

2
0
1
6

GUÍA DE ESTUDIOS

INTERCAMBIABILIDAD DE LA ENOXAPARINA

GUIA PARA EVALUAR LA INTERCAMBIABILIDAD DE LA ENOXAPARINA

1. OBJETIVO

El objetivo de esta guía es establecer los criterios para demostrar la Intercambiabilidad de productos conteniendo Enoxaparina.

2. ALCANCE

La presente guía es aplicable a los Terceros Autorizados que realicen los estudios para demostrar la intercambiabilidad de Enoxaparina, que serán sometidos a la COFEPRIS para la solicitud de prórroga o como nuevo registro de medicamento genérico.

3. LINEAMIENTOS REGULATORIOS

Corresponde a las unidades clínicas y analíticas Terceros Autorizados la aplicación de esta guía para la realización de estudios de intercambiabilidad de Enoxaparina.

Las unidades clínicas y analíticas Terceros Autorizados que realicen estas pruebas deben cumplir con los requisitos aplicables de la NOM-177 vigente y apegarse en lo dispuesto en la Ley General de Salud, Reglamento de Insumos para la Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Buenas Prácticas Clínicas (ICH) y demás disposiciones aplicables.

La evaluación de la conformidad en la realización de las pruebas de Intercambiabilidad corresponde a la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

4. INTRODUCCIÓN

La enoxaparina es un derivado de bajo peso molecular de la heparina, la cual está constituida por una mezcla de polisacáridos que son variables en longitud, consistiendo de unidades repetidas compuestas de glucosamina y ácidos urónicos (ya sea idurónico o glucurónico) con la siguiente secuencia 1-+4) α -D-glucosaminil- (1-+4) β -D-hexuronosil l)n, por lo que su peso molecular es variable (3 – 6.5kDa, con un promedio de 4.5 kDa).

La enoxaparina se produce mediante la despolimerización de la heparina. Este proceso comprende 2 pasos críticos: a) Esterificación de la heparina para formar el benzil éster y 2) la hidrólisis alcalina el éster bencílico, dando como resultado un producto heterogéneo en la longitud de la cadena de sacáridos, en su composición (sulfato, acetilo) y en el contenido y localización de los grupos funcionales, lo cual puede impactar en la actividad biológica.

La heterogeneidad depende de las características estructurales de la heparina a partir de la cual se produce y del proceso de despolimerización utilizado, por lo que difieren en sus cadenas terminales así como su distribución de las secuencias de disacáridos en las cadenas de oligosacáridos. De igual forma, las impurezas del producto pueden impactar en la inmunogenicidad del mismo.

Es importante entender la diversidad molecular de las heparinas de bajo peso molecular. La heparina es una mezcla de polisacáridos lineales que tienen una longitud variable, consistente en unidades repetidas de disacáridos compuestos por glucosamina y ácido urónico (ya sea ácido idurónico o glucurónico) con la siguiente secuencia de enlace: [(1-4) α -D-glucosaminil-(1-4) β -D-hexuronosilo] $_n$. La diversidad molecular de la heparina se origina de (1) la polidispersidad de la longitud de la cadena (3) y (2) de la diversidad de las unidades de disacáridos en la distribución correspondiente de secuencias de disacáridos en las cadenas de polisacáridos.

5. REQUERIMIENTOS

5.1 CRITERIOS QUE DEBE CUMPLIR UNA ENOXAPARINA PARA SER CONSIDERADA

El laboratorio deberá presentar la siguiente información antes de ejecutar el estudio:

5.1.1 INFORMACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

- Distribución de peso molecular del producto de prueba de enoxaparina utilizando cromatografía de exclusión, en comparación con el de referencia.
- Perfil de resolución de las cadenas de oligosacáridos (Mapeo de cadenas) entre el producto de prueba y el de referencia. Entre otros métodos se podrán utilizar alguna de las siguientes técnicas: cromatografía de intercambio iónico fuerte recubierto de cetiltrimetilamonio, MALDI-MS (espectrometría de masas asistida por ionización desorción láser), GPC-ESI-MS (espectroscopia de masas de ionización por electrospray- cromatografía de permeación de gel), o RPIP-ESI-MS (espectroscopia de masas de ionización por electrospray- fase ~~reversa~~ inversa de iones pareados).
- Composición química general del producto de prueba de enoxaparina con el de referencia por espectroscopia de resonancia magnética nuclear o absorbancia ultravioleta.

