

## 低分子量肝素生物类似药的免疫原性及监管

刘世霆

南方医科大学南方医院 药学部, 广州 510515

**【摘要】** 低分子量肝素(LMWHs)是临床常用抗凝药物,其生物类似药在近年来得到不断发展。作为大分子生物制剂,LMWHs结构及制备工艺复杂,且部分结构难以表征,其潜在免疫原性成为安全性重点关注问题。本文对LMWHs及其生物类似药复杂性、免疫原性、监管规范进行综述,以期推动我国LMWHs生物类似药合理应用。

**【关键词】** 低分子量肝素;生物类似药;免疫原性;安全性;药物监管

**【中图分类号】** R973.2;R5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1672-3384(2022)01-0025-05

**Doi:** 10.3969/j.issn.1672-3384.2022.01.002

### Immunogenicity and drug regulation of low molecular weight heparins biosimilars

LIU Shi-ting

Department of Pharmacy, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**【Abstract】** Low molecular weight heparins (LMWHs) are common anticoagulants in clinic, and the biosimilars have been developed in recent years. As macromolecular biological agents, LMWHs have complex structures and preparation processes, and some structures are difficult to characterize, so the potential immunogenicity has become a key concern of security. In this paper, the complexity, immunogenicity and regulatory norms of LMWHs and its biological analogues were reviewed in order to promote the rational application of LMWHs biosimilars in China.

**【Key words】** low molecular weight heparins; biosimilars; immunogenicity; security; drug regulation

生物制剂泛指由活细胞利用生物技术产生或提取自生物材料的物质,包括抗体、蛋白质、多糖等<sup>[1-2]</sup>,生物制剂及其类似药已在慢性疾病和免疫疾病方面体现出良好的临床价值<sup>[1,3-4]</sup>。相比传统化学药品,生物制剂合成方式、生产工艺及结构表征等方面更为复杂<sup>[1-2]</sup>。

作为临床广泛应用的生物制剂,低分子量肝素(low molecular weight heparins, LMWHs)由未分离肝素(unfractionated heparin, UFH)通过化学或酶解聚合过程制备而成,用于治疗血栓和心血管疾病,包括肺栓塞、深静脉血栓形成和急性冠状动脉综合征<sup>[5-6]</sup>。目前世界卫生组织已批准8种拥有独立国际非专利名称(international nonproprietary names,

INN)的LMWHs,包括贝米肝素、舍托肝素、达肝素、依诺肝素、那屈肝素、帕肝素、瑞肝素、亭扎肝素,其中依诺肝素、达肝素和那屈肝素已在我国获批上市<sup>[5,7]</sup>,且依诺肝素国内获批适应证范围较后两者更广,抗Xa/抗IIa比值更高。2010年7月,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了首个依诺肝素仿制药<sup>[8]</sup>,此后在欧美陆续有仿制依诺肝素获批。国内依诺肝素、那屈肝素、达肝素申报的仿制企业达10余家,其获批适应证与原研产品基本一致,但分子量分布、抗Xa/抗IIa比值、杂质水平等质控指标仍难以比肩原研产品,产品质量规范化尚待提高。作为生物源性产品,不同LMWHs分子量分布、分子结构、抗FXa/抗FIIa比值、药物代谢动力学、肝素酶

消化程度、组织因子途径抑制物释放程度等指标仍体现差异<sup>[5,7-8]</sup>,且LMWHs属于多效性分子,作用靶点复杂。因此,LMWHs生物类似药仅能实现与原研药品高度相似而非完全相同<sup>[1]</sup>,微小差异也可能造成明显药物反应,其临床应用管理仍需不断完善。本文对LMWHs结构复杂性、免疫原性、监管规范等内容进行综述,以期提高临床药物抗凝管理工作,推动我国LMWHs生物类似药的合理应用。

## 1 低分子量肝素结构复杂且难以完全表征

LMWHs的起始原料为猪肠道黏膜,由UFH解聚(化学或酶解聚)制成<sup>[6,8]</sup>。肝素作为一种复杂糖胺聚糖链混合物,相对分子质量3000~30 000不等,由碱性葡萄糖胺和酸性己糖醛酸交替组成,而已糖醛酸还存在异糖醛酸或葡萄糖醛酸两种差向异构体。此外,糖胺聚糖链可表现出硫酸化和乙酰化的不同模式。所以,即使链长、分子量大小一致,LMWHs也可能因构成肝素链的成分不同而产生异质性<sup>[2]</sup>。另一方面,LMWHs工业生产过程繁杂,需经原料收集和稳定、从蛋白聚糖中消化和释放、肝素捕获和回收、净化和漂白,最终分离和干燥得到成品<sup>[9]</sup>。而各种解聚方法将导致微小结构差异,对毒性和疗效性产生影响<sup>[7]</sup>。不同制备环境下的LMWHs生化特性、有害杂质水平不同,引发潜在不良事件的风险存在差异<sup>[8,10]</sup>。

