



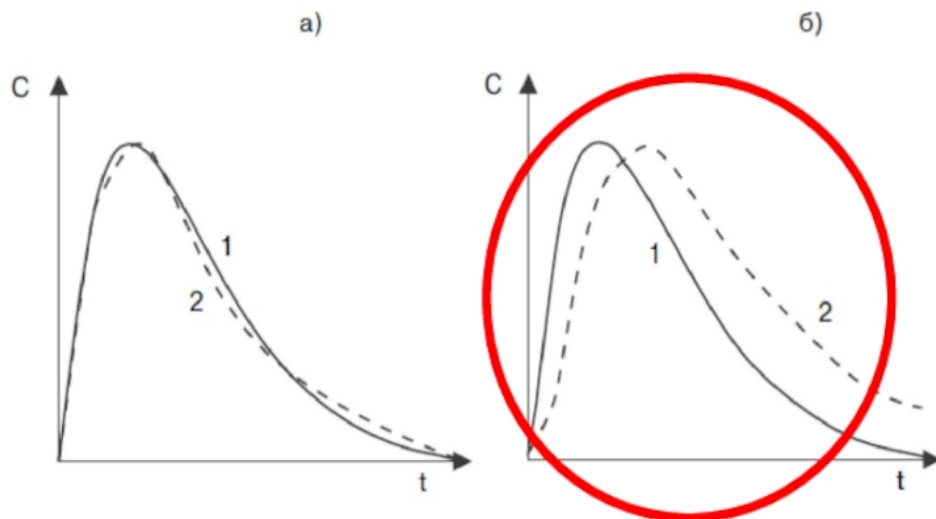
Особенности оценки биоэквивалентности низкомолекулярных гепаринов

Косман В.М., руководитель химико-аналитической лаборатории,
канд. фарм. наук.

Исследования биоэквивалентности (БЭ)

Биоэквивалентность ЛС

- А – биоэквивалентные ЛС
- Б – **бионезэквивалентные ЛС**



С сайта: <https://thepresentation.ru/medetsina/vvedenie-v-biofarmatsiyu-farmakokinetika-biodostupnost-bioekvivalentnost-genericheskikh-ls#slides-1697.php>

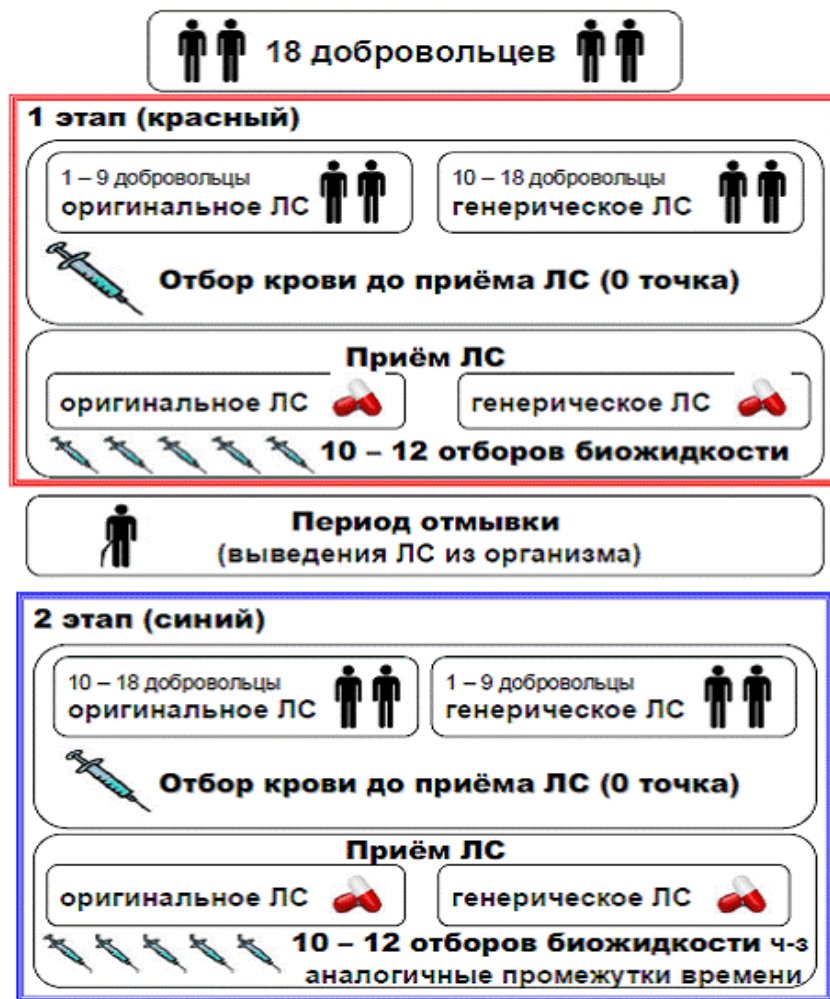
▶ часть клинических исследований, необходимы для регистрации ЛП, регламентированы требованиями нормативных документов:

Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. - М.: Гриф и К, 2013. - С. 174-200.

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского Экономического Союза. 2016.

