

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: igorshohin@yandex.ru

## РАЗРАБОТКА, ВАЛИДАЦИЯ И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-Xa- И АНТИ-IIa-АКТИВНОСТИ ЭНОКСАПАРИНА НАТРИЯ

Б.Ю. Маргаева<sup>1</sup>, И.Е. Шохин<sup>2\*</sup>

**Резюме.** Проведена разработка и валидация методик определения анти-Xa- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях *in vitro* (лекарственные препараты) и *in vivo* (плазма крови) методом УФ-спектрофотометрии. Методики были апробированы на образцах лекарственных средств эноксапарина натрия и плазмы крови кроликов. Показано, что методики пригодны для решения поставленных аналитических задач, в том числе стандартизации лекарственных средств эноксапарина натрия.

**Ключевые слова:** эноксапарин натрия, анти-Xa, анти-IIa, валидация, стандартизация.

**DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF ANTI-Xa- AND ANTI-IIa-ENOXAPARINE SODIUM ASSAY**

**B.Yu. Margaeva<sup>1</sup>, I.E. Shohin<sup>2\*</sup>**

**Abstract.** Development, validation and application of *in vitro* (dosage forms) and *in vivo* (blood plasma) anti-Xa and anti-IIa enoxaparine sodium assay by UV-spectrophotometer. Assay methods were applied for enoxaparine sodium dosage forms and rabbit plasma samples. It was shown that assay methods are suitable for these analytical purposes including standardization of enoxaparine sodium preparations.

**Keywords:** enoxaparine sodium, anti-Xa, anti-IIa, validation, standardization.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач здравоохранения РФ является своевременное обеспечение производства и надлежащей оценки эффективности и безопасности лекарственных препаратов, входящих в список стратегически значимых ЛП в соответствии со Стратегией «Фарма-2020». В их число входят и препараты-биоаналоги низкомолекулярного гепарина (НМГ), а именно эноксапарина натрия, который широко применяется в клинической практике и производство которого должно быть налажено в стране в рамках государственного проекта [1]. Для стандартизации препаратов-биоаналогов эноксапарина натрия рекомендуется проводить сравнительную оценку активности (антифакторная активность к факторам свертывания крови II и X: анти-Xa и анти-IIa) и фармакокинетики в условиях *in vitro* и *in vivo* относительно препарата сравнения, в качестве которого, как правило, используется оригинальный препарат – Клексан® [2]. В случае подтверждения сопоставимой активности исследуемого и оригинального препарата эноксапарина натрия возможно

сделать предположение об их взаимозаменяемости и биоаналогичности [3]. Следует отметить, что количественное определение низкомолекулярных гепаринов, в том числе эноксапарина натрия в сложных матрицах, таких как плазма крови, затруднено из-за неоднородности соединения, молекулярной массы и распределения в ней заряда дисперсии [4], в связи с чем оценку фармакокинетики таких ЛС проводят косвенно, на основании антифакторной активности.

На основании анализа литературных данных определение НМГ рекомендуется проводить коагулометрическим или хромогенным методом [4]. Следует отметить, что коагулометрические методики требуют использования специализированного оборудования – коагулометры, которые обычно не представлены в аналитических лабораториях. В Фармакопее США (USP 38-NF 33) и Европейской Фармакопее (Ph.Eur. 8.4) приведены общие подходы к определению антифакторной активности НМГ в препаратах, но не в биологических жидкостях [5, 6]. В публикациях по определению анти-Xa- и анти-IIa-активности НМГ,

в том числе эноксапарина натрия, не приведены валидационные характеристики методик [7, 8], что не позволяет удостовериться в надежности их применения для поставленных аналитических задач. Кроме того, при изучении публикаций по определению анти-Ха и анти-IIa-активности НМГ в плазме крови было отмечено, что все они относились к плазме крови человека (пациенты либо добровольцы), но не плазме крови кроликов, используемых в качестве тест-систем на этапе доклинических исследований. Согласно рекомендациям Агентства по лекарственным средствам и пищевым продуктам США, Европейского медицинского агентства, а также «Руководству по экспертизе ЛС» для новых биологических матриц необходимо повторно устанавливать валидационные характеристики биоаналитических методик [9–11]. В работе Sanderink с соавт. [12] было отмечено, что определение анти-IIa-активности эноксапарина натрия в плазме крови затруднено в связи с его низкими уровнями, что определяет необходимость разработки более чувствительных методик ее определения.

