



## Исследование возможности контроля производства препаратов низко-молекулярного гепарина отечественными тест-системами (обзор)

А. Л. Берковский✉, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное общество РЕНАМ» Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов «Общество больных гемофилией». 125167, Россия, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Берковский Арон Леонидович. **E-mail:** aron\_56@mail.ru

**ORCID:** А. Л. Берковский – <https://orcid.org/0000-0001-8213-1810>;

Е. В. Сергеева – <https://orcid.org/0000-0002-9137-343X>;

А. В. Суворов – <https://orcid.org/0000-0002-2314-8353>.

**Статья поступила:** 19.02.2024

**Статья принята в печать:** 12.08.2024

**Статья опубликована:** 16.08.2024

### Резюме

**Введение.** Представлены данные о широком клиническом применении препаратов низкомолекулярного гепарина (НМГ), обуславливающим необходимость эффективного и качественного производства соответствующих фармацевтических средств. Выявленная вариабельность антикоагулянтной активности препаратов НМГ предполагает обеспечение производства валидированными методами контроля и аттестации. Цель работы заключается в изучении возможности контроля антикоагулянтной активности и оценки функциональной совместимости препаратов НМГ при применении отечественных тест-систем.

**Текст.** Представлены данные об аналитических характеристиках хромогенного и коагулометрических методов, выполняемых с помощью отечественных тест-систем. Показано соответствие их показателей существующим международным требованиям. Доказана возможность указанных методов правильно и воспроизводимо сертифицировать препараты НМГ. Полученные в рамках исследований биоэквивалентности результаты свидетельствуют о возможности коагулологических методик оценивать функциональную совместимость изучаемых препаратов НМГ.

**Заключение.** Представленные данные доказывают целесообразность проведения контроля производства и аттестации препаратов НМГ отечественными тест-системами.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный гепарин, фармацевтические препараты, аттестация, промышленное производство, антикоагулянтная активность, хромогенные методы, коагулометрические методы, отечественные тест-системы

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** А. Л. Берковский – формулировка цели и задач обзора, организация поиска данных и их анализ, редактирование текста. Е. В. Сергеева – поиск источников информации, систематизация данных. А. В. Суворов – обеспечение логической связи цитируемой литературы, анализ представленных данных. Все авторы участвовали в написании текста.

**Для цитирования:** Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В. Исследование возможности контроля производства препаратов низкомолекулярного гепарина отечественными тест-системами. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(3):138–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1755>

## Study of the possibility of controlling the production of low-molecular-weight heparin preparations by domestic test systems (review)

Aron L. Berkovsky✉, Elena V. Sergeeva, Alexander V. Suvorov

SPA RENAM. 5/2, Naryshkinskaya Alley, Moscow, 125167, Russia

✉ **Corresponding author:** Aron L. Berkovsky. **E-mail:** aron\_56@mail.ru

© Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., 2024

© Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., 2024

ORCID: Aron L. Berkovsky – <https://orcid.org/0000-0001-8213-1810>;  
Elena V. Sergeeva – <https://orcid.org/0000-0002-9137-343X>;  
Alexander V. Suvorov – <https://orcid.org/0000-0002-2314-8353>.

Received: 19.02.2024

Accepted: 12.08.2024

Published: 16.08.2024

### Abstract

**Introduction.** The data on the wide clinical use of low-molecular-weight heparin (LMWH) preparations are presented, necessitating the need for efficient and high-quality production of appropriate pharmaceuticals. The revealed variability of anticoagulant activity of LMWH preparations implies the provision of production with validated methods of control and certification. The aim of the work is to study the possibility of control of anticoagulant activity and assessment of functional compatibility of LMWH preparations when using domestic test systems.

**Text.** The data on analytical characteristics of chromogenic and coagulometric methods performed with the help of domestic test systems are presented. Their parameters correspond with the existing international requirements. The possibility of the mentioned methods to certify LMWH preparations correctly and reproducibly is shown. The given research results testify to the possibility of clotting methods to determine the bioequivalence of the studied preparations of LMWH.

**Conclusion.** The presented data prove the expediency of production control and certification of LMWH preparations by domestic test systems.

