

Оценка биоэквивалентности ветеринарных лекарственных средств.

1. Общие положения

Изучение биоэквивалентности (фармакокинетической эквивалентности) лекарственных средств является основным видом оценки воспроизведенных (генерических) лекарственных средств, не отличающихся лекарственной формой и содержанием действующего(их) вещества(в) от соответствующих оригинальных лекарственных средств. Исследования биоэквивалентности позволяют сделать обоснованные заключения о том, что исследуемый препарат по фармакотоксикологическим свойствам и клинической эффективности не будет отличаться от ранее зарегистрированного оригинального (референтного) лекарственного средства.

Настоящий документ (далее по тексту Документ) определяет требования к объему исследований для подтверждения биоэквивалентности и оформлению документации по результатам проведенных исследований.

Документ предназначен для предприятий, организаций и учреждений, занимающихся разработкой лекарственных препаратов для ветеринарного применения и проведением доклинических и клинических исследований, для научно-экспертных организаций и регуляторных органов, а также экспертов и инспекторов, осуществляющих экспертизу на этапе регистрации лекарственных средств и инспектирование организаций и учреждений, в которых проводят исследования биоэквивалентности.

Документ рекомендуется применять при планировании и проведении исследований по биоэквивалентности лекарственных препаратов для ветеринарного применения, а также при составлении регистрационного досье и его экспертизе.

В Документе указаны формы лекарственных средств, для которых проводятся исследования биоэквивалентности, методики исследования биоэквивалентности и принципы анализа фармакокинетических данных при однократном и многократном введении лекарственных средств, процедура статистической оценки результатов исследования биоэквивалентности, порядок оформления отчета и протокола исследований.

2. Термины и определения

Биодоступность – это скорость и степень, с которой действующее(ие) вещество(а) и/или его(их) активный(ые) метаболит(ы), достигают системного кровотока (степень всасывания) относительно дозы лекарственного средства, введенной в организм.

Биоэквивалентность - два лекарственных препарата являются биоэквивалентными, если они обеспечивают одинаковую биодоступность действующего(их) вещества(в) при сходной скорости всасывания, распределения и выведения.

Биоэквивалентность – отсутствие разницы (при установленной степени достоверности) в биодоступности действующего(их) вещества(в) или его (их) метаболитов и в их распределении при введении оригинального и воспроизведенного препаратов в одной и той же дозе и при одинаковых условиях. Если для подтверждения биоэквивалентности используется концентрация действующего вещества в крови исходят из предположения, что, если два препарата имеют эквивалентные степень и скорость всасывания действующего вещества в кровяное русло, они будут обладать одинаковой терапевтической эффективностью. Исследования биоэквивалентности предполагает, что фармакокинетически эквивалентные (биоэквивалентные) оригиналу воспроизведенные лекарственные средства обеспечивают одинаковую эффективность и безопасность фармакотерапии, т.е. что они являются терапевтическими эквивалентами.

Лекарственные препараты - лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Лекарственная форма - состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта;

Оригинальный лекарственный препарат – препарат с новым действующим веществом, впервые зарегистрированный в Евразийском экономическом союзе на основании представления полного регистрационного досье, качество, эффективность и безопасность которого подтверждены результатами доклинических и клинических исследований.

Референтный лекарственный препарат - препарат, зарегистрированный в Евразийском экономическом союзе должны на основании представления полного регистрационного досье, качество, эффективность и безопасность которого подтверждены результатами доклинических и клинических исследований.

Воспроизведенный лекарственный препарат (дженерик) - лекарственный препарат, имеющий такой же количественный и качественный состав действующих веществ и ту же лекарственную форму, что и референтный препарат, и биоэквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждается соответствующими исследованиями биодоступности.

Фармацевтические субстанции - лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность.

Вспомогательные вещества - вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Доза лекарственного препарата - количество действующего вещества лекарственного препарата на одно применение (однократное или многократное применение).

Дозировка лекарственного препарата - количественно выраженное содержание действующих веществ в единице дозирования, объема или массы в соответствии с лекарственной формой.

3. Протокол исследований

Основной целью при составлении протокола исследования биоэквивалентности является получение достоверных результатов, позволяющих с необходимой степенью достоверности сделать вывод, что воспроизведенный лекарственный препарат будет эквивалентен оригинальному (референтному) препарату по терапевтической эффективности и безопасности. Исследования следует проводить в научно-исследовательских центрах или лабораториях, организованных в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, GLP (Good Laboratory Practice) или GCP (Good Clinical Practice). Исследования биоэквивалентности, проведенные вне территории Евразийского экономического союза должны быть проведены в условиях, не противоречащих настоящему Документу.

3.1. Объекты исследований

Объектами исследований биоэквивалентности являются воспроизведенные лекарственные препараты, предназначенные для парентерального, энтерального и

наружного применения, при условии, что их действие обусловлено появлением действующего вещества в системном кровотоке.

Исследования биоэквивалентности не проводятся в отношении:

- иммунобиологических лекарственных препаратов;
- препаратов на основе биомассы, протеинов или пептидов;
- препаратов, концентрация которых в сыворотке/плазме крови не определяет их эффективность в месте действия (например, препараты для наружного применения, которые оказывают эффект в месте нанесения; препараты для интрацистернального или внутриматочного введения).

