

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/365260517>

Сравнительный анализ двух препаратов эноксапарина натрия методом ГепТест

Article in *Химико-фармацевтический журнал* · November 2022

DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-10-61-64

CITATION

1

READS

43

4 authors, including:



Mikhail Chernobrovkin

R-Pharm

25 PUBLICATIONS 149 CITATIONS

SEE PROFILE

А. Л. Берковский^{1,*}, Е. В. Сергеева¹, М. Г. Чернобровкин², А. В. Зинченко³

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ ПРЕПАРАТОВ ЭНОКСАПАРИНА НАТРИЯ МЕТОДОМ ГЕПТЕСТ

¹ МБООИ “Общество больных гемофилией”, НПО Ренам, Россия, 125167, Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2.

² АО “Р-Фарм”, Россия, 119421, Москва, Ленинский проспект, 111/1.

³ ООО “Технология лекарств”, Россия, 141400, Московская область, Химки, Рабочая ул., д. 2а, стр. 31, пом. 21.

* e-mail: aron 56@mail.ru

Выбраны оптимальные условия для проведения анализа препаратов низкомолекулярного гепарина (НМГ) методом ГепТест. Определены метрологические характеристики метода ГепТест. Проведен сравнительный анализ влияния 2 препаратов НМГ эноксапарина натрия — отечественного препарата Эноксапарин натрия (ООО “Технология лекарств”, Россия) и оригинального препарата Клексан (Sanofi, Франция) на время свертывания человеческой плазмы в методе ГепТест. По результатам определения времени свертывания крови методом ГепТест были вычислены средние значения для каждого разведения каждой серии препаратов Эноксапарин натрия и Клексан. Построены графики зависимости времени свертывания плазмы от степени разведения этих препаратов. Показано, что форма кривых зависимости времени свертывания плазмы крови от активности эноксапарина натрия аналогична для препаратов Эноксапарин натрия и Клексан. Методом ГепТест показана сопоставимость препарата Эноксапарин натрия (ООО “Технология лекарств”, Россия) с оригинальным препаратом Клексан (Sanofi, Франция).

Ключевые слова: низкомолекулярный гепарин (НМГ); гепарин; эноксапарин натрия; время свертывания плазмы, ГепТест.

Обеспечение производства эффективных и безопасных отечественных лекарственных препаратов является важнейшей задачей фармацевтической индустрии нашей страны. Высокие требования, предъявляемые к новым препаратам, появляющимся на фармацевтическом рынке, обеспечиваются соблюдением производителями правил GMP, проведением надежных доклинических и клинических испытаний с соблюдением правил GLP и GCP, регламентируются системами управлением качества по стандартам ISO, системой менеджмента безопасности в соответствии с требованиями международных стандартов и другими нормативами.

В настоящее время в связи с высокой частотой тромботических и тромбоэмболических заболеваний и состояний, в том числе по причине COVID-19, широко используются прямые антикоагулянты, в частности, низкомолекулярные гепарины (НМГ). Надежный и предсказуемый антитромботический эффект, отсутствие необходимости в частом лабораторном контроле и многолетний успешный мировой опыт применения НМГ сделали их незаменимыми в лечении и профилактике тромбозов и тромбоэмболий. Высокая потребность в клиническом применении НМГ привела отечественных фармакологов к производству биоаналогичных препаратов, в том числе и производства по полному циклу.

Гепарин представляет собой глюкозаминогликан, содержащий смесь сульфатированных мукополисахаридов различного размера: нефракционированный (5000 – 0000 Да) или низкомолекулярный (НМГ) (1000 – 10000 Да).

При добавлении гепарина к плазме он взаимодействует с антитромбином путем связывания сульфогрупп

глюкозаминогликана с аминогруппами лизина, расположенного на поверхности антитромбина, приводя к конформационным изменениям последнего. В результате раскрывается сайт антитромбина, содержащий остаток аргинина и способный связываться с остатком серина активных протеаз коагуляционного каскада (IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa). При этом тысячекратно ускоряется блокада протеаз путем образования неактивных эквимольных комплексов гепарин — антитромбин — протеаза (рис. 1).

Таким образом, для эффективного воздействия гепарина необходим антитромбин, в противном случае никакого антикоагулянтного эффекта от применения препарата получено не будет.