**Keywords:** low molecular weight heparin, pharmaceutical preparations, certification, industrial production, anticoagulant activity, chromogenic methods, coagulometric methods, domestic test systems

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Aron L. Berkovsky – formulation of the aim and objectives of the review, organisation of data search and analysis, text editing. Elena V. Sergeeva – search of information sources, systematization of data. Alexander V. Suvorov – ensuring logical connection of the cited literature, analyze the presented data. All authors participated in text content creation.

**For citation:** Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V. Study of the possibility of controlling the production of low-molecular-weight heparin preparations by domestic test systems. *Drug development & registration*. 2024;13(3):138–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1755>

## ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике в настоящее время широко применяются препараты низкомолекулярного гепарина (НМГ), что предполагает необходимость интенсификации их производства. В РФ лекарственные препараты НМГ производят из различных отечественных и импортных субстанций. Обеспечение эффективного производства таких препаратов требует контроля функциональной активности гепарина в исходной субстанции, полупродуктах и целевых препаратах НМГ. Обеспечение эффективности и качества получения фармацевтических препаратов НМГ требует применения методов контроля антикоагулянтной активности.

**Цель работы** заключается в исследовании возможности хромогенного и коагулологических методов, проводимых с помощью отечественных тест-

систем, определять антикоагулянтную активность и функциональную совместимость препаратов НМГ при контроле их производства.

### **НМГ, фармацевтические препараты, сертификация и контроль производства**

Гепарин – это смесь линейных сульфатированных гликозаминогликанов с высокой плотностью отрицательного заряда [1, 2]. Наиболее значимым является наличие у гепарина антикоагулянтной активности, обусловленной его способностью в комплексе с антитромбином (АТ) III инактивировать сериновые протеазы, участвующие в свертывании крови [3, 4]. В присутствии гепарина АТIII быстро ингибирует активность факторов коагуляции (Ф) IIa (тромбин), IXa, Xa, XIa и XIIa. Наиболее специфичными для антикоагулянтной гепаринотерапии являются

низкомолекулярные, высокоаффинные фракции гепарина – НМГ, обладающий способностью ингибировать ФХа (анти-Ха-активность) и тромбин (анти-IIa-активность). НМГ получают различными способами, что определяет вариабельность антикоагулянтной активности его препаратов [3–5]. Эффективность клинического применения НМГ доказана при лечении (и профилактике) различных патологий сердечно-сосудистой системы, тромбозах и тромбоэмболиях, что обусловлено антикоагулянтной, противотромботической и противовоспалительной активностью используемых препаратов [3, 4, 6, 7]. Несмотря на хорошие клинические результаты, применение НМГ может вызывать такие побочные осложнения, как кровоточивость, повышение концентрации в крови аминотрансферазы, развитие гепарининдуцированной тромбоцитопении, аллергических реакций, остеопороза. Необходимо отметить, что терапевтическая активность гепаринов существенно варьирует между отдельными пациентами; межиндивидуальные различия относятся к антикоагулянтному действию и фармакодинамике применяемого препарата [3, 8]. Эти положения подчеркивают необходимость клинико-диагностической оценки, а также валидации производимых препаратов НМГ по антикоагулянтной активности. Официально утвержденными к клиническому применению препаратами НМГ являются бемипарин, цертопарин, далтепарин, эноксапарин, ардепарин, надропарин, парнапарин, ревиварин и тинзапарин [9, 10].

Определение функциональной активности гепарина является необходимым при производстве фармацевтических препаратов НМГ. Оценка результатов измерения активности гепарина в субстанциях, полупродуктах и целевых лекарственных средствах позволит обеспечивать эффективность производства и выпускать достоверно аттестованные препараты<sup>1,2</sup> [11].

К основному стандартизированному методу определения гепарина в настоящее время относят хромогенный тест измерения степени ингибирования комплексом АТIII-гепарин ФХа и тромбина (анти-Ха- и анти-IIa-активность гепарина) [12]. Определение антикоагулянтной активности НМГ по степени инактивации ФХа (анти-Ха-активность) может быть проведено и с помощью коагулологических методов<sup>3,4</sup>; к таким тестам относятся, в частно-

сти, Hepatest (Haemachem, Франция) [13] и Реаклот-гепарин<sup>5</sup>.

