

УТВЕРЖДЕН
Решением Совета
Евразийской экономической комиссии
от « » 20 г. №

П РА В И Л А
**проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных
лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе**

I. Введение

В настоящих Правилах рассматриваются требования к дизайну, проведению и оценке исследований биоэквивалентности лекарственных форм с немедленным высвобождением системного действия.

Цель настоящих Правил – определить требования к дизайну, проведению и анализу исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов. В них также рассматриваются условия, при которых исследования *in vivo* могут быть заменены исследованиями *in vitro*.

Цель подтверждения биоэквивалентности – доказать эквивалентность воспроизведенного лекарственного препарата референтному лекарственному препарату по качеству, чтобы экстраполировать результаты доклинических испытаний и клинических исследований, проведенных в отношении референтного лекарственного препарата, на воспроизведенный препарат.

Если биоэквивалентность невозможно подтвердить с помощью исследования биодоступности, проводятся фармакодинамические или клинические исследования.

Положения правил не распространяются на лекарственные препараты биологического происхождения, такие как вакцины, сыворотки животных, препараты человеческой крови и плазмы, и препараты, произведенные при помощи биотехнологии.

Понятие биоэквивалентности может рассматриваться в отношении растительных лекарственных препаратов. Основные принципы, изложенные в данных правилах, не применимы к растительным лекарственным препаратам, для которых действующие вещества не в полной мере охарактеризованы.

Рекомендации по планированию и проведению исследований для изучения биоэквивалентности, приведенные в данных правилах, могут также применяться для сравнительного исследования биодоступности с целью оценки различных рецептур, используемых в процессе разработки нового лекарственного препарата, содержащего новое химическое соединение, и для сравнительного изучения биоэквивалентности лекарственных препаратов при изменении их лекарственной формы на форму модифицированного высвобождения или разработке комбинированных препаратов, а также в случае внесения изменений и дополнений в регистрационное досье лекарственного препарата в части действующих веществ, дозировки, лекарственной формы и пути введения или гибридного заявления, основывающегося не только на данных биоэквивалентности.

Настоящие правила пересматриваются на регулярной основе с учетом опыта их применения в государствах-членах Союза, а также в случае изменений положений международных норм проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов с внесением необходимых изменений и дополнений не реже 1 раза в 5 лет.

Два лекарственных препарата, содержащих одинаковое количество действующего вещества, считаются биоэквивалентными, если они являются фармацевтически эквивалентными или фармацевтически альтернативными и их биодоступность (по скорости и степени) после применения в одинаковой молярной дозе укладывается в заранее установленные допустимые пределы. Эти пределы установлены для обеспечения сопоставимости биофармацевтических свойств [лекарственной формы] *in vivo*, то есть сопоставимости по эффективности и безопасности.

Для определения скорости и степени абсорбции в исследованиях биоэквивалентности обычно используется кривая «концентрация – время». Определенные фармакокинетические параметры и заранее установленные границы допустимых отклонений позволяют судить о биоэквивалентности сравниваемых лекарственных препаратов. AUC (площадь под кривой «концентрация–время») отражает величину экспозиции. C_{\max} (максимальная концентрация в крови, плазме или сыворотке¹) и t_{\max} (время достижения максимальной концентрации в биожидкости) являются параметрами, на которые влияет скорость абсорбции.

II. Сфера применения

Основное внимание в настоящих Правилах уделяется рекомендациям по исследованиям биоэквивалентности лекарственных препаратов с немедленным высвобождением системного действия. В них также устанавливаются критерии, когда исследования биодоступности не требуются (для дополнительных дозировок – см. раздел 5.1.6, для определенных лекарственных форм

¹ Далее по тексту вместо перечисления биожидкостей «кровь, плазма или сыворотка» использованы слова «плазма» или «биожидкость».

– см. Приложение № 2 или биоэвейвер, основанный на БКС – Приложение № 3).

Специальные рекомендации по исследованиям биоэквивалентности лекарственных препаратов с модифицированным высвобождением, трансдермальных и пероральных ингаляционных препаратов, а также препаратов для местного применения, липосомальных лекарственных препаратов представлены в других нормативных документах Союза.

Сфера применения ограничена химическими соединениями. Правила по сравнению биологических лекарственных препаратов с референтными лекарственными препаратами устанавливаются в Правилах исследования биологических лекарственных средств Союза.

III. Нормативно-правовая база

Настоящие Правила используются при подаче заявок на регистрацию лекарственных препаратов.

Исследуемые препараты, используемые в исследовании биоэквивалентности, должны производиться в соответствии с требованиями Правил надлежащей производственной практики Союза. Исследования биоэквивалентности, проведенные вне территории Союза должны быть проведены в условиях, не противоречащих настоящим Правилам.

По особым вопросам, не рассмотренным в настоящих Правилах, заявители вправе обращаться в Экспертный комитет Союза за научной консультацией.

IV. Термины и определения

Приведенные ниже определения касаются терминов, использованных в настоящем разделе, так как они могут иметь иные значения в других документах и нормативных актах.

Биоэкви́вер (biowaiver): Процедура оценки биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата без проведения исследования *in vivo*.

Биологическая доступность или биодоступность (Bioavailability): Скорость и степень, с которыми действующее вещество или его активные компоненты из дозированной лекарственной формы всасываются и становятся доступными в месте действия.

Примечание:

Абсолютную биодоступность данной лекарственной формы определяют путем сравнения с биодоступностью этого лекарственного препарата при условии его внутрисосудистого введения (100 %) (например, раствор для приема внутрь в сравнении с раствором для внутривенного введения).

Относительную биодоступность данной лекарственной формы определяют путем сравнения с биодоступностью другой лекарственной формы, введенной тем же или другим (но не внутривенным) путем (например, таблетки в сравнении с раствором для приема внутрь).

Основой проведения исследований биоэквивалентности и биодоступности воспроизведенных лекарственных препаратов является определение относительной биодоступности.

Биологическая эквивалентность или биоэквивалентность (bioequivalence): Два лекарственных препарата биологически эквивалентны, если они фармацевтически эквивалентны или они фармацевтически альтернативны и их относительная биодоступность по скорости и степени всасывания после приема в одинаковой молярной дозе укладывается в заранее установленные допустимые пределы. Эти пределы установлены для обеспечения сопоставимости биофармацевтических свойств *in vivo*, то есть сопоставимости по эффективности и безопасности.

Биофармацевтическая система классификации (БСК) (biopharmaceutics classification system, BCS): Научный подход, позволяющий разделить действующие вещества лекарственных препаратов на основании степени их растворимости в воде и кишечной проницаемости. Вместе с тестом кинетики растворения для лекарственного препарата БСК учитывает три основных фактора, влияющих на скорость и степень абсорбции действующих веществ из лекарственных форм немедленного высвобождения для приема внутрь: растворение, растворимость и кишечную проницаемость.

Воспроизведенный лекарственный препарат (генерик): 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.

Различные соли, эфиры, изомеры, смеси изомеров, комплексы или производные действующего вещества признаются одним и тем же действующим веществом, если их безопасность и (или) эффективность существенно не отличаются. Различные лекарственные формы для приема внутрь с немедленным высвобождением признаются в рамках исследований биодоступности одной и той же лекарственной формой.

Гибридный лекарственный препарат: Лекарственный препарат, не подпадающий под определение воспроизведенного лекарственного препарата в соответствии с пунктом 4.5 или, в случае, если невозможно провести подтверждение его биоэквивалентности с помощью исследований биодоступности, а также в случае, если в данном препарате произошли изменения действующего вещества (веществ),

показаний к применению, дозировки, лекарственной формы или пути введения по сравнению с референтным препаратом.

Доза лекарственного препарата (dose): Это количество действующего вещества лекарственного препарата на одно применение (однократное или многократное применение).

Дозировка лекарственного препарата (strength): Количественно выраженное содержание действующих веществ в единице дозирования, объема или массы в соответствии с лекарственной формой.

