

Структурные и функциональные характеристики низкомолекулярных гепаринов в свете разработки руководств по применению генерических продуктов

Гепарин является смесью цепей гликозаминогликанов, обладающих антикоагулянтной активностью. Это свойство вещества было описано еще в 1930-х гг. Молекулярная масса цепочек гепарина значительно варьирует – от 3000 до 30 000 D. При этом гепарины с разной молекулярной массой демонстрируют разную фармакологическую эффективность. Например, четко установлено, что для инактивации тромбина достаточно минимальной длины гепариновой цепи. Длина цепи, кроме того, влияет и на фармакокинетические характеристики. Так, короткие гепариновые цепочки обладают более высокой биодоступностью и медленнее выводятся из организма, чем более длинные. Подобные различия в фармакокинетике и фармакологических свойствах привели к созданию и активному внедрению в клиническую практику низкомолекулярных гепаринов (НМГ).

Основное объяснение действия НМГ базируется на утверждении о том, что эффективность препарата зависит от его анти-Ха активности, в то время как анти-Па активность ответственна за развитие геморрагических осложнений. В действительности же механизм действия НМГ является более сложным, для его описания *in vivo* недостаточно понимания только лишь анти-Ха и анти-Па активности. Во многих клинических исследованиях НМГ показали свою эффективность и безопасность в профилактике и лечении венозной тромбозной (ВТЭ). Позднее была установлена эффективность НМГ в терапии острого коронарного синдрома (ОКС) и тромбозной легочной артерии. В настоящее время эти препараты рассматриваются как стандарт клинического ведения больных с ВТЭ. Поскольку действие патентов на оригинальные препараты НМГ со временем истекает, существенный интерес приобретает разработка их генериков.

Необходимость разрешения экономических, научных и этических вопросов, связанных с созданием генерических НМГ, сделала их предметом активного обсуждения крупнейшими организациями, в том числе Международным союзом ангиологов (IUA, 2006-2008), Южноазиатским обществом по профилактике атеросклероза и тромбоза (SASAT, октябрь 2007-2008), Североамериканским форумом по тромбозам (NATF, сентябрь 2007-2008). В настоящее время продолжаются дискуссии на международном уровне на съездах Международного общества по тромбозу и гемостазу, в Международной академии по клиническим и прикладным вопросам тромбоза и гемостаза (2004-2008) и других организациях. В то же время контролирующими органами и фармакопейными организациями проводится активная деятельность по разработке руководств и монографий для оценки генерических аналогов НМГ.

Как определить генерический препарат НМГ?

Непрерывающиеся дискуссии по этому поводу основываются на том факте, что НМГ представляют собой сложные биологические продукты, а не простые препараты, состоящие из небольших гомогенных молекул. Генерические эквиваленты низкомолекулярных препаратов должны содержать те же активные ингредиенты (то есть обладать идентичной структурой), а также демонстрировать подобную активность и фармакокинетический/фармакодинамический профиль. Для признания такого препарата биоэквивалентным его биодоступность должна быть не более чем на 25% выше либо ниже таковой оригинального продукта.

Одной из причин, затрудняющих определение всех НМГ, является отсутствие четких химических критериев для определения циркулирующих в крови уровней препарата. Чаще всего фармакокинетический анализ основывается на оценке фармакодинамических характеристик (в частности, анти-Ха активности). Однако **биоэквивалентность, оцененная по анти-Ха активности, не может гарантировать идентичность фармакокинетических характеристик относительно других видов биологической активности.** Исследования, проведенные с различными гепаринами и НМГ, четко

показали отличия в фармакокинетических параметрах (объеме распределения, клиренсе и т. д.) при определении уровней препарата в крови по показателям циркулирующей анти-Ха, анти-Па активности и содержанию ингибитора тканевого фактора (ИТФ).

