










В.М. Косман¹  
М.В. Карлина¹ 
Н.М. Фаустова¹ 
Е.А. Ежова²,
И.Г. Котельникова² 
В.Г. Макаров¹ 
М.Н. Макарова¹ 

Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Федеральное государственное унитарное предприятие
«Московский эндокринный завод»,
Новохохловская ул., д. 25, Москва, 109052, Российская Федерация

✉ **Косман Вера Михайловна;** kosman.vm@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Для сравнительного изучения фармакодинамики и подтверждения эквивалентности препаратов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) согласно современным регуляторным требованиям необходимо сопоставить три фармакодинамических показателя: анти-Ха и анти-IIa активности и концентрацию ингибитора пути тканевого фактора (ТФPI). **Цель работы** – анализ особенностей проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция при подкожном введении. **Материалы и методы:** определение анти-Ха и анти-IIa активности НМГ и содержания ТФPI в образцах плазмы крови человека, полученных после однократного подкожного введения тестируемого и референтного препаратов в одной дозе, выполнено с применением коммерчески доступных наборов реагентов и предварительно валидированных методик. Основные фармакодинамические параметры (суррогатные фармакокинетические маркеры): максимальная активность или концентрация (A_{\max} или C_{\max}), время достижения максимальной активности или концентрации (T_{\max}), площадь под кривой «активность (концентрация) – время» (AUC), период полувыведения ($T_{1/2}$) рассчитаны внемоделным методом статистических моментов и выполнена их дальнейшая статистическая обработка. **Результаты:** полученные результаты оценки анти-Ха активности и ТФPI позволили рассчитать и сопоставить фармакодинамические параметры (A_{\max} или C_{\max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, T_{\max} , $T_{1/2}$), а также оценить доверительные интервалы, необходимые для подтверждения эквивалентности исследованных препаратов. Данные по значениям анти-IIa активности имели характер колебаний в пределах одного уровня, что не позволило рассчитать и сопоставить фармакодинамические параметры. **Выводы:** выявлены особенности, которые необходимо учитывать при планировании исследований фармакодинамики препаратов надропарина кальция: целесообразность разделения каждого образца при отборе с получением двух испытуемых аликвот (одна для определения анти-Ха и анти-IIa активностей, вторая – для анализа ТФPI) для корректного выполнения аналитического этапа; достаточность подтверждения отсутствия мешающего влияния действующего вещества на аналитическую процедуру при валидации биоаналитических методик оценки анти-Ха активности, анти-IIa активности и содержания ТФPI в плазме крови человека, валидированных в диапазоне концентраций 0,024–0,182 МЕ/мл, 0,0069–0,052 МЕ/мл и 1,56–100 нг/мл соответственно; возможность получения данных, не позволяющих рассчитать фармакодинамические параметры и сопоставить доверительные интервалы для всех трех фармакодинамических показателей. Указанные особенности могут быть характерны для других препаратов НМГ.

Ключевые слова: сравнительная фармакодинамика; биоаналогичный препарат; надропарин кальция; однократное подкожное введение; препараты низкомолекулярных гепаринов; анти-Xa активность; анти-IIa активность; ингибитор пути тканевого фактора; суррогатные маркеры концентрации

Для цитирования: Kosman V.M., Karlina M.V., Faustova N.M., Ezhova E.A., Kotelnikova I.G., Makarov V.G., Makarova M.N. Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):89–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-406>

V.M. Kosman¹ ✉ 
M.N. Karlina¹ 
N.M. Faustova¹ 
E.A. Ezhova²,
I.G. Kotelnikova² 
V.G. Makarov¹ 
M.N. Makarova¹ 

Considerations for the Bioanalytical Part of Equivalence Studies of Biosimilar Nadroparin Calcium

¹ *Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation*

² *Moscow Endocrine Plant,
25 Novokhokhlovskaya St., Moscow 109052, Russian Federation*

✉ **Vera M. Kosman;** kosman.vm@doclinika.ru

ABSTRACT

According to current regulatory views, a comparative study of the pharmacodynamics (PD) of low molecular weight heparin (LMWH) products and confirmation of their equivalence require comparing three PD markers: the anti-Xa activity, the anti-IIa activity, and the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) concentration. **The aim of this study** was to analyse the features specific to the bioanalytical part of an equivalence study of a nadroparin calcium biosimilar after single subcutaneous administration. **Material and methods:** the anti-Xa and anti-IIa activity values and TFPI content were determined in human plasma samples obtained after single subcutaneous administration of the test and the reference product in the same dose, using commercially available reagent kits and pre-validated assays. The authors calculated the main PD parameters (surrogate pharmacokinetic markers), namely the maximum activity or concentration (A_{\max} or C_{\max}), time to maximum activity or concentration (T_{\max}), area under the activity–time (or concentration–time) curve (AUC), and half-life period ($T_{1/2}$), by means of model-independent statistical moment analysis and carried out further statistical testing of the parameters. **Results:** the anti-Xa activity and TFPI concentration results provided for the possibility of calculating and comparing the PD parameters (A_{\max} or C_{\max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, T_{\max} , $T_{1/2}$) and estimating the confidence intervals that are necessary to confirm the bioequivalence of the studied products. The anti-IIa activity data had a characteristic pattern of slight fluctuations around one level, which prevented the calculation and comparison of PD parameters. **Conclusion:** the study identified specific features to consider when planning comparative PD studies of nadroparin calcium products. Firstly, it is feasible to divide samples into two test aliquots (one for anti-Xa and anti-IIa activity determination, the other for TFPI analysis) at the moment of collection in order to perform the analytical step correctly. Secondly, there is no need in full validation for the bioanalytical assays of the anti-Xa and anti-II activity and TFPI content in human plasma validated in the concentration ranges of 0.024–0.182 IU/mL, 0.0069–0.052 IU/mL and 1.56–100 ng/mL, respectively; a confirmation that the active ingredient does not interfere with the analytical procedure is adequate for the purpose. Finally, the data obtained may not allow for calculating PD parameters and comparing confidence intervals for all three markers. The listed considerations may be relevant for other LMWH products as well.

Key words: comparative pharmacodynamics; biosimilar medicinal product; nadroparin calcium; single subcutaneous administration; low molecular weight heparins; anti-Xa activity; anti-IIa activity; tissue factor pathway inhibitor; surrogate pharmacokinetic markers

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V., Faustova N.M., Ezhova E.A., Kotelnikova I.G., Makarov V.G., Makarova M.N. Considerations for the bioanalytical part of equivalence studies of biosimilar nadroparin calcium. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):89–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-406>

Введение

Исследования биоэквивалентности (БЭ) воспроизведенного лекарственного препарата, направленные на доказательство его эквивалентности референтному лекарственному препарату, являются одной из значимых частей его клинического исследования и регламентированы требованиями нормативных документов¹. В качестве основного критерия биоэквивалентности используют 90% доверительный интервал для отношения средних геометрических значений исследуемых фармакокинетических параметров (максимальной концентрации, площади под фармакокинетической кривой) тестируемого лекарственного препарата (Т) и референтного лекарственного препарата (препарата сравнения, R)².

Биологические лекарственные препараты в связи со сложной и неоднородной химической структурой относят к биоаналогичным (биоподобным)³, а не воспроизведенным препаратам. Для биоподобных препаратов рационально проведение сравнительных исследований, включающих оценку фармакодинамики с использованием не общепринятых фармакокинетических параметров, а так называемых суррогатных маркеров концентрации на основе фармакодинамических показателей. При планировании, проведении и оценке результатов

такого рода исследований обычно руководствуются общими принципами исследований БЭ.

