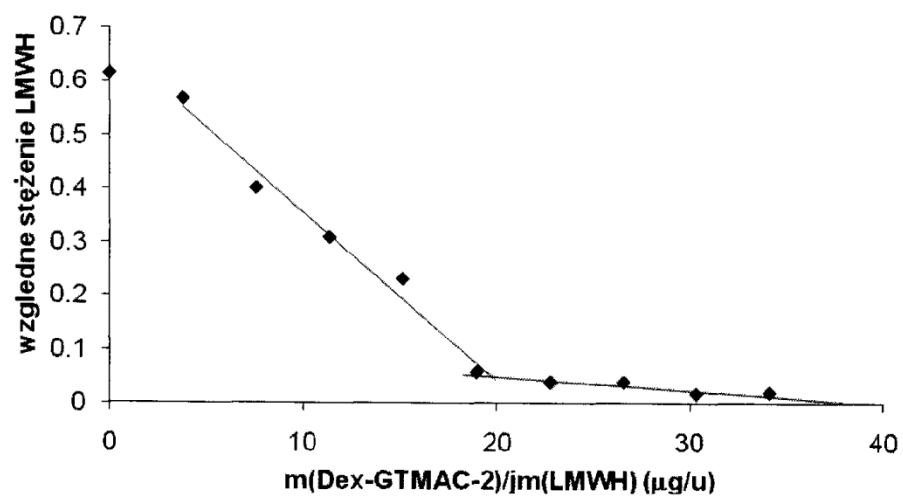


FIG. 2

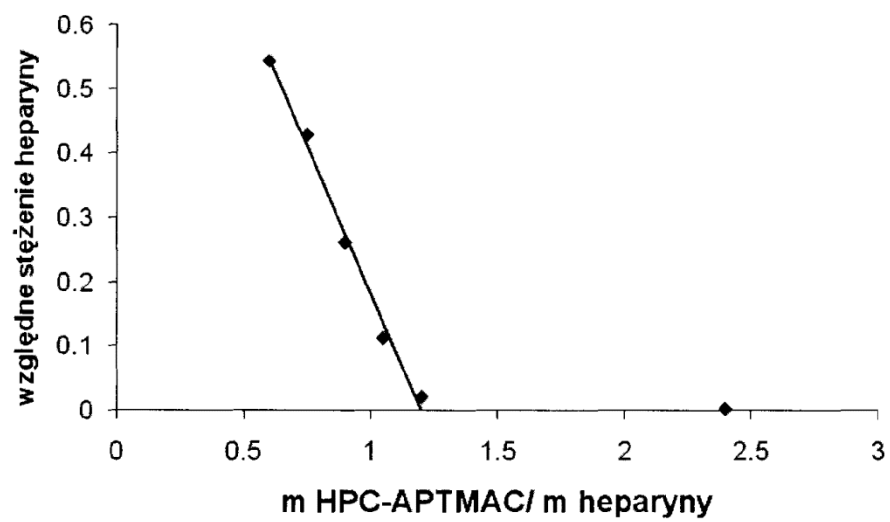


FIG.3

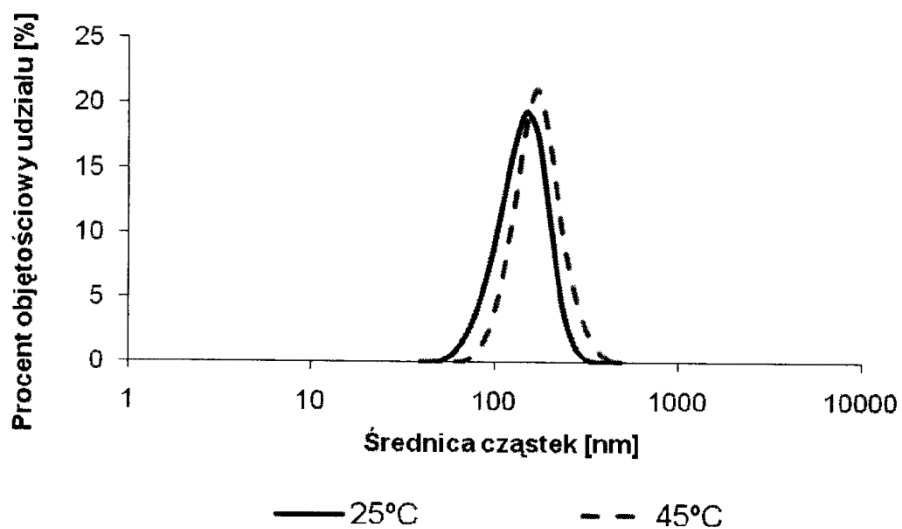


FIG. 4

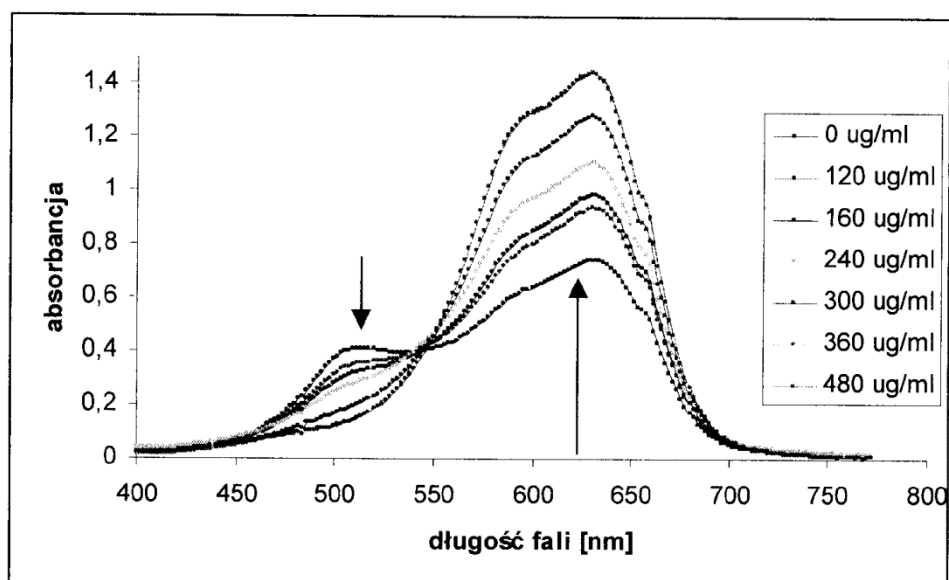