Испытание «Растворение» для контроля качества (quality control dissolution test): Определенная Фармакопеей Союза процедура испытания «Растворение» с целью рутинного контроля качества серий лекарственного препарата в виде испытания на растворение с одним контрольным временным периодом для отбора проб для препаратов с немедленным высвобождением и с тремя и более контрольными временными периодами для препаратов с модифицированным высвобождением.

Комбинированный лекарственный препарат (КЛП, fixed-dose combination finished pharmaceutical product, FDC-FPP): Готовый лекарственный препарат, содержащий два и более активных фармацевтических ингредиентов.

Лекарственная форма (dosage form): Состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого эффекта.

Оригинальный лекарственный препарат (innovator pharmaceutical product): Лекарственный препарат с новым действующим веществом, который был первым зарегистрирован и размещен на мировом фармацевтическом рынке на основании досье, содержащего результаты

полных доклинических (неклинических) и клинических исследований, подтверждающих его качество, безопасность и эффективность.

Референтный препарат или препарат сравнения или компаратор (comparator product): Лекарственный препарат, который используется в качестве препарата сравнения в исследованиях сравнительной биодоступности.

Тест сравнительной кинетики растворения *in vitro* (ТСКР) (*in vitro equivalence dissolution test*): Исследование, включающее сравнение профилей растворения воспроизведенного лекарственного препарата и препарата сравнения как правило в трех средах – буферных растворах с рН 1,2; 4,5 и 6,8.

Фармацевтическая эквивалентность (*pharmaceutical equivalence*): Лекарственные препараты являются фармацевтически эквивалентными, если они содержат одинаковое количество одного и того же действующего вещества (или веществ) в одной и той же лекарственной форме, соответствуют одним и тем же сопоставимым стандартам качества и применяются одинаковым способом.

Фармацевтически альтернативные лекарственные препараты (*pharmaceutical alternatives*): Лекарственные препараты являются фармацевтически альтернативными, если они содержат одну и ту же активную часть молекулы действующего вещества, но различаются химической формой (например, разные соли, разные эфиры, изомеры или их смеси), лекарственной формой (например, таблетки и капсулы) или дозировкой.

Фиксированная комбинация доз (ФКД) (*fixed-dose combination, (FDC)*): Комбинация двух и более действующих веществ с установленным соотношением доз. ФКД используется

для обозначения конкретной комбинации действующих веществ вне зависимости от состава или товарного знака лекарственного препарата. Комбинация действующих веществ может использоваться как совокупность монокомпонентных лекарственных препаратов, применяемых одновременно, так и в виде готового многокомпонентного лекарственного препарата.

V. Основной текст правил

5.1. Дизайн, проведение и оценка исследований биоэквивалентности

Объем и дизайн исследований необходимо обосновать физико-химическими и фармакокинетическими свойствами действующего вещества и пропорциональностью состава лекарственного препарата. В частности, следует учитывать линейность фармакокинетики, необходимость проведения исследования в зависимости от приема пищи, анализа энантиомеров и целесообразность проведения исследований дополнительных дозировок (см. разделы 5.1.4, 5.1.5 и 5.1.6).

В модуле 2.7.1 регистрационного досье в формате общего технического документа необходимо представить перечень всех значимых исследований (независимо от их результатов), проведенных с препаратом, например, исследования биоэквивалентности с целью сравнения заявляемого к регистрации лекарственного препарата (т.е. имеющего тот состав и процесс производства) с референтным лекарственным препаратом (см. раздел 5.1.2). В отношении всех проведенных исследований необходимо представить полные отчеты, за исключением пилотных исследований, для которых, если они проводились, достаточно привести краткие синопсисы (в соответствии с Приложением № 1 к правилам

Надлежащей клинической практики Союза). Полный отчет о пилотных исследованиях необходимо представить по требованию уполномоченных органов государств-членов Союза. В Модуль 2.7 необходимо также включить синопсисы отчетов об исследованиях биоэквивалентности и сравнительной биодоступности, проведенных на стадии разработки лекарственного препарата.

5.1.1 Дизайн исследования

Дизайн исследования необходимо спланировать таким образом, чтобы влияние лекарственного препарата на его фармакокинетические параметры можно было отличить от влияния других факторов.

Стандартный дизайн. При сравнении двух лекарственных препаратов рекомендуется проводить рандомизированное, двухпериодное, перекрестное в двух последовательностях исследование с приемом однократной дозы. Периоды должны быть разделены отмывочным периодом, достаточным для снижения концентрации действующего вещества ниже порога биоаналитического определения у всех субъектов в начале второго периода исследования. Обычно для этого достаточно не менее пяти периодов полувыведения.

Альтернативный дизайн. В некоторых случаях, при условии, что дизайн исследования и статистический анализ научно обоснованы, можно рассматривать альтернативные общепризнанные дизайны: параллельный – для веществ с длительным $t_{1/2}$; повторный (репликативный, replicate design) – для веществ с высоко варьируемыми фармакокинетическими параметрами (см. раздел 5.1.10).

Если вследствие непереносимости прием однократной дозы здоровыми добровольцами не допустим, а исследование однократной дозы у пациентов невозможно, допускается проведение

исследования у пациентов с многократным приемом лекарственного препарата.

В редких случаях, когда недостаточная чувствительность аналитического метода препятствует точному определению концентрации в биожидкости после приема однократной дозы, а равновесная концентрация достаточно высока для получения точных значений, в качестве альтернативы исследованию с приемом однократной дозы допустимо проведение исследования с многократным приемом лекарственного препарата. Однако, принимая во внимание, что исследования с многократным приемом менее чувствительны для определения различий в C_{max} , 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 (см. также раздел 5.1.6). Проведение исследования с многократным приемом лекарственного препарата вместо однократного в силу недостаточной чувствительности аналитического метода допустимо только в исключительных случаях.

В исследованиях равновесной концентрации отмывочный период после приема предыдущего препарата может перекрывать нарастание концентрации во втором периоде (при условии, что продолжительность такого нарастания достаточно длительная и составляет не менее пяти конечных $t_{1/2}$).

5.1.2 Референтный препарат и исследуемый препарат.

Референтный препарат

Порядок выбора референтного препарата:

1) оригинальный лекарственный препарат, качество, безопасность и эффективность которого были установлены при регистрации в Союзе («утвержденный в Союзе оригинальный препарат»);

2) оригинальный лекарственный препарат, одобренный в государстве с хорошо регулируемым фармацевтическим рынком (например, Европейский Союз, США) при невозможности выполнения пункта 1);

3) воспроизведенный лекарственный препарат, зарегистрированный в рамках Союза и подтвердивший свою биоэквивалентность оригинальному лекарственному препарату (при одобрении Экспертным комитетом ЕЭК) при невозможности выполнения пунктов 1) и 2);

4) лекарственный препарат, имеющий опыт применения на территории одной из стран Союза не менее 25 лет (при одобрении Экспертным комитетом при Евразийской экономической комиссии) при невозможности выполнения пунктов 1-3).

При исследовании воспроизведенного лекарственного препарата или внесении изменений и дополнений в регистрационное досье лекарственного препарата в части действующих веществ, дозировки, лекарственной формы и пути введения, исследуемый препарат сравнивают с соответствующей лекарственной формой и дозировкой референтного лекарственного препарата.

Если оригинальный лекарственный препарат на рынке представлен в нескольких лекарственных формах, в качестве референтного препарата рекомендуется использовать ту из них, в виде которой был впервые зарегистрирован и которая

использовалась в клинических исследованиях для подтверждения его эффективности и безопасности.

Заявитель обязан обосновать выбор референтного лекарственного препарата для исследования биоэквивалентности с учетом результатов количественного определения и данных о растворении. В серии, используемой в качестве исследуемого препарата, количественное содержание (установленное с помощью аналитической методики, предложенной для стандартных испытаний качества исследуемого препарата) не должно отличаться более чем на 5 % от серии референтного лекарственного препарата (при отсутствии должных обоснований). Заявитель с помощью испытаний ТСКР и количественного определения должен обосновать выбор серии референтного лекарственного препарата, планируемой к использованию в исследовании биоэквивалентности. При выборе серии референтного лекарственного препарата для исследования биоэквивалентности рекомендуется изучить несколько серий референтного лекарственного препарата.