Стандартный дизайн изучения биоэквивалентности предполагает сравнение двух лекарственных препаратов в рамках рандомизированного двухпериодного, перекрестного в двух последовательностях исследования с приемом однократной дозы и периодом отмычки⁴ (клинический этап). Далее в рамках аналитического этапа в полученных пробах биологического материала проводят определение содержания действующего вещества сравниваемых препаратов с помощью заранее разработанной и валидированной биоаналитической методики. На основании полученных данных проводят расчет фармакокинетических параметров и дальнейшую статистическую обработку результатов (постаналитический или статистический этап).

Для некоторых препаратов, прежде всего биологической природы, прямая оценка концентрации действующего вещества в биоматериале затруднительна или невозможна. В этом случае могут быть использованы так называемые биологические маркеры (биомаркеры, суррогатные маркеры концентрации, конечные точки фармакокинетики)⁵. Для препаратов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) в связи с их высокой гетерогенностью согласно современным нормативным требованиям⁶ для оценки

¹ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

² Там же.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁴ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁵ Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER); 2003.

Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

фармакодинамики и эквивалентности следует сопоставить анти-Ха, анти-IIa активности и концентрацию ингибитора пути тканевого фактора (tissue factor pathway inhibitor, TFPI). Данный подход был успешно применен при изучении фармакокинетики и (или) эквивалентности различных гепаринсодержащих препаратов (на основе эноксапарина, далтепарина и др.) [1–6]. Тот же принцип использован при планировании и выполнении работ по Протоколу клинического исследования № НДП-I-02/18 «Открытое рандомизированное сравнительное перекрестное исследование безопасности, переносимости и фармакодинамики препаратов Надропарин кальция, раствор для подкожного введения (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), и Фраксипарин, раствор для подкожного введения («Аспен Фарма Трейдинг Лимитед», Ирландия), у здоровых добровольцев».

Цель работы – анализ особенностей проведения биоаналитической части исследования эквивалентности, выявленных при изучении биоаналогичного препарата надропарина кальция при однократном подкожном введении.

Материалы и методы

В ходе клинического этапа работы по Протоколу клинического исследования № НДП-I-02/18 в рамках двух периодов были получены пробы плазмы крови от 26 добровольцев на 12 временных точках (через 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12 и 24 ч) после введения препаратов Т: Надропарин кальция, раствор для подкожного введения 9500 МЕ анти-Ха/мл (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) – 7600 МЕ анти-Ха-факторной активности/0,8 мл и R: Фраксипарин, раствор для подкожного введения («Аспен Фарма Трейдинг Лимитед», Ирландия) – 7600 МЕ анти-Ха/0,8 мл.

Пробы крови были отобраны в пробирки с цитратом натрия. После получения плазмы крови путем центрифугирования при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 15 мин при 3000 об./мин (1200 g) каждая проба была разделена на 3 части (аликвоты): 1-я часть – для определения анти-Ха и анти-IIa активности (объем не менее 0,3 мл); 2-я часть – для определения содержания TFPI (объем не менее 0,4 мл); 3-я часть – арбитражная

проба (объем не менее 0,7 мл). Такое деление необходимо, поскольку в ходе дальнейшего анализа допускается только однократное замораживание проб и определение всех трех предусмотренных фармакодинамических показателей в одной аликвоте затруднительно. Биопробы (части 1 и 2) переданы из клинического центра в аналитический с соблюдением температурного режима хранения (минус 20 °С).

Протокол биоаналитической части исследования рассмотрен и одобрен на заседании экспертной комиссии (ЭК) исследовательского учреждения, проводившего эту работу (АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», заключение ЭК № 40/20 от 28.09.2020).

Определение анти-Ха и анти-IIa активности плазмы крови человека выполнено с помощью набора реагентов «Ренапарин-тест», (НПО «Ренам», кат. № ГП-6) с использованием хромогенного субстрата. Определение концентрации TFPI в плазме крови человека выполнено методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., кат. № SEA394Hu). Работу с наборами вели согласно инструкциям производителей с предварительным подбором необходимого разведения для анализируемых проб. Кроме реагентов, входящих в состав наборов, для валидационных испытаний дополнительно использованы субстанция надропарина кальция (в качестве стандартного образца (СО)) и смесь вспомогательных веществ, входящих в состав готовой лекарственной формы (ГЛФ) препарата (плацебо препарата), предоставленные ФГУП «Московский эндокринный завод». В качестве интактной или бланк-плазмы использована референтная нормальная пулированная (РНП) плазма (ООО «Технология стандарт»), а также контрольная плазма двух уровней активности (норма и патология) из набора «Реахром-гепарин» (НПО «Ренам», кат. № ГП-1). При выполнении валидационных испытаний применены модельные смеси интактного биологического материала (РНП-плазмы крови человека) со СО, входящими в состав наборов: СО НМГ и калибровочным (стандартным) образцом TFPI (СО TFPI).

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017.

Биоаналитические методики валидированы согласно рекомендациям⁷. В качестве основных валидационных параметров использованы: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность, прецизионность. В ходе валидационных испытаний также проверена возможность разбавления биопроб перед анализом.

Параметры фармакодинамики (суррогатные маркеры фармакокинетики: максимальная активность или концентрация A_{\max} или C_{\max} , время достижения максимальной активности или концентрации T_{\max} , площадь под кривой «активность (концентрация) – время» AUC , период полувыведения $T_{1/2}$) рассчитаны внемоделльным методом статистических моментов [7].

При статистической обработке данных рассчитывали средние арифметические значения (\bar{X}), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), для фармакодинамических параметров дополнительно рассчитывали коэффициент вариации (CV , %), среднее геометрическое, медиану, максимальное и минимальное значения.

В качестве основного критерия эквивалентности препаратов Т и R использовали 90% доверительный интервал для отношения средних геометрических значений исследуемых фармакодинамических параметров (A_{\max} или C_{\max} , AUC), полученный с предварительным преобразованием данных на основе натурального логарифма. Доверительный интервал должен быть в пределах 80–125% (или 0,8–1,25)⁸.

В связи с получением близких значений фармакодинамического показателя (анти-Иа активности) на всех временных точках у подавляющего большинства добровольцев выполнена оценка попадания значений в диапазон $\pm 3SD$ с помощью контрольной карты Шухарта⁹.

Расчет основных фармакодинамических параметров выполнен с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel. Статистический анализ выполнен с применением программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0 (StatSoft).

Непосредственное доказательство эквивалентности исследованных препаратов не входило в задачу данного исследования, поэтому материалы, касающиеся дизайна исследования, характеристик добровольцев, критериев их включения/невключения, статистического обоснования размера выборки и т.п., а также детализация результатов статистической обработки полученных данных не включены в текст работы.

Результаты и обсуждение

Процесс валидации биоаналитической методики является обязательным в практике изучения фармакокинетики, токсикокинетики и биоэквивалентности в доклинических и клинических исследованиях. Объем и требования к валидации биоаналитических методик и анализу исследуемых биологических образцов при изучении биоэквивалентности регламентированы отдельным приложением соответствующего регуляторного документа¹⁰, который дополняет более общие рекомендации по валидации биоаналитических методик¹¹.

