

Препараты низкомолекулярного гепарина: основные свойства и возможности создания аналогов

И.С.Явелов

Городская клиническая больница №29, Москва

Основные свойства нефракционированного гепарина

Гепарин – это смесь сильно сульфатированных гликозамингликанов (мукополисахаридов), которые состоят из последовательности разных дисахаридов и имеют различную длину и молекулярную массу [1-3]. Эндогенный гепарин синтезируется в гранулах тучных клеток и имеет выраженный отрицательный заряд, наибольший среди всех известных биологических молекул. Гепарин получают из биологического сырья – различных тканей домашних животных, в основном из слизистой оболочки кишечника свиньи. Конкретный препарат гепарина нельзя охарактеризовать с помощью точного описания структуры и/или длины каждой из его молекул. Этому препятствует не только то, что данные параметры распределены без всякой закономерности (случайным образом), но и сложность структуры действующего вещества [4].

Соответственно, гепарин рассматривают как лекарственное средство биологического происхождения, содержащее в качестве активной субстанции химические соединения, выделенные из живых организмов с помощью биотехнологии [4-6]. Очевидно, что из-за сложности состава таких препаратов создание их точной копии, как это бывает при химическом синтезе, невозможно, а при разработке аналогов речь идет только о похожих, а не абсолютно идентичных лекарственных средствах [4,7].

Можно ожидать, что характер исходного сырья и особенности процесса производства будут сказываться на итоговых особенностях препаратов гепарина [4,6,8,9]. Тем не менее, основные физико-химические и антикоагулянтные свойства производимых препаратов нефракционированного гепарина относительно постоянны, хотя со временем и отмечается тенденция к увеличению выраженности сульфатирования и росту молекулярной массы его составляющих [10]. Однако, с другой стороны, имеются данные о том, что особенности состава и отдельные свойства нефракционированного гепарина зависят не только от вида животного и тканей, которые использовались для производства, но и от времени года и особенностей питания животных [8].

Эти отличия сохраняются и в случаях, когда нефракционированный гепарин подвергается дальнейшим химическим преобразованиям, и могут служить одной из причин несовпадения свойств препаратов низкомолекулярного гепарина (НМГ), а также небольших различий состава отдельных партий конкретного препарата [3,11].

Кроме того, существует опасность появления в составе гепарина нежелательных примесей, способных привести к увеличению его токсичности. Из-за сложности состава этого лекарственного средства мониторинг неожиданного возникновения подобных изменений затруднительно. Так, в конце 2007 г. – начале 2008 г. изменение состава активного ингредиента нефракционированного гепарина, поставляемого из Китая, стало причиной ряда серьезных реакций, похожих на аллергию, включая выраженную артериальную гипотонию и смерть, при введении высоких доз препарата [12-14]. В последующем выявление нежелательных примесей или предположение о возможном наличии подобных примесей стало причиной отзыва некоторых партий гепарина рядом производителей [15,16]. В итоге ужесточился контроль качества [4]. Тем не менее, от официальной констатации проблемы до выявления характера нежелательной примеси (высокая концентрация чрезмерно сульфатированного хондроитинсульфата) прошло около 2-х месяцев, а возможная причинно-следственная связь между этой особенностью состава действующего вещества и возникновением осложнений была установлена еще позднее [14,17,18]. Очевидно, гарантией безопасности может служить только хорошо налаженный процесс производства с надлежащим многоступенчатым контролем качества.

Гепарин катализирует связывание естественным антикоагулянтом – антитромбином – нескольких сериновых протеаз – ферментов, участвующих в процессах свертывания крови. Соединяясь с молекулой антитромбина, молекула гепарина вызывает конформационные изменения последней, в результате чего как минимум в 1000 раз увеличивается способность активного центра антитромбина взаимодействовать с рядом активированных факторов свертывания крови (ФСК). Образовав комплекс с антитромбином, эти ферменты перестают участвовать в процессе свертывания крови (их прокоагулянтная активность необратимо блокируется), что в конечном итоге приводит к уменьшению числа молекул тромбина. Кроме того, молекула гепарина выступает

ТАБЛИЦА. Некоторые особенности препаратов низкомолекулярного гепарина

Препарат	Способ получения из нефракционированного гепарина*	Средняя молекулярная масса (кДа)*	Разброс молекулярной массы (кДа)*	Разброс анти-Ха/анти-Па активности*	T _{1/2} [3]
Далтепарин	Деполимеризация азотистой кислотой	6000	5600-6400	1,9-3,2	2,8 ч
Надропарин	Деполимеризация азотистой кислотой	4300	3600-5000	2,5-4,0	3,7 ч
Эноксапарин	Бензилирование с последующей щелочной деполимеризацией	4500	3800-5000	3,3-5,3	4,1 ч