Определение эффективности препарата (анти-Ха и анти-Па активности), согласно данным фармакопей, сводится преимущественно к его АТ-зависимой активности. Сложность применения этого определения к генерикам состоит в том, что не все биологические функции НМГ, как и нефракционированного гепарина (НФГ), объясняются их способностью связываться с АТ. Важной детерминантой аффинности цепей гепарина к различным белкам и факторам роста (в том числе кофактору-II гепарина, фактору тромбоцитов-4 (ТФ4), ИТФ) является общая плотность распределения заряда. Известно, что микрохимические изменения в молекуле гепарина влияют на ее биологическую активность. Для более специфической характеристики этой зависимости необходимо отметить, что критическим для высокого сродства гепарина к АТ является количество сульфатных групп. Таким образом, химические свойства гепарина оказывают непосредственное влияние на его фармакологические характеристики.

Еще одна сложность состоит в ограниченности современных возможностей четко и эффективно идентифицировать все компоненты НМГ. Гепарин и НМГ содержат олигосахаридные цепи различной длины. Согласно принципу оптимальной химической структуры для каждой определенной длины цепи существуют разные, соответствующие ей дисахаридные последовательности. Хотя в последнее время благодаря магнитно-резонансной томографии (МРТ), масс-спектрометрии и реакции энзиматического расщепления достигнуты большие успехи в характеристике структуры гепарина, применение этих методов для изучения сложных смесей олигосахаридных цепей остается затруднительным. Недостаточно также знаний относительно роли каждого структурного компонента гепарина в общем клиническом эффекте препарата. Таким образом, **адекватные возможности для определения химической эквивалентности препаратов в настоящее время отсутствуют.**

В связи с этим разные препараты гепаринов, будучи гетерогенными по природе, а также зависимыми от дозы, пути и времени введения, могут значительно варьировать по количеству циркулирующих фармакологически активных компонентов.

Нормативные аспекты

В течение последних нескольких лет Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) было рассмотрено большое количество заявок на регистрацию непатентованных препаратов эноксапарина и дальгепарина. Задержки с ответами на эти заявки в большинстве случаев были обусловлены отсутствием четких логических обоснований, каким образом эти продукты (именуемые в дальнейшем биологическими либо биоаналогами) будут оцениваться. В 2007 г. на рассмотрение Сената США был представлен законопроект о конкурентной ценовой политике относительно биологических

продуктов. В данном законе регламентировался процесс регистрации и разрешения к применению биоаналогов препаратов. Согласно этому закону продукт может быть признан биоаналогичным только на основании данных анализа, подтверждающих, что он «...обладает высокой степенью сходства с оригинальным продуктом с минимальными отличиями в составе клинически неактивных компонентов», а также данных исследований на животных и клинических испытаний, в которых была оценена иммуногенность препарата и показано, что его фармакокинетические и фармакодинамические характеристики достаточны для подтверждения безопасности, чистоты и эффективности тех ситуаций, для которых был зарегистрирован оригинальный препарат. Дополнительные требования касаются подтверждения взаимозаменяемости препаратов.

В соответствии с этим законом биоаналоги должны обладать высокой степенью сходства с оригинальным продуктом с минимальными отличиями в составе клинически неактивных компонентов. С учетом этого возникает несколько вопросов. Каким образом будет определяться высокая степень сходства? Будет она основываться только на анти-Ха и анти-Па активности, или же при этом будут учитываться и другие вышеописанные параметры? Какой диапазон активности будет признан наиболее оптимальным независимо от выбранных параметров? Препараты-генерики признаются биоэквивалентными, если их активность не отличается от оригинального препарата более чем на 25% (то есть находится в диапазоне от -25% до +25%). Может ли этот диапазон лежать в основе при всех показаниях, по которым применяются НМГ?

Еще один, не менее важный вопрос: имеются ли четкие сведения о том, какие именно клинически неактивные компоненты содержатся в гепарине и являются ли они таковыми (то есть неактивными) при всех показаниях, по которым применяется НМГ?

Европейское агентство по лекарственным средствам недавно выпустило проект руководства по разработке биоаналогичных НМГ, в котором указывается на необходимость предоставления расширенной характеристики биоаналогичного продукта с проведением доклинического и клинического тестирования. До применения в клинических условиях НМГ должны продемонстрировать сравнимую с оригинальным препаратом активность в серии исследований *in vitro*, а также сходство с ним по фармакодинамическим параметрам на животных моделях.