Таким образом, разработка и валидация аналитических методик, позволяющих проводить определение активности анти-Ха и анти-IIa низкомолекулярных гепаринов в условиях *in vitro* (препараты) и *in vivo* (плазма крови), является важной задачей, необходимой для сравнительной оценки препаратов эноксапарина натрия: разрабатываемого препарата-биоаналога (эноксапарин натрия) и оригинального (Клексан®).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были взяты: исследуемый препарат – препарат-биоаналог «Эноксапарин натрия», раствор для инъекций 10000 анти-Ха российского производства (более подробная информация не может быть приведена в связи с конфиденциальностью данных); референтный препарат – Клексан®, раствор для инъекций 8000 анти-Ха МЕ/0,8 мл производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», произведено «Санофи Винтроп Индустрия», Франция. Для каждого из исследуемых ЛС использовалось по 6 доступных серий.

Для проведения определения анти-Ха- и анти-IIa-активности препаратов НМГ эноксапарина в условиях *in vitro* и *in vivo* было использовано следующее оборудование: микропланшетный ридер Mindray MR-96A, производитель Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.; УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis; УФ-спектрофотометр ПЭ-5400УФ, «ПРОМЭКОЛАБ», Санкт-Петербург; рН/мВ-метр рН 330i; рН-метр 728 рН lab, MetrohmAG, термощейкер Biosan PST-60HL для 96-луночных планшетов; термощейкер Biosan TS-100C для пробирок Эппендорфа, вортекс-шейкер Heidolph, Реахтор; дозаторы одноканальные переменного объема «Ленпипет Лайт»

10–100 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл; дозаторы восьмиканальные переменного объема «Ленпипет Лайт» – 5–50 мл и 30–300 мкл.

В работе использовали следующие реактивы и материалы: вода деионизированная; уксусная кислота ледяная (Scharlau, Испания, х.ч.), натрия хлорид (х.ч.), реагенты для определения анти-Ха- и анти-IIa-активности НМГ в условиях *in vitro* (состав: антитромбин III (1 IU/фл), лиофильно высушенный – 3 флакона; фактор Ха (15 нкат/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон; тромбин (фактор IIa) (20 NIH/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон; хромогенный субстрат для фактора Ха, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 2 флакона; хромогенный субстрат для тромбина, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 2 флакона; рабочий стандартный образец НМГ – 1 флакон; концентрат буфера (5 мл) – 1 флакон; бычий сывороточный альбумин (1 г) – 1 флакон), реагенты для определения анти-Ха-активности гепарина оптическим методом «Реахром Гепарин» (НПО «Ренам», Россия); реагенты для определения анти-Ха- и анти-IIa-активности гепарина оптическим методом «ACTICHROME® Heparin (anti-IIa)».

В качестве интактной матрицы использовалась пулированная нормальная плазма (не содержащая гепарин, собрана от 20 доноров в возрасте 20–40 лет, стабилизирована HEPES-цитратным буфером, лиофильно высушенная), а также интактная матрица крови кроликов.

В качестве стандартных и калибровочных образцов использовали плазму-калибратор для определения анти-Ха-активности гепарина (НПО «Ренам», Россия); контрольную плазму для определения анти-Ха-активности гепарина (НПО «Ренам», Россия); эноксапарин-натрия, стандарт USP RS; пулированная нормальная плазма, набор плазм-калибраторов для определения анти-Ха-активности гепарина; набор плазм контрольных для определения анти-Ха-активности гепарина. Все вышеуказанные плазмы крови были собраны от 20 доноров в возрасте 20–40 лет, стабилизированы HEPES-цитратным буфером, лиофильно высушены, не содержали гепарина. Кроме того, нами были использованы интактные плазмы крови кроликов-самцов породы шиншилла массой 2–4 кг.