▶ основной критерий БЭ 90% ДИ отношения средних геометрических значений ФК параметров (максимальной концентрации, площади по фармакокинетической кривой) препаратов Т и R.

Исследования биоэквивалентности (БЭ)



стандартный дизайн изучения БЭ предполагает:

- ▶ **клинический этап** - рандомизированное двухпериодное, перекрестное исследование с периодом отмывки.
- ▶ **аналитический этап** - определение содержания действующего вещества сравниваемых препаратов, с помощью заранее разработанной и валидированной биоаналитической методики.
- ▶ **постаналитический или статистический этап** - расчет ФК параметров и их статистическая обработка.

С сайта: <https://pandia.ru/text/80/230/30597.php>

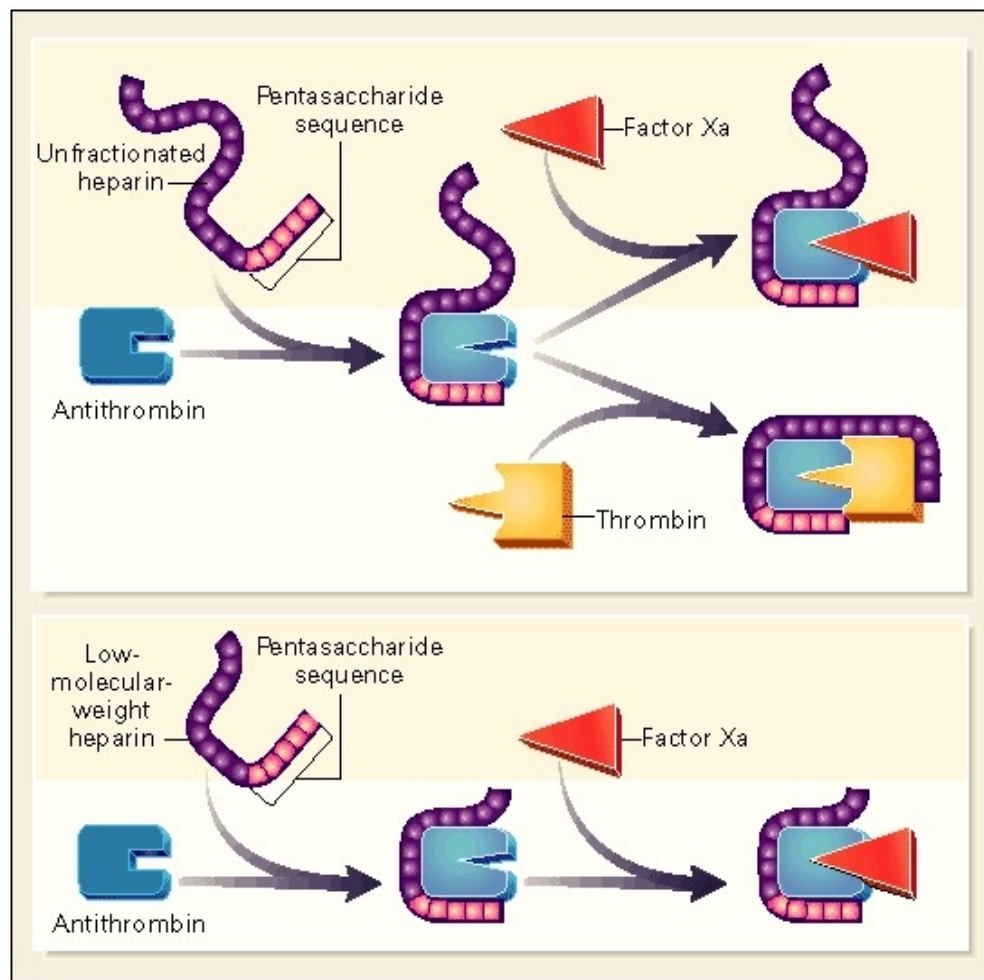
Исследования биоэквивалентности (БЭ)

- ▶ если прямая оценка концентрации действующего вещества в биоматериале затруднительна, используют биологические маркеры (биомаркеры, суррогатные маркеры концентрации, конечные точки фармакокинетики).
- ▶ для препаратов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) следует сопоставить анти-Ха, анти-IIa активности и концентрацию ингибитора пути тканевого фактора (TFPI).

Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory. 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.

Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.



Цель работы

- ▶ рассмотрение особенностей оценки биоэквивалентности препаратов низкомолекулярных гепаринов, выявленных при проведении исследований БЭ.
- Протокол клинического исследования № НДП-И-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».
- Протокол клинического исследования № НДП-БЭ-04/20 «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), **при однократном внутривенном введении** здоровым добровольцам».
- Протокол клинического исследования № ЭНО-БЭ-01/21 «Открытое рандомизированное перекрестное сравнительное исследование фармакодинамики (фармакодинамической эквивалентности), безопасности и переносимости препаратов **Эноксапарин натрия, раствор для инъекций** (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) и Клексан[®], раствор для инъекций («Санофи-Авентис Франс», Франция) **при однократном подкожном и внутривенном введении** здоровым добровольцам».