Обеспечение качества производства компонентов системы гемостаза предъявляет соответствующие требования к определению биологически активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных формах НМГ. К таким требованиям относятся: выбор специфических методов измерения; сертификация и чистота компонентов используемых тест-систем; аналитическая валидация применяемой методики по ряду характеристик (правильность, точность, воспроизводимость, линейность) [11, 14, 15]. Европейской фармакопеей 11.0<sup>6</sup> рекомендованы хромогенные методы для количественной идентификации НМГ. Повышение точности и правильности результатов определения активности НМГ этими методами обеспечивается стандартизацией измерений в основном за счет применения соответствующих международных стандартов (МС) [3, 5, 12, 16].

### **Хромогенный метод анализа анти-Ха- и анти-IIa-активности препаратов НМГ**

В России разработан и внедрен в практику контроля производства НМГ валидированный хромогенный метод и соответствующая тест-система (Ренапарин-тест) на основе полученных авторами высокоочищенных и аттестованных реагентов<sup>7</sup> [17]. Данный метод тестирования позволяет измерять ингибиторную активность гепарина в препаратах и субстанциях НМГ как по конечной точке, так и по кинетике процесса. В тест-систему включены полученные авторами высокоочищенные тромбин (ФIIa) с удельной активностью более 2000 МЕ/мг, ФХа с удельной активностью 33–35 МЕ/мг и АТIII с фактором очистки аффинной хроматографией более 500. В созданный набор реагентов входят и специфические для ФХа и тромбина хромогенные субстраты ZdArgGlyArg-pNA и TosGlyProArg-pNA соответственно, синтезированные в РФ и имеющие по данным ВЭЖХ чистоту не менее 98 %. Компонентом набора являлся также рабочий стандартный образец (PCO) НМГ с аттестованными против МС НМГ анти-Ха- и анти-IIa-активностью, бычий сывороточный альбумин и концентрат буфера трис-NaCl. С помощью

<sup>1</sup> European Pharmacopoeia 4. Heparins, low-molecular-mass. 01/2002:0828. P. 1297–1299.

<sup>2</sup> European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

<sup>3</sup> TRS 823 – 32nd report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 1992. Available at: [https://www.who.int/publications/i/item/WHO\\_TRS\\_823](https://www.who.int/publications/i/item/WHO_TRS_823). Accessed: 19.02.2024.

<sup>4</sup> Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>5</sup> Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 22 ноября 2016 года. ФСР 2011/12501. Набор реагентов для определения антиХа-активности гепарина коагулологическим методом («Реаклот-гепарин») по ТУ 9398-024-05595541-2011. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/reaklot-geparin-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

<sup>6</sup> European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

<sup>7</sup> Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 23 сентября 2016 года. ФСР 2010/09152. Набор реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина (Ренапарин-тест) по ТУ 9398-033-05595541-2010. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist%202024/renaparin-test.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

указанных компонентов была сформирована тест-система для определения НМГ по рекомендуемому Европейской фармакопеей 11.0<sup>1</sup> методу. Оценку функциональных свойств НМГ в препаратах и субстанциях проводили по отношению активности анти-Ха/анти-IIa. Измерения осуществляли по схеме:

1. При определении анти-Ха-активности НМГ

АТIII (избыток) + НМГ  $\Rightarrow$  АТIII-НМГ.

АТIII-НМГ + ФХа (избыток)  $\Rightarrow$

$\Rightarrow$  АТIII-НМГ-ФХа+ФХа (остаток).

ФХа (остаток) + ФХа-субстрат-pNA  $\Rightarrow$  Пептид + pNA.

2. При определении анти-IIa-активности НМГ

АТIII (избыток) + НМГ  $\Rightarrow$  АТIII-НМГ.

АТIII-НМГ + ФIIa (избыток)  $\Rightarrow$

$\Rightarrow$  АТIII-НМГ-ФIIa+ФIIa (остаток).

ФIIa (остаток) + ФIIa-субстрат-pNA  $\Rightarrow$  Пептид + pNA.