5.1.2 BLOQUES DE DISACÁRIDOS, MAPEO DE FRAGMENTOS Y SECUENCIA DE ESPECIES DE OLIGOSACÁRIDOS

Bloques de disacáridos

El análisis de la composición de estos bloques de disacáridos del producto de prueba y el de referencia puede ser realizado mediante alguno de estos métodos: digestión exhaustiva de la enoxaparina con heparinasas I, II, III y por ácido nítrico. Estos bloques de disacáridos individuales pueden ser separados y cuantificados por una variedad de métodos, incluyendo electroforesis capilar,

cromatografía de líquidos de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de líquidos de intercambio aniónico (SAX-HPLC).

Mapeo de fragmentos

Para confirmar si la distribución de las secuencias de los bloques de disacáridos en las cadenas de oligosacáridos son similares para el producto de prueba y el de referencia, se puede emplear la digestión parcial de la enoxaparina con enzimas heparinasas (ej.: heparinasa 1) a oligosacáridos (opuesto a la digestión completa en bloques de disacáridos) seguido de un análisis de estos fragmentos de oligosacáridos utilizando métodos como RPLCHPLC o SAX-HPLC.

Equivalencia en la secuencia de especies de oligosacáridos del producto de prueba y el de referencia.

Se puede realizar a través de MALDI-MS, mediante digestión enzimática y química de oligosacáridos etiquetados fluorescentes en conjunto con el análisis por electroforesis de gel poliacrilamida o por digestión enzimática en conjunto con espectroscopia NMR.

5.1.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Para cumplir este requisito, es importante demostrar que el producto de enoxaparina genérico es equivalente con la enoxaparina de referencia con respecto a los ensayos biológicos in vitro para la actividad anticoagulante con marcadores relevantes.

Para cumplir el criterio de intercambiabilidad en los ensayos bioquímicos, es importante demostrar que la enoxaparina genérica es equivalente a la enoxaparina de referencia con respecto a las medidas de la inhibición del factor Xa (anti-Xa) y la inhibición del factor IIa (anti-IIa).

5.1.4. INTERCAMBIABILIDAD MEDIANTE PERFIL FARMACODINÁMICO IN VIVO

El estudio se llevará a cabo en voluntarios clínicamente sanos, en dosis única, de acuerdo a un diseño cruzado 2 X 2.

La dosis a administrar será de 100 mg, por vía subcutánea.

La comparación de los perfiles farmacodinámicos estará basada en las mediciones de la inhibición de los factores Xa y IIa.

Los parámetros a determinar serán los siguientes: Efecto máximo (Emax) (Anti Xa y Anti IIa), área bajo la curva del efecto (AUEC 0-t y AUEC 0 – infinito), tmax, vida media de eliminación (t1/2) y relación AntiXa/Anti IIa).

Criterio de aceptación: El intervalo de confianza de la media geométrica de la relación prueba/referencia de Emax (Anti Xa) y AUEC 0-t (Anti Xa) deberá estar entre 80 – 125%.

6. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO IN VIVO

Las pruebas de intercambiabilidad se deben realizar con un lote de producción elaborado de acuerdo con la NOM-059-SSA vigente.

El medicamento de referencia será el indicado por la autoridad sanitaria competente y deberá ser adquirido por el patrocinador o por el Tercero Autorizado, contenido en su envase original y con copia de la factura de compra.

Los medicamentos de prueba y de referencia deben tener una fecha de caducidad vigente al momento de ser utilizados en el estudio clínico y analítico, de tal manera que su vigencia abarque toda la duración del estudio.

Los medicamentos de prueba y de referencia deben contar con un certificado analítico en el que se señalen las pruebas de control de calidad realizadas, ya sea proporcionado por el patrocinador o por un laboratorio de prueba, Tercero Autorizado.