Материалы и методы

- ▶ В ходе клинических этапов работ в рамках двух периодов получены пробы плазмы крови от 18-30 добровольцев на 12-15 временных точках после введения препаратов Т и R.
- ▶ Пробирки с антикоагулянтом с цитратом натрия. После получения плазмы крови каждая проба была разделена на 3 части (аликвоты):
 - 1 часть – для определения анти-Ха и анти-Па активности (объем не менее 0,3 мл);
 - 2 часть – для определения содержания TFPI (объем не менее 0,4 мл);
 - 3 часть – арбитражная проба (объем не менее 0,7 мл).
- ▶ Определение анти-Ха и анти-Па активности плазмы крови человека - набор реагентов Ренапарин-тест, НПО Ренам, Россия с использованием хромогенного субстрата. Определение концентрации TFPI в плазме крови человека - набор реагентов Elisa kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Cloud-Clone Corp., США методом ИФА.
- ▶ Расчет параметров 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 $T_{1/2}$) и их статистический анализ (Statistica 10.0, StatSoft, USA).



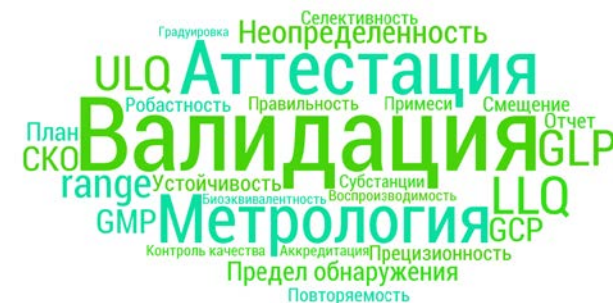
Валидация методик

- ▶ 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 документа:

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского Экономического Союза. 2016

Использование в биоаналитической работе коммерчески доступных наборов реагентов имеет ряд особенностей:

- необходимо выполнить проверку работоспособности наборов применительно к условиям конкретной лаборатории, основанную на выполнении анализа стандартных образцов (калибраторов), входящих в состав наборов;
- оценить влияние действующего вещества и плацебо исследуемых препаратов на результаты аналитической процедуры и подтвердить наличие активности *in vitro*,
- провести валидационные испытания.



Валидация методик

Таблица 1. Результаты определения активности анти-Ха и анти-Па факторов низкомолекулярного гепарина в контрольных плазмах

Параметры	Анти-Ха активность, МЕ/мл		Анти-П активность фактора МЕ/мл	
	Контрольная плазма 1	Контрольная плазма 2	Контрольная плазма 1	Контрольная плазма 2
Значения активности по паспорту, анти-Ха/мл (среднее и диапазон)	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, анти-Ха/мл (\pm SD)	0,51 \pm 0,02	0,89 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	0,76 \pm 0,04
Коэффициент вариации результатов по паспорту ¹ , %	10	10	10	10
Экспериментально полученные коэффициенты вариации результатов, %	4,2	4,8	6,4	5,2

Примечание.¹ – поскольку для нефракционированного гепарина, входящего в состав контрольных плазм из набора реагентов Реахром-гепарин, НПО «Ренам», Россия, № ГП-1, соотношение анти Ха/Па активности составляет 1:1 (Воробьев и соавт., 2016), то интервал допустимых значений для активности анти-Ха и анти-Па фактора одинаков и соответствует значению, приводимому в паспорте к набору реагентов для активности анти-Ха фактора.

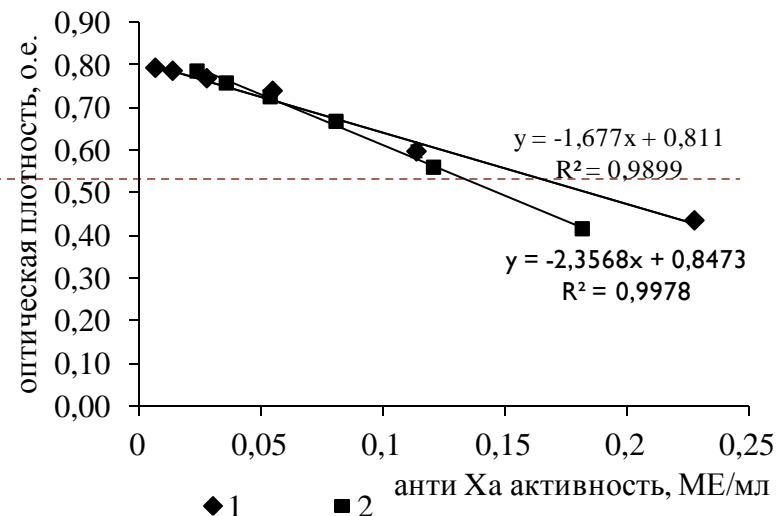


Рис. 1. Примеры калибровочных зависимостей оптической плотности от анти-Ха активности для растворов СО низкомолекулярного гепарина (1) и СО надропарина кальция (2)