Аттестацию проводили с помощью 3-го международного и британского стандартов НМГ: Low Molecular Weight Heparin International Standard (code 11/176, 1068 МЕ анти-Ха/ампула и 342 МЕ анти-IIa/ампула, 2013, NIBSC, Великобритания) и Low Molecular Weight Heparin British Standard CS30026 (NIBSC, Великобритания). При определении НМГ по конечной точке использовали планшетный спектрофотометр Multiscan EX (LabSystems, Финляндия), а при кинетическом измерении – автоматический анализатор ACL ELITE PRO (IL, США).

Согласно требованиям, предъявляемым к методам определения показателей системы гемостаза, была осуществлена аналитическая валидация Ренапарин-теста [2, 12, 14, 20, 15, 19]. Оценку правильности измерений функционально активного НМГ по величине отношения активности анти-Ха/анти-IIa с помощью разработанного теста провели на аттестованных по анти-IIa- и анти-Ха-активности британском и МС НМГ. Активность анти-Ха и анти-IIa в каждом стандарте определяли, используя в качестве калибратора другой стандарт. Правильность тестирования, то есть близость результатов измерений к истинными значениями анти-Ха- и анти-IIa-активности составила 97–99%. Правильность тестирования оценивали также по сравнению результатов измерения определяемой активности НМГ предлагаемым методом и валидированной методикой с использованием реагентов фирмы Chromogenix (Швеция). Установлено, что в этом варианте валидации правильность измерений составила 98%.

Для введения в создаваемую тест-систему РСО НМГ и с учетом доказанной правильности измерений была проведена количественная аттестация это-

<sup>1</sup> European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

го РСО; калибратором служил МС НМГ. РСО характеризовался величинами анти-IIa- и анти-Ха-активности  $3,12 \pm 0,05$  МЕ/мл и  $10,57 \pm 0,12$  МЕ/мл соответственно. Тестирование МС с помощью РСО НМГ как калибратора доказало правильность измерений при применении Ренапарин-теста и созданной тест-системы: относительная погрешность в этом случае не превышала 5%.

Воспроизводимость метода оценивали по проведению анализа в лаборатории в разное время различными сотрудниками и при тестировании одних тех же образцов НМГ в других лабораториях. Различия результатов не превышали 8%.

Аналитические характеристики разработанного метода определяли при тестировании МС НМГ, а также РСО НМГ и контрольных образцов, полученных из субстанции НМГ эноксапарин. Показано, что линейность значений анти-Ха-активности НМГ находилась в диапазоне от 0,2 до 0,04 МЕ/мл, а анти-IIa-активности – от 0,06 до 0,008 МЕ/мл; отклонение от линейности не превышало 4 и 6% соответственно. Коэффициент вариации результатов определения анти-Ха- и анти-IIa-активности НМГ был не более 5 и 1,5% соответственно. Чувствительность Ренапарин-теста по анти-Ха- и анти-IIa-активности, определяемая по ГОСТ Р 53022.2-2008, составляла 0,01 МЕ/мл. Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышал 5%.

Авторы считают, что тестирование НМГ валидированным хромогенным, рекомендуемым Европейской фармакопеей методом с использованием отечественной тест-системы [19] соответствует предъявляемым к аналитическому контролю требованиям, и Ренапарин-тест может быть использован для контроля эффективности производства лекарственных препаратов НМГ.

### **Коагулометрические методы анализа препаратов НМГ**

Для определения функциональной активности НМГ обычно применяют хромогенный метод, однако для анализа сопоставимости биологических аналогов с оригинальным препаратом FDA<sup>2,3</sup> рекомендует коагулологические (ГепТест и АЧТВ) способы измерений. В РФ по существующим требованиям к лабораторному анализу было проведено сравнительное исследование биоаналогичного препарата «Эноксапарин натрия» и оригинального «Клексан», содер-

<sup>2</sup> Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>3</sup> Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

жащих в качестве действующего вещества эноксапарин натрия<sup>1,2</sup> [18]. В качестве клоттингового метода был выбран рекомендуемый для поставленных целей ГепТест. Фактически работа была проведена с полным аналогом ГепТеста – методом Реаклот-гепарин на основе отечественной тест-системы<sup>3</sup>. Наличие сопоставимости функциональной активности обоих препаратов доказывалось согласно современным требованиям<sup>4,5</sup> [21].