В качестве препарата сравнения следует использовать соответствующий референтный препарат, если с момента его регистрации на территории Евразийского экономического союза прошло не менее 6 лет либо имеется письменное согласие разработчика референтного препарата. В случае окончания срока регистрации референтного препарата, возможно использование его аналога при соблюдении следующих условий:

- ранее установлена его биоэквивалентность оригинальному лекарственному препарату;
- препарат зарегистрирован в Евразийском экономическом союзе;
- препарат широко применяется в ветеринарии и животноводстве;
- подтверждены его качество, безопасность и эффективность.

Массовая доля действующего(их) вещества(в) в воспроизведенном лекарственном препарате может отличаться от массовой доли действующего(их) вещества(в) в референтном препарате не более, чем на $\pm 5\%$. Действующее вещество в референтном и в воспроизведенном препаратах должно иметь одинаковую молекулярную форму (с учетом возможности образования комплексных ассоциатов действующего вещества с противоионами и другими веществами). Качественный и количественный состав вспомогательных веществ в воспроизведенном и референтном препаратах может отличаться при условии, что эти различия не оказывают влияния на биодоступность и токсичность действующего(их) вещества(в). Лекарственная форма воспроизведенного препарата должна быть такой же, как и у референтного препарата.

В протоколе исследования должна быть представлена следующая информация о референтном препарате: наименование (торговое и международное непатентованное), содержание действующего вещества, лекарственная форма, номер серии, срок годности, название организации-производителя.

Информация о воспроизведенном лекарственном препарате должна включать: наименование (торговое и международное непатентованное), содержание действующего вещества, лекарственная форма, качественный состав вспомогательных веществ, номер серии, объем серии, дату производства, срок годности, название организации-производителя.

Образцы воспроизведенного лекарственного препарата, взятые для исследования биоэквивалентности, должны быть отобраны от серии препарата, произведенной в промышленном объеме в соответствии с отработанным и утвержденным регламентом на производство препарата (промышленным регламентом). Качественный и количественный состав и технология производства препарата, использованного в исследованиях биоэквивалентности, должны соответствовать составу и технологии производства препарата, который будет выпускаться в промышленном масштабе.

Перед началом исследования биоэквивалентности необходимо провести анализ образцов воспроизведенного и референтного препаратов на соответствие требованиям качества по содержанию и подлинности действующего(их) вещества(в). Предпочтительно при изучении биоэквивалентности использовать референтный препарат, в котором содержание действующего вещества отличается от воспроизведенного препарата не более, чем на $\pm 5\%$.

3.2. Выбор дозы лекарственного препарата

Дозы референтного и воспроизведенного препаратов должны быть одинаковыми. При выборе дозы в пересчете на действующее вещество следует руководствоваться утвержденной инструкцией по применению референтного препарата, а не определенной при контроле качества массовой долей действующего вещества в препарате. В случае, если содержание действующего(их) вещества(в) в референтном и воспроизведенном препаратах отличается более, чем на $\pm 5\%$, при расчете дозы для введения рекомендуется провести пересчет на действующее вещество. Данная процедура должна быть включена в протокол исследования или оформлена как дополнение к нему.

Если препарат может применяться в разных дозах, предпочтительнее использовать максимальную рекомендованную для референтного препарата дозу, так как в этом случае легче выявить возможные различия в лекарственных формах испытуемого и референтного препаратов. Если представлено научное обоснование нецелесообразности использования максимальной рекомендованной до-

зы и доказано, что референтный препарат обладает линейной фармакокинетикой в рекомендованном диапазоне доз, можно использовать любую дозу из этого диапазона. Если фармакокинетика референтного препарата не линейна в рекомендованном диапазоне доз (например, вследствие низкой растворимости) следует изучать биоэквивалентность в максимальной и в минимальной рекомендованной дозе.

В случае, если при введении терапевтической дозы действующее(ие) вещество(ва) в крови не достигают доступных для измерения современными методами значений, можно испытывать более высокие дозы, но не более трехкратной терапевтической дозы. Увеличение дозы должно быть научно обосновано, в том числе должно быть доказано, что введение трехкратной дозы референтного препарата имеет тот же профиль безопасности для данного вида животных и референтный препарат в расширенном диапазоне доз обладает линейной фармакокинетикой.

При использовании перекрестного дизайна каждому животному следует вводить лекарственный препарат в одной и той же дозе во все периоды исследования. Если исследование проводится на быстро растущих животных, дозу препарата по действующему веществу можно корректировать в пересчете на килограмм массы животного.

Подготовку препарата к введению животным следует проводить таким образом, чтобы это не оказало влияния на результаты исследования. Если индивидуальная доза препарата очень мала и ввести точное количество вещества технически трудно, испытуемый и референтный препараты можно предварительно растворить в небольшом количестве инертного растворителя (например, физиологического раствора или 2% раствора крахмала). Для лекарственных препаратов в форме таблеток с риской допускается использование половинок таблеток в том случае, если нормативной документацией на препарат предусмотрен контроль однородности дозирования половинок таблеток.