Использование в биоаналитической работе коммерчески доступных наборов реагентов имеет ряд особенностей. На начальном этапе необходимо выполнить проверку работоспособности наборов применительно к условиям конкретной лаборатории, основанную на выполнении анализа стандартных образцов (калибраторов), входящих в состав наборов; затем оценить влияние действующего вещества и плацебо исследуемых препаратов на результаты аналитической процедуры, подтвердить наличие активности *in vitro* и провести валидационные испытания.

⁷ ICH, Q2A, Harmonised tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures. Geneva: IFPMA; 1994.

ICH, Q2B, Harmonised tripartite guideline, Guideline on validation of analytical procedures: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London; 2011.

⁸ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁹ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. М.: Стандартинформ; 2008.

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

¹¹ ICH, Q2A, Harmonised tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures. Geneva: IFPMA; 1994.

ICH, Q2B, Harmonised tripartite guideline, Guideline on validation of analytical procedures: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London; 2011.

Данные по проверке работоспособности наборов реагентов с применением коммерчески доступных контрольных плазм с различным содержанием гепарина представлены в *таблице 1*. Полученные экспериментальные данные соответствовали показателям правильности определения анти-Ха и анти-IIa активности гепарина в плазме¹², что позволило подтвердить их пригодность для дальнейших испытаний.

По результатам анализа серий растворов СО надропарина кальция и СО НМГ, входящего в состав набора «Ренапарин-тест», были получены схожие зависимости оптической плотности растворов от их анти-Ха активности (*рис. 1*). На *рисунке 2* представлены УФ-спектры, полученные при анализе интактного биоматериала (бланк-плазмы) и модельных смесей с добавками СО НМГ или СО надропарина кальция. Их сопоставление позволило сделать заключение о том, что компоненты биоматериала (плазмы крови) не искажают спектров продуктов реакции с СО надропарина кальция и СО НМГ, а также подтвердить, что оптическая плотность снижается схожим образом в присутствии как СО НМГ, так и СО надропарина кальция. Таким образом, подтверждено, что действующее вещество исследуемого препарата в эксперименте *in vitro* проявляет тот вид активности,

на котором основана его дальнейшая оценка в экспериментах *in vivo* (в данном случае сравнительная оценка фармакодинамики), что обосновывает корректность использования данного аналитического подхода для дальнейшего исследования.

Результаты анализа, полученные при определении концентрации TFPI, для растворов плацебо, СО надропарина кальция и модельных смесей плазмы крови с добавками надропарина кальция, представлены в *таблице 2*.

Установлено, что плацебо препарата и СО надропарина кальция в модельных смесях с плазмой крови не оказывают влияния на уровень TFPI *in vitro* и не оказывают мешающего влияния на определение концентрации TFPI в плазме крови человека. Увеличение концентрации TFPI-фактора при действии любого НМГ (в том числе надропарина кальция) можно зарегистрировать только *in vivo* или в специальных клеточных системах, что связано с особенностями механизма его образования и регуляции в живом организме [9].

Таким образом, подтверждено отсутствие мешающего влияния надропарина кальция на результаты определения активности анти-Ха/анти-IIa факторов и концентрации TFPI.

Таблица 1. Результаты определения активности анти-Ха и анти-IIa факторов гепарина в образцах контрольной плазмы

Table 1. Results of heparin anti-Xa and anti-IIa activity evaluation in control plasma samples

Параметры <i>Parameters</i>	Анти-Ха активность, МЕ/мл <i>Anti-Xa activity, IU/mL</i>		Анти-IIa активность, МЕ/мл <i>Anti-IIa activity, IU/mL</i>	
	контрольная плазма 1 <i>control plasma 1</i>	контрольная плазма 2 <i>control plasma 2</i>	контрольная плазма 1 <i>control plasma 1</i>	контрольная плазма 2 <i>control plasma 2</i>
Значения активности по паспорту производителя, (среднее и диапазон)* <i>Activity values according to the manufacturer's product insert (mean and range)*</i>	0,43 (0,33–0,53)	0,82 (0,72–0,92)	0,43 (0,33–0,53)	0,82 (0,72–0,92)
Экспериментально полученные значения ($\bar{X} \pm SD$) <i>Experimental values ($\bar{X} \pm SD$)</i>	0,51 ± 0,02	0,89 ± 0,04	0,47 ± 0,03	0,76 ± 0,04
Коэффициент вариации результатов по паспорту производителя, % <i>Coefficients of variation for results according to the manufacturer's product insert, %</i>	10	10	10	10
Экспериментально полученные коэффициенты вариации результатов, % <i>Experimental coefficients of variation for results, %</i>	4,2	4,8	6,4	5,2

* Поскольку для нефракционированного гепарина, входящего в состав контрольных плазм из набора реагентов «Реахром-гепарин», соотношение анти-Ха/IIa активности составляет 1:1 [8], то интервал допустимых значений для активности анти-Ха и анти-IIa фактора одинаков и соответствует значению, приводимому в паспорте к набору реагентов для определения активности анти-Ха фактора (анти-Ха/мл).

* Taking into account the 1:1 ratio of anti-Xa to anti-IIa activity of unfractionated heparin from the control plasmas included into the ReaChrom-Heparin kit [8], the ranges of acceptable anti-Xa and anti-IIa activity values are the same and correspond to the range given in the insert provided with the reagent kit for determination of anti-Xa activity (anti-Xa/mL).

¹² Инструкция по применению набора реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина «Ренапарин-тест» (НПО «Ренам», Россия).

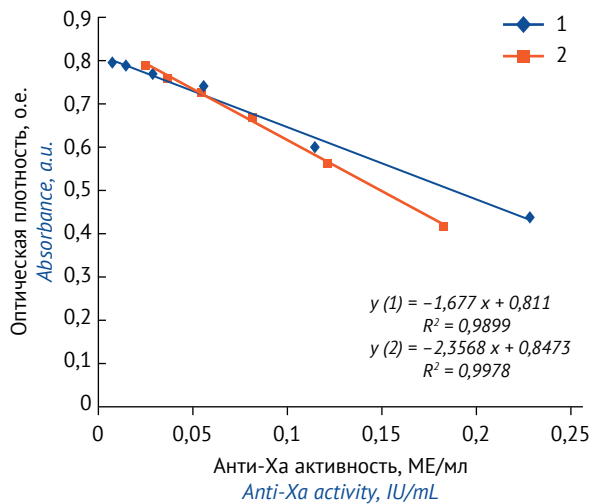


Рис. 1. Примеры калибровочных зависимостей оптической плотности растворов от анти-Ха активности СО низкомолекулярного гепарина (1) и СО надропарина кальция (2)

Fig. 1. Example calibration function of absorbance vs. anti-Xa activity of the low molecular weight heparin reference standard (1) and nadroparin calcium (2) solutions

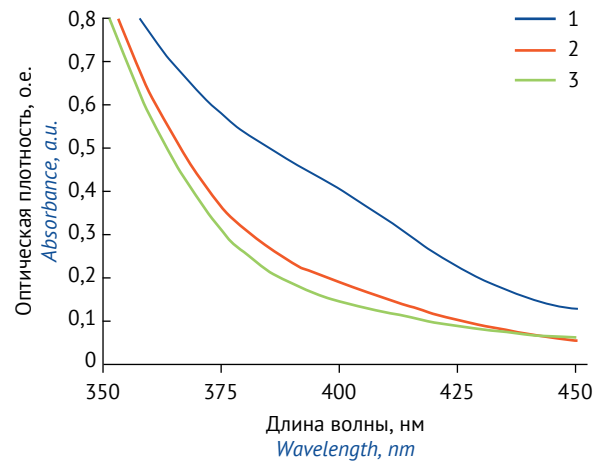


Рис. 2. Типичные УФ-спектры, полученные при анализе анти-Ха активности плазмы крови человека: 1 – бланк-плазма; 2 – модельная проба плазмы крови с добавкой стандартного образца надропарина кальция, 3 – модельная проба с добавкой стандартного образца низкомолекулярного гепарина

Fig. 2. Typical UV-spectra obtained when analysing human plasma anti-Xa activity: 1 – blank plasma, 2 – model plasma spiked with the reference standard of nadroparin calcium, 3 – model plasma spiked with the reference standard of low molecular weight heparin

Основные результаты валидации методик оценки активности анти-Ха, анти-IIa факторов и концентрации TFPI представлены в таблице 3.

