

**低分子量肝素类仿制药  
药学研究与评价技术指导原则  
(试行)**

2024年2月

## 一、概述

肝素（heparin）是从哺乳动物组织中提取的一种高度硫酸化的糖胺聚糖。通过与抗凝血酶（antithrombin, AT）结合来增强其对凝血系统中几种丝氨酸蛋白酶的抑制作用，从而达到抗凝血的作用。低分子量肝素（low-molecular-weight heparin, LMWH）是肝素通过不同的解聚法得到的系列产品。LMWH具有与肝素相同的母体结构，但在多糖链的还原末端和非还原末端呈现不同的化学结构。与肝素相比，LMWH具有较低的相对分子质量和良好的临床特性，包括更长的半衰期，更可预测的抗凝血作用和更低的不良反应发生率，如肝素诱导的血小板减少症（heparin-induced thrombocytopenia, HIT）。目前国内已上市的LMWH产品主要包括达肝素钠（dalteparin sodium）、依诺肝素钠（enoxaparin sodium）、那屈肝素钙（nadroparin calcium）等，其它在国外上市的产品有帕肝素钠（parnaparin sodium）、汀肝素钠（tinzaparin sodium，又名汀扎肝素钠或亭扎肝素钠）、贝米肝素钠（bemiparin sodium）、舍托肝素钠（certoparin sodium）、瑞肝素钠（reviparin sodium）和阿地肝素钠（ardeparin sodium）等。

肝素以及LMWH类产品为动物来源的多组分生化药，属于低聚糖混合物，结构复杂且组成不固定。就目前的技术手段而言，尚无法完全表征其精细结构；就同类品种而言，临

床检测指标在识别产品结构差异方面不敏感。因此生产全过程的质量控制是保证本类产品物质基础一致性，进而保证产品质量和疗效一致性的基础。

LMWH制剂的持有人应建立涵盖从猪小肠黏膜（及其来源生猪）到中间体粗品肝素、肝素钠/钙原料药、LMWH原料药、直至LMWH制剂产品全产业链的质量管理体系。依据质量风险管理的原则，结合品种特点，明确从原材料采集至成品放行各阶段的质量管理责任；并在产品的研发、申报以及上市后的全生命周期中持续进行监控和提高，确保产品安全、有效、质量可控。

本指导原则适用于采用猪小肠黏膜制备的LMWH原料药及其注射剂仿制药，旨在已有相关法规和指导原则的基础上，基于LMWH多组分生化药的特殊性，为其仿制药的研发与评价提供技术指导；适用于该类产品上市申请阶段的药学研究和已上市产品的一致性评价研究，已批准仿制药的上市后变更可参照本指导原则基本思路开展研究。

本技术要求的起草是基于对所涉及问题的当前认知，随着药物分析手段的不断提升以及相关法规和技术标准的不断完善，将对本指导原则进行适时修订。

## 二、生产用物料

### （一）猪小肠黏膜

肝素类产品应以猪小肠黏膜为起始原料，即应从产业链

初始端（屠宰场）进行管控，应把粗品肝素生产纳入GMP管理范围内，为LMWH产品建立从动物源头到制剂终产品的全产业链管理。

总体而言，猪小肠应来自于经动物卫生监督机构检疫、检验合格的，符合人类食用标准的健康生猪。生猪屠宰场应具备企业营业执照、定点屠宰证、动物检疫合格证书等合法资质；应设定相关管理措施，避免其它动物交叉污染。猪小肠黏膜应取自新鲜或冷链储运、保藏完好无变质的猪小肠。企业可以自行采集猪小肠进行加工，或是以合同协议方式采购一家或多家供应商的猪小肠进行加工。无论采取哪种方式，上市许可持有人均应制定包括生猪屠宰场在内的供应商筛选与准入标准、供应商清单及定期审计管理计划，确保供应商的正规、合法。猪小肠内控标准可参考《粗品肝素生产质量管理指南》团体标准T/CBPIA 0001-2022要求，并应参照中国药典2020版3部《生物制品病毒安全性控制》中动物体液 / 组织来源制品项下要求和管理，重点考虑动物病毒，特别是人畜共患病毒的风险控制。猪小肠可能被污染的外源因子包括：猪细小病毒、伪狂犬病毒、猪戊型肝炎病毒、乙型脑炎病毒、猪链球菌、口蹄疫病毒、脑心肌炎病毒、猪瘟病毒（含古典猪瘟病毒）等，检测应采用经批准的核酸检测试剂盒检定，结果应为阴性。