Примечание: * представлены данные Европейской Фармакопеи

как каталитическая поверхность, на которой взаимодействуют антитромбин и некоторые активированные ФСК, такие как тромбин (ФСК Па), ФСК Ха, IXa и XIa. Данный эффект зависит от длины молекулы гепарина и проявляется в случаях, когда она состоит как минимум из 18 моносахаридов. Соответственно, более короткие молекулы гепарина, содержащие менее 18 моносахаридов, не способны катализировать инактивацию тромбина, но сохраняют способность катализировать инактивацию ФСК Ха. В последующем молекула гепарина высвобождается и приобретает способность взаимодействовать с новой молекулой антитромбина. Среди ФСК, нейтрализацию которых катализирует гепарин, наибольшее значение придается воздействию на тромбин и ФСК Ха, которые обладают самой высокой чувствительностью к инаktivации комплексом анти-тромбина с гепарином. Таким в настоящее время представляется основное антикоагулянтное действие гепарина [1,2,5]. К другим механизмам антитромботического эффекта, которые не зависят от антитромбина и проявляются при высоких концентрациях препарата, относят активацию кофактора гепарина II, инактивирующего тромбин (для этого требуются молекулы, состоящие как минимум из 26 моносахаридов). Возможно также прямое соединение с ФСК IXa, препятствующее активации ФСК X. Кроме того, при использовании гепарина происходит высвобождение с поверхности клеток эндотелия ингибитора пути тканевого фактора, противодействующего эффекту мощного прокоагулянта – тканевого фактора [2,19].

Из-за наличия отрицательного заряда гепарин вступает в ряд взаимодействий с белками плазмы крови и некоторыми клетками. Клиническое значение этого свойства изучено недостаточно. Полагают, что выраженность заряда полисахаридов имеет значение для их взаимодействия с кофактором гепарина II, факторами роста клеток сосудистой стенки, а также высвобождения с поверхности клеток эндотелия ряда биологически активных молекул (в частности, ингибитора пути тканевого фактора) [20]. Кроме того, угнетение формирования остеобластов и активация остеокластов способствуют остеопорозу, а взаимодействие с тромбоцитарным фактором 4 лежит в основе развития иммунной тромбоцитопении [1].

Основные свойства НМГ

НМГ изготавливают из нефракционированного гепарина с помощью различных процессов химической или

ферментной деполимеризации. Свойства отдельных НМГ зависят как от характера биологического сырья, так и особенностей их производства (способов экстракции, фракционирования и дальнейшей обработки лекарственного вещества) [4,6]. Состав НМГ более сложен, чем состав нефракционированного гепарина, поскольку даже при сопоставимой длине молекулы особенности процесса деполимеризации неповторимо изменяют структуру полисахаридных цепей [3]. Так, деполимеризация азотистой кислотой приводит к появлению остатков ангидроманнитола на концах полисахаридов, подвергшихся редуцированию, а β-удаляющее расщепление, как ферментное (применяется при производстве тинзапарина), так и химическое (применяется при производстве эноксапарина), приводит к появлению ненасыщенных остатков уроната на участках молекул, не подвергшихся редуцированию [8]. Особенность состава эноксапарина – наличие бициклических 1,6-ангидро кольцевых структур с 6-0-сульфогруппами на концах 15-25% полисахаридов, подвергшихся редуцированию [11,21]. Известно, что возникновение данного структурного изменения связано с температурным режимом и кислотностью в процессе деполимеризации и сопряжено с выраженностью влияния препарата, по меньшей мере, на ФСК Ха, тромбин и активированное частичное тромбопластиновое время *in vitro* [3,11]. Соответственно, препараты НМГ отличаются не только от нефракционированного гепарина, но и между собой как по составу полисахаридов, так и особенностям фармакокинетики и фармакодинамики (см. таблицу) [3,4]. Выраженное несоответствие (уникальность) химического состава и фармакологических свойств каждого препарата НМГ привело к тому, что их считают отдельными, клинически не взаимозаменяемыми лекарственными средствами [1]. Соответственно, показания, особенности применения и дозы, рекомендуемые для одного препарата НМГ, нельзя переносить на другие лекарственные средства, относящиеся к этой группе.

Хотя в настоящее время существует ряд методов, позволяющих достаточно точно охарактеризовать физико-химические свойства каждого конкретного препарата НМГ (включая наиболее современные – ядерный магнитный резонанс и другие), структура значительной части полисахаридов, входящих в состав этих лекарственных средств, остается не выясненной (в частности, для эноксапарина называют цифру в 30%) [3,11,22,23]. Очевидно, в подобной ситуации говорить о понимании биологической роли всех составляющих НМГ (как и от-

носительного значения каких-либо особенностей структуры препарата) не приходится. Кроме того, хотя различия в составе действующего вещества отражаются на биологической активности НМГ, конкретные взаимосвязи до конца не установлены [3,5,6]. Например, доказано, что только 12-20% полисахаридных цепей, входящих в состав НМГ, обладают способностью взаимодействовать с антитромбином (и, соответственно, могут способствовать нейтрализации ФСК). Эту особенность связывают с наличием в составе каталитического центра (пентасахариды) 3-О-сульфатированного остатка глюкозамина [1,5,6,24,25]. Однако не исключено, что аналогичным свойством обладают и другие участки молекулы полисахарида [11]. Все это создает серьезные трудности при определении границ эквивалентности НМГ с химической точки зрения.