Для определения анти-Ха- и анти-IIa-активности использовались следующие растворы реактивов: рабочий буферный раствор, уксусной кислоты 70% раствор, раствор антитромбина III для определения анти-Ха-активности, раствор антитромбина III для определения анти-IIa-активности, раствор фактора Ха, раствор тромбина, раствор хромогенного субстрата для фактора Ха, раствор хромогенного субстрата для тромбина, раствор рабочего стандартного образца НМГ. HEPES-цитратный буферный раствор с рН 7,4 готовили из концентрированного буфера, входящего в состав набора реактивов «Ренапарин-тест», путем разведения 1:20 водой очищенной.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Определение анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях *in vitro*

Готовили серию разведений рабочего стандартного образца НМГ и серию разведений испытуемого препарата НМГ перед проведением анализа. Определения проводили в полистирольных планшетах, помещая их в термошейкер при 37 °С. Ход анализа определения анти-Ха-активности проходил по схеме, представленной в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Схема распределения буферного раствора (В), разведения стандартного образца НМГ гепарина (S1 – S5), образца испытуемого препарата (Т1 – Т4) и референтного препарата (R1-R4) в лунках 96-луночного планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	-	-	-	-
2	-	B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	-	-	-	-
3	-	B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	-	-	-	-
4	-	B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	-	-	-	-
5	-	S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>	-	-	-	-
6	-	S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>	-	-	-	-
7	-	S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>	-	-	-	-
8	-	S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>	-	-	-	-

Примечание: «-» – незадействованная лунка планшета.

Таблица 2.

Порядок внесения реактивов в лунки планшета

Раствор антитромбина III для определения анти-Ха-активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора Ха	40 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 2 мин	
Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха	100 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 4 мин	
Уксусная кислота	40 мкл

Ход анализа определения анти-IIa-активности проходил по схеме, представленной в таблицах 3 и 4.

Далее измеряли оптическую плотность растворов при 405 нм с помощью микропланшетного ридера Mindray MR-96A. Выбор аналитической длины волны был обусловлен тем, что при данной длине волны наблюдалось максимальное светопоглощение и спе-

цифичность определения, что связано со структурой и цветом продукта реакции фактора Ха или IIa с хромогенным субстратом (*para*-нитроанилин, максимум поглощения при 405 нм).

Таблица 3.

Схема распределения буферного раствора (В), разведения стандартного образца НМГ гепарина (S2 – S6), образца испытуемого препарата (Т1 – Т4) и референтного препарата (R1-R4) в лунках 96-луночного планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	-	-	-	-
2	-	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	-	-	-	-
3	-	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	-	-	-	-
4	-	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	-	-	-	-
5	-	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	-	-	-	-
6	-	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	-	-	-	-
7	-	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	-	-	-	-
8	-	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	-	-	-	-

Таблица 4.

Порядок внесения реактивов

Раствор антитромбина III для определения анти-IIa-активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора IIa	40 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 2 мин	
Раствор хромогенного субстрата для фактора IIa	100 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 4 минуты	
70% раствор кислоты уксусной	40 мкл

### Определение анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях *in vitro*

Пробоподготовка образцов плазмы крови к анализу проводилась путем их разведения в буферном растворе с pH 7,4, приготовленном как описано ранее. Анализ проводили в полистирольном планшете при 37 °С. С помощью одноканального дозатора в две лунки 1-й и 11-й ряда планшета вносили по 200 мкл рабочего буферного раствора (раствор сравнения). Далее с помощью многоканального дозатора приготовленные рабочие растворы вносили в полистирольные планшеты по следующей схеме, представленной в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Валидация методики