Необходимым считается также проведение клинических исследований. В частности, в рандомизированном перекрестном исследовании с участием здоровых добровольцев следует продемонстрировать сопоставимые с оригиналом всасывание и элиминацию, считающиеся традиционными суррогатными маркерами, а также анти-Ха, анти-Па активность и общие показатели свертывания крови.

Клиническая эффективность и безопасность оцениваются при назначении препарата у больных с высоким риском ВТЭ, например при крупных ортопедических операциях. При этом как в исследованиях фармакокинетики/фармакодинамики, так и при определении

эффективности/безопасности необходимо следовать жесткому дизайну с четко установленными диапазонами эквивалентности. Подтверждение сравнимой с оригиналом эффективности и безопасности дает основания экстраполировать результаты на другие аналоги.

Существующие генерики НМГ

В настоящее время в странах Юго-Восточной Азии и Южной Африки применяется большое количество препаратов-генериков эноксапарина.

Результаты нескольких клинических исследований, в которых сравнивались фармакологические свойства этих НМГ, докладывались на многих научных симпозиумах. Например, было показано, что разные генерики эноксапарина по-разному расщепляются гепариной, что свидетельствует о возможных различиях в структуре некоторых олигосахаридов, из которых состоит продукт. Причиной таких различий может быть разница в структуре исходных гепаринов. Было показано, что с фармакологической точки зрения генерики эноксапарина обладают одинаковыми антикоагулянтными свойствами и анти-Ха активностью. Различия проявлялись и при изучении других параметров, в частности высвобождения ИТФ, активации тромбининдуцируемого ингибитора фибринолиза и влияния на тромбинообразование *in vitro*. Более того, различия в эффективности препаратов были отмечены и в экспериментальных исследованиях на моделях тромбозов и кровотечений. Уровень анти-Ха активности в циркулирующей крови после введения различных препаратов-генериков эноксапарина не всегда коррелировал с их антитромботической активностью.

Гражданская петиция компании-производителя оригинального препарата

В США любой гражданин может сделать запрос либо отправить петицию с предложениями в Агентство стратегий и регулирования FDA. Эта процедура используется и для выражения сомнений относительно идентичности генерических версий биологических препаратов.

Очередным шагом в ходе непрекращающихся дискуссий относительно эквивалентности генерических НМГ оригинальным препаратам стало обращение компании *sanofi-aventis* в FDA с гражданской петицией и рядом сопроводительных документов, в которых описываются результаты доклинических исследований, проводившихся для идентификации специфических структурных свойств — опознавательных параметров, характерных только для эноксапарина. Кроме того, в представленных документах излагались факты, позволяющие установить связь между биологическими эффектами препарата и наличием этих специфических характеристик.

С развитием технических возможностей проведения анализа выявляются все более точные структурные характеристики эноксапарина по сравнению с обнаруженными при его появлении около 20 лет назад. С помощью новых технологий удалось идентифицировать (по данным производителя) около 30% всех полисахаридных цепей, из которых состоит эноксапарин.

В гражданской петиции излагаются многочисленные ранее не известные структурные характеристики эноксапарина. К примеру, было установлено, что в процессе производства препарата образуются сахаридные цепи с нечетным количеством сахаридных единиц. Эти сахаридные цепи получают при отщеплении глюкозаминового остатка от восстановленного конца олигосахаридов. В процессе этой химической реакции в полисахаридную

Продолжение на стр. 6.

Структурные и функциональные характеристики низкомолекулярных гепаринов в свете разработки руководств по применению генерических продуктов

Продолжение. Начало на стр. 5.

последовательность встраивается также галактуроновая кислота.

Технологический процесс производства эноксапарина предусматривает образование в восстановленном конце всех олигосахаридов бициклических 1,6-дегидрокольцевых структур, несущих 3-О-сульфатированную последовательность в составе глюкозаминового остатка (примерно 15-25% олигосахаридных цепей, образующих эноксапарин). По имеющимся данным, эта структура является уникальной; она не была обнаружена ни в одном из применяющихся в клинической практике НМГ.