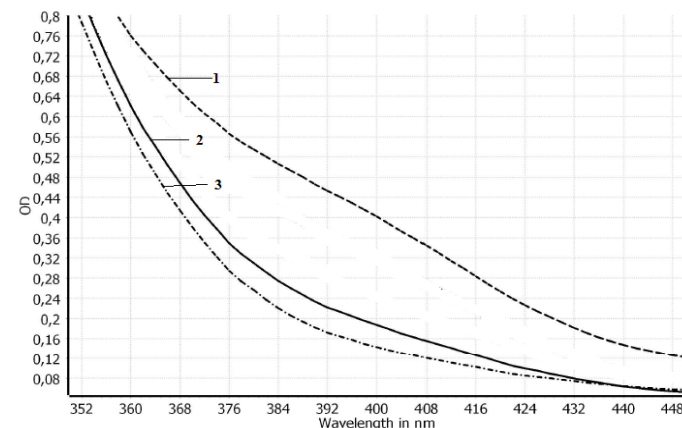


Рис. 2. Типичные УФ-спектры, полученные при анализе анти-Ха активности в плазме крови человека: 1 – бланк-плазма; 2 – модельная проба плазмы крови с добавкой СО надропарина кальция, 3 – модельная проба с добавкой СО низкомолекулярного гепарина; OD – оптическая плотность, оптические единицы, wavelength in nm – длина волны в нм

Валидация методик

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

Испытуемый образец	Оптическая плотность (о.е., в растворителе для стандарта ¹)	Модельные смеси с плазмой крови	
		Оптическая плотность (о.е.)	Концентрация ингибитора пути тканевого фактора (нг/мл)
Растворитель для стандарта ¹	0,113	0,209±0,005	48,5±2,3
Растворы СО TFPI 1,56 нг/мл ²	0,171	0,123±0,004	1,56
Плацебо	0,111±0,004	0,209±0,005	48,5±2,3
Растворы СО надропарина кальция, мкг/мл			
20,0	0,105	-	-
4,0	0,141	0,199	44,2
0,80	0,095	0,216	52,0
0,16	0,108	0,189	52,8
0,032	0,092	0,218	39,9

Примечания.¹ – входит в состав набора реагентов,

² – TFPI – ингибитор пути тканевого фактор, концентрация раствора соответствует нижнему пределу количественного определения (НПКО) 1,56 нг/мл.

Валидация методик

Таблица 3. Основные валидационные параметры методик определения анти-Ха, анти-Па активности и концентрации TFPI в плазме крови человека

Валидационный параметр	Уровень концентрации	Критерий приемлемости	Результат			Вывод
			Анти-Ха активность, МЕ/мл	Анти-Па активность МЕ/мл	Ингибитор пути тканевого фактора (нг/мл)	
Селективность	Бланк-плазма, НПКО, ВПКО ¹	Способность дифференцировать аналит	Подтверждена	Подтверждена	Подтверждена	Соответствует
Нижний предел количественного определения	НПКО	Точность, менее 20%	0,024 МЕ/мл 1,5 – 13,1%	0,0069 МЕ/мл 4,7 – 10,2%	1,56 нг/мл 8,2 – 12,5%	Установлен
		Прецизионность, менее 20%	11,6,%	14,8%	12,0%	Соответствует
Калибровочный диапазон	Калибровочные стандарты не менее, чем шести концентраций, не менее 3 серий	Коэффициент корреляции (r) $\geq 0,9$	0,024–0,182 МЕ/мл $r \geq 0,99$	0,0069–0,052 МЕ/мл $r \geq 0,99$	1,56–100 нг/мл $r \geq 0,99$	Установлен Соответствует
Точность, $ \delta ^2$, %	ВПКО	<15	4,5 – 13,1	4,7 – 10,2	1,6 – 7,8	Соответствует
	Средний КК	<15	2,5 – 10,2	3,6 – 6,7	2,9 – 4,2	
	Низкий КК	<15	0,5 – 12,0	1,2 – 13,8	8,0 – 13,4	
	НПКО	<20	0,5 – 13,4	0,9 – 14,1	8,2 – 12,5	
Прецизионность в одном цикле, RSD ³ , %	ВПКО	<15	4,5 – 12,5	3,4 – 9,6	0,1 – 7,7	Соответствует
	Средний КК	<15	3,6 – 6,5	4,1 – 7,8	0,4 – 4,2	
	Низкий КК	<15	5,5 – 7,1	2,1 – 5,6	1,8 – 13,8	
	НПКО	<20	0,7 – 8,0	0,7 – 14,1	7,6 – 13,7	
Прецизионность между циклами, RSD ³ , %	ВПКО	<15	13,3	13,1	6,4	Соответствует
	Средний КК	<15	6,6	6,8	4,7	
	Низкий КК	<15	8,6	6,5	9,0	
	НПКО	<20	11,6	14,8	12,0	

Примечания. ¹ – 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-Па 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; ² – точность оценивали по принципу «внесено-найдено» как относительную систематическую погрешность (δ) в процентах от внесенного количества, ³ – для оценки прецизионности использована величина относительного стандартного отклонения (RSD; %).