Исследуемый препарат

Исследуемый препарат, использованный в исследовании биоэквивалентности, не должен отличаться от препарата, который поступит на фармацевтический рынок, что должно быть рассмотрено и обосновано заявителем.

Например, для твердых лекарственных форм для приема внутрь системного действия:

а) В отсутствие должных обоснований исследуемый препарат должен быть отобран из серии, составляющей, по меньшей мере, 1/10 промышленной, или 100 000 единиц лекарственных форм, в зависимости от того, который из объемов больше.

b) Производство использованных серий должно обеспечивать высокую степень уверенности в том, что препарат и процесс будут воспроизведены в промышленном масштабе.

Объем серии, предназначенной для подтверждения биоэквивалентности, менее 100 000 единиц, возможен при условии, что это предлагаемый объем серийного производства, и последующее масштабирование производственных серий не предполагается.

c) Описание свойств и составление спецификации на критические показатели качества лекарственного препарата, такие как растворение, следует осуществлять, используя исследованную серию, т.е. серию для клинических исследований, в отношении которой подтверждена биоэквивалентность.

d) Образцы препарата из дополнительных опытных и (или) промышленных серий, предоставленные на регистрацию, необходимо сравнивать с образцами из серии, использованной в исследовании биоэквивалентности; они должны иметь сопоставимые профили растворения *in vitro* в подходящих условиях теста сравнительной кинетики растворения (см. Приложение № 1).

В отношении каждой из первых трех промышленных серий до выпуска их на рынок Союза необходимо провести сравнительные испытания профилей растворения в тесте сравнительной кинетики растворения с серией, использованной при проведении исследования биоэквивалентности. В случае окончания срока ее годности в качестве референтной может быть использована предыдущая промышленная серия.

Заявитель должен предоставить результаты ТСКР первых трех промышленных серий по запросу уполномоченного органа государства-члена Союза. В случае несовпадения профилей растворения, Заявитель

должен представить результаты ТСКР без запроса уполномоченного органа и указать конкретные меры, предпринятые для преодоления возникшей ситуации.

Для прочих лекарственных форм с немедленным высвобождением системного действия, необходимо представить аналогичное подтверждение эквивалентности качества промышленных серий по отношению к исследованной серии.

Упаковка сравниваемых препаратов

Исследуемый препарат и референтный препарат необходимо упаковать индивидуально для каждого субъекта и периода исследования перед их отправкой в исследовательский центр или в самом исследовательском центре. Упаковку (включая маркировку) следует осуществлять в соответствии с Приложением № 13 Правил надлежащей производственной практики.

Необходимо предусмотреть возможность точного установления подлинности лекарственных препаратов, назначаемых каждому субъекту в каждом периоде исследования. В связи с этим необходимо подробно документировать упаковку, маркировку и введение препаратов субъектам. Такая документация должна содержать описание всех мер, предпринятых для недопущения и обнаружения ошибок дозирования. Рекомендуются использовать этикетки с отрывным корешком.

5.1.3 Субъекты

Количество субъектов.

Количество субъектов, включенных в исследование, должно основываться на должном расчете размера выборки. Количество, включенных в анализ субъектов исследования биоэквивалентности, должно быть не менее 12.

Выбор субъектов.

Группа субъектов для проведения исследований биоэквивалентности должна быть подобрана таким образом, чтобы возможно было обнаружить различия между лекарственными препаратами. С целью снижения вариации результатов, не обусловленной различиями между препаратами, исследования необходимо проводить у здоровых добровольцев, за исключением случаев, когда препараты несут очевидную угрозу их здоровью, и делают такие исследования неэтичными. В большинстве случаев проведение исследования у здоровых добровольцев *in vivo* для установления различий между сравниваемыми препаратами считается приемлемым и позволяет экстраполировать результаты исследования на лиц, у которых одобрено применение референтного лекарственного препарата (лица пожилого возраста, дети, пациенты с почечной или печеночной недостаточностью и т.д.).

В протоколе исследования необходимо четко прописать критерии включения и невключения. Возраст субъектов должен быть не младше 18 лет с индексом массы тела, по возможности, 18,5-30 кг/м².

Соответствие субъектов условиям отбора необходимо подтвердить лабораторными исследованиями, анамнезом и медицинским осмотром. В зависимости от фармакотерапевтической группы и профиля безопасности лекарственного препарата до, во время и по окончании исследования необходимо провести специальные исследования и принять соответствующие меры предосторожности. Пол субъектов не имеет значения, однако необходимо учитывать риск для женщин детородного возраста. Субъекты, по возможности, должны быть не курящими; алкоголизм и наркомания (в том числе в анамнезе) являются критериями невключения. В некоторых случаях из соображений безопасности или в силу фармакокинетических

особенностей необходимо предусмотреть фенотипирование и (или) генотипирование субъектов.

При параллельном дизайне исследования сравниваемые группы должны быть сопоставимы по всем значимым переменным, которые могут повлиять на фармакокинетику действующего вещества (включая возраст, массу тела, пол, этническую принадлежность, курение, принадлежность к «быстрым» или «медленным» метаболитаторам). Это важное предварительное условие для подтверждения достоверности результатов таких исследований.

Если исследуемое действующее вещество вызывает нежелательные реакции и (или) фармакологические эффекты, представляющие неприемлемые риски для здоровых добровольцев, приняв необходимые меры предосторожности и установив соответствующее наблюдение, допустимо включать в исследование пациентов.

5.1.4 Проведение исследования

Стандартизация.

Чтобы свести к минимуму вариацию всех вовлеченных факторов, за исключением обусловленных свойствами сравниваемых препаратов, условия проведения исследования необходимо стандартизировать, в связи с чем, стандартизации подлежат рацион, прием жидкости и физические нагрузки.

Время приема лекарственного препарата необходимо установить заранее. В отсутствие обоснований субъекты не должны принимать пищу как минимум за 8 ч до приема препарата. Поскольку прием жидкости может повлиять на прохождение принимаемых внутрь препаратов через желудок, исследуемый препарат и референтный препарат необходимо запивать стандартным объемом жидкости

(150-250 мл). В течение 1 ч до и 2 ч после этого прием жидкости запрещен, в остальном устанавливается свободный питьевой режим; после приема препарата прием пищи ограничивают на четыре часа. Рацион и время приема пищи после приема препарата необходимо стандартизировать в течение достаточного периода времени (например, 12 ч).

Если исследование должно проводиться после еды, прием препарата и пищи осуществляют в соответствии с ОХЛП референтного лекарственного препарата. Если такие сведения в ОХЛП референтного лекарственного препарата отсутствуют, то субъекты должны начать прием пищи за 30 минут до приема препарата (продолжительность приема пищи – 30 минут).

Поскольку биодоступность активной части молекулы действующего вещества лекарственной формы может зависеть от длительности прохождения через желудочно-кишечный тракт и интенсивности регионарного кровотока, требуется стандартизация положения тела и физической активности субъекта.

В течение определенного периода до и во время исследования субъекты должны воздерживаться от приема пищи и напитков, которые могут повлиять на функцию сердечно-сосудистой или пищеварительной системы, печени и (или) почек (например, алкогольные напитки или некоторые соки, такие как грейпфрутовый). Субъектам не рекомендуется принимать какие-либо сопутствующие лекарственные препараты (включая лекарственные препараты растительного происхождения) в течение соответствующего периода до и во время исследования. Однако применение контрацептивов допускается. Если прием сопутствующих лекарственных препаратов неизбежен и они назначены субъекту для купирования нежелательных

явлений (например, головной боли), то в сопроводительных документах необходимо отразить сведения о применении (доза и время применения) и возможном влиянии на исход исследования. Изредка из соображений безопасности или переносимости всем субъектам назначают сопутствующие препараты (например, антагонисты опиоидных рецепторов, противорвотные средства). В этом случае необходимо учитывать возможность лекарственного взаимодействия или влияния на биоаналитическую методику, которые могут сказаться на результатах исследования.