Получены удовлетворительные результаты по всем необходимым валидационным параметрам для всех анализируемых показателей.

Необходимо подчеркнуть, что при выполнении валидационных испытаний использованы модельные смеси интактного биологического материала (РНП-плазмы) со СО, входящими в состав наборов (СО НМГ и СО TFPI). Применение СО надропарина кальция (действующего вещества исследованных препаратов) было

Таблица 2. Результаты определения концентрации ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) для плацебо, растворов и модельных смесей с различными концентрациями СО надропарина кальция

Table 2. Results of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) content determination for placebo, test solutions, and model mixtures with various concentrations of nadroparin calcium RS

Испытуемый образец <i>Test sample</i>	Оптическая плотность (в растворителе для стандарта*), о.е. <i>Absorbance (in the RS solvent*), a.u.</i>	Модельные смеси с плазмой крови <i>Model plasma mixtures</i>	
		оптическая плотность, о.е. <i>absorbance, a.u.</i>	концентрация TFPI, нг/мл <i>TFPI concentration, ng/mL</i>
Растворитель для стандарта* <i>RS solvent*</i>	0,113	0,209 ± 0,005	48,5 ± 2,3
Раствор СО TFPI 1,56 нг/мл**,** <i>TFPI RS solution 1.56 ng/mL**,**</i>	0,171	0,123 ± 0,004	1,56
Плацебо <i>Placebo</i>	0,111 ± 0,004	0,209 ± 0,005	48,5 ± 2,3
Растворы СО надропарина кальция, мкг/мл <i>Nadroparin calcium RS solution, µg/mL</i>	20,0	0,105	–
	4,0	0,141	0,199
	0,80	0,095	0,216
	0,16	0,108	0,189
	0,032	0,092	0,218

Примечание. СО – стандартный образец; «–» – не определялась.

* **Входит** в состав набора реагентов ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., кат. № SEA394Hu).

** **Концентрация** раствора соответствует нижнему пределу количественного определения (НПКО).

Note. RS – reference standard; – not determined.

* *The solvent is provided with the ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., SEA394Hu).*

** *The concentration corresponds to the lower limit of quantification (LLOQ).*

Таблица 3. Основные валидационные параметры методик определения анти-Ха, анти-IIa активности и концентрации ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) в плазме крови человека

Table 3. Main validation parameters for assays of the anti-Xa activity, anti-IIa activity, and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) concentration in human plasma

Валидационный параметр <i>Validation parameter</i>	Уровень концентрации <i>Concentration level</i>	Критерий приемлемости <i>Acceptance criterion</i>	Результат <i>Result</i>			Вывод <i>Conclusion</i>
			анти-Ха активность, МЕ/мл <i>anti-Xa activity, IU/mL</i>	анти-IIa активность, МЕ/мл <i>anti-IIa activity, IU/mL</i>	ингибитор пути тканевого фактора, нг/мл <i>TFPI, ng/mL</i>	
Селективность <i>Selectivity</i>	Бланк-плазма, НПКО, ВПКО* <i>Blank plasma, LLOQ, ULOQ*</i>	Способность дифференцировать аналит от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца <i>Ability to differentiate the analyte from the endogenous matrix and other sample components</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Соответствует <i>Conforms</i>
Нижний предел количественного определения <i>Lower limit of quantification</i>	НПКО <i>LLOQ</i>	Точность, менее 20% <i>Accuracy, <20%</i> Прецизионность, менее 20% <i>Precision, <20%</i>	0,024	0,0069	1,56	Установлен <i>Determined</i> Соответствует <i>Conforms</i> Соответствует <i>Conforms</i>
			1,5–13,1%	4,7–10,2%	8,2–12,5%	
			11,6%	14,8%	12,0%	
Калибровочный диапазон <i>Calibration range</i>	Калибровочные стандарты не менее шести концентраций, не менее 3 серий <i>Calibration standards at a minimum of 6 concentrations, at least 3 runs</i>	Коэффициент корреляции (r) $\geq 0,9$ <i>Correlation coefficient (r) ≥ 0.9</i>	0,024–0,182 $r \geq 0,99$	0,0069–0,052 $r \geq 0,99$	1,56–100 $r \geq 0,99$	Установлен <i>Determined</i> Соответствует <i>Conforms</i>
Точность** ($ \delta $, %) <i>Accuracy**</i> , ($ \delta $, %)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	4,5–13,1	4,7–10,2	1,6–7,8	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	2,5–10,2	3,6–6,7	2,9–4,2	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	0,5–12,0	1,2–13,8	8,0–13,4	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	0,5–13,4	0,9–14,1	8,2–12,5	
Прецизионность в одном цикле*** (RSD, %) <i>Intra-run precision***</i> (RSD, %)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	4,5–12,5	3,4–9,6	0,1–7,7	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	3,6–6,5	4,1–7,8	0,4–4,2	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	5,5–7,1	2,1–5,6	1,8–13,8	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	0,7–8,0	0,7–14,1	7,6–13,7	
Прецизионность между циклами*** (RSD, %) <i>Inter-run precision***</i> (RSD, %)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	13,3	13,1	6,4	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	6,6	6,8	4,7	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	8,6	6,5	9,0	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	11,6	14,8	12,0	

Примечание. ВПКО – верхний предел количественного определения, НПКО – нижний предел количественного определения, КК – контроль качества.

* Для оценки анти-Ха активности ВПКО – 0,182 МЕ/мл, средний КК – 0,121 МЕ/мл, низкий КК – 0,539 МЕ/мл, НПКО – 0,024 МЕ/мл, для оценки анти-IIa активности ВПКО – 0,052 МЕ/мл, средний КК – 0,0347 МЕ/мл, низкий КК – 0,0154 МЕ/мл, НПКО – 0,0069 МЕ/мл, для ингибитора пути тканевого фактора ВПКО – 100 нг/мл, средний КК – 50 нг/мл, низкий КК – 3,125 нг/мл, НПКО – 1,56 нг/мл.

** Точность оценивали по принципу «внесено-найдено» как модуль относительной систематической погрешности ($|\delta|$) в процентах от внесенного количества.

*** Для оценки прецизионности использована величина относительного стандартного отклонения (RSD, %).

Note. ULOQ – upper limit of quantification, LLOQ – lower limit of quantification, QC – quality control.

