



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2016, 2, 7-16
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

POSZUKIWANIE NASTĘPCÓW PROTAMINY: SKUTECZNE I BEZPIECZNE HAMOWANIE KRWAWIENIA WYWOŁANEGO PODANIEM POZAJELITOWYCH ŚRODKÓW PRZECIWKRZEPLIWYCH

Emilia Sokołowska*, Andrzej Mogielnicki

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Mickiewicza 2c, 15-089 Białystok

* autorka korespondująca, tel: +48 506 361 821, e-mail: emiliasokolowska.umwb@gmail.com

Otrzymany 21.03.2016, zaakceptowany 20.04.2016, zamieszczony 29.05.2016

STRESZCZENIE

Heparyna niefrakcjonowana jest stosowanym w medycynie antykoagulantem zapobiegającym krzepnięciu krwi. W stanach zagrożenia życia, gdy potrzebne jest szybkie odwrócenie działania antykoagulacyjnego heparyny, jako antidotum dostępna jest protamina, zarejestrowana w 1939 roku. Znaczna toksyczność protaminy, która pozyskiwana jest z nasienia łososa, prawdopodobnie jest związana z jej odzwierzęcym pochodzeniem. Toksyczność manifestuje się jako spadek ciśnienia tętniczego, katastrofalny skurcz naczyń płucnych czy prowadzące nawet do śmierci reakcje anafilaktyczne. Dlatego ośrodki naukowe od lat poszukują bezpieczniejszych alternatyw. Największe nadzieje wiąże się z już bliskim zarejestrowania andexanetem alfa. W obecnej pracy przedstawiliśmy najważniejsze działania niepożądane protaminy, a także wykaz znajdujących się w fazie badań środków neutralizujących działanie pozajelitowych leków przeciwkrzepliwych.

SŁOWA KLUCZOWE: heparyna, protamina, antidotum, odtrutka, neutralizacja

ABSTRACT

SEARCH FOR PROTAMINE REPLACEMENTS: EFFICACIOUS AND SAFE INHIBITION OF BLEEDING INDUCED BY PARENTERAL ANTICOAGULANTS

Unfractionated heparin is used in medicine as an anticoagulant to prevent blood clotting. In life-threatening emergencies when fast reversal of the anticoagulant action of heparin is necessary, protamine - an agent approved in 1939 - is available as an antidote. The biological origin of protamine, which is isolated from salmon sperm, is probably responsible for its considerable toxicity, which manifests itself as arterial hypotension, catastrophic pulmonary vasoconstriction or severe, sometimes lethal, anaphylactic reaction. Consequently, safer alternatives have been sought for many years. The most promising antidote currently in an advanced stage of development is andexanet alfa. In the present review, we discuss the major deleterious effects of protamine and list agents, presently in the research phase, with the potential to neutralize the action of parenteral anticoagulants.

KEYWORDS: heparin, protamine, antidote, neutralization

1. Wstęp

Heparyna niefrakcjonowana jest stosowana głównie w szpitalach, podczas leczenia i zapobiegania zakrzepicy, ale jej podanie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem krwawienia. Chociaż standardowa heparyna jest zastępowana, głównie ze względów bezpieczeństwa, przez heparyny drobnocząsteczkowe lub fondaparynuks, według najnowszych raportów europejski rynek heparyn szacuje się na około 2 mld USD, a może osiągnąć 3 mld USD w 2022 roku; z czego sprzedaż heparyny niefrakcjonowanej stanowi około 10% [1]. W przeciwieństwie do nowych antykoagulantów terapia heparyną jest tania i może być w pełni zneutralizowana siarczanem protaminy. Ilekroć krew styka się ze sztucznymi powierzchniami krążenia pozaustrojowego lub innego urządzenia medycznego, heparyna umożliwia wykonanie inwazyjnego zabiegu chirurgicznego poprzez zapobieganie krzepnięciu krwi. W rzeczywistości, stosowanie heparyny niefrakcjonowanej i protaminy jest istotne w wielu zabiegach przeprowadzanych na układzie sercowo-

naczyniowym, takich jak przezskórne interwencje wieńcowe, pomostowanie aortalno-wieńcowe, transplantacje serca czy wszczepienie sztucznych zastawek; ich liczba wzrosła o 28% od 5 939 000 w 2000 roku do 7 588 000 w 2010 roku w USA [2]. Istnieje kilka alternatyw protaminy dostępnych lub będących w trakcie badań. Protamina jako pierwsza została zarejestrowana przez amerykańską agencję do spraw żywności i leków (FDA) w 1939 roku. Obecnie największe szanse na zarejestrowanie ma andexanet alfa [3].

Pomimo wąskiego indeksu terapeutycznego, protamina jest jedyną opcją odwrócenia przeciwkrzepliwego działania heparyny od ponad siedemdziesięciu lat. Częstość występowania łagodnych reakcji po podaniu protaminy wynosi około 16%, a ciężkich między 0,2% i 3,0% [4,5]. Poważne działania niepożądane protaminy, jak ostry skurcz naczyń płucnych i nadciśnienie płucne, znaczne obniżenie tętniczego ciśnienia krwi lub wstrząs anafilaktyczny występują u pacjentów rzadko, ale gdy wystąpią, zagrażają życiu. Ze względu na możliwe powikłania podjęto wiele badań w ce-

lu opracowania bezpieczniejszego substytutu protaminy [6]. Obecnie najbardziej zaawansowane badania nad inhibitorami heparyn przeprowadzane na zwierzętach dotyczą uniwersalnych środków odwracających działanie heparyn (Universal Heparin Reversal Agents, UHRA) [7], opracowanych przez nas kationowo zmodyfikowanych dekstranów [8,9], lub u ludzi: andexanetu alfa [3] oraz aripazyny (PER977) [10].

Bezpieczeństwo pacjentów jest najważniejsze, więc potencjalna toksyczność nowych kandydatów na leki jest znaczącym problemem. Wiele związków, które były bardzo skuteczne w fazie badawczej, takie jak delparatang (PMX-60056) [11], układ REG1 [12], PM102 [13], później w przedklinicznych i klinicznych badaniach wykazywały niepożądane działania niepożądane i nie zostały wprowadzone do leczenia.

2. Siarczan protaminy

2.1. Kontekst historyczny

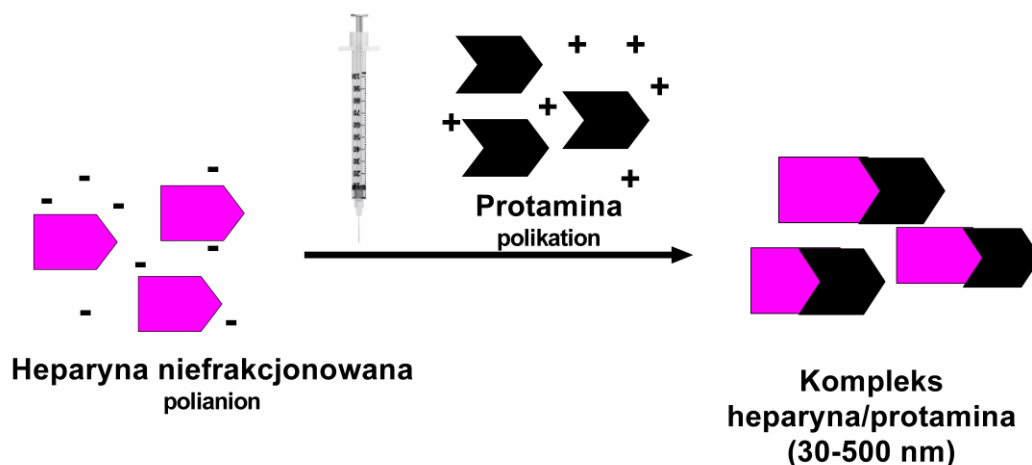
Protamina jest polikationowym białkiem otrzymywanym z ryb, mającym zastosowanie do odwracania przeciwkrzepliwego działania heparyny. W 1868 roku Friedric Miescher rozpoczął badania nad jądrem komórkowym, które doprowadziły do odkrycia zasady azotowej związanej z materiałem jądrowym pozyskiwanym z główek plemników łososia Rine [14]. W 1874 roku odkrywca nadał tej substancji nazwę protamina [15]. Spośród badanych w tym czasie białek protamina miała najprostszą kompozycję aminokwasów. Wykorzystując protaminę za wzór Miescher i wsp. stworzyli podstawy chemii białek [14]. Różne rodzaje protaminy zostały nazwane od źródeł ich pochodzenia: *clupeine* - ze śledzia, *salmine* - z łososia, *scombrine* - z makreli. Obecnie komercyjnie dostępna protamina jest pozyskiwana z mlecza spermy samców łososia, który tradycyjnie był poławiany u północno-wschodnich wybrzeży japońskiej wyspy Honsiu. Po trzęsieniu ziemi i tsunami w marcu 2011 roku japoński przemysł rybacki nie był już w stanie działać na łowiskach Honsiu z powodu braku łodzi i braku wsparcia usług na lądzie. W celu utrzymania podaży protaminy teryny odłowu dzikiego łososia zostały przeniesione na północ