Если лекарственный препарат выпускается в одной лекарственной форме, но с разной дозировкой, исследование биоэквивалентности проводится с одной дозировкой при соблюдении следующих условий:

- качественный состав лекарственных форм с разной дозировкой одинаков (за исключением красителей и ароматизаторов);
- соотношение между содержанием действующего вещества и вспомогательных веществ в лекарственных формах с разной дозировкой одинаково;

- технология производства лекарственных препаратов с разной дозировкой одинакова;
- фармакокинетика действующего вещества линейна в терапевтическом диапазоне.

Если лекарственная форма рекомендована для группового применения в смеси с кормом или водой, а действующее(ие) вещество(а) дозируется на 1 л воды или 1 кг корма, то возможно изучение биоэквивалентности, в случае если концентрация действующего(их) вещества(в) в воспроизведенном препарате отличается от концентрации действующего(их) вещества(в) в референтном препарате, но не более чем на $\pm 20\%$.

3.3. Кратность введения

В протоколе исследования биоэквивалентности должно содержаться научное обоснование выбора кратности введения препарата.

В большинстве случаев изучение биоэквивалентности предполагает однократное введение испытуемого и референтного препаратов и применяется как для препаратов с немедленным высвобождением действующего вещества, так и для препаратов с модифицированным высвобождением (контролируемое, пролонгированное и замедленное). При отсутствии научного обоснования для многократного введения, при составлении протокола опыта следует выбрать однократное введение лекарственных препаратов, так как данный подход скорее позволяет выявить возможные различия в высвобождении действующего вещества из лекарственной формы и в его поступлении в системный кровоток.

Для препаратов с замедленным высвобождением действующего вещества, предназначенных для многократного введения и имеющих тенденцию к накоплению в организме, возможно изучать биоэквивалентность после многократного введения. В таком случае при планировании исследования следует руководствоваться утвержденными рекомендациями по применению референтного препарата. Для таких препаратов важным параметром, который следует оценивать при изучении биоэквивалентности, является концентрация действующего вещества в крови при равновесном состоянии, определенная непосредственно перед введением следующей дозы препарата (C_{trough}).

Кроме того, изучать биоэквивалентность при многократном введении можно в следующих случаях:

- имеет место насыщаемое выведение;

- чувствительность аналитического метода недостаточна для получения статистически достоверных результатов, характеризующих фармакокинетику вещества в крови после однократного введения препарата.

Однако, принимая во внимание, что исследования с многократным приемом менее чувствительны для определения различий в Стах, их проведение допустимо только в том случае, если заявитель сможет однозначно доказать, что чувствительность аналитического метода не может быть улучшена, и что после приема однократной дозы лекарственного препарата точно измерить концентрацию исходного соединения невозможно, принимая во внимание при этом, что в исследованиях биоэквивалентности допустимо, представив соответствующие обоснования, использовать дозы, превышающие терапевтические.

3.4. Путь введения

При выборе пути введения лекарственного препарата в рамках исследования по изучению биоэквивалентности следует руководствоваться следующими правилами:

- одинаковый путь и место введения для испытуемого и референтного препаратов;
- если референтный препарат выпускается в разных лекарственных формах, биоэквивалентность следует изучать для каждой лекарственной формы отдельно;
- если для референтного препарата предусмотрены разные пути введения, при планировании исследования следует либо привести научное обоснование взаимозаменяемости разных путей введения (например, при подкожном и внутримышечном путях введения фармакокинетический профиль может быть сходным), либо проводить исследование при всех рекомендованных путях введения (например, при внутривенном и внутримышечном путях введения фармакокинетика будет различной, поэтому их нельзя считать взаимозаменяемыми).

3.5. Дизайн исследования

Независимо от того, какая схема введения препаратов будет выбрана, дизайн исследования должен быть описан в протоколе исследования биоэквивалентности. При изучении биоэквивалентности (как при однократном так и при многократном введении препарата) наиболее часто используются перекрестный и параллельный дизайны; в некоторых случаях используют альтернативные схемы: повторный и последовательный дизайны.

3.5.1. Перекрестный дизайн

Перекрестный дизайн предусматривает одновременное введение двум группам животных референтного и испытуемого препаратов и затем после определенного периода времени группы животных меняют местами. Схематично перекрестный дизайн выглядит следующим образом:

| | Группа I | Группа II |
|----------|----------------------|----------------------|
| Период 1 | Испытуемый препарат | Референтный препарат |
| Период 2 | Референтный препарат | Испытуемый препарат |

Преимуществом перекрестного дизайна является то, что каждое животное последовательно получает и испытуемый и референтный препараты, что позволяет снизить вероятность ошибки, обусловленной индивидуальной вариабельностью в распределении и выведении действующего(их) веществ(в). Перекрестный дизайн также позволяет провести опыт на небольшом количестве животных.

При планировании перекрестного дизайна необходимо гарантировать, что введенные в Период 1 лекарственные препараты не повлияют на фармакокинетику препаратов в Период 2, в противном случае исследование даст ложные результаты. С этой целью продолжительность периода между обработками (период отмывки) должна быть такой, чтобы обеспечить максимально полное выведение действующего(их) вещества(в) и его (их) метаболитов из организма животного, а также отсутствие остаточных физиологических эффектов от введения лекарственных препаратов в Период 1, которые могут оказать влияние на фармакокинетику действующего(их) вещества(в) в Период 2. Для большинства препаратов рекомендовано устанавливать период между обработками не менее, чем шестикратный период полувыведения действующего(их) вещества(в) и/или его метаболитов.