Аликвотирование проб при отборе



- необходим анализ всех образцов от одного субъекта в рамках одного аналитического цикла;
- затруднительно для трех показателей, т.к. недопустима повторная заморозка образцов;
- необходим подбор разведения практически для каждой пробы в связи с узким диапазоном линейности методик;
- аликвотирование на три пробы (две испытуемые) позволят корректно провести аналитический этап исследования.



Обработка данных

- ▶ базовый уровень для всех трех анализируемых показателей в трех КИ:
 - для анти-Ха фактора на уровне 0,10-0,56 МЕ/мл, 0,10-0,42 МЕ/мл, 0,03-0,46 МЕ/мл
 - для анти-Па фактора на уровне 0,14-0,65 МЕ/мл, 0,03-0,49 МЕ/мл, 0,02-0,52 МЕ/мл
 - для TFPI на уровне 12,1-77,5 нг/мл, 26,6-108 нг/мл, 4,92-30,47 нг/мл.
- ▶ показатели эндогенные, поэтому для каждого добровольца значения, полученные в «нулевой» точке (базовый уровень), вычитали из значений на всех остальных временных точках. Получены значения, которые характеризовали изменения, обусловленные экзогенными факторами (в данном случае – введением препаратов). Значения ниже базового уровня принимали равными нулю.

Обработка данных

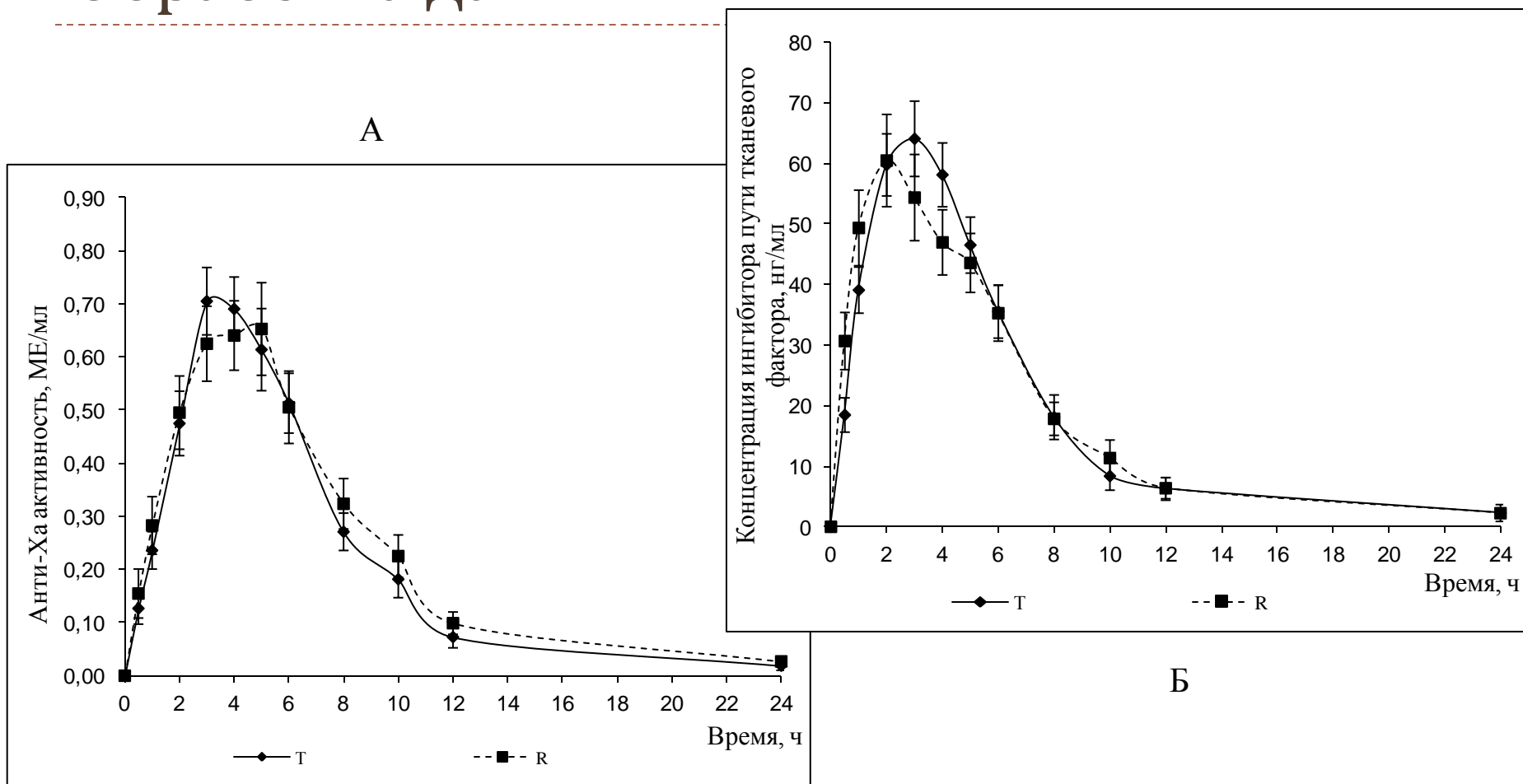


Рис. 3. Кривые «концентрация-время» изменения анти-Ха активности (А) и изменения содержания ингибитора тканевого фактора (Б) в плазме крови после однократного подкожного введения тестируемого (Т) и референсного (R) препаратов в одной дозе ($n=26$, $\bar{X} \pm S_x$)