od wyspy Hokkaido. Ta zmiana źródła surowca prowadzi do różnic w działaniu substancji czynnej. Jednak po dokonaniu oceny wszystkich dostępnych danych Europejska Agencja Leków (EMA) uznała, iż te różnice nie mają istotnego wpływu na jakość leku i ze względu na znaczenie protaminy jako leku ratującego życie może być ona nadal dopuszczona do obrotu.

Prawie 67% aminokwasów wchodzących w skład protaminy stanowi arginina, co czyni ją silnie alkalicznym białkiem, a masa cząsteczkowa wynosi około 6500 daltonów [14]. Wiele dodatnich ładunków w cząsteczce protaminy łączy się z ujemnie naładowanymi grupami fosforowymi DNA, co stabilizuje strukturalnie jądra plemników [14]. Heparyna, polianionowy mukopolisacharyd, działa antykoagulacyjne poprzez interakcję z antytrombiną III (ATIII) [16]. Mechanizm neutralizacji heparyny przez protaminę polega na powstaniu sił jonowych tworzących stabilny kompleks 1:1, natychmiast usuwany przez układ siateczkowo-śródbłonkowy [17] (Ryc. 1). W rzeczywistości protamina ma dwa miejsca aktywne, z których jedno neutralizuje heparynę, a drugie wywiera słaby efekt antykoagulacyjny [14].

2.2. Farmakologia i farmakokinetyka protaminy

Wytyczne zalecają dawkowanie protaminy w stosunku 1,0-1,5 mg na 100 jednostek międzynarodowych (j.m.) heparyny (Tabela 1). W ten sposób pacjent po otrzymaniu w bolusie 5000 jednostek heparyny wymaga podania 50 mg protaminy [16]. Niezwiązana protamina hamuje angiogenezę [18] oraz adhezję i agregację płytek krwi [19]. Nowsze badania wykazały, że protamina znacznie wzmacnia fibrylizę [20], wydłuża czas krwawienia, hamuje czynnik V (FV), przedłużając jednocześnie czas protrombinowy (PT) i czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT). Hamuje również zależną od czynnika tkankowego (TF) generację trombiny w ludzkim osoczu [21], jednak umiarkowanie neutralizuje aktywność przeciwko aktywnemu czynnikowi X (anti-FXa) [22]. Crowther i wsp. udowodnili, że niższa masa cząsteczkowa heparyn drobnocząsteczkowych, a także niższy stopień podstawienia łańcuchów glukozydowych grupami



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie mechanizmu neutralizacji heparyny niefrakcjonowanej przez protaminę. Protamina wiąże heparynę w stosunku 1:1, tworząc stabilną sól o ładunku neutralnym, pozbawioną właściwości antykoagulacyjnych. Średnia wielkość cząstek powstałych kompleksów heparyna/protamina waha się między 30 a 500 nm.

siarczanowymi, które nadają cząsteczce heparyny ładunek ujemny, utrudniają pełną neutralizację ich aktywności antykoagulacyjnej przez protaminę [23]. Stąd heparyna niefrakcjonowana z najwyższą ilością grup siarczanowych przy jednostce cukrowej jest efektywniej inaktywowana.

Modele zwierzęce są powszechnie stosowane w badaniach przedklinicznych, aby przewidzieć zachowanie metaboliczne nowych związków u pacjentów. Wiadomo, że izoformy, ekspresja i aktywność katalityczna enzymów metabolizujących mogą być inne u zwierząt. Różnice w tempie metabolizmu i eliminacji leków determinuje również szybkość przepływu krwi przez wątrobę i nerki, która w przypadku gryzoni jest około 5-7 razy większa niż u ludzi. Czas półtrwania protaminy po podaniu pojedynczej dawki szczerom wynosi około 24 minuty w przypadku braku i 18 minut w obecności heparyny [24]. Badania farmakokinetyki protaminy przeprowadzone u ludzi wykazały, iż czas półtrwania wynosił około 7,4 (5,9-9,3) minut [25]. Biorąc pod uwagę, że protamina ma krótszy okres półtrwania niż heparyna (1-2 godziny), wymagane może być podanie dodatkowej dawki protaminy. Do monitorowania skuteczności protaminy podczas neutralizacji heparyny służą aPTT i czas krzepnięcia po aktywacji (ACT) [16].

Tabela 1. Dawkowanie protaminy w zależności od czasu, który upłynął od podania heparyny niefrakcjonowanej. 1 mg siarczanu protaminy neutralizuje zwykle co najmniej 100 j.m. heparyny pozyskiwanej z błon śluzowych lub 80 jednostek heparyny pozyskiwanej z ptuc.

Czas od podania heparyny	Dawka protaminy (mg) na 100 j.m. heparyny w zależności od czasu, który upłynął od podania heparyny
< 30 minut	1,000 mg
30-60 minut	0,500-0,750 mg
60-120 minut	0,375-0,500 mg
120 minut	0,250-0,375 mg

2.3. Czynniki ryzyka

Protamina jest uważana za czynnik ryzyka powodujący zagrażające życiu działania niepożądane, które mogą występować nie tylko podczas operacji na sercu przy użyciu krążenia pozaustrojowego, ale także w znacznie mniejszych dawkach, gdy protamina neutralizuje heparynę w chirurgii naczyń obwodowych lub angioplastyce naczyń wieńcowych [26].

Opublikowano przypadek człowieka uczulonego na ryby, który miał zapaść krążeniową po podaniu protaminy [27], a test immunoenzymatyczny wykazał wysokie miana przeciwciał IgG, IgM i IgE wobec siarczanu protaminy. Z drugiej strony, Levy i wsp. opisali, iż z grupy 4796 pacjentów poddanych zabiegom kardiochirurgicznym tylko 6 miało historię alergii na ryby, lecz u żadnego nie zaobserwowano niepożądanych reakcji [28]. Ponieważ skorupiaki i ryby są filogenetycznie odrębne, alergia na skorupiaki nie jest uznawana za czynnik ryzyka.

Mężczyźni niepoddani zabiegowi wazektomii mają barierę „krew-jądra”, która oddziela spermę od reszty ciała. Wykazano, iż 35% z 55 mężczyzn po wazektomii miało w surowicy znaczące miana przeciwciał antyprotaminowych IgG, w porównaniu do 50 dopasowanych wiekiem pacjentów kontrolnych, u których nie zaobserwowano odpowiedzi immunologicznej [29]. Wcześniejsze doniesienia wskazywa-

ły, że w ciągu roku od wazektomii, więcej niż u 50% mężczyzn rozwinęły się aglutynujące autoprzeciwciała wobec plemników, a u 22% do 30% rozwinęły się autoprzeciwciała przeciwko protaminie [30]. Z powodu podobieństw między protaminą rybą i ludzką, reakcja krzyżowa jest możliwa.

Przeciwciała przeciwko protaminie są częste u pacjentów z cukrzycą, przyjmujących preparaty zawierające dodatek protaminy, która przedłuża wchłanianie podawanej podskórnie insuliny. Kompleksy protaminy i insuliny obejmują insulinę protaminowo-cynkową, z początkiem działania 7 godzin po iniekcji i 36-godzinny czasem trwania oraz insulinę izofanową, z początkiem działania po 0,5-1,5 godziny po podaniu podskórnym, szczytem między 3 a 12 godziną, i końcem działania po 18 do 22 godzinach. Insulina izofanowa jest również znana jako insulina NPH (N od neutralna, P od protamina i H od Hagedorn). Prawdopodobieństwo powstania antyprotaminowych IgG wzrasta wraz z czasem użytkowania (38% po 1 roku do 91% po więcej niż 20 latach) [31]. Spośród 3245 kardiologicznych pacjentów chirurgicznych, częstość występowania reakcji na protaminę była dziesięciokrotnie większa u chorych na cukrzycę leczonych NPH [28].