* For the anti-Xa activity assay, the ULOQ was 0.182 IU/mL, the middle QC level was 0.121 IU/mL, the low QC level was 0.539 IU/mL, and the LLOQ was 0.0240 IU/mL. For the anti-IIa factor activity assay, the ULOQ was 0.052 IU/mL, the middle QC level was 0.347 IU/mL, the low QC level was 0.0154 IU/mL, and the LLOQ was 0.0069 IU/mL. For the TFPI assay, the ULOQ was 100 ng/mL, the middle QC level was 50 ng/mL, the low QC level was 3.125 ng/mL, and the LLOQ was 1.56 ng/mL.

** Accuracy was estimated by recovery in absolute values of relative bias ($|\delta|$) expressed as a percentage of the spiked amount.

*** Precision was evaluated using the relative standard deviation (RSD, %).

целесообразным только на начальном этапе испытаний – для подтверждения отсутствия его мешающего влияния на результаты анализа. Такая особенность валидационных испытаний связана с тем, что целью аналитической процедуры было определение не самого вещества, а специфического биомаркера (анти-Ха/анти-IIa активность НМГ, концентрация TFPI), который является откликом на введение действующего вещества. Поэтому в дальнейшем при использовании валидированных ранее методик оценки указанных показателей нерационально проводить полную валидацию для каждого нового действующего вещества группы НМГ. Целесообразно ограничиться проверкой пригодности для анализа коммерчески доступных наборов реагентов и подтверждением отсутствия мешающего влияния действующего вещества (и, по возможности, плацебо исследуемой ГЛФ) на аналитическую процедуру.

Валидированные методики определения анти-Ха, анти-IIa активности НМГ в плазме крови человека и концентрации TFPI были применены для анализа проб плазмы крови добровольцев, полученных при проведении клинического исследования. Для успешного выполнения аналитического этапа имеет значение аликвотирование проб, предусмотренное при их отборе (две части – для проведения анализов, передаваемые в аналитический центр, и одна арбитражная часть, хранящаяся в клиническом центре). Обычно при использовании биоаналитических методик с хроматографическим определением одного целевого аналита для анализа используют одну аликвоту образца плазмы крови. Согласно рекомендациям по выполнению исследований БЭ для снижения вариабельности результатов анализ всех образцов, полученных от одного субъекта на всех временных точках, предусмотренных дизайном исследования, должен быть выполнен в рамках одного аналитического цикла, т.е. в совокупности образцов, приготовленных в одно и то же время, одним аналитиком с использованием одинаковых реактивов в сходных условиях¹³. Традиционно в рамках исследования БЭ предусмотрено разделение каждого отобранного образца на две равнозначные части: испытываемую пробу и арбитражную. Данное аликвотирование проводят сразу после отбора образцов крови и получения плазмы крови, до первого замораживания образцов. Арбитражную пробу обычно хранят в клиническом центре, а испытываемую передают

для дальнейшего анализа, предусмотренного протоколом исследования. При необходимости анализа нескольких соединений или параметров, выполняемых разными методами, в разных аналитических условиях или с использованием различных процедур подготовки проб, для выполнения всего комплекса аналитических работ может потребоваться повторная заморозка/разморозка образцов. Если она недопустима, то до первой заморозки полученных образцов плазмы крови рационально предусмотреть их аликвотирование не на две части, как это принято, а на большее число частей (например, на три) с учетом особенностей дальнейшего аналитического этапа. В случае изучения фармакодинамики препаратов надропарина кальция, учитывая необходимость определения в каждом образце трех показателей и рекомендации производителей наборов реагентов, исключающие повторную заморозку проб, выполнение такой аналитической работы одновременно из одной аликвоты может быть затруднительно и привести к получению некорректных результатов. Кроме того, линейность используемых биоаналитических методик для определения анти-Ха и анти-IIa активности НМГ в плазме крови человека отличается достаточно узким диапазоном; выход за пределы диапазона линейности приводит к существенным ошибкам определения анти-Ха и анти-IIa активности. Поэтому для каждого анализируемого образца плазмы крови необходимо подбирать соответствующее разбавление проб таким образом, чтобы активность аналита находилась в пределах установленных калибровочных диапазонов методик (табл. 3). При этом разведения могут отличаться в зависимости от пути введения исследуемых препаратов, временных точек отбора проб, индивидуальных особенностей конкретных добровольцев, что обуславливает необходимость экспериментального подбора в рамках конкретного исследования. В связи с этими факторами наличие двух отдельных аликвот каждого образца (одна для определения анти-Ха и анти-IIa активности, вторая – для определения концентрации TFPI) позволяет ускорить и оптимизировать работу биоаналитической лаборатории и выполнение аналитического этапа сравнительного исследования фармакодинамики препаратов надропарина кальция. Очевидно, что указанные аналитические особенности будут характерны и для других препаратов группы НМГ, поскольку для исследования их

¹³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

эквивалентности, так же как и для надропарина кальция, необходимо определение трех обсуждаемых фармакодинамических показателей, выполняемое по тем же методикам. Следует отметить, что разделение отобранного образца не на две аликвоты, а на большее количество является непривычным для клинических центров и должно быть заранее оговорено и предусмотрено при планировании исследования. Поэтому авторы считают важным подчеркнуть выявленную особенность и акцентировать на данном вопросе внимание специалистов, отвечающих за планирование такого рода исследований (подготовку протоколов исследований), проведение их клинического этапа, но не принимающих участие в выполнении аналитических работ. Обсуждаемое аликвотирование отобранных образцов, которое следует предусмотреть и выполнить в клиническом центре, является залогом успешного выполнения аналитического этапа исследования. Корректное проведение аналитического этапа работы необходимо для получения достоверных данных и является ключевым для успешного выполнения всего исследования в целом.

При выполнении анализа проб, полученных в ходе клинического этапа, был выявлен базовый уровень (оценка диапазона выполнена на основании всех значений, полученных в «нулевых»

точках) для всех трех анализируемых показателей: для анти-Ха фактора на уровне 0,10–0,56 МЕ/мл, для анти-IIa фактора на уровне 0,14–0,65 МЕ/мл, для TFPI на уровне 12,1–77,5 нг/мл. Поскольку определяемые показатели являлись эндогенными, для каждого добровольца значения, полученные в «нулевой» точке, вычитали из значений на всех остальных временных точках¹⁴. Таким способом получены значения, которые характеризовали изменения, обусловленные экзогенными факторами (в данном случае – введением препаратов). Значения ниже базового уровня принимали равными нулю.

Усредненные фармакокинетические кривые в линейных координатах приведены на рисунке 3, средние значения фармакодинамических параметров, рассчитанные на основании полученных данных, и результаты оценки доверительных интервалов для основных фармакодинамических параметров приведены в таблице 4.