При изучении биоэквивалентности препаратов на основе эндогенных субстанций очень сложно количественно учесть эффект переноса, что может существенно исказить результаты. Продолжительность периода между обработками должна быть научно обоснована, а также базовый уровень эндогенного вещества в крови, определенный перед первым периодом обработки, должен соответствовать базовому уровню перед вторым периодом обработки.

3.5.2. Параллельный дизайн

Параллельный дизайн предполагает одновременное введение двум группам животных испытуемого и референтного препаратов.

Схематично параллельный дизайн выглядит следующим образом:

| | Группа I | Группа II |
|----------|---------------------|----------------------|
| Период 1 | Испытуемый препарат | Референтный препарат |

Параллельный дизайн целесообразно использовать в следующих случаях:

- действующее вещество или его метаболиты вызывают определенные физиологические изменения в организме животного, которые впоследствии могут повлиять на фармакокинетику этого вещества при повторном введении;

- действующее вещество или его метаболиты имеют очень длительный период полувыведения или тенденцию к кумуляции в организме, в связи с чем повышается риск присутствия остаточных количеств препаратов после первого периода обработки;

- необходимость очень длительного периода между обработками, что может привести к существенным изменениям в физиологическом состоянии опытных животных;

- общий объем крови в организме животного исключает возможность повторного исследования.

При использовании параллельного дизайна следует учитывать, что на результаты исследования в значительной степени может повлиять индивидуальная вариабельность, в связи с чем количество животных в группе должно быть достаточным для получения однородных и статистически достоверных результатов.

3.5.3. Повторный дизайн

Повторный дизайн предполагает, что как минимум один период обработки повторяется. Схематично повторный дизайн выглядит следующим образом:

| | Группа I | Группа II |
|----------|----------------------|----------------------|
| Период 1 | Испытуемый препарат | Референтный препарат |
| Период 2 | Референтный препарат | Испытуемый препарат |
| Период 3 | Испытуемый препарат | Референтный препарат |

Повторный дизайн используют в случае, если стандартный перекрестный дизайн не позволяет получить приемлемые результаты без включения в экспери-

мент очень большого числа животных, что экономически нецелесообразно. При повторном дизайне может быть три или четыре периода обработок.

3.5.4. Последовательный дизайн

При использовании последовательного дизайна одной группе животных последовательно вводится сначала один, а после периода отмывки другой препарат. Такую схему введения нельзя использовать в исследованиях на интенсивно растущих животных, так как необходим определенный интервал времени между введениями испытуемого и референтного препаратов. Рекомендации при планировании исследования с последовательным дизайном аналогичны описанному выше для перекрестного дизайна, однако в случае последовательного дизайна вероятность получения ошибочных результатов выше, поэтому предпочтительнее использовать перекрестный или параллельный дизайны.

3.6. Биологическая модель

Оценка биоэквивалентности лекарственных средств проводится только на целевых животных (животным, которым препарат рекомендован инструкцией по применению референтного лекарственного препарата). Работа с экспериментальными животными должна проводиться в соответствии с рекомендациями Директивы ЕС 86/609/ЕСС и Конвенции Совета Европы по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (1986).

Если воспроизведенный и референтный препараты рекомендуются для применения нескольким видам животных, возможно проведение исследования биоэквивалентности только на одном из этих видов, если они относятся к одному классу в соответствии с общепринятой систематикой животных.

Если референтный препарат выпускается в одной лекарственной форме, но с разным содержанием действующего(их) вещества(в) биоэквивалентность можно изучать на препарате с одной концентрацией при условии, что препараты с разным содержанием действующего вещества рекомендованы для одних и тех же видов животных; если препараты с разным содержанием действующего вещества рекомендованы для разных видов животных, биоэквивалентность следует изучать отдельно для каждой концентрации на соответствующем виде животных.

3.6.1. Критерии включения животных в исследования

При исследовании биоэквивалентности используют клинически здоровых животных.

В качестве экспериментальных животных могут использоваться животные обоего пола. Возраст животных, порода, масса, уровень продуктивности (для с/х животных) в опытной и контрольной группах должны быть аналогичными. Масса не должна выходить за пределы $\pm 20\%$ для мелких животных и $\pm 10\%$ для крупных животных от средней массы по группе.

Отобранному животному должны быть присвоены индивидуальные номера, позволяющие их идентифицировать в любой момент опыта. После предварительного отбора животных (по массе, возрасту, полу и т.п.) проводится их клиническое обследование, включающее осмотр и при необходимости биохимические исследования крови и мочи, с целью допуска в опыт только клинически здоровых животных.

3.6.2. Помещения для животных

Животные должны содержаться в одинаковых условиях в соответствии с зооигиеническими нормативами для данного вида животных.

3.6.3. Организация кормления животных

Животные должны получать сбалансированный доброкачественный корм и свободный доступ к воде в соответствии с нормативами для данного вида животных. В день эксперимента доступ к корму и воде может быть ограничен в соответствии с задачами исследования. Препараты для перорального введения обычно испытывают натощак, если иное не предусмотрено утвержденной инструкцией на референтный препарат. Обычно рекомендуется период голодной выдержки не менее 8 часов до введения препаратов.