2.4. Działania niepożądane

Od ponad 70 lat wiadomo, iż protamina może wywołać spadek ciśnienia krwi, wstrząs kardiogeny i zapaść naczyniową [32]. Przy zbyt szybkim podawaniu może powodować przemijające zaczerwienienie, uczucie ciepła, bradykardię i niedociśnienie. Niepożądane reakcje na protaminę mogą objawiać się jako wysypka, pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy, świszczący oddech, skurcz oskrzeli, zapaść sercowo-naczyniowa, i niekiedy kończą się śmiercią [33].

2.4.1. Działanie hipotensyjne

Szybkie podanie protaminy prowadzi do spadku ciśnienia tętniczego krwi, a następnie zapaści sercowo-naczyniowej, zawału mięśnia sercowego i nadciśnienia płucnego z niewydolnością prawej komory. Chociaż ulotka dystrybutora zaleca podawanie protaminy nie szybciej niż 5 mg/min, wiele badań wykazuje, iż pacjenci mogą tolerować znacznie szybsze tempo bez wystąpienia poważnej niestabilności hemodynamicznej [34].

Arginina, stanowiąca do 67% podstawowego składu aminokwasowego protaminy, jest fizjologicznym prekursorem tlenku azotu (NO), który działa jako endogenny czynnik wazodylatacyjny [35], ale również hamuje agregację płytek krwi [36].

Śródbłonek determinuje napięcie naczyń w homeostazie poprzez wydzielanie substancji rozszerzających naczynia. Śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (eNOS), która jest zależną od Ca^{2+} -kalmoduliny izoformą syntazy NO, powoduje ciągłe wytwarzanie tlenku azotu [37]. Fizjologicznie najważniejszym bodźcem do wytworzenia NO jest „shear stress” - siły ścierające, pośredniczące w fosforylacji eNOS, generowane przez strumień krwi na warstwie śródbłonkowej [38]. Indukowana syntaza tlenku azotu (iNOS) jest niezależną od Ca^{2+} izoformą NOS, aktywowaną przez cytokiny, prowadzącą do nadprodukcji NO.

Pevni i wsp. [39] wykazali, że rozkurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych indukowany protaminą jest zależny od eNOS, która jest związana z błoną komórkową śródbłonka naczyniowego. Zatem protamina może rozszerzać tylko nieuszkodzony śródbłonek [32]. Ponieważ zarówno protamina, jak i jej kompleks z heparyną są zbyt dużymi cząst-

kami, aby przeniknąć do wnętrza komórki, założono, że protamina działa na receptory śródbłonkowe [32]. Wzrost aktywności iNOS wydaje się być związany z procedurą krążenia pozaustrojowego [40]. Ponadto Ruvolo i wsp. [41] wykazali, że stymulacja mechaniczna ściany naczyń przez krążenie pozaustrojowe zwiększa aktywność konstytutywnej NOS oraz nadprodukcję NO. Takakura i wsp. udokumentowali, że zarówno protamina, jak i kompleks heparyna-protamina mobilizują szlak iNOS [42].

Niemniej jednak okazało się, iż protamina powoduje spadek ciśnienia tętniczego nie tylko poprzez zależne od śródbłonka naczyniowego uwalnianie NO, ale wydaje się, że mięśniówka gładka naczyń odgrywa również istotną rolę. Mechanizmy mogą obejmować kanały potasowe, efekty zależne od wapnia lub od kanałów BK_{Ca++} [43].

2.4.2. Reakcja anafilaktyczna

Gdy protamina wiąże się z heparyną, tworzy duże kompleksy, które są immunogenne u myszy [44]. Szacuje się, że ok. 0,1-0,6% pacjentów poddanych operacji kardiocirurgicznej doświadcza zagrażających życiu incydentów po podaniu protaminy [45,46]. Działania niepożądane jak pokrzywka, zaczerwienienie, świąd, wysypka, nudności, leukopenia i małopłytkowość występują u 16% [46], zaś zmniejszenie oporu naczyniowego, przemijające niedociśnienie, skurcz oskrzeli, zwężenie naczyń krwionośnych płuc lub obrzęk skóry, błony śluzowej i jelit ocenia się na 0,3% [47] - 1,1% [48] (Ryc. 2).

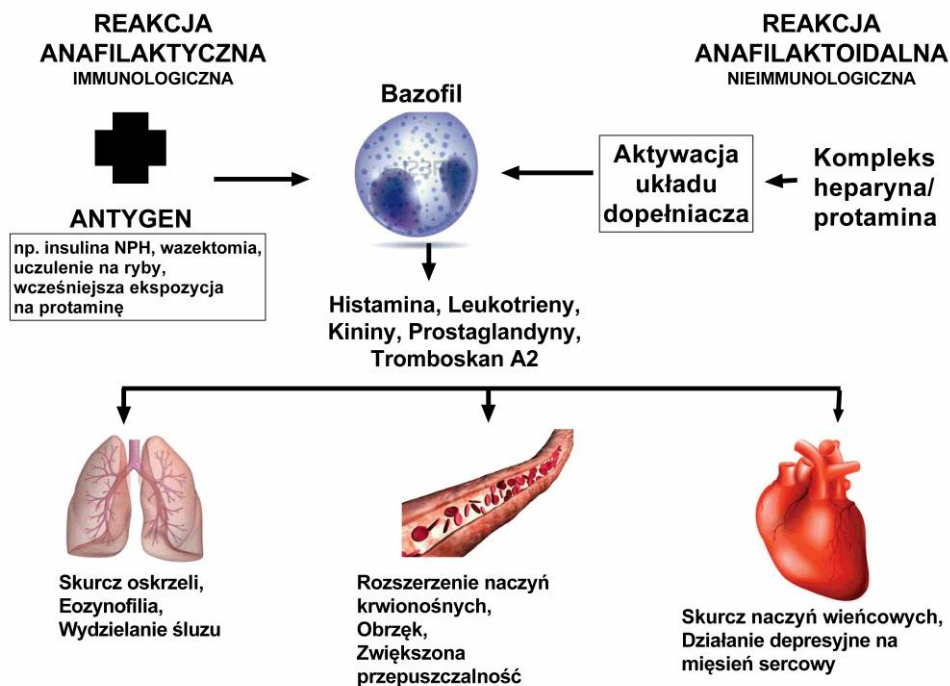
U diabetyków obecność przeciwciał antyprotaminowych IgE i IgG jest znaczącym czynnikiem ryzyka ostrej reakcji [49]. Insulina NPH zawiera od 0,35 do 0,45 mg protaminy na 100 jednostek insuliny, a rzadko używane insuliny protaminowo-cynkowe zawierają od 1,0 do 1,7 mg protaminy

na 100 jednostek insuliny [45]. Ta mała ilość protaminy nie wywołuje reakcji alergicznej. Jednakże, systematyczna ekspozycja na jej działanie powoduje powstanie komórek pamięci, w których obecności stosunkowo umiarkowane ilości protaminy mogą prowadzić do szybkiej i masywnej odpowiedzi immunologicznej [50] (Ryc. 2).

Diabetycy leczeni insuliną protaminową (NPH), mężczyźni po przebytej wazektomii, osoby uczulone na ryby są grupą zwiększonego ryzyka w przypadku konieczności neutralizacji heparyny przez protaminę. Zarówno reakcje anafilaktyczne przebiegające z udziałem przeciwciał, jak i reakcje anafilaktoidalne pobudzające m.in. układ dopełniacza mogą powodować podobne reakcje patofizjologiczne.