Исследование было выполнено с использованием 6 серий препарата «Эноксапарин натрия» (раствор для п/к введения, 10000 МЕ анти-Ха/мл, ООО «Технология лекарств», Россия) и 5 серий препарата «Клексан» (раствор для п/к введения, 10 000 МЕ анти-Ха/мл, Sanofi, Франция). После разведения рабочие растворы препаратов содержали 1,0; 0,5 и 0,25 МЕ анти-Ха/мл.

Компонентами тест-системы являлись субстратная плазма с нормальным уровнем активности факторов свертывания как источник ФV, АТIII и фибриногена и реагент, содержащий смесь ФХа с фосфолипидами [18]. В качестве стандартного образца использовали МС НМГ (code 01/608, 2194 МЕ анти-Ха/ампула), NIBSC (Великобритания)<sup>6</sup>.

В коагулологическом ГепТесте на первом этапе происходит инактивация избытка ФХа комплексом АТIII-гепарин, а на втором после добавления ионов кальция определяют активность остаточного ФХа по времени свертывания плазмы. Измерение проводили на полуавтоматическом коагулометре BioMérieux Option 4 plus (Франция). Для статистической

обработки результатов использовали пакет STATISTICAL 10.0, регрессионный и корреляционный анализы.

Метод ГепТест характеризуется способностью комплекса НМГ + АТIII ингибировать экзогенный ФХа при использовании 100 % субстратной плазмы. Результаты ГепТеста позволяют оценивать функциональную активность и полноценность препаратов НМГ. При определении метрологических характеристик ГепТеста было показано, что относительное стандартное отклонение внутри одной серии в присутствии НМГ не превышало 2,75 %, а чувствительность метода составила 0,01 МЕ анти-Ха/мл плазмы. При исследовании сопоставимости препаратов эноксапарина натрия использовали рекомендации FDA<sup>7,8</sup>, по которым сопоставимыми являются препараты, если результаты измерений всех проанализированных серий изучаемого биоаналога находятся в интервале:

$$M \pm 3\sigma,$$

где  $M$  – выборочное среднее значение времени свертывания по всем сериям оригинального препарата;  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение для результатов оригинального препарата.

При сравнительном изучении препаратов НМГ в тех же условиях анализировали разведения МС НМГ. Графики зависимости времени свертывания от анти-Ха-активности сравниваемых препаратов были одинаковыми во всем диапазоне исследуемых концентраций, что указывает на сопоставимость их влияния на время свертывания. Были определены средние значения времени свертывания плазмы для каждого разведения препарата «Клексан» и «Эноксапарин натрия» и стандартное отклонение  $\sigma$ . Показано, что результаты тестирования исследуемых серий «Эноксапарина натрия» находились в интервале  $M \pm 3\sigma$  для препарата «Клексан», что подтверждает функциональную сопоставимость этих фармацевтических средств.

Таким образом, метод ГепТест, выполненный с использованием отечественной тест-системы, позволил доказать сопоставимость «Эноксапарина натрия» и «Клексана». Аналогичность графиков зависимости времени свертывания от активности сравниваемых НМГ и отсутствие достоверных различий между коэффициентами корреляции результатов количественной оценки изучаемых препаратов свидетельствовали о сопоставимом антикоагулянтном действии эноксапарина натрия, содержащегося в исследуемых препаратах.

<sup>1</sup> Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>2</sup> European Pharmacopoeia 9.5. Nadroparin calcium. 5731-5733.

<sup>3</sup> Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 22 ноября 2016 года. ФСР 2011/12501. Набор реагентов для определения антиХа-активности гепарина коагулологическим методом («Реаклот-гепарин») по ТУ 9398-024-05595541-2011. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/reaklot-geparin-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

<sup>4</sup> Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>5</sup> Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>6</sup> WHO International Standard 2nd International Standard for Low Molecular Weight Heparin NIBSC code: 01/608 Instructions for use (Version 2.0, Dated 01/04/2008). Available at: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/01-608.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>7</sup> Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

<sup>8</sup> Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

Изучена также возможность применения при анализе сопоставимости препаратов НМГ коагулологического метода активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), проводимого с помощью отечественных реагентов<sup>1</sup>. АЧТВ является интегрированным тестом для анализа внутреннего и общего путей свертывания крови. Добавление к плазме препаратов гепарина активирует в ней АТIII, что ведет к ингибированию основных сериновых протеаз коагуляционного каскада и удлинению времени свертывания.