3.6.4. Карантирование

Вновь поступившие животные должны быть подвергнуты карантину на срок не менее 2 недель. Экспериментальные животные в течение не менее чем 30 суток (птицы в течение 15 суток) до начала исследований и в период исследований не должны получать никаких лекарственных препаратов (в зависимости от того, какие исследования проводились на животных, этот период может быть увеличен).

3.6.5. Исключение животных из опыта

Необходимость исключения части животных из опыта может возникнуть на любой стадии исследования. Необходимость исключения животных должна быть обоснована; если от исключенных животных уже были получены образцы биологического материала для исследования, должно быть принято научно обоснованное решение об исключении этих образцов из дальнейших анализов во избежание ошибочных результатов.

Для ряда препаратов существует определенная степень вероятности потери части введенной дозы, например, вследствие рвоты. Для таких препаратов в протоколе исследования должна быть предусмотрена процедура компенсации (например, повторное введение или замена другим животным).

3.6.6. Количество испытуемых животных

В исследование должно быть включены испытуемые животные в количестве, достаточном для обеспечения статистической значимости исследования. Число животных в одной экспериментальной группе должно быть не менее 6, таким образом, для опыта с параллельным дизайном в эксперимент должно быть отобрано не менее 12 животных. Большее число испытуемых животных может потребоваться для сравнения препаратов, обладающих значительной вариабельностью фармакокинетических параметров, а также при проведении исследований на животных, у которых не представляется возможным проводить многократный забор материала в необходимом количестве (птица, кошки). При планировании исследования следует учитывать вероятные потери (вследствие болезни, гибели, неправильного дозирования и т.п.) отобранных в эксперимент животных, в связи с чем необходимо предусмотреть возможность замены выбывших животных.

4 Отбор биологических материалов

4.1. Материал для исследования

В качестве биологического материала для исследования биоэквивалентности используют сыворотку, плазму крови или цельную кровь. В том случае, если невозможно определить концентрацию действующего(их) вещества(в)/метаболитов в плазме, сыворотке, цельной крови, то допускается определение действующего(их) вещества(в)/метаболитов в тканях, в которых их возможно детектировать.

4.2. Отбор проб

Отбор биологических материалов, в каждый срок исследования проводится в индивидуальные пробирки (флаконы, контейнеры), которые после закрытия должны немедленно маркироваться с указанием номера животного, времени отбора пробы и наименования исследуемого препарата или кодироваться в соответствии с протоколом исследования. Если иное не предусмотрено спецификой исследуемых препаратов, образцы биоматериала замораживают и хранят в замороженном виде до момента исследования. Биологический материал с сопроводительным документом, в котором указывают номера животных, их пол, возраст, массу, соответствующие маркировке на пробирке, передают в лабораторию для исследования.

4.3. Объем проб

Объем пробы биоматериала, необходимый для исследования, определяется исходя из потребностей аналитического метода и конкретного вида животных, на которых проводится исследование. Половина отобранной пробы используется для анализа, другая половина хранится на случай арбитражного контроля в замороженном виде в течение периода времени, установленного протоколом исследования, но не менее 2-х месяцев с момента проведения анализа.

5. Схема отбора проб

Схема отбора проб определяется формой кривой "концентрация действующего вещества - время". Выбор моментов времени отбора проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой: не менее 3-х точек для фазы первоначального возрастания концентрации и не менее 5 точек для фазы ее снижения (исключение составляют препараты для внутривенного введения). Для получения достоверного значения C_{max} отбор образцов крови в районе T_{max} должен быть достаточно частым. Продолжительность отбора проб определяется предполагаемым фармакокинетическим профилем действующего вещества. Для лекарственных препаратов с быстрым высвобождением общая продолжительность отбора проб должна быть не менее чем в 4 раза больше периода полувыведения или величина площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от нуля до момента отбора последней пробы для усредненного фармакокинетического профиля должна составлять не менее 80% от полной площади.

В случае лекарственных форм пролонгированного действия продолжительность наблюдения должна обеспечивать сравнение лекарственных средств в период, когда концентрация действующего(их) вещества(в) постоянна (относительно постоянна), а также в период последующего снижения концентрации. Время наблюдения за уровнем вещества в этой фазе должно быть как минимум в 4 раза больше периода полувыведения.

Если планируется многократное введение препаратов, отбор проб обязательно должен проводиться перед очередным введением препарата. Также схему отбора проб следует планировать таким образом, чтобы продемонстрировать достижение равновесного состояния.

Для эндогенных соединений схема отбора образцов должна позволить описать их фоновое содержание для каждого животного в каждом периоде. Как правило, такое определение возможно путем отбора 2–3 образцов до приема препарата. Иногда, чтобы учесть циркадные колебания фонового содержания эндогенного соединения, требуется регулярно определять его концентрацию в течение 1–2 дней до приема препарата.

6. Определение аналита (маркера)

Маркером для установления биоэквивалентности обычно является исходное действующее вещество препарата, так как в большинстве случаев его максимальная концентрация скорей позволяет выявить возможные различия в биодоступности испытуемого и референтного препаратов, чем C_{max} метаболита. Рекомендуется определять общую концентрацию анализируемого вещества, как связанного с протеинами, так и присутствующего в свободной форме.

При оценке биоэквивалентности комбинированных лекарственных препаратов следует определять концентрацию каждого действующего вещества, входящего в состав препарата.