Аналогичным механизмом действия обладает один из НМГ, эноксапарин натрия. Эноксапарин натрия — препарат со средней молекулярной массой около 4500 Да, получаемый щелочным гидролизом бензилового эфира гепарина, выделенного из слизистой оболочки тонкого отдела кишечника свиньи. Его структура характеризуется невозстанавливающим фрагментом 2-*O*-сульфо-4-енпиразиносуроново́й кислоты и восстанавливающим фрагментом 2-*N*⁶-*O*-дисульфо-*D*-глюкопиранозида. Структура эноксапарина натрия содержит около 20 % 16-ангидропроизводного в восстанавливающем фрагменте полисахаридной цепи [1]. Исследуемые биоаналогичный препарат Эноксапарин натрия и оригинальный Клексан содержат в качестве действующего вещества эноксапарин натрия.

Определение активности НМГ проводят обычно хромогенным методом, в то время как для доказательства сопоставимости биоаналога с оригинальным препаратом рекомендуются методы, основанные на фиксации времени образования сгустка, т.е. коагуло-

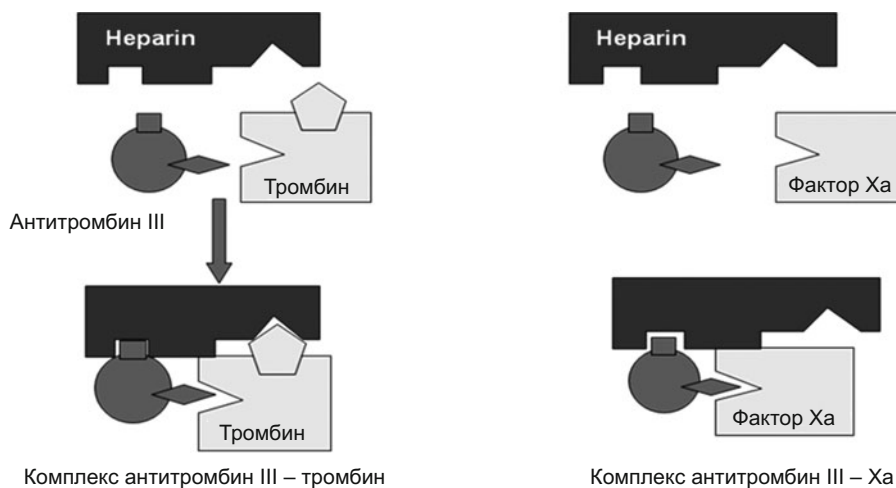


Рис. 1. Механизм действия гепарина.

метрические. FDA рекомендует использовать коагулологический ГепТест для исследования сопоставимости НМГ [2]. Применение определения анти-Ха-активности методом с использованием Международного стандарта и экзогенного фактора Ха, аналогичным ГепТесту, изложено в Руководстве по проведению доклинических испытаний лекарственных средств [3]. В данной работе сравнение влияния препаратов НМГ эноксапарина натрия на время свертывания плазмы проведено методом ГепТест с применением экзогенного активированного фактора Ха, способного ингибироваться гепарином [4–6]. Следует отметить, что разработка и оптимизация метода ГепТест проведена с использованием отечественных реактивов, произведенных НПО “Ренам” МБООИ “Общество больных гемофилией” (Россия).

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие препараты: Эноксапарин натрия, раствор для подкожного введения 10000 МЕ анти-Ха/мл, производства ООО “Технология лекарств”, Россия, серии 070521, 080521, 090521, 100521, 110521 и 120521 и Клексан, раствор для подкожного введения 10000 МЕ анти-Ха/мл, производства Sanofi, Франция, серии 9L033C, 9L377C, 9L638C, C020121 и C080321. Препараты разводили 0,15 М раствором NaCl в 10000 раз и далее последовательно в 2 раза. Это позволило с учетом указанной но-

минальной активности препаратов получить растворы для исследования, содержащие 1,0, 0,5 и 0,25 МЕ анти-Ха/мл.

Международный стандарт низкомолекулярного гепарина МС НМГ 01/608 [7] был получен из NIBSC (Великобритания). МС был разведен в соответствии с инструкцией по применению и получены растворы для исследования, содержащие 1,09, 0,55 и 0,275 анти-Ха ед/мл. Плазма субстратная с нормальным уровнем активности факторов свертывания, реагент, содержащий смесь фактора Ха с фосфолипидами и 0,035 М раствор хлорид кальция были получены из НПО “Ренам” МБООИ “Общество больных гемофилией” (Россия) [8].

Методика исследования

Метод ГепТест основан на способности гепарина, добавленного к плазме, нейтрализовать экзогенный активированный фактор Ха в присутствии антитромбина III (АТIII).