Результаты многолетнего изучения гепаринов указывают на то, что для его связывания с АТ необходимо наличие в структуре специфической 3-О-сульфатированной пентасахаридной последовательности. В гражданской петиции sanofi-aventis представлены данные и о других олигосахаридах, обнаруженных в составе эноксапарина, в том числе АТ-связывающей последовательности, а также о тех полисахаридах, которые не содержат ее, но обладают способностью с той же степенью аффинности специфически связываться с АТ. Из представленных данных следует, что наличие классической АТ-связывающей последовательности является не единственным объяснением высокого сродства эноксапарина к АТ. Присутствие в структуре препарата различных АТ-связывающих олигосахаридов является уникальным для эноксапарина, а способ их образования остается до сих пор неизвестным.

Антитромботическая активность эноксапарина, как и других НМГ, объясняется АТ-индуцируемым угнетением протеаз коагуляционного каскада, а также другими, не зависящими от АТ, механизмами. В гражданской петиции излагаются факты, позволяющие связать специфические структурные характеристики препарата с его биологическими воздействиями. При этом в результатах многих из представленных исследований акцент делается на роли 1,6-дегидроколец.

Прямой взаимосвязи между содержанием 1,6-дегидроколец и степенью угнетения образования фактора VIIa выявлено не было. Но при этом на угнетение образования данного фактора оказывала влияние концентрация в эноксапарине мест связывания с АТ. Подтверждением этому служил тот факт, что чистые октасахариды с нормальным количеством мест связывания с АТ демонстрировали более выраженное угнетающее влияние на фактор VIIa, чем соединения с низким содержанием АТ-связывающих олигосахаридов. Соотношение и структура АТ-связывающих локусов определяются особенностями технологического процесса производства.

Важную роль в регуляторном механизме свертывания крови играет ИТФ, высвобождаемый эндотелиальными клетками сосудов. После введения стандартного гепарина и эноксапарина циркулирующий уровень ИТФ достоверно возрастал. Было показано, что ИТФ вносит существенный вклад в формирование антикоагулянтной/антитромботической активности и гепарина, и эноксапарина. Влияние компонентов и структурных частей эноксапарина на высвобождение ИТФ изучалось в условиях блокады последнего липополисахаридами бактериального эндотоксина. Обратимость такого угнетения подтвердила способность изучаемых соединений высвобождать ИТФ. В этом исследовании было продемонстрировано влияние длины полисахаридных цепей и содержания 1,6-дегидрокольцевых структур на обратимость угнетения ИТФ эноксапаринном. Для любой длины цепей сохранялась зависимость, при которой обратимость угнетающего действия была более выражена у олигосахаридов, содержащих большие концентрации 1,6-дегидроструктур.

Эноксапарин показан для профилактики тромбоза глубоких вен после операций на органах брюшной полости, протезирования

бедренного и коленного суставов, у больных с высоким риском тромбозов вследствие длительной иммобилизации, а также для профилактики ишемических осложнений нестабильной стенокардии и не-Q инфаркта миокарда. В патогенезе этих состояний важная роль принадлежит воспалению. Например, воспаление может стать причиной нестабильной стенокардии, вызвав разрыв либо эрозию бляшки в коронарной артерии.

Воспаление играет ключевую роль в развитии ишемии миокарда, нестабильной стенокардии и атеросклеротических поврежденных сосудистой стенки. Противовоспалительные свойства эноксапарина были показаны как *in vitro* (взаимодействие с Р-селектином), так и *in vivo* (на животных – угнетение накопления нейтрофилов в зоне инфаркта миокарда). В гражданской петиции представлены данные предварительных исследований, изучавших влияние 1,6-дегидроструктур на биологические эффекты препарата, не связанные с его антикоагулянтным действием. В частности, было обнаружено угнетение кининовой системы, зависящее от содержания 1,6-дегидроколец. Кроме того, было показано, что изменение их содержания в препарате (увеличение или уменьшение) приводит к снижению способности тормозить высвобождение нитритов/нитратов под действием липополисахаридов и угнетать активность комплемента. Остается непонятным, почему наблюдавшаяся разница в противовоспалительном эффекте являлась достоверной по клинически значимым конечным точкам, особенно учитывая тот факт, что большинство кардиологических больных получали также другие противовоспалительные препараты (в частности, аспирин).