От длины молекулы и величины ее заряда зависит ряд особенностей фармакокинетики и фармакодинамики гепарина, а также его способность взаимодействовать с белками крови и клетками [1,3,20]. Более мелкие полисахаридные цепи отличаются лучшей биодоступностью при подкожном введении и более медленным клиренсом, который осуществляется преимущественно почками. За счет преобладания коротких полисахаридных цепей, многие из которых после деполимеризации содержат менее 18 моносахаридов, низкомолекулярные гепарины по сравнению с нефракционированным теряют часть антитромбиновой активности и приобретают способность в большей степени угнетать ФСК Ха. При этом помимо стандартного антикоагулянтного действия у НМГ описана способность вызывать высвобождение с поверхности клеток эндотелия ингибитора пути тканевого фактора, тканевого активатора плазминогена и его ингибитора, взаимодействовать с фактором фон Виллебранда, препятствовать активации ингибитора фибринолиза, активируемого тромбином, вмешиваться в систему активированного протеина С, изменять функциональную активность факторов роста клеток сосудистой стенки, а также давать противовоспалительные, антипролиферативные и иммунологические эффекты, причем последние, очевидно, не ограничиваются взаимодействием полисахаридов с тромбocитарным фактором 4. Установлено, что как минимум по ряду этих свойств (в частности, по выраженности активности против ФСК Ха [анти-Ха] и ФСК IIa [анти-IIa], их соотношению, а также способности влиять на уровень ингибитора пути тканевого фактора и фактора фон Виллебранда в крови) имеются существенные различия как между НМГ и нефракционированным гепарином, так и между отдельными препаратами НМГ [3,9,26-28]. Однако практическое значение указанных особенностей (их роль в итоговом клиническом эффекте НМГ) в настоящее время не определено [1,3,4,28]. Известно, по крайней мере, что из-за не столь выраженного взаимодействия с белками крови и клетками НМГ в меньшей степени способствуют возникновению остеопороза и иммунной тромбоцитопении [1].

В целом, до конца не ясно, что лежит в основе анти-

тромботического и клинического эффекта НМГ – хорошо изученное воздействие на отдельные ФСК (которое считается основным, может быть измерено на практике и используется для стандартизации лечения), эффекты, которые в настоящее время представляются не столь значимыми, или иные, еще не известные механизмы. Не исключено, что роль отдельных особенностей, присутствующих в препаратах НМГ, может меняться в зависимости от клинических обстоятельств (в частности, от того, по каким показаниям они используются) [3].

Из-за сложностей определения НМГ в организме провести общепринятые фармакокинетические исследования не возможно. Поэтому абсорбцию и элиминацию НМГ изучают с помощью суррогатных фармакодинамических показателей, таких как анти-Ха и анти-IIa активность, их соотношение, а также уровень ингибитора пути тканевого фактора в крови, позволяющий косвенно оценить биологическое действие НМГ *in vivo* [3,5]. Полагают, что оценка этих фармакодинамических параметров может служить суррогатным маркером концентрации НМГ в крови и выступать как характерный признак (своеобразный “неповторимый отпечаток” [fingerprint]) набора полисахаридов, входящих в состав конкретного НМГ [5]. Вместе с тем, до конца не ясно, в какой степени данные показатели соотносятся с клинической эффективностью НМГ (влиянием на исходы различных заболеваний) и безопасностью лечения (риском возникновения осложнений) [3,5,6,29].

Таким образом, хотя НМГ обладают несомненной клинической эффективностью, механизмы их биологического действия во многом остаются не выясненными. Ситуация осложняется сложностью состава НМГ, что исключает возможность их точного воспроизведения (копирования) в процессе производства. Соответственно, для доказательства того, что два препарата НМГ являются эквивалентными биологическими лекарственными средствами, простого соответствия требованиям, содержащимся в фармакопее, недостаточно, а основная нагрузка ложится на сравнительные клинические исследования [3,5,6,11]. Трудности в организации подобных исследований, призванных сопоставить клиническое воздействие двух препаратов, имеющих минимальные различия по исходным свойствам, очевидны [4].

НМГ в основном выводятся почками, при нарушении функции которых происходит накопление действующего вещества в крови (кумуляция). Повторное введение препарата приводит к нарастанию анти-Ха активности, которое у препаратов с достаточно низкой средней молекулярной массой идет параллельно снижению клиренса креатинина [1]. В результате повышается риск кровотечений. Особенности выведения различных препаратов НМГ при почечной недостаточности заметно различаются. К факторам, влияющим на фармакокинетику НМГ, относится также необычная масса тела больного (слишком низкая или высокая при применении фиксированных доз, чрезмерно высокая при под-

боре дозы с учетом массы тела). Есть особенности и при беременности (увеличение массы тела женщины за счет развития плода, изменение объема распределения НМГ, повышение скорости клубочковой фильтрации). Поэтому при изучении фармакокинетики только на здоровых добровольцах может быть упущена информация, необходимая для использования конкретного препарата НМГ в широкой клинической практике.

Современные требования к аналогам оригинальных препаратов НМГ

В настоящее время истекает или уже истек срок патентной защиты оригинальных препаратов НМГ и неизбежно стали появляться более дешевые препараты-аналоги. Этот процесс наиболее активно идет в Индии, Китае (в этих странах не существует ограничений на воспроизведение лекарственных средств, появившихся до 1995 года), а также Южной Америке [3,4]. Так, в 2008 году были доступны несколько аналогов эноксапарина и далтепарина, которые широко использовались в 17 странах Юго-Восточной Азии и Южной Америки [11,30]. Однако при этом многие важные вопросы, связанные с определением сходства оригинального НМГ и его “копии”, до недавнего времени оставались неразрешенными. Пока не существует и общепринятого термина, наилучшим образом описывающего препараты такого рода. Возможно их обозначение как “генерики” (generic), “биологические аналоги” (biosimilar) или “биологические генерики” (biogeneric). В США используется термин “follow-on biologics”, в Канаде – “subsequent entry biologics” [4]. Эксперты Всемирного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH), а также Европейского медицинского агентства (ЕМЕА) предпочитают термин “биологический аналог” [5,6].