Обработка данных

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

Параметр	Тестируемый препарат (Т)	Референтный препарат (R)	90% доверительные интервалы
Анти-Ха активность			
Максимальная активность (A_{max}), МЕ/мл	0,84±0,36	0,88±0,40	1,0071-1,1662
Время достижения максимальной активности (T_{max}), ч ²	3,9±1,3	4,0±1,3	-
Площадь под кривой «активность-время» AUC_{0-24} , ч·МЕ/мл	4,87±2,45	5,19±2,80	0,9876-1,1879
Площадь под кривой «активность-время», $AUC_{0-\infty}$, ч·МЕ/мл	5,19±2,77	5,68±3,02	0,9657-1,1667
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч	3,1±2,7	3,8±2,1	-
Концентрация ингибитора пути тканевого фактора			
Максимальная концентрация C_{max} , нг/мл	72,2±27,1	70,1±36,6	0,9401-1,0978
Время достижения максимальной концентрации (T_{max}), ч	2,8±1,0	2,4±1,3	-
Площадь под фармакокинетической кривой, AUC_{0-24} , ч·нг/мл	425,2±248,9	402,7±220,8	0,8949-1,1029
Площадь под фармакокинетической кривой, $AUC_{0-\infty}$, ч·нг/мл	474,0±338,2	508,1±320,4	0,8692-1,0960
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч	3,2±2,8	3,3±2,1	-

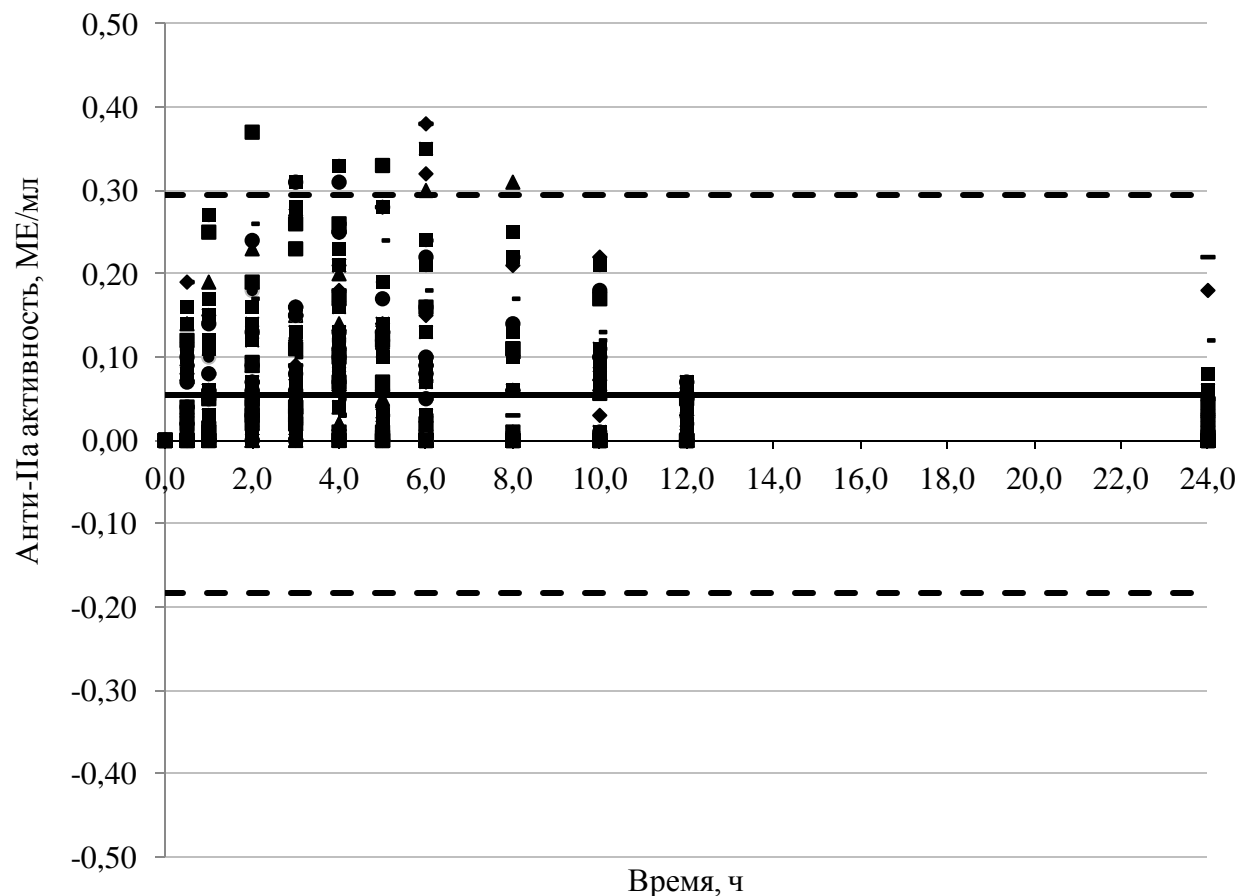
Примечания.¹ – для упрощения восприятия материала в таблице не приведены значения всех остальных статистических параметров (стандартная ошибка среднего значения, коэффициент вариации, среднее геометрическое, медиана, максимум, минимум), рассчитанных согласно регуляторным требованиям, ² – оценка доверительных интервалов не предусмотрена регуляторными документами.