Ход анализа

Вносили в лунки:	Образец	Бланк
Рабочий раствор фактора Ха или IIa	40 мкл	---
Раствор 2	40 мкл	---
Рабочий буферный раствор	---	200 мкл
Инкубировали при 37 °С точно 5 минут		
Раствор хромогенного субстрата	40 мкл	---
Инкубировали при 37 °С точно 5 мин		
70% раствор уксусной кислоты	80 мкл	---

Измеряли оптическую плотность образца на планшетном спектрофотометре при длине волны 405 нм и по калибровочному графику рассчитывали анти-Ха-активности эноксапарина натрия.

Аналогичным образом проводили исследования анти-IIa-факторной активности эноксапарина натрия при использовании соответствующих реактивов и раствора фактора свертывания IIa с целью оценки анти-IIa-активности эноксапарина натрия.

Кроме того, разработанная методика была модифицирована для использования на кюветном УФ-спектрофотометре, поскольку объемы исследуемого образца (200 мкл) недостаточны для внесения в классическую кювету шириной 10 см. Для этого все объемы вносимых образцов реактивов были пропорционально увеличены в 5 раз по сравнению с методикой для планшетного спектрофотометра, при этом инкубирование образцов проводилось в пробирках Эппендорфа вместимостью 2 мл в соответствующем термошейкере.

Валидацию методик определения анти-IIa- и анти-Ха-активности эноксапарина натрия в препаратах и плазме крови кроликов проводили согласно ГФ XIII ОФС «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на двух уровнях: сходимость, промежуточная прецизионность), аналитический диапазон.

Для методик определения анти-IIa- и анти-Ха-активности в плазме крови кроликов валидация проводилась как для методики в модификации как для планшетного, так и кюветного УФ-спектрофотометра.

**Специфичность.** Для оценки специфичности методики определения активности анти-IIa- и анти-Ха-активности эноксапарина натрия в препаратах (*in vitro*) и плазме крови кроликов (*in vivo*) для каждой из методик проводили определение активности для холостого образца (для определения анти-IIa- и анти-Ха-активности эноксапарина натрия в препаратах в качестве холостого образца использовали воду очищенную). Для определения для анти-IIa- и анти-Ха-активности эноксапарина натрия в качестве холостого образца использовали интактную плазму кроликов от 6 разных животных, а также интактную плазму крови человека и рассчитывали в каждом из случаев сигнал УФ-СФМ для данного образца.

Для каждой из разработанных методик отклик сигнала для холостого образца как для плазмы крови человека, так и плазмы крови кроликов, уровень анти-IIa- и анти-Ха-активности эноксапарина натрия не отличался от нуля. Таким образом, было показано, что при использовании разных биологических матриц (плазма крови человека или кроликов) сохраняется специфичность разработанной методики.

Таблица 6.

Схема внесения образцов в лунки планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Контроль 1	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	Бланк
B	Контроль 2	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	Бланк
C	Калибровка 0	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X
D	Калибровка 1	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X
E	Калибровка 2	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X
F	X	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X
G	X	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X
H	X	....	....	....	....	....	....	....	....	....	X	X

Примечание: X – пустая лунка;  
«...» – образцы исследуемой плазмы кроликов.

### Линейность

Определение анти-Ха-активности эноксапарина натрия *in vitro*

Готовили 5 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,212 МЕ/мл, 0,141 МЕ/мл, 0,094 МЕ/мл, 0,0628 МЕ/мл, 0,0418 МЕ/мл. Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием 1/х. Проводили линию тренда в диапазоне активности 0,2–0,04 МЕ/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график (рисунок 1) совместно с уравнением калибровочной кривой. Коэффициент корреляции составил 0,98 для этого и последующих определений. Во всех случаях была отмечена обратная пропорциональная зависимость активности эноксапарина натрия от оптической плотности образца. Рекомендуемые координаты калибровочных графиков были приведены в информационных материалах к реактивам и различались для оценки анти-Иа и анти-Ха-активности.