Очевидно, что к НМГ нельзя приложить упрощенные требования к регистрации генериков лекарственных средств, состоящих из небольших молекул, созданных с помощью химического синтеза, когда хватает доказательства совпадения структуры действующего вещества и отсутствия выраженных различий в фармакокинетике/фармакодинамике, поскольку для продуктов, полученных из биологического сырья, этого явно не достаточно [3,11]. Первые официальные документы, регламентирующие подходы к изучению и регистрации аналогов НМГ, были приняты только в 2009 году.

Рекомендации Европейского медицинского агентства.

В 2009 году появились рекомендации Комитета по лекарственным продуктам для использования у людей (СНМР) Европейского медицинского агентства (ЕМЕА) по доклинической и клинической разработке аналогов биологических лекарственных препаратов, содержащих НМГ [5]. Согласно этому документу, для доказательства биоэквивалентности НМГ, предлагаемых в качестве аналогов оригинального препарата с установленной клинической эффективностью, следует придерживаться следующего плана изучения.

Доклинические исследования должны предшество-

вать клиническому изучению препарата-аналога. Их следует планировать таким образом, чтобы сопоставить оригинальный НМГ и его аналог и выявить возможные различия фармакологического и токсикологического ответа между двумя лекарственными средствами, а не только охарактеризовать ответ на новый препарат НМГ сам по себе. При этом в ходе сравнительных фармакодинамических исследований *in vitro* следует сопоставить активность двух препаратов, определив показатели, которые согласно современному уровню знаний имеют клиническое значение. Для НМГ это, по крайней мере, оценка анти-Ха и анти-Па активности. В ходе сравнительных фармакодинамических исследований *in vivo* на надлежащей модели следует количественно сопоставить клинически значимые эффекты двух препаратов, включающие, по крайней мере, определение анти-Ха и анти-Па активности в крови и оценку выделения ингибитора пути тканевого фактора. В зависимости от ожидаемых клинических показаний может проводиться моделирование венозного или артериального тромбоза на животных. Кроме того, необходимо выполнить, по крайней мере, одно исследование токсичности с повторным введением препаратов у надлежащего вида животных (например, на крысах). Продолжительность такого исследования должна быть сопоставима с ожидаемой длительностью лечения больных и составлять, по крайней мере, 4 недели. При этом следует обратить особое внимание на влияние НМГ на систему гемостаза. Из-за трудностей определения НМГ общепринятые токсикологические исследования с использованием этих лекарственных средств провести нельзя, а мониторинг выраженности их воздействия должно осуществляться на основании оценки приведенных выше фармакодинамических показателей. Следует также получить данные о местной переносимости препарата как минимум на одном виде животных (возможно, в ходе токсикологического исследования с введением повторных доз). Проведение других доклинических исследований безопасности, включая оценку репродуктивной токсичности, мутагенности и канцерогенности, при изучении аналогов НМГ обычно не требуется.

Клинические исследования являются обязательным этапом изучения аналогов НМГ. Фармакокинетические/фармакодинамические свойства двух препаратов следует сравнить в рандомизированном, двойном слепом, перекрестном исследовании с подкожным введением одной дозы у здоровых добровольцев. Если предполагается получение разрешения на внутривенное введение, аналогичное сравнительное исследование должно быть проведено и для данного способа использования НМГ. Выбранные дозы препаратов должны находиться в границах, обеспечивающих клиническую эффективность, и в пределах диапазона доз, рекомендованных при различных показаниях к использованию конкретного НМГ. Кроме того, следует заранее установить и надлежащим образом обосновать статистические критерии, свидетельствующие об эквивалентности двух лекарственных средств (границы эквивалентности).

Клиническая (терапевтическая) эквивалентность двух препаратов НМГ должна быть установлена как минимум в одном достаточно крупном рандомизированном, двойном слепом, сравнительном клиническом исследовании, специально спланированном для этой цели, в котором одна группа больных должна получать оригинальный препарат, а другая – его аналог. Данное исследование должно быть спланировано таким образом, чтобы с достаточной надежностью сопоставить влияние двух препаратов НМГ на практически важные неблагоприятные исходы заболевания (конечные точки). При этом статистические границы эквивалентности должны быть определены заранее и обоснованы с учетом клинического значения возможных различий эффективности препаратов.

Из всех показаний к применению НМГ в данном документе предпочтение отдается профилактике тромбоза глубоких вен нижних конечностей и тромбозам легочной артерии у хирургических больных с высоким риском возникновения подобных осложнений, а среди них – ортопедической хирургии (протезирование тазобедренного и коленного суставов, операция при переломе бедра). Это больные с самым высоким риском возникновения венозных тромбозов и осложнений, у которых эффективность и безопасность НМГ, а также влияющие на них факторы изучены наиболее хорошо. Подобное исследование должно включать в себя достаточное количество больных, которым проводится операция по поводу перелома бедра, а способ использования НМГ (включая достаточную продолжительность профилактики) должен соответствовать одобренным показаниям для применения конкретного НМГ. Конечные точки, имеющие наибольшее клиническое значение, включают в себя проксимальный тромбоз глубоких вен нижних конечностей, тромбоз легочной артерии и смерть от венозных тромбозов и осложнений. Однако не исключено использование и “суррогатной” конечной точки, учитывающей все венозные тромбозовые осложнения. Оценивать конечные точки должен независимый центральный комитет экспертов слепым методом. Для выявления конечных точек должны использоваться наиболее информативные методы диагностики (компрессионная ультрасонография для проксимального тромбоза глубоких вен нижних конечностей, билатеральная венография для дистального). Оценку первичной конечной точки следует проводить при возникновении подозрительных симптомов или в конце лечения у бессимптомных больных; длительность периода наблюдения должна составлять как минимум 60 дней. В итоге, частота возникновения наиболее важных компонентов первичной конечной точки (в особенности проксимального тромбоза глубоких вен нижних конечностей, тромбозов легочной артерии и смерти) в группе аналога НМГ должна соответствовать предположению об эквивалентности двух лекарственных средств. Очевидно, что приведенные строгие требования соответствуют современному, хорошо спланиро-