Обработка данных

- ▶ Для анти-Па активности:
 - при усреднении всех данных наблюдали незначительное нарастание его активности.
 - уровень анти-Па активности примерно в 4 раза ниже, чем анти-Ха активности (отношение анти-Ха/анти-Па активность по средним значениям активностей составило 4,2 и 4,6 для препаратов Т и R соответственно).
 - при рассмотрении индивидуальных кривых выявлено, что анти-Па активность 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-Па активности, наблюдали как для тестируемого препарата, так и для препарата сравнения.

Таким образом, полученные данные для исследованных препаратов, схожи, что подтверждало схожее влияние исследованных препаратов на анти-Па активность и не противоречило предположению об их эквивалентности.

Обработка данных



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

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

Обработка данных

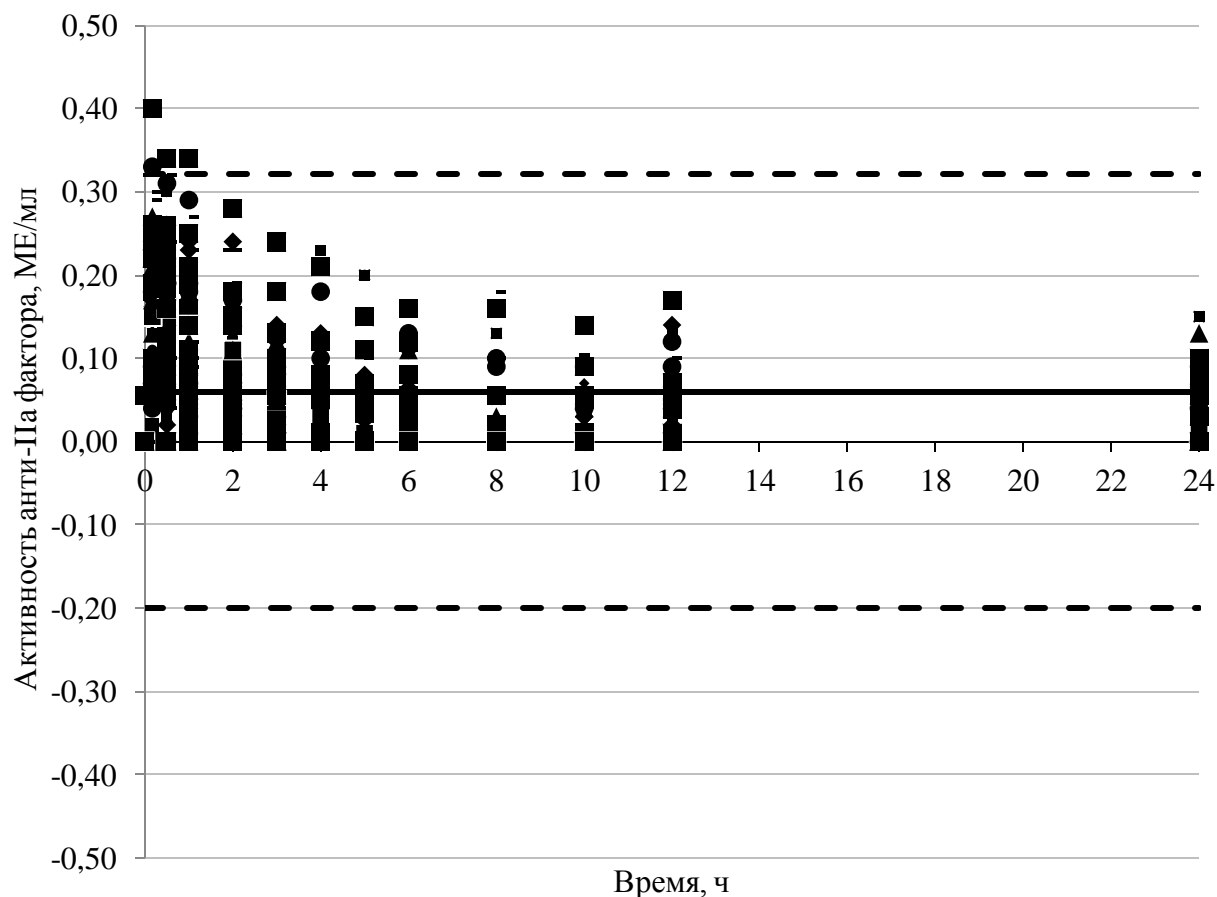
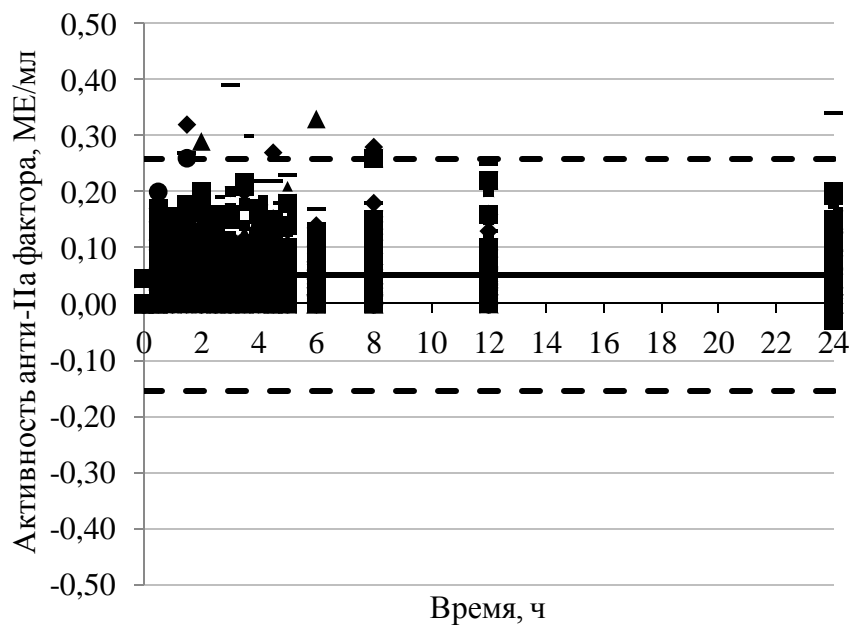
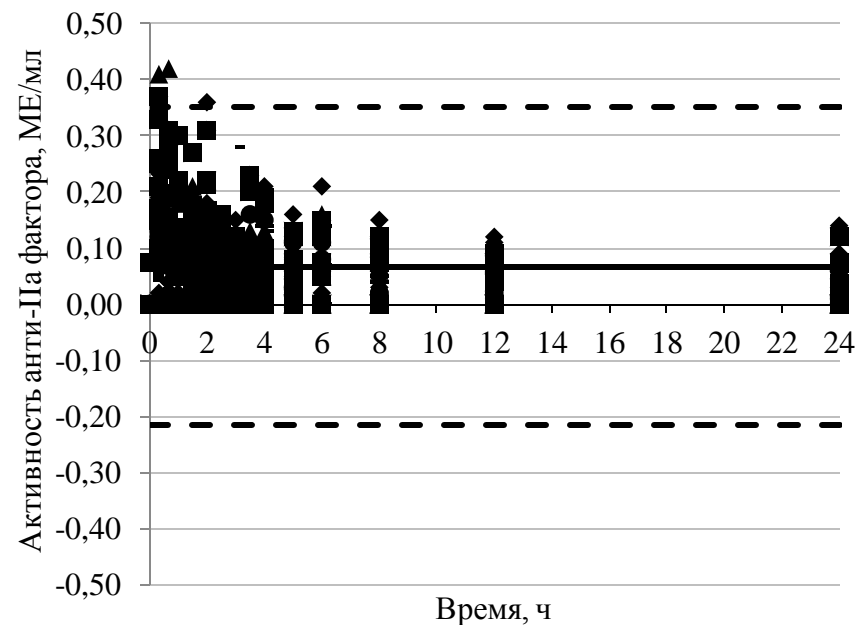