Определяли влияние различных концентраций в субстратной плазме человека МС НМГ на величину АЧТВ. Каждая концентрация НМГ была проанализирована 16 раз.

Как видно из рисунка 1, значение АЧТВ зависело от активности НМГ и описывалось кривой с уравнением линии тренда

$$y = 3,5116x^2 + 22,176x + 37,522$$

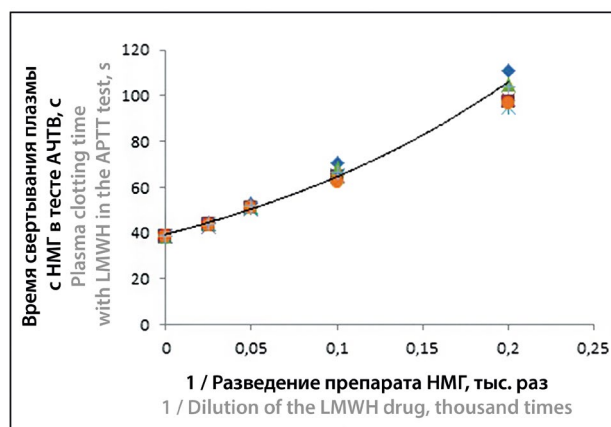
с коэффициентом корреляции линии тренда  $R^2 = 0,9997$ . Стандартное отклонение в одной серии не превышало 2,34 с, а коэффициент вариации составил не более 2,60 %.

В рамках исследования биоэквивалентности было проведено определение антикоагулянтной активности «Надропарина кальция»<sup>2</sup> (ООО «Технология лекарств», Россия) и «Фраксипарина» (Aspen Pharma Trading Limited, Ирландия) с помощью указанной отечественной тест-системы. При этом определяли антикоагулянтную активность в 3 сериях «Фраксипарина» и в 3 сериях «Надропарина кальция» АЧТВ-тестом и вычисляли интервал  $M \pm 3\sigma$  [7]. Как видно из рисунка 2, выборочные средние времена свертывания плазмы в обоих разведениях препарата «Надропарин кальция» находились в диапазоне  $M \pm 3\sigma$ , определенном для 3 серий препарата «Фраксипарин», что свидетельствует о сопоставимости исследованных препаратов.

Форма кривых зависимости времени свертывания плазмы от антикоагулянтной активности надропарина кальция была аналогична для препаратов «Надропарин кальция» и «Фраксипарин», что свидетельствует о сопоставимом влиянии надропарина кальция, содержащегося в обоих исследуемых препаратах.

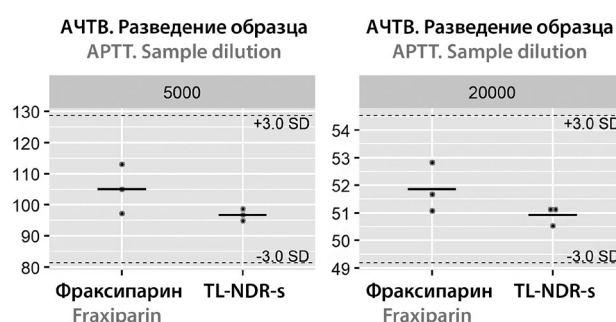
<sup>1</sup> Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 23 сентября 2016 года. ФСР 2009/04598. Набор реагентов для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ-тест) по ТУ 9398-017-05595541-2009. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/achtv-test-2016-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

<sup>2</sup> Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.