2.4.3. Nadciśnienie płucne

Kompleks heparyna-protamina indukuje nadciśnienie płucne przez wydzielanie tromboksanu A2 i serotoniny, a dalej prowadzi do obrzęku płuc i związanych z nim zaburzeń wentylacji/perfuzji, niedotlenienia, aktywacji leukocytów, gromadzenia płytek krwi w płucach i aktywacji dopełniacza [51]. Nadciśnienie płucne łatwo rozwija się u owiec i świń, u ludzi rzadko [52]. Skurcz oskrzeli można łagodzić przez podanie antagonistów receptora tromboksanu lub inhibitory cyklooksygenazy [53]. Leczenie polega na obniżaniu ciśnienia w tętnicy płucnej - w tym celu stosuje się nitroglicerynę, nitroprusydek sodu lub inhibitory fosfodiesterazy. Uszkodzenie naczyń płucnych może zaburzać uwalnianie zależnego od endotelium czynnika relaksującego [32]. W konsekwencji śródbłonek traci zdolność do ochrony przed czynnikami naczynioskurczowymi, a działanie wazodylatacyjne protaminy zmienia się na kurczące.



Ryc. 2. Cykl zdarzeń w reakcjach anafilaktycznej i anafilaktoidalnej.

3. Nowe środki hamujące krwawienie wywołane podaniem pozajelitowych leków przeciwkrzepliwych

3.1. Środki, których badania zostały przerwane, z uwagi na zbyt dużą toksyczność

3.1.1. Heparynaza I (Neutralase)

Jedną z pierwszych bardziej zaawansowanych prób zastąpienia protaminy było przetestowanie heparynazy I, która jest specyficznym enzymem rozkładającym heparynę na łańcuchy cukrowe, z okresem półtrwania od 5 do 18 minut. Naturalnie syntetyzowana przez bakterie *Flavobacterium heparinum* heparynaza I katalizuje rozszczepianie wybranych potąceń 1-4 glikozydowych w cząsteczce heparyny, a powstałe fragmenty di-, tetra-, heksa-, i oligosacharydów nie hamują aktywności czynnika IIa, chociaż zachowują 10-20% aktywności hamowania czynnika Xa nierozłożonej heparyny. Podczas testowania wykazano zwiększone ryzyko działań niepożądanych i większe zapotrzebowanie na transfuzje krwi u pacjentów otrzymujących heparynazę I w porównaniu do pacjentów leczonych protaminą. Prawdopodobnie mogło być to związane z niepełnym odwracaniem aktywności czynnika Xa podczas degradacji heparyny. Prawie dwukrotnie więcej pacjentów miało poważne zdarzenia niepożądane po podaniu heparynazy I. Bliższa analiza ciężkich incydentów ujawniała wzór zachorowalności, głównie związanych z krwawieniem (tamponada serca, wysięk osierdziowy, wysięk opłucnowy, krwiak opłucnej). Pacjenci, którym podawano heparynazę I musieli być hospitalizowani jeden dzień dłużej. Stwierdzono, iż heparynaza I ma gorszy profil bezpieczeństwa niż siarczan protaminy, dlatego w 2005 roku wstrzymano nad nią badania [54].

3.1.2. Czynniki płytkowy 4 (PF4)

PF4 jest białkiem wykazującym wysokie powinowactwo do wiązania i neutralizowania heparyny. Syntetyzowany jest przez megakariocyty i przechowywany w ziarnistościach alfa płytek krwi. Ludzki PF4 zbudowany jest z 70 aminokwasów o masie cząsteczkowej 7800 Da. Rekombinowany PF4 (rPF4) otrzymano z bakterii *Escherichia coli* metodami inżynierii genetycznej. Mechanizm neutralizacji heparyny przez PF4 jest bardziej specyficzny niż działanie protaminy. Istnieją dowody na to, że dwa czynniki są konieczne dla wysokiego powinowactwa wiązania heparyny: dwie pary lizyny (Lys 61, Lys 62, Lys 65 i Lys 66) otaczające parę reszt izoleucyny na C-końcu PF4, jak również drugorzędowa struktura cząsteczki zdeterminowana przez dwa mostki S-S (Cys 10-Cys 36 i Cys 12-Cys 52) [55]. W warunkach fizjologicznych, PF4 istnieje jako tetramer skomplexowany z nośnikiem o wysokiej masie cząsteczkowej, który jest także wydzielany przez płytki krwi [56]. Istnieją dowody, iż struktura tetrameryczna PF4 jest warunkiem jego działania neutralizującego heparynę. Stwierdzono, iż PF4 jest skutecznym i bezpieczniejszym od protaminy antydotum heparyny. W przeciwnieństwie do protaminy nie powodował zaburzeń hemodynamicznych, hematologicznych, ani nie aktywował układu dopełniacza. Pomimo oczywistych zalet, PF4 wykazuje wiele efektów biologicznych, które budzą niepokój, jak uwalnianie histaminy z ludzkich bazo-filów, hamowanie dojrzewania megakariocytów, odwrócenie immunosupresji, czy hamowanie angiogenezy. W niektórych badaniach zaobserwowano, iż PF4 zwiększa ryzyko małopłytkowości związanej z heparyną, więc dalsze prace nad tym związkiem wstrzymano.

3.1.3. PM102

PM102 jest peptydem, który składa się z trzech jednakowych helis aminokwasowych. Dwa segmenty helisy tworzą kanał wiążący heparynę, a trzeci zabezpiecza to połączenie. PM102 szybko (w ciągu 1,0-5,0 minut) i skutecznie odwracał wydłużony czas aPTT po podaniu heparyny. W osoczu uzyskiwał stężenie maksymalne (Cmax) po 1,0-2,6 minut i prawie natychmiast był usuwany z ustroju z czasem półtrwania wynoszącym w przybliżeniu od 4 do 31 minut [13]. Po sukcesie w badaniach na zwierzętach planowano rozpocząć badania I fazy na zdrowych ochotnikach. Niestety związek ten nie posiadał lepszego profilu bezpieczeństwa niż siarczan protaminy i badania nad nim zakończono w 2010 roku.

3.1.4. Delparantag (PMX-60056)

Delparantag (dawniej PMX-60056) jest syntetyczną, małowcząsteczkową pochodną salicylamidu [57], stosowaną do odwracania działania powszechnie stosowanych antykoagulantów, zwłaszcza heparyny niefrakcjonowanej i jej pochodnych. Wiąże się z pentasacharydem [11] oraz zaburza interakcję pomiędzy heparyną i antytrombiną. Delparantag miał za zadanie utrzymywać odpowiednią równowagę między leczeniem przeciwzakrzepowym i antykoagulacyjnym oraz zmniejszać częstość krwawień podczas zabiegów kardiologii interwencyjnej, w których heparyny są stosowane i mogą powodować krwawienia. Po sukcesie w badaniach na zwierzętach został również przetestowany w I fazie badań klinicznych, w której wykazał zdolność do skutecznego cofania działania heparyny niefrakcjonowanej oraz tinzaparyny. W maju 2012 firma Polymedix ogłosiła, że wstrzymała dwa badania kliniczne z udziałem delparantagu: badanie kliniczne fazy 2 na odwrócenie działania przeciwzakrzepowego heparyny niefrakcjonowanej u pacjentów poddawanych zabiegom angioplastyki naczyń wieńcowych oraz fazę 1B/2 badania klinicznego na odwrócenie działania przeciwzakrzepowego enoksaparyny u zdrowych ochotników. Mimo, iż delparantag wykazał skuteczność w neutralizacji obu heparyn, dalsze badania nad lekiem wstrzymano ze względu na obniżenie ciśnienia krwi u niektórych pacjentów.

3.2. Środki w fazie badań przedklinicznych i klinicznych

3.2.1. Białko wiążące inhibitory czynnika Xa (andexanet alfa, PRT064445)

Jest to modyfikowane, rekombinowane białko, uzyskane z ludzkiego czynnika Xa, o masie cząsteczkowej około 39 kDa (tj. ~ 11 kDa łańcuch lekki i ~ 28 kDa łańcuch ciężki). Nie posiada wiążącej się z błoną domeny kwasu γ -karboksylglutaminowego i nie wykazuje aktywności katalitycznej, ze względu na podstawienie seryny alaniną w pozycji 419 (S419A) w proteazie triady katalitycznej, która jest zwykle złożona z histydyny, kwasu asparaginowego i seryny. Anandexanet alfa uzyskany został z linii komórkowej jajnika chomika chińskiego. W wyniku wyżej wymienionych modyfikacji anandexanet alfa posiada wysokie powinowactwo do bezpośrednich inhibitorów FXa (np. apiksabanu, bextrixabanu, rywaroksabanu) [3]. Białko działa jako przynęta dla bezpośrednich inhibitorów czynnika Xa, wiąże te leki w sposób zależny od dawki i tym samym neutralizuje ich działanie antykoagulacyjne. Anandexanet alfa może wiązać się i modulować aktywność kompleksu powstałego po połą-

czeniu ATIII i pośredniego inhibitora FXa (heparyny drobnocząsteczkowej lub fondaparynuksu).