LMWHs结构表征是达到生物相似性标准的关键<sup>[11]</sup>,但由于LMWHs物理检测困难,常规的药物代谢动力学研究无法进行,因此常采用药效学方法研究LMWHs吸收和消除,主要是对抗Xa和抗IIa活性的检测<sup>[6]</sup>。但抗Xa和抗IIa活性并不足以完全解释它们在体内的作用。尽管现有技术(如分子量分析、核磁共振、酶消化法等)在表征LMWHs低聚糖分布情况方面取得一定进展,但这些技术难以全面表征LMWHs活性,无法定义更精细的链化学结构,这些精细链化学结构的硫酸化和乙酰化模式却可能对LMWHs生物活性产生影响,因此其得到表征十分有必要<sup>[12]</sup>。另一方面,部分LMWHs复杂寡糖尚未完全表征,其潜在药物影响仍有待确认<sup>[13]</sup>。

LMWHs作为大分子生物制剂具有高度复杂的结构特性,且生产各环节细微变化可能导致产品重大变

化,部分结构受限于现有技术仍未被完全表征,其潜在影响难以预估,这些因素共同导致LMWHs极具复杂性,容易造成临床安全性问题。

## 2 低分子量肝素的免疫原性问题

LMWHs安全性问题主要源于其潜在的免疫原性。免疫原性是生物制剂特有的安全性问题,指使用后产生的抗体反应<sup>[4]</sup>。产品、患者、治疗等因素均可能诱发免疫原性,进而降低药物生物利用度、影响临床疗效、中和活性蛋白质、引起机体免疫效应等<sup>[4,14]</sup>。随着越来越多生物类似药不断问世,对其进行免疫原性评估愈发重要。但生物类似药免疫原性并不能在临床前试验和非人体试验中被完全预测,评估免疫原性并非易事<sup>[15-16]</sup>。因此,生物类似药在批准前需要进行临床免疫原性研究,上市后仍需要进行严格的药物警戒监管<sup>[6]</sup>。目前常使用放射免疫沉淀法、电化学发光分析、酶联免疫吸附法测定抗体的存在,随后进行特征分析以确定抗体的滴度和类型<sup>[16]</sup>。

LMWHs免疫原性问题主要为肝素引起的小血小板减少症(heparin-induced thrombocytopenia, HIT)。HIT是由LMWHs与血小板因子4(platelet factor 4, PF4)相互作用,导致血小板活化、聚集和血栓形成的病理过程<sup>[17]</sup>。在该过程中,带负电荷的LMWHs链与带正电荷的PF4发生电荷交换,通过与LMWHs链中的硫酸多糖相互作用引起二者构象变化,形成肝素-血小板因子4(heparin-platelet factor 4, HPF4)复合物,该复合物促进机体产生免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体,IgG抗体与HPF4形成IgG-HPF4复合物,进而与血小板表面受体相结合,激活和促进血小板释放多种促凝颗粒,导致血栓形成和血小板损耗<sup>[17-19]</sup>。接受治疗剂量肝素的患者中有0.1%~5.0%会发生HIT,其风险与患者年龄、性别、自身疾病状态有关<sup>[19]</sup>。另一方面,不同LMWHs免疫原性潜力存在差异,这一过程与肝素寡糖链长度、硫酸化程度等因素有关<sup>[18-19]</sup>。前瞻性临床试验发现,LMWHs生物类似药相比原研药品依诺肝素在人体内产生更多IgG,更易引起HIT<sup>[20]</sup>。此外,不同制造商、不同批次的LMWHs生物类似药对人体免疫系统刺激程度不同,这意味着不同LMWHs生物类似药引发HIT的