Процесс происходит в два этапа:

1. Инактивация избытка фактора Ха комплексом АТIII — гепарин.
2. Измерение коагулологической активности остаточного фактора Ха на фосфолипидной мембране в присутствии ионов кальция.

Источником АТIII, фибриногена и фактора V служит субстратная плазма.

Анализ проводился на полуавтоматическом коагулометре Biomerieux Option 4 plus в соответствии с протоколом, представленным в табл. 1.

При определении времени свертывания плазмы в ГепТесте регистрировали время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка.

Статистический анализ (с использованием статистического пакета Statistica 10.0) включал регрессионный и корреляционный анализы. R — обозначение коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты и их обсуждение

При проведении ГепТеста к цитратной плазме добавляется НМГ, избыток экзогенного активированного

Таблица 1

Схема проведения ГепТеста

| Внести в кювету анализатора: | Объем |
|--|-------|
| Плазма субстратная, мкл | 100 |
| Одно из разведений МС НМГ или разведений препарата Эноксапарина натрия или Клексана или 0,15 М раствора NaCl (холостая проба), мкл | 25 |
| Инкубировать при 37 °С точно 1 мин | |
| Реагент фактор Ха с фосфолипидами, мкл | 50 |
| Инкубировать при 37 °С точно 3 мин | |
| Кальций хлористый 0,035 М раствор, мкл | 50 |

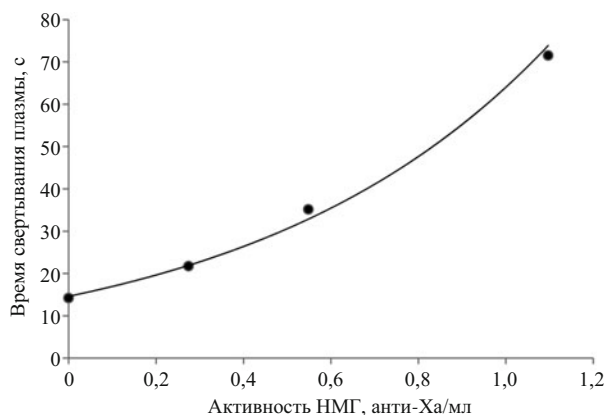


Рис. 2. Зависимость времени свертывания плазмы в тесте ГепТест от активности МС НМГ ($R = 0,9978, p < 0,001$).

фактора Ха с фосфолипидными везикулами и раствор хлорида кальция. На первом этапе теста НМГ связывается с антитромбином плазмы и быстро инактивирует экзогенный фактор Ха. На втором этапе после добавления хлорида кальция запускается реакция активации протромбина. Оставшийся фактор Ха на поверхности фосфолипидной мембраны в присутствии ко-фактора Va и ионов Ca^{2+} связывает протромбин и расщепляет его. В результате образуется тромбин (фактор IIa). Под воздействием тромбина происходит превращение растворенного фибриногена в нерастворимый фибрин и образование сгустка. В ГепТесте фиксируется время от момента добавления в реакционную смесь ионов кальция до момента образования сгустка. Таким образом, в ГепТесте фиксируется способность гепарина в комплексе с антитромбином ингибировать только фактор Ха, в отличие от теста АЧТВ, где фиксируется ингибирование всех сериновых протеаз, участвующих во внутреннем и общем пути коагуляционного каскада.

При проведении ГепТеста с плазмой, содержащей гепарин, происходит неизбежное удлинение времени свертывания плазмы, причем чем больше гепарина будет добавлено в плазму, тем больше образуется активного комплекса гепарин — антитромбин, тем больше инактивируется экзогенного фактора Ха, тем меньше останется фактора Ха для реакции образования тромбина, и тем длиннее будет время свертывания плазмы. Если в тесте будет использоваться плазма, содержащая 100 % активности всех факторов свертывания, то по степени удлинения времени ее свертывания в ГепТесте можно судить о функциональной полноценности

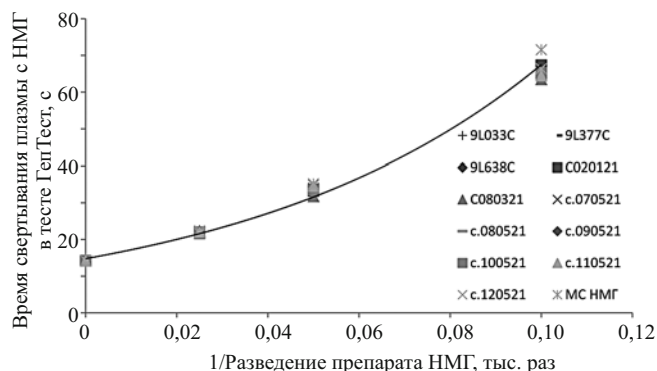


Рис. 3. Графическая оценка сопоставимости препаратов Эноксапарин натрия и Клексан методом ГепТест с разведением препаратов: а — в 10 000 раз; б — в 20 000 раз; в — в 40 000 раз.