Для зависимостей активности анти-Ха фактора и концентрации TFPI от времени для препаратов Т и R наблюдали схожие по форме фармакокинетические кривые. Максимальную анти-Ха активность в плазме крови наблюдали через 3–5 ч после введения препарата, максимальную концентрацию TFPI – через 1–4 ч после введения, далее наблюдали постепенное снижение регистрируемых значений (рис. 3а и 3б

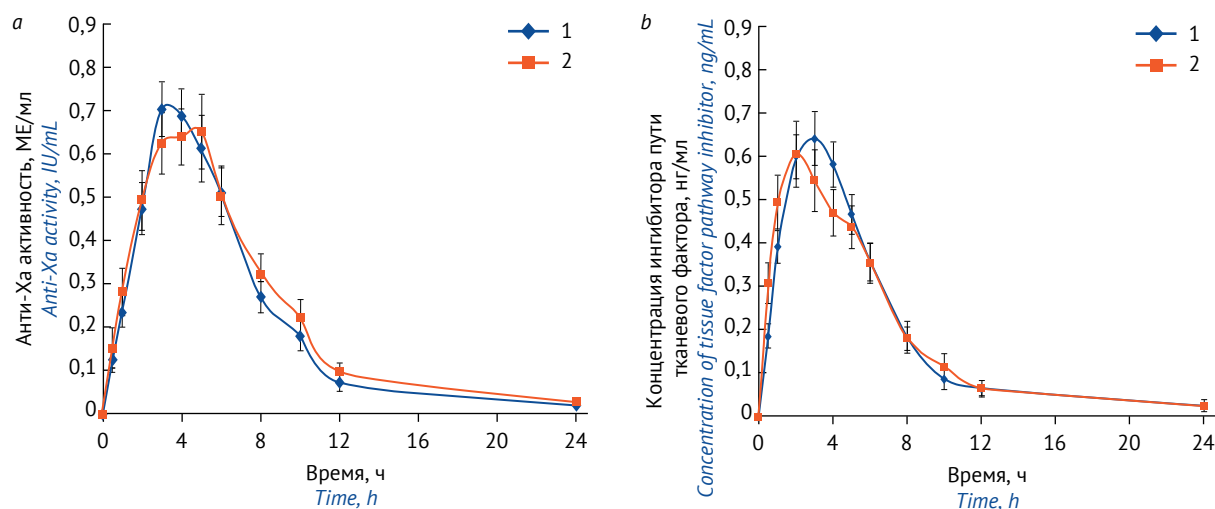


Рис. 3. Изменение анти-Ха активности (а) и содержания ингибитора тканевого фактора (б) в плазме крови после однократного подкожного введения тестируемого (1) и референсного (2) препаратов в одной дозе (число добровольцев $n = 26$, $\bar{X} \pm S_x$)

Fig. 3. Time courses for anti-Xa activity (a) and tissue factor pathway inhibitor concentration (b) in plasma after single subcutaneous administration of test (1) and reference (2) products in the same dose ($n = 26$, $\bar{X} \pm S_x$)

¹⁴ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Таблица 4. Показатели фармакодинамики (суррогатные маркеры фармакокинетики) после однократного подкожного введения тестируемого и референтного препаратов в одной дозе ($n = 26, \bar{X} \pm SD^*$)

Table 4. Pharmacodynamic parameters (pharmacokinetic surrogate markers) after single subcutaneous administration of test and reference products in the same dose ($n = 26, \bar{X} \pm SD^*$)

Параметр <i>Parameter</i>	Тестируемый препарат (Т) <i>Test product (T)</i>	Референтный препарат (R) <i>Reference product (R)</i>	90% доверительные интервалы <i>90% confidence intervals</i>
Анти-Ха активность <i>Anti-Xa activity</i>			
Максимальная активность (A_{max}), МЕ/мл <i>Maximum activity (A_{max}), IU/mL</i>	0,84 ± 0,36	0,88 ± 0,40	1,0071–1,1662
Время достижения максимальной активности (T_{max}), ч <i>Time to maximum activity (T_{max}), h</i>	3,9 ± 1,3	4,0 ± 1,3	–
Площадь под кривой «активность–время» (AUC_{0-24}), ч×МЕ/мл <i>Area under the activity–time curve (AUC_{0-24}), h×IU/mL</i>	4,87 ± 2,45	5,19 ± 2,80	0,9876–1,1879
Площадь под кривой «активность–время» ($AUC_{0-\infty}$), ч×МЕ/мл <i>Area under the activity–time curve ($AUC_{0-\infty}$), h×IU/mL</i>	5,19 ± 2,77	5,68 ± 3,02	0,9657–1,1667
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч <i>Half-life period ($T_{1/2}$), h</i>	3,1 ± 2,7	3,8 ± 2,1	–
Концентрация ингибитора пути тканевого фактора <i>Concentration of tissue factor pathway inhibitor</i>			
Максимальная концентрация (C_{max}), нг/мл <i>Maximum concentration (C_{max}), ng/mL</i>	72,2 ± 27,1	70,1 ± 36,6	0,9401–1,0978
Время достижения максимальной концентрации (T_{max}), ч <i>Time to maximum concentration (T_{max}), h</i>	2,8 ± 1,0	2,4 ± 1,3	–
Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0-24}), ч×нг/мл <i>Area under the pharmacokinetic curve (AUC_{0-24}), h×ng/mL</i>	425,2 ± 248,9	402,7 ± 220,8	0,8949–1,1029
Площадь под фармакокинетической кривой ($AUC_{0-\infty}$), ч×нг/мл <i>Area under the pharmacokinetic curve ($AUC_{0-\infty}$), h×ng/mL</i>	474,0 ± 338,2	508,1 ± 320,4	0,8692–1,0960
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч <i>Half-life period ($T_{1/2}$), h</i>	3,2 ± 2,8	3,3 ± 2,1	–

Примечание. «–» – оценка доверительных интервалов не предусмотрена регуляторными документами.

* Для упрощения восприятия материала в таблице не приведены значения других статистических параметров (стандартная ошибка среднего значения, коэффициент вариации, среднее геометрическое, медиана, максимум, минимум), рассчитанных согласно регуляторным требованиям.

Note. – regulatory documents do not require confidence interval assessment.

* For simplicity, the table does not show values for other statistical parameters calculated according to regulatory requirements (standard error of the mean, coefficient of variation, geometric mean, median, maximum, and minimum values).

соответственно); через 24 ч после введения анти-Ха активность составила около 3–4% от максимального уровня, концентрация TFPI – около 3,6% от максимального уровня.

Полученные результаты оценки анти-Ха активности и TFPI позволили рассчитать и сопоставить основные фармакодинамические параметры (A_{max} или C_{max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, T_{max} , $T_{1/2}$) исследованных препаратов, а также оценить доверительные интервалы по параметрам A_{max} или C_{max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, необходимые для подтверждения эквивалентности исследованных препаратов (табл. 4).

Для анти-IIa активности при усреднении всех данных наблюдали незначительное нарастание значений во времени после введения исследованных препаратов. Уровень анти-IIa активности примерно в 4 раза ниже, чем анти-Ха

активности (отношение анти-Ха/анти-IIa активность по средним значениям активностей составило 4,2 и 4,6 для препаратов Т и R соответственно). При рассмотрении индивидуальных кривых выявлено, что анти-IIa активность после введения препаратов нарастала лишь у некоторых добровольцев; во многих случаях получены значения близкие к нулю, свидетельствующие скорее о колебаниях данного показателя вокруг одного уровня. Отсутствие значимого отклика по анти-IIa активности наблюдали как для тестируемого препарата, так и для препарата сравнения, что подтверждало схожее влияние исследованных препаратов на анти-IIa активность и не противоречило предположению об их эквивалентности.