Лекарственные препараты, которые в соответствии с ОХЛП референтного лекарственного препарата должны применяться только в комбинации с другим препаратом (например, некоторые ингибиторы протеазы ВИЧ применяют только в комбинации с ритонавиром), разрешается принимать как отдельно, так и в комбинации с рекомендуемым препаратом.

При изучении биоэквивалентности эндогенных соединений необходимо контролировать факторы, влияющие на их фоновое содержание (например, строгий контроль принимаемой пищи).

Время отбора образцов.

Для точного описания профиля «концентрация–время» необходимо отобрать достаточное количество образцов. В целях получения точной оценки максимальной экспозиции необходимо предусмотреть частый отбор образцов вблизи предполагаемого t_{\max} . В частности, схема отбора образцов должна быть составлена так, чтобы C_{\max} не являлась первой точкой на кривой «концентрация–время». Количество отобранных образцов также должно быть достаточным, чтобы обеспечить надежную оценку длительности экспозиции. Это достигается, когда $AUC_{(0-t)}$ перекрывает не менее 80 % от $AUC_{(0-\infty)}$.

С целью получения надежной оценки константы скорости терминальной элиминации (необходима для достоверной оценки $AUC_{(0-\infty)}$) в течение терминальной фазы следует отобрать не менее 3–4 образцов. Если фаза абсорбции лекарственного препарата для приема внутрь с немедленным высвобождением не превышает 72 ч, то для сравнения длительности экспозиции в качестве альтернативы $AUC_{(0-t)}$ может использоваться AUC , усеченная до 72 ч ($AUC_{(0-72 \text{ ч})}$). Поэтому для любых лекарственных препаратов с немедленным высвобождением независимо от $t_{1/2}$ активного вещества отбор образцов в течение более 72 ч не требуется.

В исследованиях с многократным приемом лекарственного препарата для точного определения $AUC_{(0-\tau)}$ «преддозовый» образец необходимо забрать непосредственно (в течение 5 минут) перед приемом препарата, а последний образец – в течение 10 минут в конце заданного интервала дозирования.

Если в качестве биологического материала, в котором определяется содержание активного вещества, выбрана моча, то ее необходимо собирать в течение не менее трех $t_{1/2}$. Однако в соответствии с рекомендациями по отбору образцов плазмы, сбор мочи в течение более 72 ч также не требуется. Для определения скорости экскреции интервалы между отбором образцов в фазе абсорбции должны быть, по возможности, как можно короче (см. также раздел 5.1.5).

Для эндогенных соединений схема отбора образцов должна позволить описать их фоновое содержание для каждого субъекта 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 (см. также раздел 5.1.5).

При обычных обстоятельствах биологической жидкостью, отбираемой для измерения концентрации действующих веществ, должна быть кровь. В большинстве случаев измеряется содержание действующего вещества или его метаболитов в сыворотке или плазме. В случаях, если отсутствует возможность измерить содержание действующего вещества в плазме, а действующее вещество экскретируется в неизменном виде с мочой и существует пропорциональная взаимосвязь между концентрациями действующего вещества в крови и моче, в качестве биологического материала может использоваться моча. Объем каждого образца следует изучать по возможности незамедлительно после сбора и вносить результаты в отчет. Количество образцов должно быть достаточным, чтобы провести расчет фармакокинетических параметров. Тем не менее, в большинстве случаев следует избегать использования только данных о выделении действующего вещества с мочой, так как это не позволяет рассчитать t_{\max} и максимальную концентрацию вещества в системной циркуляции.

Образцы биожидкости необходимо обрабатывать и хранить в условиях, при которых ранее не обнаруживалось разложение определяемых компонентов (в большинстве случаев, приемлемым является хранение при температуре не выше -20°C). Данные условия должны быть включены в отчет по валидации (см. подраздел 5.1.8., «Представление данных»).

Методология сбора образцов оговаривается в протоколе исследования.

Прием натощак или после еды.

Исследования биоэквивалентности, как правило, проводят натощак, поскольку считается, что это соответствует наибольшей чувствительности для выявления различий между сравниваемыми лекарственными препаратами. Если в ОХЛП референтного препарата его рекомендуется применять натощак или независимо от приема пищи, то исследование биоэквивалентности проводят натощак. Если согласно ОХЛП референтного препарата его следует применять исключительно после еды, то исследование биоэквивалентности проводят после приема пищи.

Однако для некоторых лекарственных форм (например, микроэмульсии, твердые дисперсии) исследование биоэквивалентности проводят как натощак, так и после приема пищи; указанное правило не применяется, если лекарственный препарат необходимо принимать либо строго натощак, либо после еды.

Если требуется проведение обоих видов исследования, то допустимо проводить два отдельных перекрестных исследования в двух группах или одно перекрестное исследование в четырех группах субъектов.

В условиях, когда прием лекарственного препарата осуществляется после приема пищи, ее состав должен соответствовать рекомендациям ОХЛП референтного препарата. Если в ней отсутствуют какие-либо рекомендации по этому поводу, то пища должна быть высококалорийной (800–1000 ккал), с высоким содержанием жиров (около 50 % от общей калорийности). На белки должно приходиться 150 ккал, на углеводы – 250 ккал и на жиры – 500–600 ккал. Необходимо описать состав пищи относительно содержания в ней белков, жиров и углеводов в граммах, абсолютном и относительном содержании калорий.

5.1.5 Исследуемые параметры.

Фармакокинетические свойства.

При оценке фармакокинетических свойств необходимо использовать фактическое время отбора образцов. В исследованиях биоэквивалентности после однократного приема препарата определяют $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, остаточную площадь, C_{max} и t_{max} . Если отбор образцов продолжается в течение 72 ч, и в точке 72 ч концентрация все еще поддается определению, то описывать $AUC_{(0-\infty)}$ и остаточную площадь нет необходимости, достаточно документировать сведения о AUC , усеченной в точке 72 ч ($AUC_{(0-72 \text{ ч})}$). Дополнительно могут быть описаны константа скорости терминальной элиминации (k_{el}) и $t_{1/2}$.

Для лекарственных препаратов с немедленным высвобождением в исследованиях биоэквивалентности в равновесном состоянии необходимо определять $AUC_{(0-\tau)}$, $C_{max,ss}$ и $t_{max,ss}$.

При использовании в качестве биологического материала мочи необходимо определять $Ae_{(0-t)}$ и, по возможности, R_{max} .

Для определения фармакокинетических свойств в исследованиях биоэквивалентности используют внемоделльные методы. Использование камерных моделей неприемлемо.

Исходное соединение или его метаболиты.

Общие рекомендации.

В большинстве случаев оценку биоэквивалентности необходимо проводить путем определения концентрации исходного соединения, поскольку для обнаружения различий между лекарственными препаратами по скорости абсорбции C_{max} исходного соединения обычно является более чувствительным показателем, чем C_{max} его метаболита.

Неактивные пролекарства.

Для неактивных пролекарств исследование биоэквивалентности также рекомендуется проводить в отношении исходного соединения. Определять концентрацию активного метаболита не требуется. Однако концентрация в биожидкостях некоторых пролекарств достаточно низкая, и они быстро элиминируются из кровотока, что затрудняет подтверждение биоэквивалентности по исходному соединению. В этом случае допускается подтверждать биоэквивалентность для основного активного метаболита без измерения концентрации исходного соединения. В контексте настоящих Правил под исходным соединением, являющимся неактивным пролекарством, подразумеваются соединения, с полным отсутствием или очень низкой клинической эффективностью.

Использование данных о метаболите вместо данных об активном исходном соединении.