潜在风险也存在差异<sup>[21]</sup>。

### 3 低分子量肝素的药品监管规范

LMWHs 复杂性高,潜在免疫原性可能造成不良临床事件。为确保 LMWHs 安全、合理用药,建立必要的 LMWHs 监管规范意义重大。

#### 3.1 低分子量肝素生物类似药获批监管

欧美已针对 LMWHs 生物类似药的获批上市出台相关规范,要求 LMWHs 生物类似药应与原研药在结构分析、免疫原性检测、健康受试者的药学特征等方面达到一致性<sup>[6,22]</sup>。我国借鉴国外监管经验,近年来相继颁布《关于低分子量肝素类药品的审评思考》<sup>[23]</sup>、《关于仿制的低分子量肝素类产品新增技术要求的意见》<sup>[24]</sup>,其对 LMWHs 生物类似药获批的技术要求与欧美既定标准基本一致<sup>[25]</sup>。

#### 3.2 低分子量肝素的免疫原性监管

针对 LMWHs 及其生物类似药的免疫原性管理,FDA 要求评估 LMWHs 与 PF4 的相互作用,以及在特定条件下形成的 LMWHs-PF4 复合物大小和电荷<sup>[22]</sup>。欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)结合药物警戒的考量,规定 LMWHs 生物类似药批准程序中应提交符合现行欧盟法规和药物警戒指南的风险管理计划,应尤其注意监测 LMWHs 相关罕见严重不良事件(如 HIT)<sup>[6]</sup>。我国于 2020 年陆续发布《药物免疫原性研究技术指导原则(征求意见稿)》<sup>[26]</sup>、《低分子量肝素类仿制药免疫原性研究基本要求(征求意见稿)》<sup>[27]</sup>,对生物制剂免疫原性研究内容、抗药抗体检测、LMWHs 免疫原性评估要求进行规定。

#### 3.3 低分子量肝素生物类似药命名规范

LMWHs 生物类似药命名与技术审评、批准后的流通应用、临床用药准确性、安全性问题的药品追溯等环节息息相关。各国对生物类似药的命名制定了特殊规则:FDA 规定生物类似药命名由国际非专利名称(international nonproprietary names for pharmaceutical substances, INN)并后缀 4 个无任何意义的小写字母(至少有 3 个字母不同)组成,对既往无后缀的已获批创新生物制品将不再要求做添加后缀的名称变更<sup>[28-29]</sup>;EMA 对生物类似药采用了与参照药相同

的 INN,但规定成员国在处方、发药、销售和不良事件报告时使用商品名和批号加以区分,并要求生物类似药产品说明书和包装标签添加黑色倒三角标志予以提醒<sup>[29]</sup>;我国《生物制品通用名命名指南》<sup>[30]</sup>规定,治疗性生物制品通用名称原则上采用 INN,不再沿用传统结构/功能描述性通用名称。对于已批准上市、采用传统通用名称的治疗性生物制品,如回顾性采用 INN,应证明符合 INN 特定品种下对其结构和作用机理的相关描述<sup>[29-31]</sup>。

#### 3.4 低分子量肝素生物类似药互换使用

随着 LMWHs 生物类似药不断涌入医药市场,其与原研药品的互换使用已成为关注焦点。生物类似药互换使用,可以降低治疗成本,提高药物可及性,加快生物类似药发展,常有转换和替代两种形式<sup>[32]</sup>。但生物类似药互换也面临诸多风险,例如免疫原性、反安慰剂效应等<sup>[33-35]</sup>。欧盟各成员国对生物类似药互换持不同立场,多数国家支持生物类似药转换使用。随着临床数据不断验证或经济政策限制,部分国家开始采用限制性政策替代使用生物类似药,而 EMA 未就生物类似药互换使用提供具体的官方指导建议<sup>[33,36-37]</sup>。美国 FDA 对可互换性态度更为保守,联邦法律将生物类似药分为“生物类似药”和“可互换性生物类似药”两类,后者需提供可互换性研究数据和上市后安全性监测以证明生物相似药具有可互换性。目前 FDA 尚未批准具有可互换性的生物类似药,各州生物类似药互换使用法规处于不同发展阶段<sup>[33]</sup>。我国生物类似药领域起步较晚,对生物类似药互换使用的监管仍在不断完善中,目前药品审评部门或卫生管理部门均未出台明确规定。除医院处方医师外,我国零售药店药师是否有权将生物类似药与其参考药品进行互换仍有待考量<sup>[32,37]</sup>。LMWHs 具有潜在 HIT 风险,部分已上市 LMWHs 生物类似药缺乏大量临床试验验证安全性。此外,针对 LMWHs 生物类似药互换使用的法律规定、指导原则尚待细化和完善,因此,对 LMWHs 互换使用仍应持谨慎态度。

#### 3.5 低分子量肝素生物类似药适应证外推

适应证外推是指将生物类似药适应证从经临床确证的适应证外推到参照药的其他已批准适应证<sup>[38-40]</sup>。FDA 规定适应证外推应证明研究的适应证与参照药无临床意义差异,同时需考虑作用机制、不