Учитывая характер полученных данных, они представлены в форме контрольной карты Шухарта (рис. 4), где средняя линия

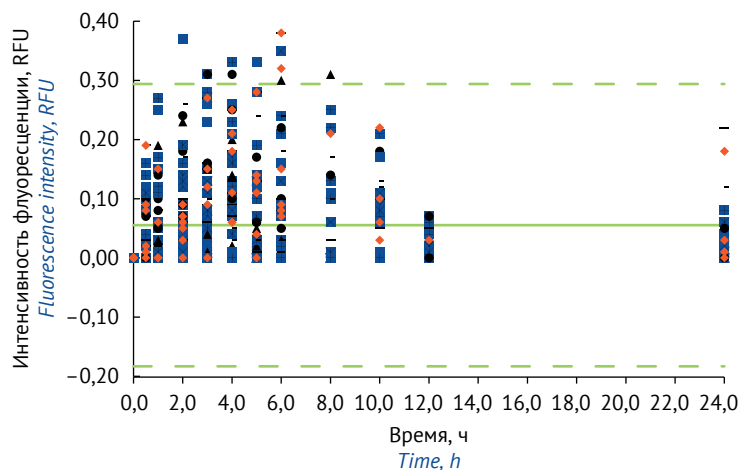


Рис. 4. Контрольная карта Шухарта анти-IIa активности в плазме крови добровольцев (после вычитания базового уровня) после однократного подкожного введения тестируемого (T ♦) и референтного (R ■) препаратов в одной дозе (объединенные данные для препаратов T и R, n = 52)

Fig. 4. Shewhart control chart for anti-IIa activity in plasma of volunteers (after baseline subtraction) after single subcutaneous administration of test (T ♦) and reference (R ■) products in the same dose (pooled T and R data, n = 52)

соответствует среднему значению, верхняя и нижняя пунктирные линии – верхней и нижней контрольной границе, определяемой как $\pm 3SD$. Попадание экспериментальных значений в указанный диапазон свидетельствует о том, что характеризуемый ими процесс является стабильным с вероятностью 99,7%¹⁵.

Большинство полученных экспериментальных значений укладывались в диапазон $\pm 3SD$, что подтверждало предположение о том, что анти-IIa активность носит характер колебаний вокруг одного уровня. Поэтому дальнейший расчет и сопоставление фармакодинамических параметров на основании полученных данных по анти-IIa активности нецелесообразен.

По данным литературы, анти-Xa активность надропарина кальция приблизительно в 4 раза превосходит его анти-IIa активность [9–11]¹⁶; фармакокинетические свойства препарата «Фраксипарин форте» определяются его анти-Xa факторной активностью, поскольку активность данного фактора выше, чем анти-IIa фактора¹⁷; низкомолекулярные гепарины, к которым относятся далтепарин натрия, надропарин кальция и эноксапарин натрия, сильнее влияют на фактор Ха, чем на фактор IIa, что приводит к более выраженному подавлению образования тромбина,

а также сильнее влияют на фактор ингибитора активатора плазминогена [12]. Авторы [13, 14] отмечают, что избирательность действия в отношении анти-Xa активности падает в ряду эноксапарин → надропарин → далтепарин → тинзапарин. Таким образом, данные литературы свидетельствуют об отсутствии выраженного влияния действующего вещества исследованных препаратов (надропарина кальция) на анти-IIa активность плазмы крови, что согласуется с полученными нами данными как *in vitro*, так и *in vivo*.

Отметим также, что в литературе нет единого мнения о возможности расчета фармакодинамических параметров на основании всех трех фармакодинамических показателей (анти-Xa, анти-IIa активности и концентрация TFPI), определяемых для препаратов данной фармакологической группы. Ряд работ содержит данные по фармакодинамическим параметрам, полученные на основании анти-IIa-факторной активности после подкожного и внутривенного введения препарата Цертопарин (Новаритис, Германия) [1], подкожного введения препаратов далтепарина [4], эноксапарина [3, 6] наряду с данными для других показателей (анти-Xa, TFPI).

Вместе с тем авторы публикации [3] отмечают слабо выраженный эффект сравниваемых

¹⁵ ГОСТ Р 50779.42-99. Контрольные карты Шухарта. 2000.

¹⁶ Надропарин кальция. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1fb59f3d-37f9-4922-a04c-680f0edbe405&t=
Фраксипарин форте. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=5922a504-bd7e-43ef-89dd-0fae986b5267&t=

Australian Public Assessment Report for Nadroparin. 2018. <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-nadroparin-180904.pdf>

¹⁷ Фраксипарин форте. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=5922a504-bd7e-43ef-89dd-0fae986b5267&t=

препаратов эноксапарина по отношению к анти-IIa активности, а авторы работы [6] подчеркивают наибольшее значение анти-Xa активности для оценки фармакологического действия и безопасности сравниваемых препаратов. Авторы [15] при сопоставлении фармакокинетики препаратов НМГ (дальтепарина натрия и надропарина кальция) у детей с онкологическими заболеваниями, осложненными тромбозом, а также авторы ряда других работ, связанных с оценкой фармакокинетики препаратов данной фармакологической группы (например, [16–20]), оперируют только параметрами, основанными на анти-Xa активности.

В работе [2] суммированы результаты исследований биоэквивалентности сразу нескольких препаратов группы НМГ – эноксапарина, далтепарина, тинзапарина и фондапаринокса (надропарина) при подкожном введении. Авторы рекомендуют использовать для оценки биоэквивалентности этих препаратов параметры, полученные на основе оценки анти-Xa активности, а результаты по анти-IIa активности считают необходимым представлять в качестве доказательства сопоставимого терапевтического воздействия. Эта позиция согласуется с полученными нами результатами. С нашей точки зрения, схожее отсутствие значимого отклика в отношении одного из показателей (анти-IIa активности) для обоих сравниваемых препаратов при соблюдении необходимых критериев эквивалентности по результатам оценки двух других показателей (анти-Xa активности и концентрации TFPI) является достаточными аргументами для подтверждения их эквивалентности.

Заключение

При сравнительном исследовании фармакодинамики и оценке эквивалентности биоаналогичного препарата «надропарин кальция»

при подкожном введении выявлен ряд особенностей, которые важны для планирования аналогичных исследований.

Отмечена необходимость дополнительного разделения (аликвотирования) каждого биообразца при их отборе с получением двух испытуемых аликвот (одна для определения анти-Xa и анти-IIa активностей, вторая – для анализа TFPI) для корректного выполнения их дальнейшего анализа. Показано, что валидация биоаналитических методик оценки анти-Xa активности, анти-IIa активности и содержания TFPI в плазме крови человека, валидированных в диапазоне концентраций 0,024–0,182 МЕ/мл, 0,0069–0,052 МЕ/мл и 1,56–100 нг/мл соответственно, в полном объеме для каждого нового действующего вещества нецелесообразно, достаточно проверки отсутствия мешающего влияния изучаемого препарата и его плацебо на аналитическую процедуру с одновременным подтверждением активности препарата *in vitro* (в отношении анти-Xa и анти-IIa активностей).

При планировании сравнительных исследований фармакодинамики и оценки эквивалентности препаратов надропарина кальция необходимо учитывать возможность отсутствия значимого изменения анти-IIa активности плазмы крови на введение препарата и получения данных, не позволяющих рассчитать фармакодинамические параметры и сопоставить доверительные интервалы для трех анализируемых фармакодинамических показателей.