Использование сведений о метаболите вместо данных об активном исходном соединении не рекомендуется. Такая замена допустима лишь в том случае, если заявитель сможет доказать, что чувствительность аналитического метода в отношении исходного соединения не может быть улучшена, и что после однократного приема лекарственного препарата точно измерить концентрацию исходного соединения невозможно, учитывая, что в исследованиях биоэквивалентности допустимо использовать дозы, превышающие максимальные разовые дозы (см. также раздел 5.1.6). Замена данных об исходном соединении данными о его метаболите допустима лишь в исключительных случаях. При осуществлении такой замены, заявитель обязан представить все имеющиеся сведения, подтверждающие, что экспозиция (AUC) метаболита отражает экспозицию исходного соединения,

и что в терапевтических дозах образование метаболита не является насыщаемым процессом.

Энантиомеры.

Как правило, допускается использовать нестереоспецифичные биоаналитические методы. Однако при выполнении всех нижеперечисленных условий необходимо измерять концентрацию каждого энантиомера:

(1) энантиомеры обладают различными фармакокинетическими свойствами,

(2) фармакодинамические свойства энантиомеров существенно различаются,

(3) отношение экспозиции (AUC) энантиомеров меняется при изменении абсорбции.

Если все вышеперечисленные условия выполняются или сведения о них отсутствуют, то необходимо измерять концентрацию каждого энантиомера. Если только один из энантиомеров обладает фармакологической активностью (фармакологическая активность второго энантиомера низкая или полностью отсутствует), то достаточно подтвердить биоэквивалентность только для активного энантиомера.

Использование мочи в качестве биологического материала.

Если достоверно определить профиль «концентрация–время» в плазме исходного соединения невозможно, то для определения величины экспозиции в качестве замены концентрации в плазме допустимо использование данных об экскреции с мочой. Однако необходимо четко обосновать использование данных мочи при определении максимальной экспозиции. Если удастся получить достоверные сведения о C_{\max} в плазме, то для оценки биоэквивалентности эти данные необходимо представить наряду

с величиной экспозиции, полученной при использовании мочи. При использовании мочи в качестве биологического материала заявитель обязан представить всю имеющиеся сведения, подтверждающие, что экскреция с мочой отражает экспозицию в плазме.

Эндогенные вещества.

Если исследуемое вещество является эндогенным, то измерение фармакокинетических параметров необходимо осуществлять с поправкой на его фоновое содержание, чтобы исследуемые фармакокинетические параметры относились к дополнительным концентрациям, полученным вследствие приема препарата. При условии приемлемой переносимости и если концентрацию, превосходящую фоновую, достигаемую после приема препарата, можно достоверно измерить, в исследованиях биоэквивалентности эндогенных веществ допустимо применение доз, превышающих максимальные разовые дозы. Если после приема различных доз эндогенного вещества разница в экспозиции ранее не была показана, ее необходимо определить либо в пилотном исследовании, либо в рамках одного из периодов основного исследования биоэквивалентности с использованием различных доз референтного препарата при условии, что использование этих доз позволит определить потенциальные различия между лекарственными препаратами.

В протоколе исследования необходимо заранее определить и описать метод, используемый для поправки на фоновое содержание эндогенного вещества. В качестве поправки предпочтительно использовать стандартное вычитание: вычитается либо средняя концентрация эндогенного вещества, определенная до приема препарата, либо средняя AUC. Изредка, когда концентрация

эндогенного вещества после приема препарата существенно превышает фоновую, поправка на фоновое содержание эндогенного вещества не требуется.

В исследованиях биоэквивалентности эндогенных веществ напрямую оценить влияние эффекта переноса не представляется возможным, поэтому необходимо соблюдать особую осторожность при выборе длительности отмывочного периода.

5.1.6 Исследуемые дозировки.

Если регистрации подлежат несколько дозировок, то в зависимости от пропорциональности состава между различными дозировками и другими свойствами лекарственного препарата, описанными ниже, исследование биоэквивалентности достаточно провести в отношении одной или двух из них. Выбор дозировки (дозировок) зависит от линейности фармакокинетики действующего вещества.

Если фармакокинетика нелинейная (увеличение AUC непропорционально принимаемой дозе), пригодность различных дозировок для определения потенциальных различий между сравниваемыми препаратами может отличаться. В рамках настоящих Правил линейность фармакокинетики признается, если разница между скорректированными по дозе средними AUC для исследуемой дозировки (дозировки, используемой в исследовании биоэквивалентности) и дозировки (дозировок), в отношении которой(ых) проведение исследования биоэквивалентности не планируется, не превышает 25 %. Для оценки линейности заявитель должен изучить и критически оценить всю доступную научную литературу (публикации) на предмет пропорциональности дозы.

Линейность подтверждается, если различия между скорректированными по дозе AUC находятся в пределах $\pm 25\%$.

Если биоэквивалентность для дозировки (дозировок), обладающей наибольшей чувствительностью в отношении установления различий между сравниваемыми препаратами, подтверждена, то в проведении исследований биоэквивалентности *in vivo* с другой(ими) дозировкой(ами) нет необходимости.

Общие критерии биовейвера для различных дозировок лекарственного препарата.

В случае заявления об отсутствии необходимости проведения исследования биоэквивалентности в отношении дополнительных дозировок (биовейвер), должны соблюдаться следующие условия:

(а) производственный процесс лекарственных препаратов с различными дозировками должен быть одинаковым;

(b) качественный состав лекарственного препарата с различными дозировками должен совпадать (данное требование не касается красителей и ароматизаторов);

(с) состав лекарственных препаратов с различными дозировками должен быть количественно пропорционален: отношения между содержанием действующего вещества (действующих веществ) и каждого из вспомогательных веществ должны совпадать для всех дозировок (данное требование не касается оболочек лекарственных препаратов с немедленным высвобождением, оболочек капсул, красителей и ароматизаторов).

Если количественная пропорциональность состава отсутствует, то условие с) все еще считается выполненным, если в отношении исследуемой дозировки и дозировок, для которых не предполагается

проведение исследования биоэквивалентности, соблюдаются условия 1) и 2) или 1) и 3):

1. Содержание действующего вещества (действующих веществ) не превышает 5 % от массы ядра таблетки, массы содержимого капсулы;

2. Содержание вспомогательных веществ ядра таблетки или содержимого капсулы совпадает для всех регистрируемых дозировок, изменяется лишь содержание действующего вещества;

3. Содержание наполнителя(ей)² изменяется в зависимости от содержания действующего вещества; содержание остальных вспомогательных веществ ядра или содержимого капсулы для рассматриваемых дозировок остается неизменным;

(d) данные о ТСКР должны подтверждать отсутствие необходимости в проведении дополнительного исследования биоэквивалентности *in vivo*.

Линейная фармакокинетика

Если описанные выше условия а)–d) выполняются, достаточно проведения исследования биоэквивалентности в отношении одной дозировки.

Обычно исследование биоэквивалентности проводится для наибольшей дозировки. Для лекарственных препаратов с линейной фармакокинетикой при условии высокой растворимости действующего вещества исследование биоэквивалентности допустимо проводить с использованием меньших дозировок. Выбор меньшей дозировки также может быть обоснован с позиций безопасности или переносимости, когда применение наибольшей дозировки

² Наполнители – разновидность вспомогательных веществ, используемых для придания твердым лекарственным формам заданного размера.

у здоровых добровольцев неприемлемо. Кроме того, если чувствительность аналитического метода не позволяет точно измерить концентрацию при приеме наибольшей дозировки допустимо применение более высокой дозы (предпочтительно использовать несколько таблеток с наибольшей дозировкой). Превышение максимальной терапевтической дозы допустимо лишь в том случае, если она хорошо переносится здоровыми добровольцами и отсутствуют ограничения по степени абсорбции или растворимости в такой дозе.

Нелинейная фармакокинетика.