Изучалось также влияние эноксапарина на сосуды. Одним из компонентов патофизиологии нестабильной стенокардии и не-Q инфаркта миокарда является увеличение артерий, связанное с пролиферацией гладкомышечных клеток (ГМК). Было обнаружено, что 1,6-дегидрокольца в составе эноксапарина повышают ингибиторный потенциал препарата по отношению к пролиферации ГМК. Однако клиническое значение таких наблюдений пока не до конца выяснено. В этих исследованиях культуры клеток выдерживали в течение 7 дней в средах, обогащенных различными НМГ. Следует отметить, что концентрация НМГ удерживалась постоянной либо практически постоянной по сравнению с той, что наблюдается после одно- или двукратного введения НМГ. Причиной более пристального изучения влияния эноксапарина на ГМК явилось то, что пролиферация последних играет важную роль в развитии сосудистой патологии, связанной с атеросклерозом, гипертензией, рестенозом. К сожалению, у таких пациентов сосудистые заболевания к моменту начала лечения гепарином уже в достаточной мере развились.

Ангиогенез непосредственно связан с пролиферацией эндотелиальных клеток, что улучшает течение заболеваний, характеризующихся микроваскулярной недостаточностью (в частности, ишемической болезнью сердца, при которой гипоксия миокарда требует формирования новых сосудов с целью ограничения ишемического повреждения). Кислореагирующий фактор роста фибробластов (кФРФ) способен потенцировать неангиогенез в ишемизированном миокарде. Было выявлено, что 1,6-дегидрокольцевые структуры оптимизируют взаимодействие эноксапарина с кФРФ. Исследование другого представителя ФРФ – основного фактора роста фибробластов (оФРФ) – показало, что выделенные из эноксапарина олигосахариды подавляют оФРФ-индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток более выраженно, если они не содержат 1,6-дегидроколец.

Информация, представленная в гражданской петиции, дала основание предположить наличие других потенциальных биологических влияний НМГ, которые могли бы объяснить клинические эффекты препарата.

Приведенные в этом документе концепции могут определить направления дальнейших исследований биологических свойств НМГ.

Также в гражданской петиции нашли отображение ранее не известные структурные свойства олигосахаридов, входящих в состав эноксапарина. Учитывая современные технические возможности, вполне объяснимо более точное описание структуры эноксапарина. Закономерно, что наиболее полные данные о препарате должны быть использованы для изучения структурных особенностей его непатентованных аналогов. Однако, несмотря на достижения аналитических технологий, значительное количество олигосахаридов, входящих в состав эноксапарина, остается не идентифицированным (по данным производителя – до 30%). Расширение количества структурных компонентов, которые будут сравниваться в оригинальных и биоэквивалентных НМГ, повысит доверие к данным о сходстве их фракций.

Несмотря на существующие утверждения об отсутствии полной характеристики эноксапарина, генерические НМГ, содержащие разное количество 1,6-дегидрокольцевых структур, могут считаться подобными ему только на основании анти-Ха активности, молекулярной массы и соотношения анти-Ха/анти-Па свойств. Поскольку образование 1,6-дегидрогрупп происходит в процессе деполимеризации и зависит от времени реакции, pH и температуры, возникает резонный вопрос: происходят ли при этом другие структурные изменения? С учетом того, что большинство фракций олигосахаридов до сих пор не описано, невозможно точно определить, является ли наличие 1,6-дегидрогрупп единственной причиной различий в активности препаратов.

В ряде исследований проводилась оценка влияния 1,6-дегидрогрупп на различные биологические эффекты, но при этом оценивались НМГ с более низким или высоким их содержанием, чем в коммерческих препаратах эноксапарина. Поэтому маловероятно, что биоэквивалентные препараты отличаются только по этому признаку. Скорее всего, в процессе производства эноксапарина возникают и другие изменения структуры, помимо 1,6-дегидросодержащих сахаров.

FDA предлагает использовать иммуногенность в качестве важного критерия подтверждения отличия либо доказательство биоэквивалентности генерических НМГ и оригинальных продуктов. Применение НМГ сопровождается меньшей частотой развития гепарининдуцированной тромбоцитопении. Тем не менее у 20% пациентов в ответ на введение НМГ вырабатываются антитела к комплексу гепарин-ТФ4, патофизиологическая роль которого пока не установлена. Предполагается, что если генерический продукт имеет такой же состав и соотношение олигосахаридов, как и оригинальный продукт, он должен обладать таким же по качественным и количественным характеристикам иммуногенным профилем.