## （二）其他物料

除猪小肠黏膜外，生产中所用的其它物料包括肠衣盐、蛋白酶、氢氧化钠、盐酸、乙醇、树脂等；用于特定 LMWH 生产的物料，如达肝素钠、那屈肝素钙生产中使用的亚硝酸钠、依诺肝素钠生产过程中使用的苜蓿氯铵和氯化苜蓿等。

应根据生产工艺的需求拟定相应的物料质量标准，如生产过程中用到离子交换树脂，应明确所用离子交换树脂的来源、型号，树脂的活化方式、再生方案和重复使用次数的限度，说明冲洗过程中树脂上脱落基团的研究和控制情况。如生产过程中涉及过滤步骤，应提供过滤系统详细信息，分析过滤系统与产品的相容性情况，并进行相关研究。

### 三、生产工艺

#### （一）肝素原料药

##### 1.起始物料的选择

肝素原料药应以猪小肠黏膜作为起始物料。

##### 2.生产工艺开发

肝素的生产工艺是从猪小肠黏膜中提取肝素，并将与之共存的蛋白质、核酸、脂质、硫酸皮肤素、硫酸软骨素等可能引起免疫原性的杂质去除的过程。肝素的生产可分为两个阶段：猪小肠黏膜至粗品肝素的生产阶段、粗品肝素至肝素原料药生产阶段。

##### 2.1 猪小肠黏膜至粗品肝素生产阶段：

该阶段应对猪小肠黏膜来源及质量进行严格控制，加强

自猪小肠黏膜至肝素粗品的生产管理及过程控制，从源头控制避免其它物种肠黏膜掺入。对粗品肝素制备工艺进行研究，确定粗品肝素关键质量属性、关键工艺步骤及关键工艺参数。

## 2.2 粗品肝素至肝素原料药生产阶段：

该阶段进一步对粗品肝素中存在的蛋白质、核酸、脂质、硫酸皮肤素、硫酸软骨素等杂质进行去除。应对生产过程中所用物料、试剂、设备、环境等工艺条件可能引入的杂质进行分析评估，将可能引入或者工艺产生的杂质逐一列出，结合工艺原理，对杂质残留进行研究与检测，评估各工艺阶段对杂质的去除能力，必要时增加特定的杂质去除工艺步骤。并根据上述研究结果，确定各杂质的控制策略。

肝素生产工艺中至少应包含从机制上可以互补的两种有效病毒去除/灭活工艺步骤，并分别进行病毒去除/灭活效果验证。病毒灭活研究选则的指示病毒应具有代表性，应选择物料可能污染的病毒和/或者去除灭活/工艺具有针对性的病毒。具体可参照 ICH Q5A 相关规定进行。

## 3.关键工艺参数和过程控制

对于肝素产品而言，去除/灭活病毒的生产工艺尤为重要，涉及去除/灭活病毒的生产工艺参数应列为关键生产工艺参数。

对于粗品肝素，应采用经验证的检测方法进行中间体控制，主要项目应包括动物来源确认、生物活性、多硫酸软骨

素等杂质控制，具体可参考《粗品肝素生产质量管理指南》团体标准 T/CBPIA 0001-2022 要求。

## （二）LMWH 原料药

### 1. 起始物料的选择

LMWH 原料药可选择猪小肠黏膜或已上市肝素原料药为起始物料。用于生产 LMWH 所用的肝素原料药质量应符合现行版《中国药典》要求，应明确其来源为猪小肠黏膜，符合外源因子、病毒灭活、检验检疫等要求；对可能影响解聚顺序的硫酸软骨素、乙酰肝素或硫酸皮肤素等高分子杂质，应结合对参比制剂的分析研究以及自制品工艺去除能力，制定控制限度标准。