Las pruebas de control de calidad tanto para los medicamentos de prueba y de referencia, deben realizarse siguiendo los métodos descritos en farmacopeas reconocidas internacionalmente o empleando métodos validados.

El número de sujetos de investigación evaluables no debe ser menor a 12 y se debe especificar previamente en el protocolo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Hirsch J. et al. Heparin and Low-Molecular Weight Heparin. Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy and Safety. *Chest*, 2001;4S-94S:119-164.

Linhardt 1999; European Pharmacopeia (EP), 5th ed., 2006, Enoxaparin Sodium, at 3493-3494; EP, Dalteparin sodium at 3925-3926, EP, Tinzaparin Sodium, at 2586.

Capila, I., Linhardt, R.J. (2002), "Heparin-Protein Interactions," *Angew Chem Int Ed* 41:391-412.

Linhardt, R.I. (2003), "Heparin: Structure and Activity," *J Med Chem* 46:1-14.

Mulloy, Gray E., Barrowcliffe, T.W. (2000), "Characterization of Unfractionated Heparin: Comparison of Materials From the Last 50 Years," *Thromb Haemost* 84:1052-1056.

Courier, P.A.J., Viskov, C. (2004), "Chromatographic Analysis and Sequencing Approach of Heparin Oligosaccharides Using Cetyltrimethylammonium Dynamically Coated Stationary Phases," *Analytical Biochemistry* 332:299-313.

Mourier, P.A.J. Viskov, C. Chromatographic Analysis and Sequencing Approach of Heparin Oligosaccharides using Cetyltrimethylammonium dynamically coated Stationary Phases. *Analytical Biochemistry*. 2004;332:299-313.

Thanawirron, C, Rice, K.G., Toida, T. Linhardt, R.J. Liquid chromatography Mass Spectrometry Sequencing Approach for Highly Sulfated heparin derived Oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:2608-2615.

Chuang, W., Christ, MD., Rabenstein, D.L. Determination of the Primary Structures of Heparin- and Heparin Sulfate-Derived Oligo saccharides Using Band Selective Homonuclear-Decoupled Two Dimensional HNMR Experiments," *Anal. Chem*. 2001;73:2310-2316.

USP 32-NF 27 (official en Diciembre 1,2009)

Sundarem, M., Qi, Y., Shriver, Z., Liu, D., Zhao, G., Venkaraman, G., Langer, R., Sasisekharan, R. (2003), "Rational Design of Low-Molecular Weight Heparins with Improved In Vivo Activity," *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 651-656.

Toyoda, H., Yamamoto, H., Ogino, N., Toida, T., Imanari, T. (1999), "Rapid and Sensitive Analysis in Heparin and Heparin Sulfate of Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography on a 2 mm Porous Silica Gel Column," *J. Chromatography, A* 830 197-20L

Mourier P., Viskov C., (June 2, 2005), "Method for Determining Specific Groups Constituting Heparins or Low Molecular Weight Heparins," *US Patent Application Publication US2005/0119477 A1*.

Saad, a.M., Leary, J.A. (2003), "Compositional Analysis and Quantification of Heparin and Heparin Sulfate by Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry," *Anal. Chem* 75, 2985-2995.

Stringer, S.E., Balbant, S.K., Pye, D.A., Gallagher, J.T. (2003), "Heparin Sequencing," *Glycobiology* 13(2) 97-103.

Myette, J.R., Shriver, Z., Kislitepe, T., McLean, M.W., Venkataraman, G., Sasisekharan, R. (2002), "Molecular Cloning of the Heparin/Heparin Sulfate 14,5 Unsaturated Glycol Oxidase From *Flavobacterium heparinum*, Its Recombinant Expression in *Escherichia Coli*, and Biochemical Determination of its Unique Substrate Specificity," *Biochemistry*, 41.7424-7434.

Linhardt, R.J., Rice, K.O, Kim, Y.S., Lohse, D.L. Wang, H.M., Loganathan, D. Mapping and quantification of the Major Oligosaccharide Components of Heparin. *Biochem J*. 1988. 254:781- 787.

Chuang, W.L., McAllister, H., Rabenstein, D.L. (2001) "Chromatographic Methods for Product-Profile Analysis and Isolation of Oligo saccharides Produced by Heparinase- Catalyzed Depolymerization of Chromatography, A 932 65-74.