W II fazie badań klinicznych po podaniu zdrowym ochotnikom andexanetu alfa zauważono podwyższenie poziomu inhibitora czynnika tkankowego (TFPI) i fibrynogenu, co wskazuje na jego słabe właściwości przeciwzakrzepowe [58]. Warto zauważyć, iż TFPI jest endogennym, odwracalnym inhibitorem FXa [59]. Andexanet alfa był dobrze tolerowany, nie zaobserwowano zaburzeń zakrzepowych, reakcji alergicznych, nie było też przypadków śmiertelnych [58]. Problemem może być jego potencjalna immunogenność, podobnie jak w przypadku wszystkich zmodyfikowanych strukturalnie białek. Trwające badanie kliniczne AN-NEXA-4 fazy 3b (NCT02329327) ma na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania andexanetu u pacjentów, u których wystąpiło poważne, ostre krwawienie związane z podaniem inhibitora FXa. W 2016 roku Bristol-Myers Squibb Company razem z Pfizer Inc. ogłosiły, że zawarły umowę współpracy z Portola Pharmaceuticals Inc. w celu opracowania i komercjalizacji andexanetu alfa w Japonii. Jednocześnie Portola pozostaje wyłącznym dystrybutorem andexanetu alfa na całym świecie z wyłączeniem Japonii. Przewiduje się, że zawarta umowa licencyjna w Japonii przyniesie korzyść firmie Portola w wysokości do 120 milionów USD.

3.2.2. Perosphere (Aripazine, PER977)

Aripazyna (PER977) [10] jest małą, syntetyczną, hydrofilną kationową cząsteczką, która wiąże się niekowalencyjnymi wiązaniami wodorowymi na zasadzie interakcji ładunek-ładunek i hamuje działanie heparyn, fondaparynuksu, doustnych bezpośrednich inhibitorów FXa (edoksabanu, rywaroksabanu i apiksabanu) i inhibitorów trombiny (dabigatranu). Badania przedkliniczne *in vitro* nie wykazały żadnych znaczących interakcji PER977 z innymi czynnikami krzepnięcia lub albuminami, czy interakcji z często stosowanymi lekami anestetycznymi, przeciwpadaczkowymi czy mających zastosowanie w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego. W badaniu na szczurach PER977 zmniejszył krwawienie o 90%, gdy zwierzętom podano 100 razy większą niż terapeutyczną dawkę dabigatranu, rywaroksabanu, apiksabanu i enoksaparyny. Pierwszym ochotnikiem leczonym wstępnie edoksabanem podano 300 mg PER977 dożylnie, co znormalizowało ACT, a efekt utrzymywał się przez 24 godziny. Wyniki badań wskazują na słabe działanie prokoagulatoryjne PER977.

W październiku 2014 roku Perosphere Inc. ogłosiła, iż PER977 wszedł do 3 fazy badań klinicznych jako odtrutka edoksabanu (Daiichi Sankyo, Inc.). Natomiast w kwietniu 2015 roku FDA nadała PER977 oznaczenie szybkiej ścieżki, tzw. Fast Track. Opcja ta ułatwia i przyspiesza rozwój leków innowacyjnych, na które jest szczególne zapotrzebowanie. Dzięki temu chorzy szybciej mogą skorzystać z najnowszych osiągnięć naukowych w przypadku chorób, dla których obecnie nie ma skutecznego sposobu leczenia, bądź jest ono niewystarczające. Po nadaniu statusu Fast Track, FDA może pomóc w zaprojektowaniu odpowiednich badań, dostarczyć danych dotyczących bezpieczeństwa, lub danych dawka-efekt. FDA może również oceniać i opiniować poszczególne etapy rozwoju leku, jeszcze przed rejestracją.

3.2.3. UHRA (Universal Heparin Reversal Agents)

W University of British Columbia opracowano syntetyczne polimery dendrytyczne, tzw. uniwersalne środki odwracające działanie heparyny (Universal Heparin Reversal Agents, UHRA). UHRA zbudowane są z rozgałęzionego rdzenia poliglicerolowego, połączonego z trójwartościowymi grupami kationowymi wiążącymi heparynę. Gałęzie poliglicerolowe ograniczone łańcuchami glikolu polietylenowego (PEG) tworzą powłokę ochronną. Gęstość powłoki PEG jest zoptymalizowana w celu zwiększenia biokompatybilności ogólnej struktury oraz by zminimalizować niespecyficzne interakcje, przy zachowaniu jej powinowactwa do heparyny. Spośród szesnastu zsyntetyzowanych związków o różnej masie cząsteczkowej, zmiennym stosunku stechiometrycznym grup wiążących heparynę, zawierających od 1 do 33 grup R (każda grupa R obejmuje cztery aminy trzeciorzędowe), jeden tylko - UHRA-7 zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo* spowodował całkowite lub prawie całkowite zobojętnienie heparyny niefrakcjonowanej, dwóch badanych heparyn drobnocząsteczkowych: enoksaparyny i tinzaparyny, oraz fondaparynuksu. Protamina mniej skutecznie odwracała działanie heparyn drobnocząsteczkowych (około 60%), a fondaparynuksu nie neutralizowała zupełnie. UHRA-7 nie zmieniał parametrów układu krzepnięcia, nie spowodował aktywacji dopełniacza czy innych oznak toksyczności podczas 29-dniowego okresu obserwacji. W przypadku myszy, testowana dawka UHRA 50 mg/kg nie wykazała toksyczności, natomiast dawka 20-30 mg/kg protaminy była dawką śmiertelną. W przeciwieństwie do protaminy polimery dendrytyczne nie powodowały hemolizy erytrocytów, nie aktywowały płytek krwi, nie nasilały generacji trombiny w osoczu bogatopłytkowym po podaniu w maksymalnej dawce 200 mg/kg myszom. Badania biodystrybucji wykazały, iż okres półtrwania UHRA wynosi około 40 minut, przy czym związki te nie kumulują się w istotnych narządach (około 8% początkowej dawki w wątrobie i śledzionie, 2% w nerce, sercu i płucach po 48 godzinach). Zaletą jest prosta synteza struktury dendrymeru, którego cząsteczka jest lekiem, a nie tylko nośnikiem substancji leczniczej. Należy teraz udowodnić, że w procesie syntezy otrzymuje się jednorodne produkty o takiej samej aktywności farmakologicznej, braku immunogenności i przetestować polimery podczas wykonywania operacji پوستowania u większych zwierząt, np. świń [7].

3.2.4. Awidyna

Osiągnięciem w badaniach nad pentasacharydami o długim okresie półtrwania była synteza idrabiotaparynuksu, który wykazuje silne powinowactwo do antytrombiny. Jest to złożona substancja składająca się z idraparynuksu i biotyny (witaminy H). Połączenie pentasacharydu i biotyny zaowocowało kilkoma istotnymi cechami charakterystycznymi idrabiotaparynuksu: możliwością szybkiej neutralizacji działania przeciwzakrzepowego od 67% do 97%, uzyskiwanej za pomocą awidyny (odpowiednio spreparowanego białka jaja kurzego o małej antygenowości) oraz niewielką akumulacją aktywności przeciwzakrzepowej. Awidyna była dobrze tolerowana i nie zaobserwowano zdarzeń zakrzepowo-zatorowych przez 3 miesiące od podania 100 mg awidyny w 30-minutowej infuzji. Jednak awidyna posiada krótki okres półtrwania w osoczu (2 minuty) w porównaniu do idrabiotaparynuksu (tygodnie). Idrabiotaparynuksu ponadto ma bardzo dużą biodostępność po podaniu podskórnym. Szczytowe stężenie osiąga po 2-4 godzinach. Ma bar-

dzo długi okres półtrwania - około 80 godzin, co pozwala na dawkowanie raz w tygodniu. Wydalany jest przez nerki, stąd nie należy go stosować, gdy klirens kreatyniny jest mniejszy niż 30 ml/minutę. W przypadku idrabiotaparynuku następuje spontaniczna debiotynizacja. Powstający w niewielkich ilościach idraparynuk ulega kumulacji [60].