### 2. 生产工艺开发

LMWH 的生产是有控制的将肝素进行解聚，使其分子量达到目标范围的过程；常用的解聚模式包括  $\beta$ -消除降解法、亚硝酸降解法、过氧化氢降解法、酶降解法等。由不同方法制备的 LMWH，其糖链组成及末端结构不同。LMWH 应采用与参比制剂对应原料药相同的解聚模式，工艺步骤和工艺参数选择应有充分的文献依据和实验依据，应保证工艺过程的重现性和产品质量的批间一致性。

### 3. 关键工艺参数和过程控制

应重点关注关键工序（如解聚、氧化等）及反应条件（如解聚温度、pH、时间等），依据工艺开发和多批次原料药生产

阶段的工艺监控信息，拟订合理的过程控制项目及可接受标准。

如采用亚硝酸降解法，应关注亚硝酸盐及 N-NO 杂质的残留，必要时增加 N-NO 去除工艺（如辐照）。如采用  $\beta$ -消除降解法，应关注苜索氯铵及氯化苜的残留，拟定合理的控制限度。

### （三）LMWH 制剂

#### 1. 生产工艺开发

LMWH 仿制制剂的剂型、处方及处方组成应与参比制剂一致，包括处方中的渗透压调节剂及酸碱调节剂的种类及用量，也建议与参比制剂保持一致。

需参照《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》及 NMPA 发布的相关指导原则，对 LMWH 仿制药生产工艺开展研究。

#### 2. 关键工艺参数和过程控制

关键工艺参数控制范围应有详尽的工艺研究与验证数据作为支持。应对制剂产品是否需充氮保护进行充分论证。

过程控制选择的检测指标应结合工艺步骤具有针对性，检测方法应经过适宜的方法学验证。

## 四、质量一致性研究与评价

### （一）质量一致性研究

LMWH 类产品是多组分混合物，其组成比例不固定。即

即使是参比制剂，其批间差异也是存在的。所以仿制药与参比制剂的质量对比类似于两个数据集之间的比较，所谓一致是统计学概念上的一致。

由于质量研究中各项目与药品疗效之间的相关性尚未完全得到确认，基于目前方法的检测能力，最大限度的保持与参比制剂的一致性通常是认可的方式。

单一的检测项目通常仅能够反映多组分混合物少量的质量信息，无法确定整体的一致性。通常可接受的方式是对仿制药与参比制剂进行多种手段、多个维度、多个结构部位的平行对比研究，利用相互佐证的方法来确证二者的一致性。

目前，进行仿制药与参比制剂质量一致性的评价，一般从肝素原料和解聚模式、理化性质、结构和组成、体外生物学活性、免疫原性等方面进行综合评估。

## 1. 肝素原料和解聚模式的一致性研究

仿制药的肝素原料（如来源、质量控制等）和解聚模式应与参比制剂一致，具体要求详见“三、生产工艺（一）肝素原料药和（二）LWMH原料药”。

## 2. 理化性质的一致性研究

### 2.1 常规理化指标

常规理化指标通常包括分子量和分子量分布、pH值、氮含量、硫酸根与羧酸根离子摩尔比、紫外最大吸收和比吸收系数（依诺肝素钠）、钠含量、钙含量（那屈肝素钙）等，仿

制药应与参比制剂一致。

## 2.2 杂质

杂质通常包括脂质、核酸、蛋白、游离硫酸盐、苯甲醇残留（依诺肝素钠）、亚硝酸盐残留和 N-NO 基团（那屈肝素钙、达肝素钠）等，仿制药的杂质水平应不高于参比制剂。

## 3. 结构与组成一致性研究

结构与组成方面可进行包括（但不限于）单糖组成、二糖结构单元、寡糖片段分布、寡糖序列、特征末端结构等的对比研究。该部分研究结果可与理化性质和生物活性效价的考察相互印证，结构与组成方面的研究通常不需要全部定入质量标准，但应选择部分具有代表性的项目，在生产过程中进行持续的积累，以便于产品生命周期中的回顾性研究。