ванному и тщательно выполненному клиническому исследованию по профилактике венозных тромбозов и осложнений, предназначенному для оценки клинической эквивалентности двух терапевтических подходов.

Число больных, у которых изучается новый НМГ, должно быть достаточным для оценки его безопасности. При этом препарат-аналог следует тщательно сопоставить с оригинальным препаратом по типу, частоте и тяжести нежелательных явлений. Для анализа частоты больших и клинически значимых небольших кровотечений должна использоваться единообразная классификация, а саму оценку должен проводить независимый центральный комитет экспертов слепым методом. Для выявления иммунной тромбоцитопении рекомендуют контролировать число тромбоцитов в крови и проводить необходимое дополнительное обследование при подозрении на это осложнение. Рекомендуется также определение активности печеночных ферментов.

В данном документе отмечено, что сопоставимые эффективность и безопасность оригинального НМГ и его аналога у хирургических больных с высоким риском венозных тромбозов и осложнений могут стать основанием для экстраполяции этого вывода на другие показания к применению данного НМГ, если это будет “надлежащим образом обосновано”. Однако подобное заключение представляется спорным. Так, с одной стороны, не ясно, какого рода должно быть это обоснование для того, чтобы быть убедительным, с другой – нет уверенности в том, что результат сопоставления эффективности и безопасности двух препаратов НМГ, полученный при профилактике венозного тромбоза, окажется аналогичным при лечении тромбозов различной локализации, когда применяются более высокие дозы НМГ.

Рекомендации Международного общества по тромбозу и гемостазу. В 2009 году были опубликованы рекомендации подкомитета по контролю антикоагулянтов Комитета по науке и стандартизации (SSC) Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) [6]. В этом документе подчеркивается, что отсутствие достоверных различий между оригинальным препаратом НМГ и его аналогом должно быть продемонстрировано в прямых сравнительных исследованиях *in vitro* и *ex vivo*, спланированных надлежащим образом, а также в клинических условиях. Основная цель – доказать, что препарат-аналог по меньшей мере не уступает оригинальному НМГ (*non-inferior*). При этом доверительные границы для констатации сопоставимого эффекта следует определять с использованием адекватных статистических методов. Допускается, что размер подобных исследований может быть не столь велик, как при первоначальном изучении оригинального препарата НМГ, однако он должен быть достаточным, чтобы продемонстрировать отсутствие статистически значимых различий между двумя препаратами по всем контролируемым параметрам.

Первоначально необходимо убедиться, что физико-химические свойства предложенного аналога НМГ соответствуют требованиям, предъявляемым к оригинальному препарату. При этом следует указать, из какого исходного сырья произведены оригинальный НМГ и его аналог (ткань животного, страна происхождения). Характеризовать аналог НМГ необходимо точно так же, как в документах, подготовленных для оригинального препарата, а процессы их производства должны точно совпадать. С помощью надлежащих аналитических методов необходимо сопоставить оригинальный препарат и его аналог по некоторым ключевым особенностям состава полисахаридов: внутренней последовательности дисахаридов, концевым остаткам 2,5-ангидроманнозы, 1,6-ангидроглюкозы или концевым группам немодифицированного N-сульфатированного глюкозамина, средней молекулярной массе и ее дисперсии. Следует также сопоставить препараты по содержанию сульфатных и карбоксильных групп, способности соединяться с антитромбином, активировать кофактор гепарина II, а также отсутствию посторонних примесей (не слишком высокое содержание дерматана сульфата, отсутствие других гликозамингликанов и посторонних примесей). Кроме того, рекомендуется определить степень различий в составе препарата-аналога в пределах одной партии и различных партиях лекарственного средства, которая не должна быть больше, чем у оригинального препарата.

В отличие от требований Европейского медицинского агентства, при сравнении антикоагулянтного действия препаратов НМГ *in vitro* эксперты Международного общества по тромбозу и гемостазу рекомендуют оценивать не только анти-Ха и анти-IIa активность в плазме крови человека, но и определять активированное частичное тромбопластиновое время. При этом подчеркивается, что должен быть сопоставимым также разброс измерений, полученных при использовании оригинального НМГ и его аналога, взятых как из одной, так и разных партий каждого из препаратов. Рекомендуют также сопоставлять возможности нейтрализации НМГ и степень их связывания с тромбоцитарным фактором 4 (как меру риска возникновения иммунной тромбоцитопении). Оценка острой и хронической токсичности должна проводиться как минимум на двух видах животных с использованием различных доз сравниваемых препаратов. Кроме того, рекомендуют сопоставить оригинальный НМГ и его аналог на стандартизированных моделях артериального и венозного тромбоза у животных, а также модели кровотечения.