同人群药物代谢动力学、预期毒性、免疫原性等因素<sup>[38]</sup>。EMA将生物相似性研究的完整证据链(药理学分析、非临床、临床药物代谢动力学/药效学、临床疗效/安全性等数据)作为判断依据<sup>[39]</sup>。我国2015年颁布的《生物类似药研发与评价技术指导原则(试行)》中要求适应证外推需根据产品特点个案化考虑<sup>[3]</sup>。2021年最新颁布的《生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则》同样遵循个体化原则,并对适应证外推条件予以明确<sup>[40]</sup>。目前已上市的部分LMWHs类似药与原研药品在预防性适应证和治疗性适应证方面存在一定差异,外推使用时应强化对疗效与安全性的监测,个体化制定用药策略。此外,制定有关LMWHs适应证外推的指导原则也是规范化管理的需求之一。

综上,LMWHs生物类似药在临床广泛应用中面临着一些必须解决的问题。首先,LMWHs作为生物来源的多组分复杂药物,生产环节易造成巨大产品差异,且部分结构尚未表征,诸多因素对LMWHs临床安全使用产生潜在不良影响。此外,LMWHs生物类似药获批监管、安全性管理、区分性命名、药品互换、适应证外推等仍是安全性管理的重要关注话题。随着未来对生物类似药不同细分领域相关政策的不断落实,相信包括LMWHs在内的生物类似药管理将更趋完善。

## 【参考文献】

- [1] Sekhon BS, Saluja V. Biosimilars: an overview[J]. Biosimilars, 2011(1): 1-11.
- [2] Jeske W, Walenga J M, Hoppensteadt D, et al. Update on the safety and bioequivalence of biosimilars-focus on enoxaparin[J]. Drug Health Patient Saf, 2013, 5: 133-41.
- [3] 国家药品监督管理局. 国家食品药品监督管理总局关于发布生物类似药研发与评价技术指导原则的通告(2015年第7号)[EB/OL]. (2015-02-18) [2021-04-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20150228155701114.html>.
- [4] Carlos P, Gilberto CH, Ira AJ, et al. Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals[J]. Bio Drugs, 2016, 30(3): 195-206.
- [5] Harenberg J, Cimminiello C, Agnelli G, et al. Biosimilars of low-molecular-weight heparin products: fostering competition or reducing 'biodiversity'?[J]. J Thromb Haemost, 2016, 14(3): 421-426.
- [6] European Medicines Agency. Guideline on Non-Clinical and Clinical Development of Similar Biological Medicinal Products Containing Low-Molecular-Weight-Heparins[EB/OL]. (2016-11-10) [2021-04-24]. <https://www.ema.europa.eu/en>.
- [7] Jacobus RB, Brouwers J, Jeanine E, et al. Biosimilars of low molecular weight heparins: Relevant background information for your drug formulary[J]. Br J Clin Pharmacol, 2019, 85(11): 2479-2486.
- [8] Ludovic D. Low molecular weight heparin biosimilars: how much similarity for how much clinical benefit[J]. Target Oncol, 2012, 7 (Suppl): S35-S42.
- [9] Sultan NB, Robert J, Linhard T. Advances in the preparation and synthesis of heparin and related products[J]. Drug Discov Today, 2020, 25(12): 2095-2109.
- [10] Marcelo AL, Eduardo HC, De F, et al. Structural and pharmacological profile of generic enoxaparins used in Brazil[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2012, 18(4): 379-386.
- [11] Rohitesh G, Moorthy PP. Analysis of sulfates on low molecular weight heparin using mass spectrometry: structural characterization of enoxaparin[J]. Expert Rev Proteomics, 2018, 15(6): 503-513.
- [12] Cafer A, Walter PJ, Debra H, et al. Structural and functional characterization of low-molecular-weight heparins: impact on the development of guidelines for generic products[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2009, 15(2): 137-144.
- [13] Jawed F, Jeanine MW. Why differentiate low molecular weight heparins for venous thromboembolism?[J]. Thromb J, 2007, 5: 8.
- [14] Thomas S, Bettina B, Artem Z, et al. Comparative immunogenicity assessment of biosimilars[J]. Future Oncology, 2019, 15(3): 319-329.
- [15] Zsuzsanna KS, Marcell O, Katalin G. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 69: 185-195.
- [16] Michele K, David G, Huub S. Immunogenicity of biopharmaceuticals[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006; 21(Suppl): S9-S12.
- [17] Ingrid MD, Kamrouz G. Heparin Induced Thrombocytopenia for the perioperative and critical care clinician[J]. Curr Anesthesiol Rep, 2020, 29: 1-11.
- [18] Gowthami MA, Douglas BC. Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia[J]. Transl Res, 2020, 225: 131-140.
- [19] Marie H, Jeffrey SB. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Review of incidence, diagnosis, and management[J]. Vasc Med, 2020, 25(2): 160-173.
- [20] Marise G, Eduardo R, Debra H, et al. An open label, non-randomized, prospective clinical trial evaluating the immunogenicity of branded enoxaparin versus biosimilars in healthy volunteers[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2011, 17(1): 66-69.
- [21] Ernesto L, Pankaj A, Riyaz M, et al. Evaluation of immunostimulatory potential of branded and US-generic enoxaparins in an in vitro human immune system model[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2015, 21(3): 211-222.
- [22] Food And Drug Administration. Immunogenicity-Related Considerations for Low Molecular Weight Heparin Guidance for Industry[EB/OL]. (2016-02) [2021-04-24]. <https://www.fda.gov/media/88253/download>.
- [23] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于低分子量肝素类药品的审评思考[EB/OL]. (2010-11-15) [2021-04-24]. <https://db.yaozh.com/policies/4769.html>.
- [24] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于仿制的低分子肝素类