Если в терапевтическом диапазоне степень увеличения AUC лекарственных препаратов с нелинейной фармакокинетикой больше степени увеличения дозы, исследование биоэквивалентности обычно проводится с использованием наибольшей дозировки. Как и в случае с лекарственными препаратами с линейной фармакокинетикой, выбор меньшей дозировки может быть обоснован с позиций безопасности и переносимости, когда применение наибольшей дозировки у здоровых добровольцев неприемлемо. Вследствие низкой чувствительности аналитического метода аналогично лекарственным препаратам с линейной фармакокинетикой также допускается применение более высоких доз лекарственных препаратов с нелинейной фармакокинетикой.

Исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов, у которых AUC в терапевтическом диапазоне увеличивается меньше, чем соответствующее увеличение дозы, в большинстве случаев требуется проводить для наибольшей и наименьшей дозировок (или для дозировки, фармакокинетика которой находится в линейном диапазоне), то есть в этом случае проводится два исследования биоэквивалентности. Если нелинейность не обусловлена низкой

растворимостью, а объясняется, например, насыщением переносчиков и соблюдаются условия а)–d) (описанные выше) и сравниваемые препараты не содержат вспомогательных веществ, влияющих на моторику желудочно-кишечного тракта или белки-переносчики, достаточно проведение исследования биоэквивалентности с наименьшей дозировкой (или дозировкой, фармакокинетика которой находится в линейном диапазоне). Выбор других дозировок может быть обоснован низкой чувствительностью аналитического метода, когда проведение исследования с наименьшей дозировкой невозможно или применение наибольшей дозировки у здоровых добровольцев неприемлемо с позиций безопасности или переносимости.

Исследование крайних вариантов (брекетинг).

Если исследование биоэквивалентности требуется провести более чем для двух дозировок, например, вследствие различий в пропорциональности состава, используют подход, позволяющий ограничиться проведением исследований крайних вариантов. Если выбранные дозировки представляют собой крайние значения, например, максимальная и минимальная или наиболее резко отличающиеся по составу дозировки (т.е. отличия по составу других дозировок укладываются в эту разность), то допустимо проведение двух исследований биоэквивалентности.

Если оценку биоэквивалентности необходимо осуществить натощак и после приема пищи и для двух дозировок вследствие нелинейной абсорбции или отклонений от пропорциональности состава, достаточно провести исследование натощак и после приема пищи одной дозировки. Отсутствие необходимости проведения исследования натощак или после приема пищи для других дозировок может быть обосновано данными научных публикаций и (или) данными

о фармакокинетике, полученными при изучении исследуемой дозировки из других исследований, проведенных натощак и после приема пищи. При выборе условий проведения исследований (натощак или после приема пищи) для изучения остальных дозировок предпочтение отдается условиям, обладающим наибольшей чувствительностью в выявлении возможных различий между сравниваемыми препаратами.

Комбинированные лекарственные препараты.

В отношении всех комбинированных лекарственных препаратов должны выполняться условия пропорциональности состава, описанные выше. При расчете содержания каждого действующего вещества комбинации остальные должны рассматриваться в качестве вспомогательных веществ. Каждый слой двухслойных таблеток может рассматриваться независимо.

5.1.7 Методология биоаналитической части исследования.

Биоаналитическая часть исследований биоэквивалентности должна осуществляться в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) Союза.

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

Основными характеристиками биоаналитической методики для обеспечения приемлемости и достоверности полученных аналитических данных являются селективность, нижний предел количественного определения, функция отклика, правильность, прецизионность и стабильность.

Поскольку поддающаяся обнаружению концентрация до приема препарата должна составлять 5 % и менее от C_{\max} , нижний предел количественного определения методики должен обеспечивать определение концентрации $\leq 5\%$ от C_{\max} (см. раздел 5.1.8, «Эффекты переноса»).

В протоколе исследования необходимо предусмотреть возможность проведения повторного анализа исследуемых образцов до фактического начала такого анализа. В обычных условиях повторный анализ образцов по фармакокинетическим причинам не допустим, что особенно важно для исследований биоэквивалентности, поскольку это может исказить результаты исследования.

Лица, осуществляющие анализ образцов, не должны знать о принимаемых субъектами исследуемых препаратах.

5.1.8 Оценка.

Поправку на различия в количественном определении между сериями исследуемого и референтного препарата в исследованиях биоэквивалентности для фармакокинетических параметров вводить, как правило, не допускается. Однако в исключительных случаях, если различия между сериями референтного и исследуемого препарата не превышают 5 % (см. раздел 5.1.2), такая поправка допустима. Поправку, наряду с результатами количественного определения исследуемого препарата и препарата сравнения, необходимо отразить в протоколе исследования.

Отбор субъектов для анализа.

В статистический анализ необходимо, по возможности, включить всех субъектов, принимавших препарат. Однако субъекты, участвовавшие в перекрестном исследовании, у которых отсутствуют

данные как по исследуемому препарату, так и препарату сравнения, или субъекты, участвовавшие в параллельном исследовании, у которых отсутствуют данные единственного периода, не должны включаться в анализ.

Обработку данных всех субъектов, принимавших препарат, необходимо осуществлять одинаковыми методами. В протоколе исследования не допускается предусматривать включение в анализ данных о «дублерах» добровольцев только с целью замены данных исключенных субъектов. Даже если в ходе исследования не было выбываний из исследования, необходимо предусмотреть включение в анализ всех субъектов, принявших препарат.

В исследовании с более чем двумя группами сравнения (например, трехпериодное исследование с двумя референтными препаратами или четырехпериодное исследование при приеме натощак и после приема пищи) анализ по каждой сравниваемой паре необходимо осуществлять лишь после предварительного исключения данных, не относящихся к сравниваемым группам.

Критерии исключения.

Для объективной оценки результатов рандомизированных исследований необходимо, чтобы наблюдение и ведение всех субъектов осуществлялось по единым правилам. Эти правила не должны зависеть от принимаемого препарата или исхода, поэтому решение об исключении субъекта из статистического анализа необходимо принять до начала лабораторного анализа образцов.

Любая причина может являться критерием исключения, если она заранее описана в протоколе исследования, а решение об исключении принято до начала анализа образцов. Однако вследствие снижения статистической мощности исследования, а также

при необходимом минимуме в количестве 12 субъектов, следует избегать исключения последних из исследования.

Примером критериев исключения субъектов из исследования могут являться рвота или диарея, которые могут исказить результаты измерения концентрации. В исключительных ситуациях критерием исключения также может служить одновременное применение других лекарственных препаратов.

В протоколе исследования необходимо заранее описать критерии исключения. Если возникает ситуация, трактуемая как критерий исключения, сведения о ней необходимо занести в индивидуальную регистрационную карту в ходе проведения исследования. Исключение субъектов, основанное на заранее предусмотренных критериях, необходимо четко отразить и перечислить в отчете об исследовании.

Ввиду невозможности отделить влияние лекарственных препаратов от других факторов, влияющих на фармакокинетику, исключение данных только на основании статистического анализа или по фармакокинетическим причинам не допускается.

Исключениями из этого правила являются:

- 1) Субъекты, в плазме которых концентрация референтного препарата не определяется или определяется лишь в незначительных количествах. Концентрации субъекта признаются очень низкими, если его AUC не превышает 5 % от средней геометрической AUC референтного препарата (рассчитанной без учета данных субъекта с выбросами). Исключение данных по этой причине допустимо лишь в единичных случаях, и в целом ставит под сомнение достоверность (валидность) проведенного исследования.

2) Субъекты с ненулевой исходной концентрацией, превышающей 5 % от C_{\max} . Такие данные необходимо исключить из исследования биоэквивалентности (см. ниже «Эффекты переноса»).

В отношении лекарственных препаратов с немедленным высвобождением вышеописанные ситуации могут возникать при несоблюдении субъектами режима исследования или недостаточном отмывочном периоде. В первом случае необходимо предусмотреть осмотр ротовой полости субъекта, чтобы удостовериться, что препарат был проглочен, во втором – предусмотреть достаточный отмывочный период. Образцы субъектов, исключенных из статистического анализа, необходимо проанализировать, а их результаты представить в отчете об исследовании (см. ниже «Представление данных»).