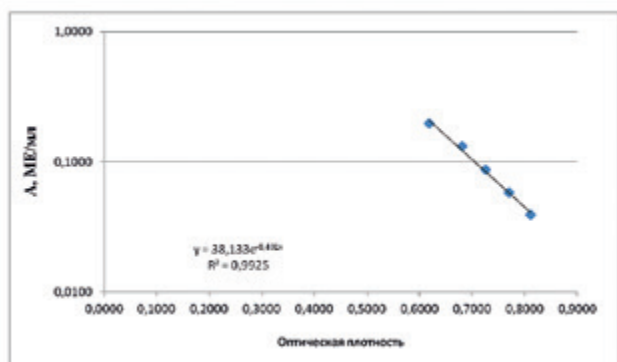


Рисунок 1. Калибровочный график для определения анти-Ха-активности препарата

Определение анти-Иа-активности эноксапарина натрия *in vitro*. Проводили измерение оптической плотности 5 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,041 МЕ/мл, 0,0277 МЕ/мл, 0,0184 МЕ/мл, 0,0123 МЕ/мл, 0,0082 МЕ/мл.

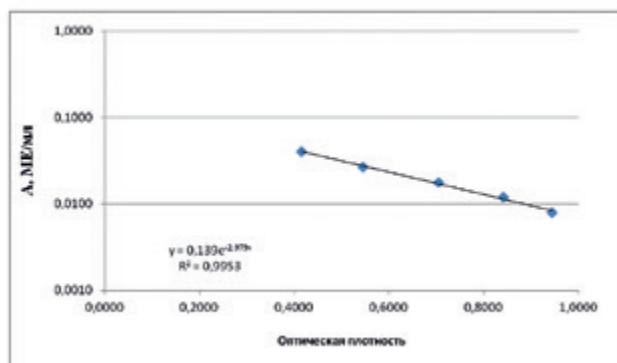


Рисунок 2. Калибровочный график для определения анти-Иа-активности препарата

Определение анти-Ха-активности эноксапарина натрия *in vivo*. Проводили измерение оптической плотности 3 стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,00 МЕ/мл, 0,48 МЕ/мл, 0,93 МЕ/мл.

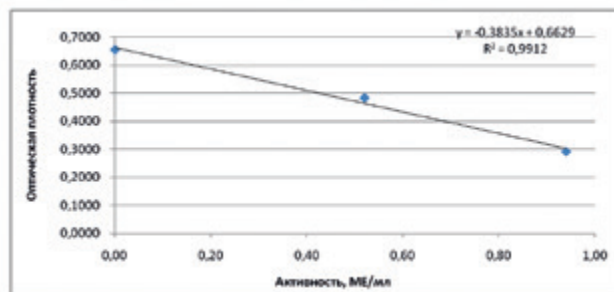


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности эноксапарина от его активности (анти-Ха)

Определение анти-Иа-активности эноксапарина натрия *in vivo*. Проводили измерение оптической плотности 4 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,000 МЕ/мл, 0,0150 МЕ/мл, 0,300 МЕ/мл, 0,600 МЕ/мл.

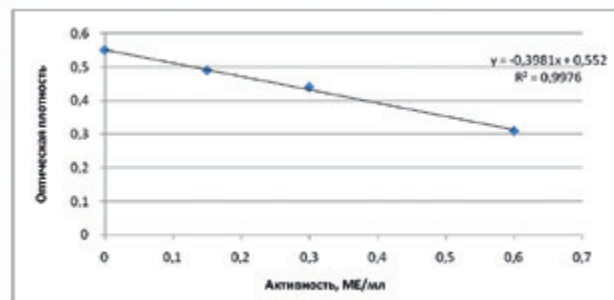


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости оптической плотности эноксапарина от его активности (анти-Иа)