Клинические фармакодинамические исследования должны проводиться на добровольцах с введением типичной дозы препаратов для профилактики венозного тромбоза более 5-7 дней, а также лечебной дозы 2 раза в сутки на протяжении 5-7 дней. Рекомендуют контролировать анти-Ха и анти-IIa активность в крови, их соотношение, активированное частичное тромбопластиновое время, высвобождение ингибитора пути тканевого фактора, а также взаимодействие с тромбо-

цитарным фактором 4. Кроме того, обосновано сравнение оригинального НМГ и его аналога у больных с нарушенной функцией почек. Для этого анти-Ха и анти-IIa активность в крови, их соотношение, а также активированное частичное тромбопластиновое время рекомендуется измерять при введении дозы для профилактики венозного тромбоза 1 раз в сутки в течение 5-7 дней.

Эксперты Международного общества по тромбозу и гемостазу подчеркивают, что патофизиология артериального и венозного тромбоза, а также дозы НМГ, применяемые для профилактики тромбоза глубоких вен у различных категорий больных и лечения развившихся тромбоэмболических осложнений, отличаются. Есть также особенности патогенеза тромбоза, возникающего на искусственных поверхностях (при коронарном стентировании, гемодиализе). Все это определяет необходимость проведения отдельных проспективных, рандомизированных, двойных слепых клинических исследований с прямым сравнением эффективности и безопасности оригинального НМГ и его аналога по каждому показанию, которое планируется зарегистрировать. Наиболее существенные из них – профилактика венозных тромбоэмболических осложнений после хирургических вмешательств, лечение тромбоза глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии, острый коронарный синдром.

В целом, очевидно, что несмотря на принципиальную общность подходов, опубликованные документы, подготовленные различными группами экспертов, по ряду позиций не совпадают. Различия касаются, прежде всего, объема необходимых доказательств сходства оригинального препарата НМГ и его аналога. Единой точки зрения, высказанной, по крайней мере, наиболее авторитетными регулирующими инстанциями, пока не существует. Американская администрация по пищевым продуктам и лекарствам (FDA) на данном этапе не имеет официальной концепции, касающейся биологических аналогов (генериков) препаратов, произведенных из живых организмов (follow-on biologics) [4]. Южноазиатское общество по атеросклерозу и тромбозу (SASAT) приняло основные положения приведенных выше документов [30]. Соответствующая работа ведется и другими международными организациями [3,11]. Есть надежда, что стандартизации подходов смогут способствовать усилия Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [31].

Доказательства эквивалентности оригинальных препаратов НМГ и их аналогов

Наибольшее число аналогов в настоящее время создано для эноксапарина. При сопоставлении ряда из них (Cutenox, Gland Pharma, Индия; Lupenox, Lupin, Индия; Dripanina, Arison, Бразилия; Clenox, Pharmayest, Колумбия; Dilutol, Lazar, Аргентина) с оригинальным препаратом Ловенокс [в РФ поставляется под названием Клексан], производимым фирмой Санофи-Авентис (Франция), оказалось, что при сходных средней моле-

кулярной массе, а также влиянии на ФСК Ха и активированное частичное тромбопластиновое время в плазме крови человека *in vitro*, между эноксапарином и его аналогами имеются заметные структурные и фармакологические различия [3]. Так, существенно отличался ответ на действие гепариназ, расщепляющих участки молекул полисахаридов определенной структуры. Имелись некоторые отличия анти-Па активности в плазме крови человека *in vitro*. Было обнаружено выраженное несоответствие способности эноксапарина и его аналогов инактивировать ФСК Ха и Па в очищенной системе при добавлении антитромбина, влиянии на активацию тромбоцитов, опосредованную тромбином, и активности активируемого тромбином ингибитора фибринолиза, а также количества МЕ активности против ФСК Ха в миллиграмме сухого вещества (*potency*). При подкожном введении в дозе 100 МЕ/кг у приматов имелись различия в максимальных значениях анти-Ха активности в крови, ее изменении со временем, а также динамике высвобождения ингибитора пути тканевого фактора.

Результаты изучения других аналогов эноксапарина оказались более оптимистичными. Так, в рандомизированном двойном слепом перекрестном исследовании у здоровых добровольцев (10 мужчин и 10 женщин в возрасте 27-37 лет с массой тела от 66 до 90 кг) сравнивали ответ на однократную подкожную инъекцию 40 мг оригинального препарата эноксапарина и его аналога, выпускаемого фирмой OPOCRIN S.p.A. (Италия). Динамика анти-Ха и анти-Па активности в крови, величины активированного частичного тромбопластинового времени, времени свертывания, активируемого протромбиназой, а также максимальная концентрация ингибитора пути тканевого фактора в крови соответствовали статистическим критериям эквивалентности, учитывающим 90% доверительный интервал для результатов, полученных у разных больных [32]. В то же время доверительные интервалы площади под кривой концентрация-время для уровня ингибитора пути тканевого фактора оказались слишком широкими, что не позволило сделать вывод о биоэквивалентности препаратов эноксапарина по этому показателю. Очевидно, это произошло из-за выраженного разброса индивидуальных значений, когда для получения надежного результата необходимо изучение гораздо большего числа больных. В рандомизированном, открытом, перекрестном исследовании с однократным подкожным введением 40 мг оригинального препарата эноксапарина и его аналога Троупоха, производимого фирмой Troika Pharmaceuticals Ltd. (Индия), у 12 здоровых мужчин с массой тела от 50 до 80 кг величина анти-Ха активности в крови и активированное частичное тромбопластиновое время, измеренные автоматическим коагулометром, были сопоставимы [33]. В рандомизированном, открытом, перекрестном исследовании у 22 здоровых китайцев мужского пола в возрасте 19-23 лет с массой тела от 54 до 75 кг однократное подкожное введение 60 мг оригинального препарата эноксапарина и его аналога, выпускаемого Hangzhou Juiyuan Gene Engineering Co., Ltd.