3.3. Badania własne autorów

3.3.1. Kationowo zmodyfikowany dekstran - Dex40-GTMAC3

Dex40-GTMAC3 został zsyntetyzowany przez dodanie do komercyjnie dostępnego dekstranu o masie cząsteczkowej 40 kDa grup kationowych chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC) w proporcji 0,65 grupy kationowej na 1 grupę cukrową [8]. Dekstran jest rozgałęzionym polisacharydem, składającym się z łańcuchów o różnych długościach, biokompatybilnym, nietoksycznym i tanim. Jest on stosowany w medycynie jako środek zmniejszający lepkość krwi oraz jako ekspander objętości krwi w anemii. W naszych badaniach kationowo zmodyfikowany dekstran podawany dożylnie sam nie wpływał na krzepnięcie krwi. Podobnie do protaminy, słaby wpływ zmodyfikowanego dekstranu na hamowanie czynnika X przez heparynę sugeruje, że jego aktywność neutralizacyjna może być ograniczona tylko do heparyny niefrakcjonowanej [8]. W porównaniu z innymi badanymi przez nasz zespół polimerami, tylko Dex40-GTMAC3 nie zmienił parametrów hemodynamicznych i hematologicznych po podaniu szczurom szczepu Wistar, natomiast szybko i całkowicie przywracał do wartości kontrolnych wartości czasów krzepnięcia, które zostały wcześniej wydłużone przez heparynę. [8,9]. Ponadto, Dex40-GTMAC3 nie wywołał odpowiedzi immunologicznej u myszy BALB/c, gdy reżim heparynizacji/neutralizacji był powtarzany przez 5 tygodni, co naśladowało kliniczną sytuację pacjentów dializowanych [9]. W ostatnio opublikowanych badaniach toksyczności udowodniliśmy, iż Dex40-GTMAC3 wykazuje korzystniejszy profil bezpieczeństwa niż protamina [61]. Okazało się, że znakowany fluoresceiną Dex40-GTMAC3 jest szybko eliminowany z osocza szczurów z okresem półtrwania około 12 minut. Jeśli brać pod uwagę stosunek masy do powierzchni ciała (37 u ludzi i 6 u szczurów) [62], jego czas półtrwania może być 6 razy dłuższy u ludzi [61]. Różnice w czasie półtrwania wynikają z zasady, iż dawek stosowanych u zwierząt nie należy ekstrapolować na ludzi przez proste przekształcenia w stosunku do ciężaru ciała. Dla bardziej odpowiedniej konwersji dawek leków z badań na zwierzętach do badań na ludziach, korzysta się z powierzchni ciała, która dobrze koreluje u kilku gatunków ssaków z licznymi parametrami biologicznymi, jak wykorzystanie tlenu, wydatek kaloryczny, podstawowa przemiana materii, objętość krwi krążącej, wiązanie z białkami osocza oraz czynność nerek. Wykorzystanie powierzchni ciała w celu konwersji dawek ze zwierząt na ludzi zalecane jest zwłaszcza dla I i II fazy badań klinicznych [62].

Modyfikowany dekstran podawany dożylnie ulegał szybkiej dystrybucji do nerek i wątroby. Nie zaobserwowaliśmy trwałych zmian widocznych histopatologicznie oraz podwyższenia osoczowych markerów uszkodzenia najważniejszych narządów wewnętrznych zarówno po godzinie, jak i po 28 dniach od podania związku. Dex40-GTMAC3 nie wpływał na masę ciała, ani nie wywołał zaburzeń behawioralnych w obserwacji całodobowej. Po godzinie od podania widoczne były niewielkie przekrwienia w płucach i lekkie zmiany wodniczkowe w wątrobie, natomiast w nerkach

nieznaczna wakuolizacja części proksymalnej nefronu. Okazało się, iż zmiany te ustępują w ciągu 28 dni [61]. Zgodnie z literaturą, zmiany wodniczkowe w wątrobie są skutkiem wychwytu frakcji dekstranu o większej masie cząsteczkowej [63], gdyż zakres mas cząsteczkowych 40 kDa polimeru waha się od 10 do 80 kDa. Prawdopodobnie frakcja o niskim ciężarze cząsteczkowym Dex40-GTMAC3 wydalana jest z moczem, ponieważ wielkość cząsteczki jest znacznie poniżej limitu klirensu nerkowego, natomiast większe frakcje wnikają do hepatocytów na drodze pinocytoty [63].

4. Podsumowanie

Od lat wiadomo, że zastosowanie protaminy w celu zatrzymania krwawienia wywołanego podaniem heparyny niefrakcjonowanej wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia groźnych dla życia działań niepożądanych i jest wybraniem mniejszego zła. Dodatkowo brak skuteczności protaminy w stosunku do nowszych i bezpieczniejszych pozajelitowych środków przeciwkrzepliwych, takich jak heparyny drobnocząsteczkowe lub fondaparynuk, ogranicza stosowanie tych ostatnich w czasie zabiegów operacyjnych z wykorzystaniem medycznych urządzeń wymagających obniżonej krzepliwości krwi. Mimo długiej historii badań nad nowymi następcami protaminy wciąż nie udało się wprowadzić na rynek w pełni bezpiecznego i skutecznego środka neutralizującego wszystkie dostępne antykoagulanty. Ostatnie lata przyniosły jednak wiele nowych obiecujących wyników badań na zwierzętach, a pierwsze środki weszły w fazę badań klinicznych (Tabela 2).

W naszej opinii istnieje duża szansa, że w ciągu 2 lat lekarze będą mieli dostępny środek, który w przypadkach, gdy ryzyko podania protaminy będzie duże lub konieczna będzie neutralizacja heparyny drobnocząsteczkowej, zastąpi ją w praktyce klinicznej. Problemem w Polsce może być utrudniona dostępność z powodu wysokiej ceny. Przykładem może być idarucizumab (Praxbind), niedawno zarejestrowany lek neutralizujący działania dabigatranu (Pradaxa), którego cena wynosi 3500 \$ dla zalecanej dawki 5 mg (2 fiołki po 2,5 g/50 ml). Zarejestrowanie bezpiecznego następcy protaminy pozwoli na poprawę stanu zdrowia i zmniejszy śmiertelność wielu pacjentów wymagających operacji kardiochirurgicznych lub skomplikowanych zabiegów na naczyniach krwionośnych.

5. Wykaz skrótów

ACT	czas krzepnięcia po aktywacji (<i>Activated Clotting Time</i>)
aPTT	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (<i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>)
ATIII	antytrombina III (<i>Antithrombin III</i>)
Cmax	stężenie maksymalne (<i>Maximum Concentration</i>)
EMA	europajska agencja leków (<i>European Medicines Agency</i>)
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (<i>endothelium Nitric Oxide Synthase</i>)
FV	czynnik krzepnięcia V, proakceleryna (<i>Coagulation factor V, proaccelerin</i>)
FX	czynnik krzepnięcia X, (<i>Coagulation factor X</i>)
FDA	amerykańska Agencja do Spraw Żywności i Leków (<i>Food and Drug Administration</i>)

Tabela 2. Środki neutralizujące pozajelitowe antykoagulanty dopuszczone do obrotu bądź będące w fazie badań przedrejestracyjnych.