Рис. 5. Контрольная карта Шухарта анти-Па активности в плазме крови добровольцев (после вычитания базового уровня) после однократного внутривенного введения тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов надропарина кальция в одной дозе (объединенные данные для препаратов Т и R, n=58)

Обработка данных



А



Б

Рис. 6. Контрольные карты Шухарта анти-IIa активности в плазме крови добровольцев (после вычитания базового уровня) после однократного подкожного (А, n=60) и внутривенного (Б, n=36) введения тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов эноксапарина натрия в одной дозе (объединенные данные для препаратов Т и R)

Заключение

- ▶ При сравнительном исследовании фармакодинамики и оценке эквивалентности биоаналогичных препаратов из группы НМГ выявлен ряд особенностей, которые важны для планирования аналогичных исследований:
 - необходимо разделение каждого биообразца при отборе с получением двух испытуемых аликвот.
 - методики оценки анти-Ха активности, анти-II-a активности и содержания TFPI в плазме крови человека валидированы в диапазоне концентраций 0,024-0,182 МЕ/мл, 0,0069-0,052 МЕ/мл и 1,56-100 нг/мл соответственно. Их валидация в полном объеме для каждого нового действующего вещества нецелесообразна.
 - допустимо отсутствие значимого изменения анти-IIa активности плазмы крови на введение препаратов и получение данных, не позволяющих рассчитать фармакодинамические параметры и сопоставить доверительные интервалы для всех трех 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.

Косман В.М., Карлина М.В., Фаустова Н.М., Ежова Е.А., Котельникова И.Г., Макаров В.Г., Макарова М.Н. Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция // Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения. 2022 (в печати)

Благодарю за внимание!



kosman.vm@doclinika.ru