**Рисунок 1.** Зависимость времени свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени от разведения трех серий препаратов «Фраксипарин» и «Надропарин кальция»

**Figure 1.** Dependence of plasma clotting time in the activated partial thromboplastin time test on dilution of three series of Fraxiparin and Nadroparin calcium preparations



**Рисунок 2.** Графическая оценка сопоставимости препаратов «Фраксипарин» и «Надропарин кальция» (TL-NDR-s) методом активированного частичного тромбопластинового времени

**Figure 2.** Graphical assessment of comparability of Fraxiparin and Nadroparin calcium (TL-NDR-s) preparations by the activated partial thromboplastin time method

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов проведенных исследований по определению антикоагулянтной активности препаратов НМГ можно заключить:

1. Для определения анти-Ха- и анти-IIa-активности НМГ хромогенным методом разработана отечественная тест-система Ренапарин-тест. Ее аналитические характеристики соответствовали предъявляемым требованиям к правильности, чувствительности и воспроизводимости. Указанный метод может быть применен для аттестации препаратов НМГ.

2. В рамках исследований биоэквивалентности показана возможность определения функциональной совместимости оригинального и аналогового препаратов НМГ коагулометрическими методами с помощью отечественных тест-систем Реаклот-гепарин и АЧТВ-тест.

Таким образом, применение соответствующих отечественных тест-систем позволит обеспечить контроль качества и эффективность производства фармацевтических препаратов НМГ в РФ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: ФЭН; 2000. С. 219–240.
2. Kitchen S., Olson J. D., Preston F. E., editors. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. P. 170–178.
3. Qiu M., Huang S., Luo C., Wu Z., Liang B., Huang H., Ci Z., Zhang D., Han L., Lin J. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;139:111561. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111561.
4. Савельева К. Р., Фруммин Л. Е., Шестаков В. Н. Гепарин и низкомолекулярные гепарины. *Вестник службы крови России*. 2013;4:46–52.
5. Hirsh J. Low Molecular Weight Heparins. 4<sup>th</sup> ed. Hamilton: BC Decker; 2007.
6. Guo J. W. S. J., Zhong G. Y. S. X. Guidelines for rational drug use in coronary heart disease. 2<sup>nd</sup> edition. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*. 2018;10:1–130.
7. Gee E. The National VTE Exemplar Centres Network response to implementation of updated NICE guidance: venous thromboembolism in over 16s: reducing the risk of hospital-acquired deep vein thrombosis or pulmonary embolism (NG89). *British Journal of Haematology*. 2019;186(5):792–793. DOI: 10.1111/bjh.16010.
8. Bloemen S., Hemker H. C., Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica*. 2013;98(4):549–554. DOI: 10.3324/haematol.2012.073601.
9. Cosmi B., Palareti G. Old and new heparins. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):388–391. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.008.
10. Onishi A., Ange K., Dordick J. S., Linhardt R. J. Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*. 2016;21:372–392.
11. Hemker H. C. A century of heparin: past, present and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(12):2329–2338. DOI: 10.1111/jth.13555.
12. Hoffman M. Heparins: clinical use and laboratory monitoring. *Laboratory Medicine*. 2010;41(10):621–626. DOI: 10.1309/LMSXWC3A4LBIJ2B.
13. Bara L., Combe-Tamzali S., Conard J., Horellou M. H., Samama M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin (enoxaparin) with a new clotting test (HepTest). *Haemostasis*. 1987;17(3):127–133. DOI: 10.1159/000215570.
14. Gosselin R. C., Adcock D., Dorgalaleh A., Favaloro E. J., Lippi G., Pego J. M., Regan I., Siguret V. International council for standardization in haematology recommendations for hemostasis critical values, tests, and reporting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020;46(4):398–409. DOI: 10.1055/s-0039-1697677.

15. Gardiner C., Coleman R., de Maat M. P. M., Dorgalaleh A., Echenagucia M., Gosselin R. C., Ieko M., Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2021;43(2):169–183. DOI: 10.1111/ijlh.13411.
16. Hirsh S., Anand S. S., Halperin J. L., Fuster V. Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001;103(24):2993–3018. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2994.
17. Берковский А., Сергеева Е., Макаров В., Дрозд Н., Козлов А., Градова Ю., Суворов А. Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов «Общество больных гемофилией», патентообладатель. Способ получения очищенного активированного фактора X свертывания крови. Российская Федерация патент RU 2221578C1. 27 апрель 2004.
18. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Мелкумян А. Л., Козлов А. А., Нешкова Е. А., Яровая Г. А. Методы определения активности гепарина. М.: РМАПО; 2015. С. 32–44.
19. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Козлов А. А. Тестирование активности низкомолекулярного гепарина в препаратах и субстанциях. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(4):50–53.
20. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Чернобровкин М. Г., Зинченко А. В. Сравнительный анализ двух препаратов эноксапарина натрия методом ГепТест. *Химико-фармацевтический журнал*. 2022;56(10):63–66.
21. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