Maddineni, J., Walenga, IM., Jeske, W.P., Hoppensteadt, D.A., Fareed, J., Wah, R., Bick, R.L. (2006), "Product Individuality of Commercially Available Low-Molecular-Weight Heparins and their Generic Versions: Therapeutic Implications, Clinical and Applied," *Thrombosis/Hemostasis* 12:267-276.

Venkatarman, G., Shriver Z., Raman, R., Sasisekharan, R. (1999), "Sequencing Complex Polysaccharides," *Science* 286:537-542.

Shriver, Z., Raman, R., Venkatarman, G., Turnbull, K.J., Toida, T., Linhardt, R., Bieman, K., Sasikharan, R. (2000), "Sequencing of 3-O Sulfate Containing Heparin Decasaccharides with Partial Antithrombin II Binding Site," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10359-10364.

Turnbull, I.E., Hopwood, II, Gallagher, J.T. (1999), "A Strategy for Rapid Sequencing of Heparin Sulfate and Heparin Saccharides," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2698-2703.

Yamada, S., Sakamoto, K., Tsuda, H., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K. (1999), "Structural Studies of Octasaccharides Derived from the Low-Sulfated Repeating Disaccharide Region and Octasaccharide Serine," *Biochemistry* 38 838-847.

Greinacher, A. (1995), "Characterization the Structural Requirements for a carbohydrate based anticoagulant with a reduced risk of inducing the immunological type of heparin-associated thrombocytopenia," *Thrombosis and Haemostasis* 74:886-892.

Newman, P.M., Swanson, R.L. and Chong B.H. (1998), "Heparin-induced thrombocytopenia: IgG binding to PF4-heparin complexes in the fluid phase and cross-reactivity with low molecular weight heparin and heparinoid." *Thrombosis and Haemostasis* 80:292-297.

Planes, A. et al. (1999), "Prevention of Deep Vein Thrombosis after Hip Replacement: Comparison between Two Low-Molecular Heparins, Tinaparin and Enoxaparin," *Thrombosis and Haemostasis* 81: 22-25.

Linhardt, R.J., Gunay, N.S. (1999), "Production and Chemical Processing of Low Molecular Weight Heparin," *Semin Thromb Hemost* 25 S3: 10.

Eriksson, B.I. et al., (1995), "A comparative study of three low-molecular weight heparins (LMWH) and unfractionated heparin (UH) in healthy volunteers," *Thrombosis and Haemostasis* 73: 398- 401.

Rauova, L, Poncz, M, McKenzie, SE et al., 2005, Ultra Large Complexes of PF4 and Heparin are Central to the Pathogenesis of Heparin-induced Thrombocytopenia. *Blood*, 05:131-8. 34

Greinacher, A, Alban, S, Omer-Adam, M A et. al., 2008, Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Stoichiometry-Based Model to Explain the Differing Immunogenicities of Unfractionated Heparin, Low-

Molecular-Weight Heparin, and Fondaparinux in Different Clinical Settings, Thrombosis Research, TR-03320.

Suvarna, S, Qi R, and Arepally, G M, 2009, Optimization of a Murine Immunization Model for Study of PF4/ Heparin Antibodies, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7:857–864.

International Conference on Harmonisation guidances for industry Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances and Q3B (R2) Impurities in New Drug Products.

FDA. Draft Guidance on Enoxaparin Sodium

EMA. Guideline on non clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins

FDA. Guidance. Immunogenicity-Related considerations for the approval of low molecular weight Heparin for NDA and ANDAs

FDA. Draft Guidance on Enoxaparin Sodium

EMA. Guideline on non clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins

FDA. Guidance. Immunogenicity-Related considerations for the approval of low molecular weight Heparin for NDA and ANDAs

Lee S, Raw A, Yu L, et al. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States. Nature Biotechnology. 11: 220-226 (2013)

European Pharmacopoeia. Enoxaparin Sodium

Mourao P, Glauser B et. Al. Propositional Debate on Biosimilar Enoxaparin in Brazil. Arq. Bras Cardiol 98: e 11 –e14 (2012)