препаратов гепарина, используемых для ингибирования свертывания.

На первом этапе работы была исследована зависимость времени свертывания нормальной человеческой плазмы, содержащей 100 % активности факторов свертывания, от активности гепарина с помощью МС НМГ. С этой целью были приготовлены 4 независимых ряда разведений 2-го МС НМГ, содержащие 1,09 анти-Ха ед/мл; 0,55 анти-Ха ед/мл и 0,275 анти-Ха ед/мл соответственно. Затем каждое разведение МС НМГ было добавлено к нормальной человеческой плазме и определено время свертывания в ГепТесте в 4 повторах по схеме, приведенной выше (табл. 1). В результате одна и та же концентрация МС НМГ была проанализирована 16 раз. По результатам ГепТеста были определены средние времена свертывания плазмы, содержащей различное количество НМГ. Это позволило построить график зависимости времени свертывания плазмы от активности НМГ (рис. 2).

Для оценки применимости метода ГепТест были определены его метрологические характеристики. Относительное стандартное отклонение внутри одной серии измерений времени свертывания плазмы в присутствии НМГ не превышало 2,75 %. Повторные измерения на следующий день с использованием свежеприготовленных растворов плазмы и гепарина дали аналогичные результаты (относительное стандартное отклонение не более 3,0 %) [9].

Стандартное отклонение времени свертывания плазмы в тесте ГепТест в отсутствии НМГ (“холостая проба”) составило 0,22 с при среднем времени свертывания 14,21 с. Эти результаты позволили вычислить

Таблица 2

Оценка сопоставимости препаратов Клексан и Эноксапарин натрия методом ГепТест ($P = 0,95, n = 4$)

| Разведение препарата, тыс. раз | Среднее время свертывания плазмы для препарата Клексан M , с | Стандартное отклонение σ , с | $M \pm 3\sigma$ | Среднее время свертывания плазмы для 6 серий препарата Эноксапарин натрия $M_1 \pm \sigma$ |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|------------------|--|
| 10 | 65,70 | 2,15 | $65,70 \pm 6,45$ | $65,75 \pm 0,86; 66,35 \pm 0,79; 65,40 \pm 0,93; 65,05 \pm 1,29; 64,48 \pm 0,43; 66,40 \pm 1,95$ |
| 20 | 32,49 | 0,89 | $32,49 \pm 2,68$ | $33,90 \pm 0,57; 33,75 \pm 0,34; 33,43 \pm 0,70; 33,53 \pm 0,64; 34,55 \pm 0,45; 34,78 \pm 0,35$ |
| 40 | 21,95 | 0,37 | $21,95 \pm 1,12$ | $22,10 \pm 0,52; 22,10 \pm 0,98; 22,13 \pm 0,75; 22,00 \pm 0,71; 21,90 \pm 0,27; 22,35 \pm 0,37$ |

чувствительность метода [9], которая в этом случае составила 0,01 МЕ анти-Ха/мл плазмы.

Для оценки сопоставимости препаратов эноксапарина натрия методом ГепТест использовали критерий, описанный в рекомендациях FDA [10]. Препараты считались сопоставимыми по времени свертывания плазмы, если результаты анализа 100 % проанализированных серий исследуемого биоаналогичного препарата находились в интервале $M \pm 3\sigma$, где M — среднее значение времени свертывания плазмы, полученное для всех серий оригинального препарата, а σ — стандартное отклонение для результатов анализа оригинального препарата.

Изучение влияния препаратов Эноксапарин натрия и Клексан на время свертывания плазмы и оценка их сопоставимости методом ГепТест были проведены на 6 сериях препарата Эноксапарин натрия и на 5 сериях оригинального препарата Клексан. Препараты были последовательно разведены физиологическим раствором (0,15 М раствор NaCl) в 10, 20 и 40 тысяч раз. Каждое разведение каждой серии препарата было добавлено к нормальной плазме и определено время свертывания в тесте ГепТест в соответствии со схемой, описанной в табл. 1. Одновременно в тех же условиях были проанализированы растворы МС НМГ, содержащие 1,09, 0,55, 0,275 и 0 МЕ анти-Ха ед/мл.