## REFERENCES

1. Zubairov D. M. The molecular basis of blood clotting and thrombus formation. Kazan: FEN; 2000: P. 219–240. (In Russ.)
2. Kitchen S., Olson J. D., Preston F. E., editors. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. P. 170–178.
3. Qiu M., Huang S., Luo C., Wu Z., Liang B., Huang H., Ci Z., Zhang D., Han L., Lin J. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;139:111561. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111561.
4. Savelyeva K. R., Frumin L. E., Shestakov V. N. Heparin and low molecular weight heparins. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2013;4:46–52. (In Russ.)
5. Hirsh J. Low Molecular Weight Heparins. 4<sup>th</sup> ed. Hamilton: BC Decker; 2007.
6. Guo J. W. S. J., Zhong G. Y. S. X. Guidelines for rational drug use in coronary heart disease. 2<sup>nd</sup> edition. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*. 2018;10:1–130.
7. Gee E. The National VTE Exemplar Centres Network response to implementation of updated NICE guidance: venous thromboembolism in over 16s: reducing the risk of hospital-acquired deep vein thrombosis or pulmonary embolism (NG89). *British Journal of Haematology*. 2019;186(5):792–793. DOI: 10.1111/bjh.16010.

8. Bloemen S., Hemker H. C., Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica*. 2013;98(4):549–554. DOI: 10.3324/Haematol.2012.073601.
9. Cosmi B., Palareti G. Old and new heparins. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):388–391. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.008.
10. Onishi A., Ange K., Dordick J. S., Linhardt R. J. Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*. 2016;21:372–392.
11. Hemker H. C. A century of heparin: past, present and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(12):2329–2338. DOI: 10.1111/jth.13555.
12. Hoffman M. Heparins: clinical use and laboratory monitoring. *Laboratory Medicine*. 2010;41(10):621–626. DOI: 10.1309/LMSXWC3A4LBIJP2B.
13. Bara L., Combe-Tamzali S., Conard J., Horellou M. H., Samama M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin (enoxaparin) with a new clotting test (Heptest). *Haemostasis*. 1987;17(3):127–133. DOI: 10.1159/000215570.
14. Gosselin R. C., Adcock D., Dorgalaleh A., Favalaro E. J., Lippi G., Pego J. M., Regan I., Siguret V. International council for standardization in haematology recommendations for hemostasis critical values, tests, and reporting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020;46(4):398–409. DOI: 10.1055/s-0039-1697677.
15. Gardiner C., Coleman R., de Maat M. P. M., Dorgalaleh A., Echenagucia M., Gosselin R. C., Ieko M., Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2021;43(2):169–183. DOI: 10.1111/ijlh.13411.
16. Hirsh S., Anand S. S., Halperin J. L., Fuster V. Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001;103(24):2993–3018. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2994.
17. Berkovsky A., Sergeeva E., Makarov V., Drozd N., Kozlov A., Gradova Yu., Suvorov A., Interregional charitable public organization of disabled people "Society of Hemophilia Patients", patent holder. Method for obtaining purified activated blood coagulation factor X. Patent RUS 2221578C1. 27 April 2004. (In Russ.)
18. Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Melkumyan A. L., Kozlov A. A., Neshkova E. A., Yarovaya G. A. Methods for determining the activity of heparin. Moscow: RMAPO; 2015. P. 32–44. (In Russ.)
19. Berkovskii A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Kozlov A. A. Evaluating activity of low-molecular-weight heparin in preparations and substances. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(4):50–53 (In Russ.)
20. Berkovskii A. L., Sergeeva E. V., Chernobrovkin M. G., Zinchenko A. V. Comparative analysis of two enoxaparin sodium preparations by the Heptest method. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(10):63–66. (In Russ.)
21. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)