- 产品新增技术要求的意见[EB/OL]. (2013-11-25) [2021-04-24]. <https://db.yaozh.com/policies/5008.html>
- [25] 石靖, 陈思. 低分子量肝素仿制研究技术要求和监管理念的进展[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(11): 852-857.
- [26] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《药物免疫原性研究技术指导原则(征求意见稿)》意见的通知[EB/OL]. (2020-08-24) [2021-04-24]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=viewInfoCommon&id=d92cbf7b3c5addea>.
- [27] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《低分子量肝素类仿制药免疫原性基本技术要求(征求意见稿)》意见的通知[EB/OL]. (2020-09-15) [2021-04-24]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=viewInfoCommon&id=7d35b44502f08712>.
- [28] Food And Drug Administration. Nonproprietary Naming of Biological Products Guidance for Industry [EB/OL]. (2017-01) [2021-04-24]. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM459987.pdf>.
- [29] 王冲, 周耘, 杨建红, 等. 各国生物类似药命名原则的比对研究及完善我国生物类似药命名原则的建议[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(4): 911-915.
- [30] 国家药典委员会. 生物制品通用命名指南[EB/OL]. (2018-11-21) [2021-04-24]. <https://news.yaozh.com/archive/24797.html>
- [31] 陈昊. 生物类似药的特殊性与监管措施探讨[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(11): 1201-1204.
- [32] 刘聿颀, 张相林. 中、美、日、欧等国家/地区生物类似药监管措施的比较研究[J]. 中国药房, 2020, 31(24): 2961-2965.
- [33] Anurag SR, James GS, Hemlata C, et al. The Global Landscape on Interchangeability of Biosimilars[J]. Expert Opin Biol Ther, 2021, PMID: 33567923.
- [34] Won P, Dae HY, Pedro M, et al. Efficacy and safety of switching from reference infliximab to CT-P13 compared with maintenance of CT-P13 in ankylosing spondylitis: 102-week data from the PLANETAS extension study [J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(2): 346-354.
- [35] Liese B, Hans CE, Paul D, et al. The efficacy, safety, and immunogenicity of switching between reference biopharmaceuticals and biosimilars: a systematic review [J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 108(4): 734-755.
- [36] Josep T, Malvika V, Rosa G, et al. Biosimilars: a position paper of the European Society for Medical Oncology, with particular reference to oncology prescribers [J]. ESMO Open, 2017, 1(6): e000142.
- [37] 里扎·阿德列提别克, 蒋蓉, 邵蓉. 欧盟地区生物类似药可互换性政策与管理实践研究[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(11): 1361-1366.
- [38] Food And Drug Administration. Biosimilar development, review, and approval [EB/OL]. (2017-10-20) [2021-04-24]. <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-development-review-and-approval>.
- [39] European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues [EB/OL]. (2014-12-18) [2021-04-24]. <https://www.ema.europa.eu/en>
- [40] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则》的公告(2021年第18号)[EB/OL]. (2021-02-10) [2021-04-24]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=viewInfoCommon&id=0781c768db1dbe43>.

收稿日期: 2021-05-16 本文编辑: 杨昕