### 3.1 单糖组成的对比

肝素是由葡萄糖醛酸和葡糖胺组成的多糖混合物，不同种属来源的肝素在单糖种类及比例上有所差异。

单糖组成的测定可以采用全降解的方法，将 LWMH 采用强酸（如三氟醋酸等）在高温条件下进行水解，使糖苷键完全断裂，然后采用柱前衍生化的 HPLC 方法对所得到的单糖进行分析，同时可获得葡糖胺和葡萄糖醛酸的比例等信息。

但是，传统的强酸降解方法可能会使得低分子肝素在糖苷键断裂的同时造成糖环的破坏和各种取代基的脱落。而核磁共振（NMR）技术可在 LWMH 不水解的情况下，甄别其

中各单糖的信号峰，并通过峰面积的积分对各种单糖进行定量分析。

LWMH 的单糖组成以及 N-乙酰基、N-硫酸基和 O-硫酸基的位置可根据核磁共振一维谱图( $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$ )和二维谱图(异核单量子相关谱 HSQC)进行确定。不同取代单糖在核磁共振图谱中的信号峰位置不同。例如:氮磺酸化的葡糖胺(ANS)的 H2 信号、艾杜糖醛酸(I)的 H1 信号、C6 位磺酸化的葡糖胺(A6S)的 C6 信号皆在核磁图谱的不同位置有特征信号峰。对不同的碳、氢信号峰进行积分，可以得到不同取代模式单糖的比例。如:不同取代模式的葡萄糖胺(N-磺酸化葡萄糖胺、N-乙酰化葡萄糖胺、C6-磺酸化的葡萄糖胺等)所占的比例;不同取代模式的糖醛酸(艾杜糖醛酸、C2-磺酸化的艾杜糖醛酸、葡萄糖醛酸、C2-磺酸化的不饱和糖醛酸、不饱和糖醛酸)所占的比例。

### 3.2 二糖结构单元的对比

二糖结构单元的测定对于 LMWH 产品的结构确证非常重要。肝素是由葡萄糖醛酸和葡萄糖胺组成的双糖单位重复连接构成的大分子糖链。由于葡萄糖醛酸和葡萄糖胺上的某些位置上(糖的 2 位、3 位、6 位)可以有不同的取代基(乙酰化、硫酸化)，因而组成肝素钠糖链上的每一个单糖就有多种可能。这样就造成了肝素双糖单元的多样化。最常见的二糖单元有 8 种。目前，这些双糖标准品均已商品化，可以作为

定性用对照品。

双糖组成的测定一般利用混合肝素酶（肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III），对 LMWH 进行彻底酶解，得到双糖结构单元，然后可以对这些双糖结构单元进行组成分析。可以选取不同分离原理的色谱方法（如强阴离子交换色谱、亲水相互作用色谱、反向离子对色谱等）进行液相色谱或色谱串联质谱，对二糖结构单元进行定性和定量分析，对比评估仿制药与参比制剂的一致性。

### 3.3 寡糖片段分布的对比

通过单一酶（如肝素酶 I）的选择特异性，将低分子量肝素部分酶解，获得糖片段后，用不同分离原理的方法（如强阴离子交换色谱、亲水相互作用色谱等）进行液相色谱或色谱串联质谱研究。可对重复低聚糖序列片段的指纹图谱进行定性和相对定量分析，并对比评估仿制药与参比制剂的一致性。

### 3.4 寡糖序列的对比

利用不同分离原理的方法（如分子排阻色谱、亲水相互作用色谱、ATIII 亲和色谱法等）对 LMWH 中寡糖进行分离。然后使用高分辨率的分析技术检测，并对比评估仿制药与参比制剂的一致性。