Odtrutka	Antykoagulant	Mechanizm działania	Dawka	Okres półtrwania	Faza rozwoju	Referencje
PROTAMINA	UFH, LMWH (częściowo)	wiąże UFH tworząc sól o neutralnym ładunku	1 mg/100 j.m.	UFH 7.4 min bez/ 4.5 min z UFH	zarejestrowana	[25]
ANDEXANET ALFA, PRT064445, PRT4445	doustne inhibitory FXa, LMWH, fondaparynuks	działa jako przynęta do wiązania zarówno doustnych, jak i podawanych w postaci iniekcji inhibitorów FXa	400 mg IV bolus następujące po wlewie 480 mg/2 godziny	1 godzina	badania kliniczne	NCT02329327
ARIPAZINE, PER977, ciraparantag	doustne inhibitory FXa oraz DTI, UFH, LMWH, fondaparynuks	mała cząsteczka wiążąca doustnie i podawane parenteralnie antykoagulanty przez niekowalencyjne wiązania wodorowe i interakcje ładunek-ładunek	5-300 mg IV	1.5 godziny	badania kliniczne	[10]
UHRA	UFH, LMWH, fondaparynuks	polimery dendrytyczne z grupami kationowymi wiążące UFH, LMWH i fondaparynuks	50 mg/kg	40 min	badania przedkliniczne	[7]
DEX40-GTMAC3	UFH	wysokocząsteczkowy dekstran z grupami GTMAC wiążącymi UFH oparty na interakcji ładunków	7,5 mg/100 j.m. IV	12 min	badania przedkliniczne	[8,9,61]

UFH, heparyna niefrakcjonowana; LMWH, heparyny drobnocząsteczkowe; IV, dożylnie; INR, międzynarodowy współczynnik znormalizowany; DTI, bezpośredni inhibitor trombiny; j.m, jednostka międzynarodowa; UHRA, uniwersalny środek odwracający działanie heparyny; FXa, czynnik Xa.

GTMAC	chlorek glicydylotrimetyloamoniowy (<i>Glycidyltrimethylammonium chloride</i>)
iNOS	indukowana syntaza tlenu azotu (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
INR	międzynarodowy współczynnik znormalizowany (<i>International Normalised Ratio</i>)
IV	dożylnie (<i>Intravenous</i>)
j.m.	jednostka międzynarodowa (<i>International Unit</i>)
NO	tlenek azotu (<i>Nitric Oxide</i>)
PEG	glikol polietylenowy (<i>Polyethylene Glycol</i>)
PF4	czynnik płytkowy 4 (<i>Platelet Factor 4</i>)
PRP	osocze bogatopłytkowe (<i>Platelet Rich Plasma</i>)
PT	czas protrombinowy (<i>Prothrombin Time</i>)
T ½	okres półtrwania eliminacji (<i>Half Life Time</i>)
TF	czynnik tkankowy (<i>Tissue Factor</i>)
TFPI	inhibitor czynnika tkankowego (<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)
UHRA	środki uniwersalnie odwracające działanie heparyny (<i>Universal Heparin Reversal Agents</i>)

Źródło finansowania

„Studium, badanie, komercjalizacja - program wsparcia doktorantów UMB”. Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Działania 8.2 - Transfer wiedzy, Poddziałania 8.2.1. - Wsparcie dla współpracy sfery

nauki i przedsiębiorstw, Priorytet VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

6. Bibliografia

- Transparency Market Research, 2015. Heparin Market - Europe Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2014 - 2022". Dostępny: <http://globenewswire.com/news-release/2015/10/20/778033/10153283/en/LMWH-is-the-Dominant-Heparin-Product-Market-in-Europe-and-is-Expected-to-Reach-USD-3-14-Billion-in-2022-Transparency-Market-Research.html> (ostatnia aktualizacja Marzec 2016).
- Mozzaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2015 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015, 131, e29-322.
- Lu G, DeGuzman FR, Hollenbach SJ, Karbarz MJ, Abe K, Lee G, Luan P, Hutchaleelaha A, Inagaki M, Conley PB, Phillips DR, Sinha U. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nat Med* 2013, 19, 446-451.
- Cook JJ, Niewiarowski S, Yan Z, Schaffer L, Lu W, Stewart GJ, Mosser DM, Myers JA, Maione TE. Platelet factor 4 efficiently reverses heparin anticoagulation in the rat without adverse effects of heparin-protamine complexes. *Circulation* 1992, 85 (3), 1102-1109.
- Lowenstein E, Johnston WE, Lappas DG, D'Ambra MN, Schneider RC, Daggett WM, Akins CW, Philbin DM. Catastrophic pulmonary vasoconstriction associated with protamine reversal of heparin. *Anesthesiology* 1983, 59 (5), 470-473.
- Bromfield SM, Wilde E, Smith DK. Heparin sensing and binding-taking supramolecular chemistry towards clinical applications. *Chem Soc Rev* 2013, 42 (33), 9184-9195.
- Shenoi, RA, Kalathottukaren, MT, Travers, RJ, Lai BFL, Creag AL, Lange D, Yu K, Weinhardt M, Chew BH, Du C, Brooks DE, Carter CJ, Morrissey JH, Haynes CA, Kizhakkedathu JN. Affinity-based design of a synthetic universal reversal agent for heparin anticoagulants. *Sci Transl Med* 2014, 6 (260), 260ra150.