FIG.5

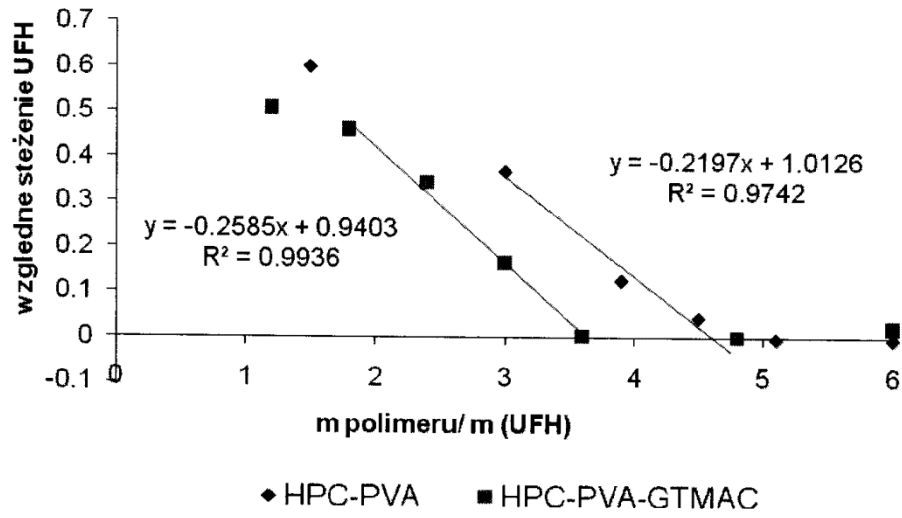


FIG.6

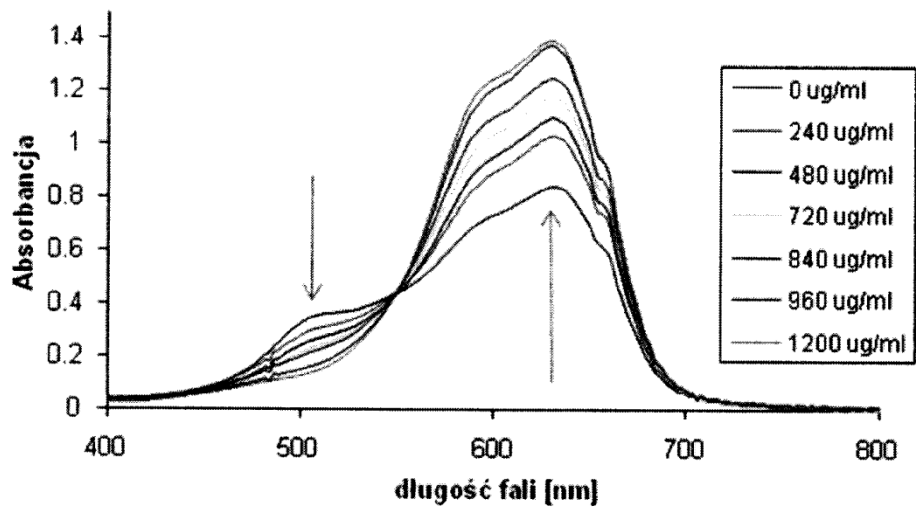


FIG. 7

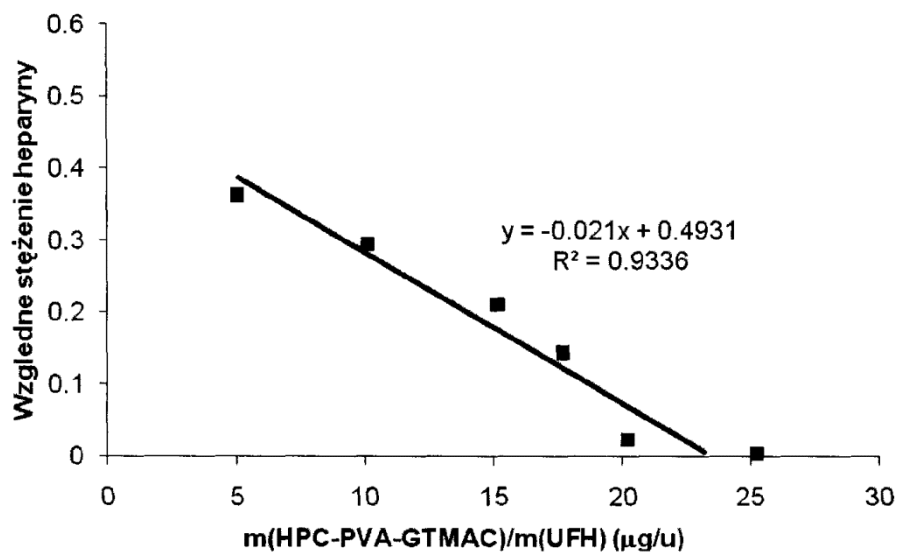


FIG.8