因为较短的寡糖对工艺条件的变化较为敏感，故在本部分的评价中，重点是较短的寡糖，不需要对 LMWH 原料药

中的所有寡糖进行测序。

### 3.5 特征末端结构

单糖组成研究部分已涵盖了末端结构确定的内容。除使用紫外吸收光谱、红外光谱、核磁共振对特征官能团（羧酸、4-烯醇式吡喃糖醛酸、异头碳）进行定性验证外，可在二糖谱分析过程中，对含有特征末端结构的二糖进行定性和定量。例如，1, 6-酞环状结构是依诺肝素钠的还原端特征结构，可利用肝素酶 I,II,III 联合酶解，将肝素彻底解聚，对含有 1,6 酞环状结构的组分(1,6-anhydro- $\Delta$ IS-IS、1,6-anhydro- $\Delta$ IS、1,6-anhydro- $\Delta$ IIS)进行定性和定量。同理，达肝素钠和那屈肝素钙的还原末端的结构（6-O-硫酸-2,5-脱水-D-甘露醇）亦可在二糖谱分析时进行确证。

### 4.生物学和生化活性对比研究

对仿制药和参比制剂进行的生物学活性和生化活性的对比研究一般包括（但不限于）抗 FXa 活性、抗 FIIa 活性、抗 FXa/抗 FIIa 活性比、aPTT、HEPTEST 等，仿制药应与参比制剂一致。

### 5.免疫原性研究

LMWH 类产品存在免疫原性风险，应参考《低分子量肝素类仿制药免疫原性基本技术要求（试行）》、《药物免疫原性研究技术指导原则》进行研究，仿制药的免疫原性风险应不高于参比制剂。

## 6.检测项目的可接受标准

对于已有可参考标准的项目，如分子量和分子量分布、末端结构含量等，仿制品检测结果应满足标准要求。

对于尚无可参考标准的项目，应结合项目与临床安全有效性的关联程度、在评估结构一致性的方面的重要程度、检测方法的准确性及可重现性、以及多批次参比制剂的实际结果等进行综合评估，选择适宜的统计分析方法、制定合理的可接受标准，并评价仿制药与参比制剂是否存在显著差异。

可采用统计方法包括： $t$ -检验、主成分分析或偏最小二乘判别多元分析、Kappa 一致性检验等。也可以采用其他评估方法（如质量范围方法）来评估 LMWH 仿制药与参比制剂的差异。通常情况下，用于定量评估的质量范围定义为  $(\mu_R - X\sigma_R, \mu_R + X\sigma_R)$ ，其中  $\mu_R$  为检测样本的平均值， $\sigma_R$  为标准偏差，系数  $X$  的设定应根据质量属性的风险等级进行科学论证，仿制药足够批次（如 90%以上）的检测结果落在参比制剂质量范围内，则认为该研究项目仿制药与参比制剂无显著差异。

## 7.试验样品的要求

仿制药与参比制剂批次和批次量的选择，以保证所获数据结果的代表性和统计学意义为原则。如制剂样品应具有足够的批次数，以体现仿制药和参比制剂的批间差异性；制剂样品应处于不同效期阶段，以反映稳定性期间样品质量属

性；应选取不同批次肝素原料药、低分子肝素原料药制备的制剂，以体现物料质量、生产工艺对样品质量属性的影响。

## 8.分析方法的要求

LMWH 类产品为组成和比例均未完全确证的混合物，仿制药与参比制剂质量一致性研究具有复杂性、不确定性，故所选择的分析方法应具有足够的灵敏度和适用性，能够识别仿制药与参比制剂的分子结构或杂质谱等质量的微小差异。要求对分析方法的适用性进行评估，并进行充分的方法验证。此外，建议增加阳性/阴性样品的制备和研究。这对于部分可能影响结构的生产工艺参数的考察确认、分析方法的开发和验证的辨识度，以及质量标准的指标限度制定合理性及科学性均较为重要。

### （二）质量标准

在 LMWH 类仿制药和参比制剂全面质量一致性研究的基础上，参照国内外药典标准、参比制剂文献资料，结合仿制药的生产工艺、产品特性等拟定质量标准。

#### 1.原料药的质量标准

原料药的质量标准中通常包括，但不限于以下项目：

性状：通常包括外观、引湿性、溶解度。

鉴别：除化学鉴别、紫外-可见分光光度法、钠盐（或钙盐）鉴别试验外，还应参照生物检定统计法（中国药典 2020 年版四部通则 1431）进行了抗 Xa 因子效价/抗 IIa 因子效价