Если исходное действующее вещество является про-лекарством, его концентрации в крови незначительны и эффективность лекарственного средства определяется активным(ми) метаболитом(ми), при изучении биоэквивалентности следует определять активный(е) метаболит(ы).

Установление биоэквивалентности, основанное на определении концентрации метаболита(ов), в каждом случае должно быть обосновано с учетом того, что цель исследования биоэквивалентности — сравнение характеристик *in vivo* воспроизведенного и референтного препаратов. В частности, если метаболиты игра-

ют значительную роль в общей активности действующего вещества, необходимо определять концентрации как исходного лекарственного вещества, так и активного метаболита и оценивать их отдельно.

Если действующее вещество состоит из двух и более изомеров (или подвергается изомеризации, попадая в организм), которые обладают разной фармакокинетикой и фармакодинамическими свойствами, следует изучать фармакокинетику каждого изомера по отдельности и предусмотреть для этого соответствующие хиральные (стереоспецифические) методы анализа. Если только один из изомеров обладает фармакологической активностью (фармакологическая активность второго изомера низкая или полностью отсутствует), то достаточно подтвердить биоэквивалентность только для активного изомера.

7. Аналитический метод

Для определения концентрации действующих веществ в плазме, сыворотке или цельной крови могут быть использованы различные методы (физико-химические, иммунологические, микробиологические и др.), обеспечивающие возможность получения достоверных данных о концентрации действующего(-их) вещества(-в) с учетом чувствительности метода, отвечающего общим требованиям избирательности, точности, воспроизводимости. Метод должен позволять определять концентрации аналита, соответствующие терапевтическим уровням (нижняя градуировочная концентрация не более 5% от C_{\max}) и быть линейным в ожидаемом диапазоне концентраций.

Для получения надежных результатов, поддающихся удовлетворительной интерпретации, необходимо подробно описать используемые биоаналитические методики, полностью их валидировать и документировать (Приложение 1). В каждом аналитическом цикле в рамках исследования необходимо подтвердить пригодность методики с использованием образцов для контроля качества.

Следующие аспекты, характеризующие аналитический метод, должны быть отражены в финальном отчете:

- линейность в необходимом диапазоне концентраций;
- эффекты биосубстрата;
- предел детектирования (LOD);
- предел количественного детектирования (LOQ);
- специфичность (селективность);
- точность;

- прецизионность;
- стабильность анализа в процессе анализа.

Поскольку поддающаяся обнаружению концентрация до приема препарата должна составлять не менее 5% от C_{\max} , нижний предел количественного определения методики должен обеспечивать определение концентрации $\leq 5\%$ от C_{\max} .

8. Анализ фармакокинетических данных

Оценка биодоступности лекарственного средства или его основного биологически активного метаболита (если изучаемые препараты представляют собой пролекарства) основывается на сравнении значений фармакокинетических параметров, оцененных непосредственно по данным "концентрация (C) - время (t)" для воспроизведенного и референтного препаратов.

8.1. Однократное введение лекарственных препаратов

Индивидуальные значения площади под кривыми "концентрация - время" - AUC (как в пределах длительности наблюдения за концентрацией лекарственного средства - AUC_t , так и в пределах от 0 до бесконечности - AUC_{∞}), максимальной концентрации (C_{\max}) и времени ее достижения (t_{\max}) следует оценивать внемодельными (некомпраментальными) методами по данным "концентрация - время", установленным у каждого животного для каждого из изучаемых препаратов. Значения параметров C_{\max} и t_{\max} оценивают как наибольшее из измеренных значений концентрации и соответствующее время наблюдаемого максимума. Величину AUC_t рассчитывают при помощи метода обычных или логарифмических трапеций. Значения AUC_{∞} определяют по формуле: $AUC_{\infty} = AUC_t + C_t/k_{el}$, где C_t и k_{el} - расчетные значения концентрации лекарственного средства в последней пробе и константы элиминации, соответственно. Для вычисления C_t и k_{el} конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывают с помощью нелинейного регрессионного анализа.

При достаточной длительности наблюдения, когда $AUC_t > 80\% AUC_{\infty}$, для оценки полноты всасывания исследуемого препарата следует использовать значения AUC_t , а при условии, что $AUC_t < 80\% AUC_{\infty}$ - значения AUC_{∞} .

Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривает вычисление индивидуальных отношений AUC_t или AUC_{∞} (соответственно f' и f - оценки относительной степени всасывания) и C_{\max} (f'') - для любых лекарственных форм, отношений C_{\max}/AUC_t или C_{\max}/AUC_{∞} как характеристик скорости всасыва-

ния - для обычных форм, а для форм пролонгированного действия - продолжительность периода времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает 75% от C_{\max} ($T > 75\% C_{\max}$).

8.2. Многократное введение лекарственных препаратов

В тех случаях, когда ввиду недостаточной чувствительности аналитического метода получить полноценные фармакокинетические профили после однократного введения лекарственного средства невозможно, действующее(ие) вещество(а) накапливается в организме, а также когда внутрииндивидуальная вариабельность концентрации лекарственного средства при однократном введении выше, чем при его длительном введении, оценка биоэквивалентности препаратов проводится после их многократного введения.