(Китай), было сопоставимо по уровню анти-Ха и анти-Па активности в крови, а также величине активированного частичного тромбопластинового времени, что соответствовало статистическим критериям биоэквивалентности, учитывающим 90% доверительный интервал для результатов, полученных у разных больных [34].

Тем не менее, очевидно, что эти тщательно спланированные исследования, выполненные на достаточно высоком методологическом уровне, содержат только начальные свидетельства в пользу биоэквивалентности оригинального препарата НМГ и его аналога. Нельзя не заметить и их ограничения, касающихся как изученной дозы НМГ (однократно вводилась профилактическая или близкая к терапевтической доза эноксапарина), так и контингентов обследованных больных (небольшое количество здоровых добровольцев с нормальной массой тела). Препаратов-аналогов НМГ, прошедших полный цикл изучения в соответствии с современными рекомендациями (включая доказательства клинической эквивалентности), пока не существует. Соответственно, нет уверенности в том, что снижение стоимости лечения при использовании существующих аналогов НМГ не скажется на качестве медицинской помощи. Широкое распространение аналогов НМГ без достаточного предварительного изучения способно создать ряд серьезных практических проблем. Потребность в НМГ возникает в ситуациях, когда опасность тяжелых осложнений, связанных с возникновением тромбозов и тромбоэмболий (выраженное нарушение функции органов, инвалидизация, смерть), достаточно высока. Профиль эффективности и безопасности известных препаратов НМГ хорошо изучен как в рамках крупных контролируемых клинических исследований, так и в широкой клинической практике (данные регистров, сообщения о нежелательных побочных эффектах). Эти знания необходимы для принятия решения о целесообразности применения НМГ у конкретного больного, что возможно только после учета всех имеющихся особенностей и тщательной оценки соотношения ожидаемой пользы и возможного риска при введении лекарственного средства. Они особенно важны в нестандартных и сложных клинических случаях, когда подобное решение не очевидно и принимается у больных, не принимавших участие в соответствующих клинических исследованиях (в частности, с нарушенной функцией почек и другими факторами риска кровотечений). Поэтому заметное несоответствие эффективности и/или безопасности двух препаратов НМГ, декларируемых как эквивалентные, может быть не только причиной более высокой вероятности тромботических осложнений (недостаточной эффективности лечения) или серьезных побочных эффектов (что особенно важно у больных с высоким риском этих событий и/или их потенциальных последствий), но и способно сильно затруднить выбор оптимальных подходов к лечению, особенно в сложных клинических ситуациях.

Характерно, что ни Европейское медицинское агентство (ЕМЕА), ни Американская администрация по пи-

щевым продуктам и лекарствам (FDA) пока не одобрили для применения ни один из предложенных аналогов НМГ [4].

Заключение

Низкомолекулярные гепарины получают из различного биологического сырья с использованием разных технологических процессов, что заметно сказывается на свойствах отдельных препаратов, относящихся к этой группе. Методов, характеризующих состав и особенности фармакологического действия низкомолекулярных гепаринов и позволяющих с уверенностью судить о равенстве их клинических эффектов, в настоящее время не существует. В этой ситуации единственный способ убедиться в аналогичной эффективности и безопасности двух препаратов у определенной категории больных – провести проспективное сравнительное клиническое исследование, чтобы продемонстрировать как минимум равное воздействие оригинального низкомолекулярного гепарина и его аналога. Чтобы результаты такого исследования оказались достаточно информативными (позволяли обоснованно судить об отсутствии существенных клинических различий между двумя лекарственными средствами), оно должно соответствовать определенным требованиям, которые включают в себя достаточный размер выборки, принцип рандомизации с соблюдением двойного слепого метода, объективный анализ клинически важных неблагоприятных исходов, а также заранее оговоренные и хорошо обоснованные (важные для практики) статистические критерии эквивалентности. Пока такая информация не будет получена, замена препарата низкомолекулярного гепарина с доказанной клинической эффективностью и известным профилем безопасности на аналог, похожий по ряду фармакологических свойств, представляется не оправданной ни с врачебной, ни с этической точек зрения.