Согласно разделу 5.1.4, $AUC_{(0-t)}$ должна перекрывать не менее 80 % $AUC_{(0-\infty)}$. Тем не менее, если это правило не выполняется, исключать субъектов из статистического анализа не следует. Однако если $AUC_{(0-t)}$ не перекрывает 80 % $AUC_{(0-\infty)}$ в более чем 20 % случаев, следует усомниться в результатах такого исследования. Это требование не применимо к исследованиям с длительностью отбора образцов, равным 72 ч и более, когда вместо $AUC_{(0-t)}$ используется $AUC_{(0-72 \text{ ч})}$.

Анализируемые параметры и допустимые пределы.

В исследованиях биоэквивалентности с однократным приемом лекарственного препарата к исследуемым фармакокинетическим параметрам относятся: $AUC_{(0-t)}$ или $AUC_{(0-72 \text{ ч})}$ соответственно и C_{\max} . Отношение данных параметров исследуемого препарата к референтному препарату должно лежать в интервале 80,00–125,00 % при 90 %-ном доверительном интервале. Границы интервалов округляются до двух знаков после запятой.

К изучаемым параметрам исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов с немедленным высвобождением с определением равновесной концентрации относятся $AUC_{(0-\tau)}$ и $C_{max,ss}$, которые должны лежать внутри выше описанных интервалов.

Если в качестве биологического материала используется моча, показатель $Ae_{(0-t)}$ должен лежать в интервале, описанном для $AUC_{(0-t)}$, а R_{max} – в интервале для C_{max} .

Статистическая оценка t_{max} не требуется. Однако если указывается, что быстрое высвобождение имеет клиническую значимость и влияет на начало действия или приводит к нежелательным реакциям, значимых различий в t_{max} и его вариации между исследуемым препаратом и референтным препаратом быть не должно.

Допустимые пределы биоэквивалентности лекарственных препаратов с узким терапевтическим диапазоном следует сузить (см. раздел 5.1.9). С другой стороны, для лекарственных препаратов с высокой вариабельностью C_{max} в определенных случаях эти границы могут быть расширены.

Статистический анализ.

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. Процедуры статистической обработки следует оговорить в протоколе перед началом сбора данных.

Статистический метод для анализа биоэквивалентности основывается на определении 90-процентного доверительного

интервала для отношений логарифмически преобразованных средних арифметических $\left(\frac{\text{воспроизведенный препарат}}{\text{препарат сравнения}}\right)$ рассматриваемых фармакокинетических параметров, а также на выполнении двух односторонних тестов при 5% уровне значимости. Для установления фармакокинетической биоэквивалентности рассчитанный доверительный интервал должен находиться в границах заранее установленных пределов биоэквивалентности. Эти процедуры должны приводить к симметричному заключению относительно двух изучаемых лекарственных препаратов (например, позволяя получить одинаковый вывод о том, является ли эквивалентным воспроизведенный лекарственный препарат по отношению к препарату сравнения или препарат сравнения по отношению к воспроизведенному).

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). Обычно модель дисперсионного анализа в качестве независимых переменных вариантов включает препарат, период исследования, последовательность приема и факторы, относящиеся к субъекту.

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.

Такая же процедура должна использоваться для изучения параметров, полученных в результате испытаний в стационарном состоянии или суммарного выведения с мочой, если это требуется.

Следует представить также данные по описательной статистике для показателя t_{\max} . В тех случаях, когда t_{\max} считается клинически значимым, среднее значение и диапазон t_{\max} следует сравнить между тестируемым и референтным лекарственным препаратом для исключения клинически значимых численных значений. Формальное статистическое сравнение требуется редко. Обычно размер выборки не рассчитывается, для получения необходимой статистической мощности для t_{\max} . Если параметр t_{\max} будет подвергаться статистическому анализу, то изучение должно основываться на непараметрических методах и проводиться с использованием нетрансформированных данных. Для повышения точности оценки t_{\max} необходимо взять достаточное количество образцов близких к ожидаемым максимальным концентрациям. Для показателей, описывающих фазу элиминации ($t_{1/2}$), требуется только описательная статистика.

Информация относительно обращения с резко выделяющимися данными изложена в подразделе 5.1.8., «Критерии исключения». Исключение данных только по причинам статистического и фармакокинетического характера не допустимо.

Эффекты переноса.

Проверка на эффект переноса не является релевантной, и никакие решения, влияющие на анализ (например, анализ данных, полученных только из первого периода исследования), не должны приниматься на ее основе. (Уточнить перевод). Вероятность переноса может быть напрямую учтена при отборе образца биожидкости до приема препарата во втором периоде исследования (и, если применимо, в последующих).

Если концентрация до приема препарата превышает 5 % от C_{max} , то сведения, полученные от субъекта в данном периоде, исключаются из статистического анализа. Это значит, что в рамках двухпериодного исследования такой субъект выбывает из анализа. Продолжение исследования считается неприемлемым, если число подлежащих анализу субъектов оказалось менее 12. Данный подход не применим к исследованию эндогенных соединений.

Двухэтапный дизайн.

Исследование биоэквивалентности допускается проводить в два этапа. На первом этапе проводится исследование на начальной (первичной) группе субъектов с анализом полученных результатов. Если биоэквивалентность не подтверждается, то можно набрать дополнительную группу и объединить результаты, полученные в обеих группах для окончательного анализа. Если выбран такой подход, то нужно принять определенные меры, чтобы сохранить неизменной вероятность ошибки I рода для всего исследования, при этом статистические критерии остановки исследования необходимо четко

определить до его начала. Анализ данных, полученных в ходе первого этапа, можно рассматривать как промежуточный, и оба анализа необходимо проводить по скорректированным уровням значимости. Для доверительных интервалов следует использовать скорректированную вероятность не менее 90 %. Например, использование 94,12 % доверительных интервалов для обоих анализов на первом этапе и для объединенных данных первого и второго этапов будет приемлемым, однако существует множество других вариантов, и выбор, какой уровень значимости (α) использовать для промежуточного анализа, является прерогативой спонсора. В протоколе необходимо заранее описать двухэтапный дизайн исследования наряду со скорректированным уровнем значимости.

При анализе объединенных данных, полученных в ходе двух этапов, фактор «этап» необходимо включить в модель дисперсионного анализа.

Представление данных.

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 $AUC_{(0-\infty)}$).

В качестве основных результатов статистического анализа изученных фармакокинетических параметров следует указывать точечные оценки и 90 % доверительные интервалы для отношения средних значений.

Следует также прилагать традиционные результирующие таблицы дисперсионного анализа, включая результаты статистических тестов на все эффекты в использованной модели.

Отчет необходимо детализировать настолько, чтобы фармакокинетический и статистический анализы можно было воспроизвести, то есть включить точное время отбора образцов после приема препарата, концентрации препаратов, значения фармакокинетических параметров каждого субъекта в каждом периоде исследования и схему рандомизации.

Необходимо подробно описать все случаи выбывания и исключения субъектов из исследования. По возможности, для каждого такого субъекта в отдельном документе необходимо представить данные о концентрации и фармакокинетических параметрах, но не включать их в общий статистический анализ.

Биоаналитическую методику необходимо документировать до начала исследования для последующего формирования валидационного отчета. Необходимо представить биоаналитический отчет в составе итогового отчета исследования биоэквивалентности. Он должен включать краткое описание использованной биоаналитической методики, результаты по всем калибровочным стандартам и образцам для контроля качества. Необходимо представить достаточное количество хроматограмм или других исходных данных, охватывающих весь диапазон концентраций для всех стандартов и образцов для контроля качества, а также испытуемых образцов

(все хроматограммы и другие первичные данные не менее чем от 20 % субъектов с соответствующими образцами для контроля качества и калибровочными стандартами циклов, относящихся к указанным субъектам).