8. Kalaska B, Sokolowska E, Kaminski K, Szczubialka K, Mogielnicki A, Nowakowska M, Buczek W. Cationic derivative of dextran reverses anticoagulant activity of unfractionated heparin in animal models of arterial and venous thrombosis. *Eur J Pharmacol* 2012, 686 (1-3), 81-89.
9. Kalaska B, Kaminski K, Sokolowska E, Czaplicki D, Kujdowicz M, Stalińska K, Bereta J, Szczubialka K, Pawlak D, Nowakowska M, Mogielnicki A. Nonclinical evaluation of novel cationically modified polysaccharide antidotes for unfractionated heparin. *PLoS ONE* 2015, 10 (3), e0119486.
10. Ansell J, Bakhru SH, Laulicht SS, Steiner SS, Grosso M, Brown K, Dishy V, Noveck RJ, Costin JC. Use of PER977 to reverse the anticoagulant effect of edoxaban. *N Engl J Med* 2014, 371 (22), 2141-2142.
11. Mahan CE. A 1-year drug utilization evaluation of protamine in hospitalized patients to identify possible future roles of heparin and low molecular weight heparin reversal agents. *J Thromb Thrombolysis* 2014, 37 (3), 271-278.
12. Burke PA. The Ups and Downs of Clinical Translation of New Technologies: Déjà Vu All Over Again. *Molecular Therapy* 2015, 3 (5), 791-792.
13. Cushing DJ, Cooper WD, Cohen ML, McVoy JR, Sobel M, Harris RB. Reversal of heparin-induced increases in aPTT in the rat by PM102, a novel heparin antagonist. *Eur J Pharmacol* 2010, 635 (1-3), 165-170.
14. Horrow JC. Protamine: a review of its toxicity. *Anesth Analg* 1985, 64 (3), 248-261.
15. Miescher F. Das Protamin, eine neue organische Base aus den Samenfasern des Rheinlachs. *Ber deut chem Ges* 1874, 7, 376-379.
16. Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, Gould M, Samama MM, Weitz JI. Parenteral anticoagulants. *Chest* 2008, 133 (6 Suppl), 1415-1595.
17. Carr JA, Silverman N. The heparin-protamine interaction: a review. *J Cardiovasc Surg* 1999, 40 (5), 659-666.
18. Taylor S, Folkman J. Protamine as an inhibitor angiogenesis. *Nature* 1982, 297 (5864), 307-312.
19. Mochizuki T, Olson PJ, Szlam F, Ramsay JG, Levy JH. Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1998, 87 (4), 781-785.
20. Nielsen VG. Protamine enhances fibrinolysis by decreasing clot strength: role of tissue factor-initiated thrombin generation. *Ann Thorac Surg* 2006, 81 (5), 720-727.
21. NiAnile F, Preston RJS, Jenkins PV, Nel HJ, Johnson JA, Smith OP, White B, Fallon PG, O'Donnell JSO. Protamine sulfate downregulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood* 2009, 114 (8), 1658-1665.
22. Woltz M, Weltermann A, Nieszpaar-Los M, Schneider B, Fassolt A, Lechner K, Eichler HG, Kyrle PA. Studies on the neutralizing effect of protamine on unfractionated and low molecular weight heparin (Fragmin) at the site of activation of the coagulation system in man. *Thromb Haemost* 1995, 73 (3), 439-443.
23. Crowther MA, Berry LR, Monagle PT, Chan AKC. Mechanisms responsible for the failure of protamine to inactivate low-molecular-weight heparin. *Br J Haematol* 2002, 116 (1), 178-186.
24. Delucia A, Wakefield TW, Kadell AM, Wroblewski SK, VanDort M, Stanley JC. Tissue distribution, circulating half-life, and excretion of intravenously administered protamine sulfate. *ASAIO* 1993, 39 (3), M7 15-18.
25. Butterworth J, Lin YA, Prielipp R, Bennett J, James R. The pharmacokinetics and cardiovascular effects of a single intravenous dose of protamine in normal volunteers. *Anesth Analg* 2002, 94 (3), 514-522.
26. Kimmel SE, Sekeres MA, Berlin JA, Ellison N, Siessa VJ, Strom BL. Risk factor for clinically important adverse events after protamine administration following cardiopulmonary bypass. *Am J Cardiol* 1998, 32 (7), 1916-1922.
27. Knape JTA, Schuller JL, de Haan P, de Jong AP, Bovill JG. An anaphylactic reaction to protamine in a patient allergic to fish. *Anesthesiology* 1981, 55 (3), 324-325.
28. Levy JH, Schweiger IM, Zaidan JR, Faraj BA, Weintraub WS. Evaluation of patients at risk for protamine reactions. *J Throat Cardiovasc Surg* 1989, 98 (2), 200-204.
29. Adourian U, Champagne EL, Hirshman CA, Fuchs E, Adkinson NF Jr. High-titer protamine-specific IgG antibody associated with anaphylaxis: report of a case and quantitative analysis of antibody in vasectomized men. *Anesthesiology* 1993, 78 (2), 368-372.
30. Samuel T, Linnet L, Rumke P. Post vasectomy autoimmunity to protamines in relation to the formation of granulomas and sperm agglutinating antibodies. *Clin Exp Immunol* 1978, 33 (2), 261-269.
31. Kurtz AB, Gray RS, Markanday S, Nabarro JD. Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins. *Diabetologia* 1983, 25 (4), 322-324.
32. Pearson PJ, Evora PR, Ayrancioglu K, Schaff HV. Protamine releases endothelium-derived relaxing factor from systemic arteries. A possible mechanism of hypotension during heparin neutralization. *Circulation* 1992, 86 (1), 289-294.
33. Chu YQ, Cai LJ, Jiang DC, Jia D, Yan SY, Wang YQ. Allergic shock and death associated with protamine administration in a diabetic patient. *Clin Ther* 2010, 32 (10), 1729-1732.
34. Horrow JC. Protamine allergy. *J Cardiothor Anesth* 1988, 2 (2), 225-242.
35. Moncada S, Higgs AE. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *E J Clin Inv* 1991, 21 (4), 361-374.
36. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987, 90 (4), 687-692.
37. Buckley BS, Mirza Z, Whorton AR. Regulation of Ca²⁺ dependent nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1995, 269 (3 Pt 1), C757-765.
38. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001, 357 (Pt 3), 593-615.
39. Pevni D, Gurevich J, Frolkis I, Keren G, Schapira I, Paz J, Kramer A, Locker C, Mohr R. Protamine induces vasorelaxation of human internal thoracic artery by endothelial NO-synthase pathway. *Ann Thorac Surg* 2000, 70 (6), 2050-2053.
40. Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Inducible nitric oxide production is an adaptation to cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 2001, 72 (1), 149-155.
41. Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L, Marino B, Mollace V, Nisticò G. Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994, 57 (4), 1055-1057.
42. Takakura K, Mizogami M, Fukuda S. Protamine sulfate causes endothelium-independent vasorelaxation via inducible nitric oxide synthase pathway. *Can J Anesth* 2006, 53 (2), 162-167.
43. Orescanin-Dusic Z, Milovanovic S, Spasie M, Radojicic R, Blagojevic D. Effect of protamine sulfate on the isolated mesenteric arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch Biol Sci* 2008, 60 (2), 163-168.
44. Chudasama SL, Espinasse B, Hwang F, Qi R, Joglekar M, Afonina G, Wiesner MR, Welsby IJ, Ortel TL, Arepally GM. Heparin modifies the immunogenicity of positively charged proteins. *Blood* 2010, 116 (26), 6046-6053.
45. Levy J, Zaidan J, Faraj B. Prospective evaluation of risk of protamine reactions in patients with NPH insulin-dependent diabetes. *Anesth Analg* 1986, 65 (7), 739-742.
46. Nybo M, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systemic literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008, 103 (2), 192-196.
47. Gurses KM, Kocyigit D, Yalcin MU, Evranos B, Yorgun H, Sahiner ML, Kaya EB, Oto ML, Ozer N, Aytemir K. Safety and efficacy outcomes of protamine administration for heparin reversal following cryoballoon-based pulmonary vein isolation. *J Interv Card Electrophysiol* 2015, 43 (2), 161-167.
48. Chilukuri K, Henrikson CA, Dalal D, Scherr D, MacPherson EC, Cheng A, Spragg D, Nazarian S, Sinha S, Berger R, Marine JE, Calkins H. Incidence and outcomes of protamine reactions in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol* 2009, 25 (3), 175-181.

49. Weiss ME, Nyhan D, Peng Z, Horrow JC, Lowenstein E, Hirshman C, Adkinson NF Jr. Association of protamine IgE and IgG antibodies with life-threatening reactions to intravenous protamine. *N Engl J Med* 1989, 320 (3-4), 886-892.
50. Porsche R, Brenner Z. Allergy to protamine sulfate. *Heart Lung* 1999, 28 (6), 418-428.
51. Laubser PG. Effect of methylprednisolone on complement activation during heparin neutralization. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997, 29 (5), 23-27.
52. Nuttall GA, Murray MJ, Bowie W. Protamine-heparin-induced pulmonary hypertension in pigs: effects of treatment with a thromboxane receptor antagonist on hemodynamics and coagulation. *Anesthesiology* 1991, 74 (1), 138-145.
53. Conzen PF, Habazettl H, Gutmann R, Hobbhahn J, Goetz AE, Peter K, Brendel W. Thromboxane mediation of pulmonary hemodynamic responses after neutralization of heparin by protamine in pigs. *Anesth Analg* 1989, 68 (1), 25-31.
54. Stafford-Smith M, Lefrak EA, Qazi AG, Welsby IJ, Barber L, Hoeft A, Dorenbaum A, Mathias J, Rochon JJ, Newman MF. Efficacy and safety of heparinase I versus protamine in patients undergoing coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2005, 103 (2), 229-240.
55. Rucinski B, Niewiarowski S, Strzyzewski M, Holt JC, Mayo KH. Human platelet factor 4 and its C-terminal peptides: Heparin binding and its clearance from the circulation. *Thromb Haemost* 1990, 63 (3), 493-498.
56. Moore S, Pepper DS, Cash JD. Platelet antiheparin activity. The isolation and characterization of platelet factor 4 released from thrombin-aggregated washed human platelets and its dissociation into subunits and the isolation of membrane bound antiheparin activity. *Biochim Biophys Acta* 1975, 379 (2), 370-384.
57. Kuziej J, Litinas E, Hoppensteadt DA, Liu D, Walenga JM, Fareed J, Jeske W. In vivo neutralization of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin by a novel salicylamide derivative. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010, 16 (4), 377-386.
58. Shah N, Mohammad AR. Reversal Agents for Anticoagulants: Focus on Andexanet Alfa. *AMSRJ* 2014, 1, 16-28.
59. Adams M. Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 2012, 38 (2), 129-134.
60. Paty I, Trelu M, Destors JM, Cortez P, Boëlle E, Sanderink G. Reversibility of the anti-FXa activity of idrabiotaparinux by intravenous avidin infusion. *J Thromb Haemost* 2010, 8 (4), 722-729.
61. Sokolowska E, Kalaska B, Kaminski K, Lewandowska A, Błażejczyk A, Wietrzyk J, Kasacka I, Szczubialka K, Pawlak D, Nowakowska M, Mogielnicki A. The toxicokinetic profile of Dex40-GTMAC3 - a novel polysaccharide candidate for reversal of unfractionated heparin. *Front Pharmacol* 2016, 7, 60.
62. Regan-Shaw S, Nihil M, Ahmad N. Dose translation from animals to human studies revised. *FASEB J* 2008, 22 (3), 659-661.
63. Mehvar R, Robinson MA, Reynolds JM. Molecular weight dependent tissue accumulation of Dextran: in vivo studiem in rats. *J Pharm Sci* 1994, 83 (10), 1495-1499.