1. Hirsh J., Bauer K., Donati M. et al. Parenteral anticoagulants. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest, 2008, 133, 141S-159S.
2. De Caterina R., Husted S., Wallentin L., et al. Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives. Eur. Heart J., 2007, 28, 880-913.
3. Jeske W., Walenga J., Hoppensteadt D. et al. Differentiating low-molecular-weight heparins based on chemical, biological, and pharmacologic properties: implications for the development of generic versions of low-molecular-weight heparins. Semin. Thromb. Hemost., 2008, 34, 74-85.
4. Gray E., Mulloy B. Biosimilar low molecular heparin products. J. Thromb. Haemost., 2009, 7, 1218-1221.
5. European Medicines Agency (EMA). Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guidelines on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. (EMA/CHMP/BMWP/118264/2007). <http://www.emea.europa.eu>.
6. Harenberg J., Kakkar A., Bergqvist D. et al., on behalf of the subcommittee on control of anticoagulation of the SSC of the ISTH. Recommendations on biosimilar low-molecular-weight heparins. J. Thromb. Haemost., 2009, 7, 1222-1225.
7. European Medicines Agency. Guidelines on similar biological medicinal products. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/043704en.pdf/>.
8. Linhardt R., Gunay N. Production and chemical processing of low molecular

- weight heparin. Semin. Thromb. Hemost., 1999, 25 (suppl. 3), 5-16.
9. Alban S., Gastpar R. Plasma levels of total and free tissue factor pathway inhibitor (TFPI) as individual pharmacological parameters of various heparins. Thromb. Haemost., 2001, 85, 824-829.
10. Mulloy B., Gray E., Barrowcliffe T. Characterisation of unfractionated heparin samples: comparison of samples from the last 50 years. Thromb. Haemost., 2000, 84, 1052-1056.
11. Adiguzel C., Jeske W., Hoppensteadt D. et al. Structural and functional characterization of low-molecular-weight heparins: impact on the development of guidelines for generic products. Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2009, 15, 137-144.
12. Heparin contaminant traced to Chinese plant. Hughes S. <http://www.theheart.org/article/847995.do>
13. Baxter Healthcare. Baxter issues urgent nationwide voluntary recall of heparin 1,000 units/mL 10- and 30-mL multidose vials. January 25, 2008. http://www.baxter.com/about_baxter/news_room/news_releases/2008/01-25-08-heparin_multi.html
14. Blossom D., Kallen A., Patel P. et al. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. N. Engl. J. Med., 2008, 359, 2674-2684.
15. More heparin recalls in Europe and US. Hughes S. <http://www.theheart.org/article/849335.do>
16. Enoxaparin now affected by heparin contaminant. Hughes S. <http://www.theheart.org/article/859795.do>
17. Kishimoto T., Viswanathan K., Ganguly T. et al. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. N. Engl. J. Med., 2008, 358, 2457-2467.
18. Viskov C., Bouley E., Hubert P. et al. Isolation and characterization of contaminants in recalled unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin. Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2009, Jul 17; doi:10.1177/1076029609338710.
19. Sandset P., Abildgaard U., Larsen M. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). Thromb. Res., 1988, 50, 803-813.
20. Linhardt R., Capila I. Heparin-protein interactions. Angew. Chem. Int., 2002, 41, 390-412.
21. Enoxaparin sodium. Pharmacopeiac Forum, 2007, 33, 52-57.
22. Guerrini M., Guglieri S., Naggi A. et al. Low molecular weight heparins: structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Semin. Thromb. Hemost., 2007, 33, 478-487.
23. Gray E., Mulloy B., Barrowcliffe T. Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb. Haemost., 2008, 99, 807-818.
24. Weitz J. Low-molecular-weight heparins. N. Engl. J. Med., 1997, 337, 688-698.
25. Walenga J., Petitou M., Samama M. et al. Importance of 3-O-sulfate in a heparin pentasaccharide for antithrombotic activity. Thromb. Res., 1988, 52, 553-563.
26. Montalescot G., Philippe F., Ankri A. et al. Early increase of von Willebrand factor predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French Investigators of the ESSENCE Trial. Circulation, 1998, 98, 294-299.
27. Montalescot G., Bal-dit-Sollier C., Chibedi D. et al. Comparison of effects on markers of blood cell activation of enoxaparin, dalteparin, and unfractionated heparin in patients with unstable angina pectoris or non-ST-segment elevation acute myocardial infarction (the ARMADA study). Am. J. Cardiol., 2003, 91, 925-930.
28. Montalescot G., Collet J., Lison L. et al. Effects of various anticoagulant treatments on von Willebrand factor release in unstable angina. JACC, 2000, 36, 110-114.
29. Samama M., Gerotziafas G. Comparative pharmacokinetics of LMWHs. Semin. Thromb. Hemost., 2000, 26 (suppl. 1), 31-38.
30. Kalodiki E., Leong W., on behalf of the SASAT and Task Force on Generic LMWHs. SASAT (South Asian Society on Atherosclerosis & Thrombosis) Proposal for Regulatory Guidelines for Generic Low-molecular Weight Heparins (LMWHs). Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2009, 15, 8-11.
31. WHO Informal Consultation on Regulatory Evaluation of Therapeutic Biological Medicinal Products. http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/Final%20Biosimilar%20meeting%20Report%20for%20web%2013%20September%202007.pdf
32. Kuczka K., Harder S., Picard-Willems B. et al. Biomarkers and coagulation tests for assessing the biosimilarity of a generic low-molecular-weight heparin: results of a study in healthy subjects with enoxaparin. J. Clin. Pharmacol., 2008, 48, 1189-1196.
33. Sharma V., Madhu S., Natarajan P. et al. A Comparison of the biological activity of two formulations of enoxaparin in 12 healthy volunteers. Clin. Appl. Thromb. Haemost., 2009, doi: 10.1177/1076029609338044.
34. Feng L., Shen-Tu J., Liu J. et al. 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, 1559-1567.