### Правильность и прецизионность

Определение анти-Ха- и анти-Иа-активности эноксапарина натрия *in vitro*. Проводили анализ 3 образцов активности стандартных растворов эноксапарана натрия 0,212 МЕ/мл, 0,0940 МЕ/мл, 0,0418 МЕ/мл для определения анти-Ха- и 0,0410 МЕ/мл, 0,0184 МЕ/мл, 0,0082 МЕ/мл для определения анти-Иа-активностей. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 3 раза. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полученных значений анти-Ха-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,0103; 0,0072; 0,0035, intra-day: 0,0192; 0,0066; 0,0041), относительного стандартного отклонения (RSD, %, inter-day: 5,24; 7,67; 7,57; intra-day: 9,33; 7,06; 9,48) и относительной погрешнос-

ти (ε, % inter-day: 7,70; 0,00; 10,45; intra-day: 2,91; 0,74; 3,27). Для полученных значений анти-IIa-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,0024; 0,0018; 0,0008, intra-day: 0,0023; 0,0014; 0,0007), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 6,07; 9,91; 9,30; intra-day: 5,84; 7,54; 7,82) и относительной погрешности (ε, % inter-day: 3,41; 0,36; 2,44; intra-day: 2,44; 0,45; 2,24).

*Определение анти-Xa- и анти-IIa-активностей эноксапарина натрия in vivo.* Проводили анализ 3 образцов активности стандартных растворов эноксапарина натрия 0,00 МЕ/мл, 0,48 МЕ/мл, 0,93 МЕ/мл для определения анти-Xa- и 0,150МЕ/мл, 0,300МЕ/мл, 0,600МЕ/мл для определения анти-IIa-активности. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 3 раза. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полученных значений анти-Xa-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,00; 0,04; 0,07, intra-day: 0,00; 0,05; 0,06), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 0,00; 7,21; 7,24; intra-day: 0,00; 9,40; 6,07) и относительной погрешности (ε, % inter-day 0,00; 4,17; 2,87; intra-day: 0,00; 2,08; 2,15). Для полученных значений анти-IIa-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,015; 0,011; 0,015, intra-day: 0,014; 0,009; 0,018), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 9,96; 3,45; 2,50; intra-day: 9,43; 2,97; 2,92) и относительной погрешности (ε, % inter-day: 2,22; 1,56; 0,28; intra-day: 0,00; 1,25; 0,53). Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) не пре-

вышали 10,00% (максимально допустимое отклонение, приведенное в инструкциях по применению наборов для нализа анти-Xa- и анти-IIa-активности).

Таким образом, по результатам валидации методик определения анти-Xa- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в препаратах и плазме крови кроликов было показано, что разработанные методики пригодны для указанных аналитических задач.

**Апробация методики определения анти-Xa- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях in vitro**

В ходе количественного определения анти-Xa- и анти-IIa-активности препаратов эноксапарина натрия по разработанной методике были получены величины анти-Xa- и анти-IIa-активности для исследуемого и референтного препаратов, соответствующие нормам отношения активностей по USP (таблица 7). Кроме того, было показано, что при анализе различных серий исследуемого и референтного препаратов данные соотношения не меняются от серии к серии. Таким образом, было установлено, что исследуемый разрабатываемый препарат «Эноксапарин натрия» обладает межсерийной однородностью по величинам анти-Xa- и анти-IIa-активности in vitro, а также их соотношению (RSD не более 5%).

**Апробация методики определения анти-Xa- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях in vivo**

Определение антифакторной активности эноксапарина натрия (для оригинального и воспроизведенного препаратов) в условиях in vivo (доклиническое

Таблица 7.