Указанные особенности могут быть характерны и для других препаратов НМГ, поскольку при сравнительном исследовании фармакодинамики и оценке эквивалентности таких препаратов используют суррогатные маркеры концентрации, а не содержание исходного действующего вещества.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hoffmann U, Harenberg J, Bauer K, Huhle G, Tolle AR, Feuring M, Christ M. Bioequivalence of subcutaneous and intravenous body-weight-independent high-dose low-molecular-weight heparin Certoparin on anti-Xa, Heptest, and tissue factor pathway inhibitor activity in volunteer. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(4):289–96. <https://doi.org/10.1097/00001721-200206000-00003>
2. Feng L, Shen-Tu J, Liu J, Chen J, Wu L, Huang M. Bioequivalence of generic and branded subcutaneous enoxaparin: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy Chinese male subjects. *Clin Ther*. 2009;31(7):1559–67. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.07.017>
3. Gadiko C, Thota S, Tippabotla SK. Pharmacokinetic parameters to be evaluated for selected low molecular weight heparins in bioequivalence studies. *Int J Pharm Sci Res*. 2012;3(11):4065–72. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(11\).4065-72](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4065-72)
4. Gadiko C, Tippabhotla SK, Thota S, Cheerla R, Betha MR, Vobalaboina V. Bioequivalence study of two subcutaneous formulations of dalteparin: randomized, single-dose, two-sequence, two-period, cross-over study in healthy volunteers. *J Drug Assess*. 2013;2(1):21–9. <https://doi.org/10.3109/21556660.2013.781504>
5. Boubaker H, Grissa MH, Sassi M, Chakroun T, Beltaief K, Hassine M, et al. Generic and branded

- enoxaparin bioequivalence: A clinical and experimental study. *J Bioequiv Availab.* 2015;7(5):225–8. <https://doi.org/10.4172/jbb.1000244>
6. Martinez González J, Monreal M, Ayani Alma-gia IA, Llaudo Garín J, Ochoa Diaz de Monasterioguren L, Gutierrez Adúriz I. Bioequivalence of a biosimilar enoxaparin sodium to Clethane® after single 100 mg subcutaneous dose: results of a randomized, double-blind, crossover study in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:575–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S162817>
 7. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99(3):306–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
 8. Воробьев АВ, Чабров АМ, Савченко АА, Макацария АД Патогенетические особенности применения антикоагулянтной терапии у онкологических больных. *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2016;10(1):26–37. [Vorobiev AV, Chabrov AM, Savchenko AA, Makatsariya AD. Anti-thrombotic therapy in cancer patients. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2016;10(1):26–37 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2015.10.1.026-037>
 9. Бицадзе ВО, Макацария АД. Применение низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике. *Российский медицинский журнал.* 2000;8(18):772. [Bitsadze VO, Makatsariya AD. The use of low molecular weight heparins in obstetric practice. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal.* 2000;8(18):772 (In Russ.)]
 10. Fan P, Gao Y, Zheng M, Xu T, Schoenhagen P, Jin Z. Recent progress and market analysis of anticoagulant drugs. *J Thorac Dis.* 2018;10(3):2011–25. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.03.95>
 11. Qiu M, Huang S, Luo C, Wu Z, Liang B, Huang H, et al. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111561. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111561>
 12. Стуров НВ. Клиническая фармакология НМГ: важнейшие аспекты. *Трудный пациент.* 2006;4(11):38–42. [Sturov NN. Clinical pharmacology of low molecular weight heparins: the most important aspects. *Trudny patsient = Difficult Patient.* 2006;4(11):38–42 (In Russ.)]
 13. Низкомолекулярные гепарины: оригинальные препараты и их биоаналоги – выбор в клинической практике. Семинар. *Атеротромбоз.* 2017;(2):142–51. [Low molecular weight heparins: original drugs and their biosimilars – the choice in clinical practice. Seminar. *Aterotromboz = Atherothrombosis.* 2017;(2):142–51 (In Russ.)]
 14. Fareed J, Hoppensteadt D, Walenga J, Iqbal O, Ma Q, Jeske W, Sheikh T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of enoxaparin: implications for clinical practice. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(12):1043–57. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342120-00003>
 15. Дмитриев ВВ, Липай НВ, Мигаль НВ, Бегун ИВ, Дмитриев ЕВ. Фармакокинетика низкомолекулярных гепаринов при тромбозах, осложнивших лечение детей с онкологическими заболеваниями. *Онкогематология.* 2021;16(1):73–82. [Dmitriev VV, Lipay NV, Migal NV, Begun IV, Dmitriev EV. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins in thrombosis, complicate the treatment of children with cancer. *Onkogematologiya = Oncohematology.* 2021;16(1):73–82 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2021-16-1-73-82>
 16. Rico S, Antonijoan RM, Ballester MR, Gutierrez I, Ayani I, Martinez-Gonzalez J, et al. Pharmacodynamic assessment of Bemiparin after multiple prophylactic and single therapeutic doses in adult and elderly healthy volunteers and in subjects with varying degrees of renal impairment. *Thromb Res.* 2014;133(6):1029–38. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.038>
 17. Egan G, Ensom MH. Measuring anti-factor Xa activity to monitor low-molecular-weight heparin in obesity: a critical review. *Can J Hosp Pharm.* 2015;68(1):33–47. <https://doi.org/10.4212/cjhp.v68i1.1423>
 18. Nutescu EA, Burnett A, Fanikos J, Spinler S, Witkowski A. Pharmacology of anticoagulants used in the treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41(1):15–31. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1314-3>
 19. Pannucci CJ, Fleming KI, Bertolaccini CB, Prazak AM, Huang LC, Pickron TB. Assessment of anti-factor Xa levels of patients undergoing colorectal surgery given once-daily enoxaparin prophylaxis: a clinical study examining enoxaparin pharmacokinetics. *JAMA Surg.* 2019;154(8):697–704. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2019.1165>
 20. Cihlar R, Sramek V, Papiez A, Penka M, Suk P. Pharmacokinetic comparison of subcutaneous and intravenous nadroparin administration for thromboprophylaxis in critically ill patients on vasopressors. *Pharmacology.* 2020;105(1–2):73–8. <https://doi.org/10.1159/000502847>

Вклад авторов. В.М. Косман – идея исследования, обработка и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; Н.М. Фаустова – экспериментальная работа по валидации методик и анализу биопроб; М.В. Карлина – обсуждение и интерпретация результатов, доработка текста рукописи; И.Г. Котельникова – анализ данных литературы и нормативных документов, редактирование текста рукописи; Е.А. Ежова – анализ данных литературы; В.Г. Макаров – концепция исследования, М.Н. Макарова – критический пересмотр текста рукописи и иллюстративного материала.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Vera M. Kosman – elaboration of the study idea, processing and systematisation of experimental data, preparation and finalisation of the manuscript; Natalia M. Faustova – experimental work on method validation and bioassays; Marina V. Karlina – discussion and interpretation of the results, finalisation of the text of the manuscript; Irina G. Kotelnikova – analysis of literature data and regulatory documents, editing of the text of the manuscript; Ekaterina A. Ezhova – analysis of literature data; Valery G. Makarov – elaboration of the study concept; Marina N. Makarova – critical revision of the text and illustrative material.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of the *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
kosman.vm@doclinika.ru

Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Ежова Екатерина Александровна.

mez@endopharm.ru

Котельникова Ирина Геннадьевна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1584-8739>
mez@endopharm.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Статья поступила 16.11.2021

После доработки 28.01.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 20.07.2022

Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
kosman.vm@doclinika.ru

Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Ekaterina A. Ezhova.

mez@endopharm.ru

Irina G. Kotelnikova, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1584-8739>
mez@endopharm.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Article was received 16 November 2021

Revised 28 January 2022

Accepted for publication 7 June 2022

Online first 20 July 2022