Одним из предметов дискуссий относительно характеристик генериков эноксапарина является влияние вышеописанной вариативности на окончательный клинический эффект препарата. Однако информации по этому вопросу недостаточно, к тому же она касается в основном оригинального продукта, хотя является очень важной для установления различий между генерическими и оригинальными продуктами, а также между разными препаратами-генериками. Недостаточно даных и о том, какое влияние оказывают вариации исходного материала на окончательный продукт НМГ.

Выводы

НМГ представляют собой сложные лекарственные продукты, состоящие из большого количества олигосахаридных цепей и оказывающие множественные биологические эффекты. В пределах класса каждый НМГ обладает своей молекулярной массой и биологической активностью по отношению

к анти-Ха и анти-Па факторам. Каждый НМГ применяется в своей дозировке, и замена одного НМГ другим в том же количестве единиц или мг не рекомендуется. Хотя НМГ считаются золотым стандартом в лечении ВТЭ и ОКС, до сих пор остается неизвестным, какую роль играют их биологические воздействия в общей терапевтической эффективности.

В настоящее время активно разрабатываются непатентованные версии НМГ, которые отнесены к классу биоэквивалентных препаратов. Однако, хотя более дешевое лечение и является хорошим стимулом для их создания, определить, насколько они действительно эквивалентны оригинальным препаратам, сложно вследствие ряда причин. Выявление структурного сходства затрудняет гетерогенность компонентов олигосахаридов, из которых состоят НМГ. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что даже при одинаковой молекулярной массе НМГ имеют разную микроструктуру, обуславливающую различную чувствительность к расщеплению гепариной. Такие микроструктурные отличия оказывают влияние на взаимодействие протеинов с клетками.

Несмотря на то что НМГ обычно сравнивают по их АТ-зависимой активности (анти-Ха и анти-Па), они оказывают и другие эффекты, дополняющие антитромботические свойства. Последние данные свидетельствуют о том, что хотя генерики НМГ и сравнимы по антикоагулянтной и антипротеазной активности, они отличаются по другим механизмам действия. В недавно завершившемся исследовании эффекты генериков НМГ различались по трем показателям – влиянию на тромбининдуцированную активацию тромбоцитов, фармакодинамику высвобождения ИТФ и активацию тромбининдуцируемого ингибитора фибринолиза.

Возникает важный вопрос: каким образом химические и биологические различия между генериками НМГ *in vitro* могут влиять на их фармакологические свойства и, соответственно, клиническую эффективность и безопасность? В руководствах по оценке генерических препаратов НМГ предусматриваются многие параметры, помимо традиционного определения анти-Ха и анти-Па активности и измерения молекулярной массы, в том числе характеристика исходных материалов и изучение фармакологических свойств. Обязательно должны приниматься во внимание специфические структурные признаки каждого препарата и их влияние на общий биологический профиль продукта. Существует потребность в проведении исследований *in vivo*, в том числе на моделях животных и у человека, для подтверждения биоэквивалентности генериков и оригинальных препаратов НМГ.

Действующие правила, регулирующие производство генерических препаратов, представляют серьезную проблему для контрольных органов, особенно FDA и EMEA. Поскольку генерики составляют более 60% всех выписываемых в США лекарств, а их цена существенно ниже оригинальных препаратов, рынок таких лекарственных средств является достаточно привлекательным с экономической точки зрения. Однако неоднозначность состава этих препаратов и их эндогенные взаимодействия приводят к различным реакциям со стороны организма, например к синтезу антител, отдаленным влияниям на безопасность и эффективность лечения. Таким образом, существующие нормы для препаратов-генериков являются не вполне адекватными для НМГ и их производных. **В настоящее время разрабатываются дополнительные требования, в том числе к технологии производства и процедурам исследования препарата. До этого невозможно провести исследования по структуре и биологическому действию препаратов, как НМГ, не рекомендуется.**

Перевод статьи предоставлен компанией sanofi-aventis.

Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis
2009 April; 15: 2