的鉴定。

检查：应包括主要的理化性质如酸碱度（pH 值）、溶液的澄清度与颜色、分子量与分子量分布、硫酸根与羧酸根摩尔比、钠或钙离子含量、氮含量、铵盐及有关物质如硫酸皮肤素和硫酸软骨素、游离硫酸盐等。同时，还应进行脂质、核酸、蛋白残留的研究，并结合原料药的合成工艺进行苯甲醇、亚硝酸盐、N-NO 基团、过氧化氢、氯化苄的研究，根据研究结果酌情订入质量标准。具有警示结构的杂质如过氧化氢、氯化苄的研究和控制策略应符合 ICHM7 的要求。

效价测定：采用生物检定统计法（中国药典 2020 年版四部通则 1431）进行抗 Xa 因子效价、抗 IIa 因子效价测定，根据多批仿制药检测结果拟定合理的限度，原则上不低于药典标准。

## 2. 制剂的质量标准

LMWH 类仿制药为注射剂，拟定质量标准时需为原料药关键质量属性基础上增加如无菌、细菌内毒素等注射剂的一般质量属性要求，具体项目参照（中国药典 2020 年版四部通则 0102 注射剂）拟定。考虑到肝素原料为生物来源，为保证注射剂的安全性，需参照（中国药典 2020 年版四部通则 9301 注射剂安全性检查法应用指导原则）进行如异常毒性、过敏反应、降压物质等安全性检查，仿制药的安全性检查应符合要求，评估后酌情订入质量标准。

## 五、包装和稳定性研究

仿制药包装形式建议与参比制剂保持一致，否则应提供充分的合理性依据。

应参照《中国药典》2020年版四部通则 9001 原料药物与制剂稳定性试验指导原则，以及《化学药物（原料药和制剂）稳定性研究技术指导原则（修订）》规范开展原料药及制剂的稳定性研究，确保仿制药稳定性不低于参比制剂。

## 六、参考文献

1. 《中华人民共和国药典》2020年版
2. Ph.Eur.11th: Heparins, low-molecular-mass
3. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007: Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins.10 November 2016
4. EU GMP Annex 2: Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use
5. FDA: Guidance for Industry: Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality, June 2013
6. FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity-Related Considerations for Low Molecular Weight Heparin, February 2016
7. Lee S, et al. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States. Nature

Biotechnology, 2013, 31(3):220-2262013

8. 中国生化药品协会 《粗品肝素生产质量管理指南》  
团体标准 T/CBPIA 0001-2022

9. ICHQ5A: Viral Safety Evaluation of Biotechnology  
Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin

10. 国家食品药品监督管理局药品审评中心.《生物组织  
提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评  
一般原则》(20070823)

11. 国家药品监督管理局药品审评中心.《化学药品注射  
剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》(2020年第2号)

12. 国家食品药品监督管理局.《关于发布化学药品注  
射剂和多组分生化药注射剂基本技术要求的通知(国食药监  
注[2008]7号)》

13. the FDA response to citizen petition, Docket No. FDA-  
2003-P-0273

14. 陈思,石靖.低分子肝素类药品的质量控制.中国新药  
杂志.2018,(3):285-289

15. 张震.低分子肝素的结构确证研究.中国新药杂志.  
2014,23(8):901-906

16. CDE 电子刊物 20101110 依诺肝素钠药学研究资料  
基本要求

17. CDE 电子刊物 20101115 关于低分子量肝素类药品  
的审评思考

18. 国家药品监督管理局药品审评中心.《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》（20150228）

19. 国家药品监督管理局药品审评中心.《生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则》（20210218）

20. 国家药品监督管理局药品审评中心.《低分子量肝素类仿制药免疫原性研究指导原则（试行）》（20210806）

21. 国家药品监督管理局药品审评中心.《药物免疫原性研究技术指导原则》（2021年第25号）

22. ICH M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk

23. 国家食品药品监督管理总局.《化学药物（原料药和制剂）稳定性研究技术指导原则（修订）》