Графики зависимости времени свертывания плазмы от степени разведения исследуемых препаратов для удобства восприятия были построены в координатах время свертывания плазмы от величины, обратной разведению. Профили полученных зависимостей (рис. 3) для препарата Эноксапарин натрия и Клексан одинаковы во всем диапазоне исследуемых концентраций, что свидетельствует об их сопоставимом влиянии на время свертывания плазмы.

Для исследования сопоставимости методом ГепТест были определены средние значения времени свертывания плазмы для каждого разведения препарата Клексан (M) и Эноксапарин натрия ($M1$) и стандартное отклонение времени свертывания (σ). Результаты исследования представлены в табл. 2.

Результаты анализа для исследуемых серий Эноксапарина натрия находятся в интервале $M \pm 3\sigma$ для препарата Клексан (рис. 4), что подтверждает их сопоставимость.

Таким образом, методом ГепТест определено влияние препаратов Эноксапарин натрия (ООО “Технология лекарств”, Россия) и Клексан (Sanofi, Франция) на время свертывания плазмы крови и исследована сопоставимость препаратов. Схожесть профилей зависимости времени свертывания плазмы от активности эноксапарина натрия, а также отсутствие значимого различия соответствующих коэффициентов корреляции у препаратов Эноксапарин натрия (ООО “Технология лекарств”, Россия) и Клексан (Sanofi, Франция), говорит о сопоставимом влиянии эноксапарина натрия, содержащегося в исследуемых препаратах, на время свертывания плазмы в тесте ГепТест. Методом ГепТест подтверждена сопоставимость препаратов Эноксапарин натрия (ООО “Технология лекарств”, Россия) и Клексан (Sanofi, Франция).

ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia 10.4. Enoxaparin sodium, pp. 2502 – 2504 (2019).
2. <https://www.fda.gov/media/88253/download>.
3. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1*, Гриф и К, Москва (2012).
4. L. Bara, S. Combe-Tanzaly, J. Conard, et al., *Haemostasis*, **17**, 127 – 133 (1987).
5. T. Ozawa, J. Domagalski, E. F. Mammen, *Am. J. Clin. Pathol.*, **99**, 157 – 162 (1993).
6. P. J. Campbell, M. A. Tirvengadam, *W. Clin. Lab. Haem.*, **21**, 193 – 199 (1999).
7. Национальный институт биологических стандартов и контролей. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/01-608.pdf>.
8. <http://new.renam.ru/wp-content/uploads/2021/06/Реаклот-гепарин.pdf>.
- 9.
10. FDA DRAFT GUIDANCE. Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. September 2017.

Поступила 13.05.22

COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO ENOXAPARIN SODIUM DRUGS BY HEPTEST

A. L. Berkovskii^{1*}, E. V. Sergeeva¹, M. G. Chernobrovkin², and A. V. Zinchenko³

¹ Research division of the “Society of patients with hemophilia”, 125167, Moscow, Russia

² “R-pharm” group, 119421, Moscow, Russia

³ “Technologiya lekarstv”, LLC, 141400, Khimki, Moscow region, Russia

* e-mail: aron 56@mail.ru

Optimal conditions for the analysis of low-molecular-weight heparin (LMWH) drugs by Heptest and the metrological characteristics of the Heptest method were determined. A comparative analysis of the effect of two LMWH preparations of enoxaparin sodium, the domestic drug Enoxaparin sodium (Technologiya lekarstv, Russia) and the original drug Clexane (Sanofi, France), on the time of human plasma clotting in the Heptest method was carried out. Based on the results of determining the blood clotting time by Heptest, the average values were calculated for each dilution of each series of drugs Enoxaparin sodium and Clexane. Graphs of the dependence of the plasma clotting time on the degree of dilution of these drugs are plotted. It is shown that the shape of the curves of the dependence of the blood plasma clotting time on the activity of enoxaparin sodium is similar to both drugs (Enoxaparin sodium and Clexane). The Heptest method showed the comparability of Enoxaparin sodium (LLC Technologiya lekarstv, Russia) with the original drug Clexane (Sanofi, France).

Keywords: low-molecular-weight heparin (LMWH); heparin; enoxaparin sodium; plasma clotting time, HepTest.