Результаты определения анти-Xa- и анти-IIa-активности исследуемых препаратов

серия №	Эноксапарин натрия, активность			Клексан®, активность		
	анти-Xa	анти-IIa	соотношение	анти-Xa	анти-IIa	соотношение
1	10 480	2 840	3,69	10 264	2 668	3,85
2	10 077	2 590	3,89	10 297	2 565	4,01
3	10 527	2 680	3,93	10 672	2 759	3,87
4	9 834	2 660	3,70	10 843	2 735	3,96
5	10 665	2 788	3,83	10 634	2 760	3,85
6	10 319	2 493	4,14	10 225	2 631	3,89
Ср.знач.	10 317	2 675	3,86	10 489	2 686	3,91
RSD,%	3,01	4,75	4,32	2,48	2,94	1,68

исследование) проходило в два этапа: биологический и аналитический. Биологический этап исследования проводился на 8 кроликах-самцах породы шиншилла. Забор венозной крови для определения концентрации исследуемых препаратов производили у экспериментальных животных из ушной вены: до введения препаратов, через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч. Анализ образцов проводился по приведенной выше методике.

По результатам фармакокинетических исследований как для анти-Ха-, так и для анти-IIa-активности препарата-биоаналога эноксапарина натрия было установлено, что характер фармакокинетических кривых, полученных после введения препаратов эноксапарин натрия (Т) и Клексан (R), в целом сходен, причем индивидуальная вариабельность значений активностей эноксапарина натрия в обоих случаях примерно одинакова. Эквивалентность фармакокинетических профилей препаратов Т и R была подтверждена при помощи математических методов ( $f$ ,  $f'$ ,  $f''$ ), которые укладывались в допустимый интервал (80,00–125,00%).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Были разработаны методики определения анти-Ха- и анти-IIa-активностей эноксапарина натрия в условиях *in vitro* и *in vivo* методами УФ-спектрофотометрии и планшетной УФ-спектрофотометрии, установлены их основные валидационные характеристики согласно ГФ 13. Показано, что разработанные методики могут быть использованы для указанных аналитических задач.
2. Проведена апробация разработанной методики для сравнительного исследования активности выбранных препаратов-биоаналогов в условиях *in vitro*. Установлено, что соотношение активностей анти-Ха и анти-IIa для исследуемых препаратов является сопоставимым.
3. Осуществлена апробация разработанной методики для сравнительного исследования активности выбранных препаратов-биоаналогов в условиях *in vivo*. Было определено, что фармакокинетика исследуемых ЛС является эквивалентной. На основании результатов сравнительных исследований *in vitro* и *in vivo* показана биоаналогичность исследуемых ЛС на доклиническом этапе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Утвержден распоряжением Правительства

Российской Федерации от 6 июля 2010 г. № 1141-р, г. Москва.

2. Б.Ю. Маргаева. Подходы к оценке взаимозаменяемости биоаналогов (биосимиляров) на стадии их государственной регистрации в свете реализации стратегии «Фарма-2020» (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 88–93.
3. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1). EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2012. URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/05/WC500127960.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/05/WC500127960.pdf) (дата обращения 30.09.2016).
4. А.Л. Бекровский, Е.В. Сергеева, А.В. Суворов, А.А. Козлов. Методическое руководство. Методы определения активности гепарина. – М.: Ренам, 2011. С. 3.
5. European Pharmacopoeia 8.0.
6. United States Pharmacopoeia. – National Formulary 38–33.
7. Т.А. Ярушок, Б.Ю. Маргаева, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко. Определение анти-Ха- и анти-IIa-активности препаратов низкомолекулярного гепарина (эноксапарина натрия) с использованием готовых наборов «Ренапарин-тест» методом с хромогенными субстратами // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. № 1. С. 47–52.
8. Т.А. Ярушок, Б.Ю. Маргаева, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко. Доклинические фармакокинетические исследования препаратов-биоаналогов эноксапарина натрия // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. № 1. С. 56–60.
9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.
10. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2013.
11. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). – London. 2011.
12. G.J. Sanderink, C.G. Guimart, M.L. Ozoux, N.U. Jariwala, U.A. Shukla, B. X. Boutouyrie. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prophylactic dose of enoxaparin once daily over 4 days in patients with renal impairment // Thrombosis Research. 2002. № 105. P. 225–231.