В условиях достижения равновесного состояния (ss), реализующихся при повторяющемся введении лекарственных препаратов в одинаковой дозе с одним и тем же интервалом дозирования (τ), индивидуальные фармакокинетические профили следует охарактеризовать значениями площади под кривой «концентрация – время» в пределах интервала дозирования после установления стационарного распределения препарата - $AUC_{\tau,ss}$, C_{\max} , $C_{\max}/AUC_{\tau,ss}$, значениями минимальной концентрации (C_{\min} - концентрация в конце интервала дозирования), C_{trough} (концентрация вещества в равновесном состоянии непосредственно перед введением следующей дозы), а также разности между значениями C_{\max} и C_{\min} , отнесенной к средней стационарной концентрации ($C_{ss} = AUC_{\tau,ss}/\tau$). Также вычисляют индивидуальные значения отношений $AUC_{\tau,ss}$ и C_{\max} для исследуемого препарата и препарата сравнения (соответственно f' и f'').

Для форм пролонгированного действия рассчитываются продолжительность периода времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает среднее значение C_{ss} ($T > C_{ss}$), а также $T > 75\% C_{\max}$.

9. Статистическая оценка биоэквивалентности

Оценка биоэквивалентности проводится по параметрам сравнения, выбранным в соответствии со схемой введения лекарственного средства (однократное и многократное введение) и его лекарственной формой (обычная или пролонгированного действия).

Первостепенное значение для оценки биоэквивалентности имеет минимизация риска ложноположительного результата биоэквивалентности. Статистический

анализ испытания биоэквивалентности должен подтвердить маловероятность клинически значимого различия между биодоступностью воспроизведенного лекарственного препарата и препарата сравнения.

Статистический метод для анализа биоэквивалентности основывается на определении 90-процентного доверительного интервала для отношений логарифмически преобразованных средних арифметических (воспроизведенный препарат / препарат сравнения) рассматриваемых фармакокинетических параметров, а также на выполнении двух односторонних тестов при 5% уровне значимости.

Статистический анализ проводят в предположении о лог-нормальном распределении параметров AUC , C_{max} и C_{max}/AUC и нормальном распределении остальных параметров за исключением t_{max} . В предположении о лог-нормальном распределении, сравнение средних значений параметров для исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения проводится на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строятся для отношений соответствующих средних значений.

Все фармакокинетические параметры, которые непосредственно зависят от концентрации (AUC и C_{max}), следует преобразовать логарифмированием, используя десятичные или натуральные логарифмы. Выбор вида логарифмов (десятичные или натуральные) должен оставаться неизменным и указываться в отчете исследования. Преобразованные логарифмированием фармакокинетические параметры, зависящие от концентрации, необходимо оценивать с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

Для обычной рандомизированной перекрестной схемы статистическая модель дисперсионного анализа должна включать следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариацию данных:

- различия между лекарственными средствами,
- различия между испытуемыми (межиндивидуальные различия),
- последовательность приема лекарственных средств,
- периоды исследования.

Дисперсионный анализ применяется для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого из указанных факторов в наблюдаемую вариабельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации используется при расчете доверительного интервала для отношения средних значений соответствующего параметра.

Параметрические методы, т.е. основанные на законе нормального распределения, рекомендуются для анализа показателей биоэквивалентности, преобразованных логарифмированием.

Общий принцип заключается в построении 90% доверительного интервала для величины $\mu_T - \mu_R$, который позволяет сделать вывод о фармакокинетической эквивалентности, если данный доверительный интервал находится в границах принятых предельных значений. Принцип параметрических доверительных интервалов означает, что их определение равнозначно проведению двух односторонних тестов для гипотезы при 5% уровне статистической значимости. Полученные антилогарифмы доверительных интервалов составляют 90 % доверительный интервал для соотношения среднегеометрических значений воспроизведенного лекарственного препарата и препарата сравнения.

Процедура статистического сравнения состоит в вычислении параметрических двусторонних 90%-ные доверительных интервалов для отношений соответствующих средних значений для исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения. Лекарственные средства считаются биоэквивалентными, если границы оцененного доверительного интервала для AUC_t или AUC_{∞} , а также $AUC_{\tau,ss}$ находятся в пределах 80–125%. Для лекарственных препаратов с C_{max} и C_{max}/AUC_t , C_{max}/AUC_{∞} или $C_{max}/AUC_{\tau,ss}$, характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляют 75 – 133%.

Допустимый интервал для AUC лекарственных препаратов с узким терапевтическим диапазоном следует сузить до 90,00–111,11%. Поскольку C_{max} занимает особое место с точки зрения эффективности, безопасности и мониторинга концентрации лекарственного средства, допустимый интервал для данного параметра также следует сузить до 90,00–111,11%. Действующее вещество следует относить к лекарственным препаратам с узким терапевтическим диапазоном исходя из клинических соображений.

При проведении оценки биоэквивалентности может быть обнаружено, что у одного или нескольких испытуемых различия между параметрами или их отношениями значимо отличаются от таковых у основной группы (резко выделяющиеся наблюдения – “outliers”). Выявление таких наблюдений проводится при помощи специальных статистических тестов. Для демонстрации наличия таких наблюдений приводятся графики индивидуальных стандартизованных различий (центрированных по среднему значению и нормированных по стандартному отклонению).

Резко выделяющиеся наблюдения могут не приниматься в расчет при оценке биоэквивалентности при условии, что справедливость исключения этих данных доказана.

10. Протокол исследования биоэквивалентности

В протоколе должны быть отражены:

- организация, проводившая исследования;
- место проведения исследования (фазы исследования на животных и аналитической фазы);
- специалисты, проводившие исследования;
- сведения о референтном препарате: наименование (торговое и международное непатентованное), содержание действующего вещества, лекарственная форма, номер серии, срок годности, название разработчика и организации-производителя;
- сведения о воспроизведенном лекарственном препарате: наименование (торговое и международное непатентованное), содержание действующего вещества, лекарственная форма, качественный состав вспомогательных веществ, номер серии, объем серии, дату производства, срок годности, название разработчика и организации-производителя;
- сведения о животных в соответствии с п.3.6 и их количестве;
- способ введения лекарственных препаратов, доза и режим дозирования;
- интервал времени между введением препаратов;
- биоматериал, в котором определяли концентрацию действующего(их) вещества(в);
- схема отбора проб, условия их хранения;
- описание аналитического метода;
- описание методов фармакокинетического анализа;
- описание процедур статистического анализа и оценки биоэквивалентности с указанием использованных программных средств;
- описание критериев биоэквивалентности.

Протокол исследования биоэквивалентности должен быть подписан всеми участниками изучения биоэквивалентности с указанием должности и места работы.

11. Финальный отчет

Отчет об исследовании биоэквивалентности должен содержать утвержденный протокол проведения исследований и всю документацию по проведению исследования.

В отчете по изучению биоэквивалентности должна быть представлена следующая информация:

1) Аналитический отчет, который должен содержать обоснование выбора метода определения аналита в биосубстрате; описание использованного оборудования, средств измерения и реактивов; описание метода; описание пробоподготовки; метрологические характеристики метода (п.7); фактические результаты, полученные в процессе валидации метода; хроматограммы, подтверждающие представленные результаты валидации (стандартные образцы во всем испытанном диапазоне концентраций, контрольные образцы, стандартные образцы в биосубстрате); опытные хроматограммы, включая контрольные образцы биоматериала, полученные до начала исследования – «нулевые пробы», подтверждающие представленные результаты исследования.

2) Описание использованного способа расчета фармакокинетических параметров.

3) Обоснование исключения резко выделяющихся результатов.

4) Результаты определения содержания действующего(их) вещества(в) в биологическом материале, полученные для каждого животного, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений.

5) Статистические критерии, использованные для оценки биоэквивалентности, и результаты этой оценки. Для каждого из сравниваемых препаратов необходимо представить все значения индивидуальных концентраций и фармакокинетических параметров, наряду с данными описательной статистики, включая геометрическое среднее, медиану, арифметическое среднее, стандартное отклонение, коэффициент вариации, максимальные и минимальные значения. Индивидуальные кривые «концентрация–время» следует представить на линейной и логарифмической шкалах. Необходимо описать метод получения фармакокинетических параметров из исходных данных и количество точек в терминальной логарифмической фазе, использованных для оценки константы скорости терминальной элиминации (которая используется для достоверной оценки $AUC_{0-\infty}$).

б) Выводы

Отчет должен быть подписан исполнителями и утвержден руководителем организации, проводившей изучение биоэквивалентности.

Список обозначений

AUC - площадь под кривой "концентрация действующего вещества - время";

AUC_t - площадь под кривой "концентрация действующего вещества - время" в интервале времени от 0 до момента (t) отбора последней пробы биоматериала;

AUC_{∞} - площадь под кривой "концентрация действующего вещества - время" в интервале времени от 0 до бесконечности;

$AUC_{\tau,ss}$ - площадь под кривой "концентрация действующего вещества - время" в пределах интервала дозирования в стационарных условиях (ss) при многократном введении лекарственного средства;

C - концентрация действующего вещества;

C_{max} - максимальная концентрация действующего вещества;

C_{min} - минимальная концентрация действующего вещества;

C_{ss} - средняя концентрация действующего вещества в стационарных условиях;

C_t - концентрация действующего вещества в момент t;

C_{trough} - концентрация вещества в равновесном состоянии непосредственно перед введением следующей дозы

CV - коэффициент вариации;

f - относительная степень всасывания (относительная биодоступность) лекарственного средства, определяемая отношением $AUC_{\infty,T}/AUC_{\infty,R}$;

f' - относительная степень всасывания лекарственного средства, определяемая отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$ или $AUC_{\tau,ss,T}/AUC_{\tau,ss,R}$.

f'' - отношение $C_{max,T}/C_{max,R}$;

k_{el} - константа элиминации лекарственного средства;

t - время от момента приема (введения) лекарственного препарата;

t_{max} - время достижения максимальной концентрации действующего вещества;

R - референтный препарат;

T - воспроизведенный препарат;

$T_{1/2}$ - период полувыведения лекарственного средства;

$T > C_{ss}$ - период времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает C_{ss} ;

$T > 75\% C_{max}$ - период времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает 75% от C_{max} ;

μ_T - генеральное среднее показателя для воспроизведенного лекарственного препарата;

μ_R - генеральное среднее показателя для референтного препарата;

σ^2 - средний квадрат "ошибки", или остаточная внутрииндивидуальная вариация;

τ - интервал дозирования.