Если в отношении определенной дозировки определенного лекарственного препарата проведено несколько исследований, часть из которых подтверждает его биоэквивалентность, а часть нет, всю совокупность данных необходимо рассматривать как единое целое. В расчет необходимо принимать только исследования, описанные в разделе 5.1. Наличие исследований, подтверждающих биоэквивалентность, не является поводом не рассматривать исследования, в которых она не подтверждена. Заявитель должен тщательно проанализировать все результаты и обосновать наличие биоэквивалентности. В качестве альтернативы в дополнение к отдельным исследованиям, по возможности, допускается проведение обобщенного анализа всех исследований. Недопустимо обобщать исследования, не подтверждающие наличие биоэквивалентности, если исследования, подтверждающие биоэквивалентность, отсутствуют.

5.1.9 Лекарственные препараты с узким терапевтическим диапазоном

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 %. Дать четкое определение лекарственным препаратам с узким терапевтическим диапазоном невозможно, поэтому отнесение действующего вещества к этой группе следует решать, исходя

из клинических соображений (при необходимости привлекая экспертов уполномоченных органов государств-членов Союза).

5.1.10 Лекарственные препараты с высокой вариабельностью.

Если внутрииндивидуальная вариабельность фармакокинетического параметра превышает 30 %, такие лекарственные препараты признаются высоко вариабельными. Если заявитель считает, что лекарственный препарат может обладать высокой вариабельностью по скорости и (или) степени абсорбции, рекомендуется проводить исследования с повторным перекрестным дизайном.

Лекарственные препараты с высокой вариабельностью, для которых большее различие в C_{max} считается клинически незначимым (подтвержденное строгим клиническим обоснованием), ее оценка может осуществляться на основании расширенных интервалов. В этом случае критерий приемлемости для C_{max} может быть расширен до 69,84–143,19 %. В целях расширения критерия приемлемости дизайн исследования биоэквивалентности должен быть повторным и в нем необходимо подтвердить, что вариабельность C_{max} референтного лекарственного препарата в исследовании действительно превышает 30 %. Заявитель должен доказать, что вычисленная внутрииндивидуальная вариабельность достоверна, а не обусловлена выбросами. Возможность расширения допустимого интервала необходимо заранее оговорить в протоколе исследования.

Определение степени расширения интервала основано на внутрииндивидуальной вариабельности, полученной по результатам исследования биоэквивалентности с использованием метода взвешенной средней биоэквивалентности (scaled average bioequivalence) согласно формуле $[U, L] = \exp [\pm k \times s_{WR}]$, где U – верхняя граница

интервала приемлемости, L – нижняя граница интервала приемлемости, k – нормативная константа, принятая за 0,760 и s_{WR} – внутрииндивидуальное стандартное отклонение логарифмически преобразованных значений C_{max} лекарственного препарата сравнения. Из представленной ниже таблицы видно, как на основании описанной методологии различная степень вариабельности влияет на границы интервалов приемлемости.

Внутрииндивидуальный CV (%)*	Нижняя граница	Верхняя граница
30	80,00	125,00
35	77,23	129,48
40	74,62	134,02
45	72,15	138,59
≥50	69,84	143,19

$$*CV(\%) = 100\sqrt{e^{s_{WR}^2} - 1}$$

Отношение геометрических средних должно находиться в пределах 80,00–125,00 %.

Расширение приемлемых границ биодоступности на основании внутрииндивидуальной вариабельности не распространяется на AUC, границы которой вне зависимости от вариабельности должны быть ограничены интервалом 80,00–125,00 %.

При повторном дизайне используют 3- или 4-периодную перекрестную схему исследования.

5.2. Тест сравнительной кинетики растворения *in vitro*.

Описание испытания растворения кратко представлено в Приложении 1, включая основные требования по использованию фактора подобия (сходимости, f_2 -критерий).

5.2.1. Тест сравнительной кинетики растворения *in vitro* как дополнение к исследованиям биоэквивалентности.

Необходимо представить результаты ТСКР в трех различных буферных средах (обычно при рН 1,2; 4,5 и 6,8) и среде, подлежащей использованию в выпускающих испытаниях лекарственного препарата (среда для контроля качества), серий исследуемого препарата и референтного препарата, использованных в исследовании биоэквивалентности. Исследование некоторых лекарственных форм, например, таблеток, диспергирующихся в полости рта, проводят в различных условиях. Отчет о результатах исследования следует представлять в виде профилей доли растворенного количества во времени с указанием средних значений и обобщающих статистик.

В отсутствие иных обоснований спецификации на ТСКР для контроля качества исследуемого лекарственного препарата следует составлять на основании профиля растворения серии лекарственного препарата, биоэквивалентность которой референтному препарату подтверждена (см. Приложение № 1).

Если результаты ТСКР, проведенного с различными сериями, не подтверждают ранее доказанную в исследованиях *in vivo* биоэквивалентность, то опираются на результаты исследований *in vivo*. Однако необходимо изучить и объяснить причины такого расхождения.

5.2.2. Тест сравнительной кинетики растворения в целях биовейвера дозировок

Обоснованность отказа от проведения дополнительных исследований биоэквивалентности *in vivo* необходимо подтвердить надлежащим ТСКР. Если не указано иное, необходимо изучить растворение при различных значениях рН (обычно при рН 1,2; 4,5 и 6,8). Для всех представленных серий необходимо подтвердить

сопоставимость профилей растворения *in vitro* между дополнительными дозировками и дозировкой(ами) из серии, использованной(ыми) в исследовании биоэквивалентности, во всех условиях (см. Приложение № 1).

При значениях рН, при которых ни для одной из дозировок не удастся достичь полного растворения, условия проведения ТСКР между дозировками могут различаться. Однако для подтверждения того, что это обусловлено свойствами действующего вещества, а не лекарственной формы, необходимо провести сравнение с соответствующей дозировкой референтного препарата. Кроме того, заявитель вправе подтвердить сопоставимость профилей для одинаковых доз (например, между двумя таблетками с дозировкой 5 мг и одной таблеткой с дозировкой 10 мг).

5.3. Отчет об исследовании.

5.3.1. Отчет об исследовании биоэквивалентности.

Отчет об исследовании биоэквивалентности должен содержать все необходимые сведения о его протоколе, проведении и анализе. Отчет должен быть составлен и подписан исследователем в соответствии с Приложением № 1 правил Надлежащей клинической практики Союза. Структура отчета должна соответствовать приложению 4 к настоящим правилам.

В нем также необходимо указать имя и место работы ответственного(ых) исследователя(ей), место и длительность проведения исследования, сертификат(ы) или заключение(я) аудита (при наличии).

Отчет должен содержать подтверждение того, что выбор референтного лекарственного препарата соответствует требованиями раздела 4.1.2. настоящих Правил. В частности необходимо указать

его торговое наименование, дозировку, лекарственную форму, номер серии, производителя, срок годности и страну, в которой был приобретен препарат сравнения.

Необходимо указать наименование и состав исследуемого(ых) препарата(ов). Необходимо указать размер и номер серии, дату производства и, по возможности, дату истечения срока годности исследуемого препарата.

Сертификаты анализа исследуемого препарата и референтного препарата, использованные в исследовании, прикладываются к отчету в виде приложения.

Сведения о концентрациях, фармакокинетических параметрах и результатах статистического анализа необходимо представить в объеме, предусмотренном разделом 4.1.8. «Представление данных».

5.3.2. Прочие требования к представлению результатов исследования биоэквивалентности в составе регистрационного досье

Заявитель должен представить подписанный им официальный документ, подтверждающий, что количественный состав и технология производства исследуемого препарата и препарата, поданного на регистрацию, не отличаются. Необходимо приложить сравнительные профили растворения (см. раздел 5.2).

Отчет о валидации биоаналитического метода необходимо включить в Модуль 5 регистрационного досье в формате общего технического документа.

По запросу необходимо представить данные (например, в виде электронного текстового файла с данными разделенными запятыми или пробелами или в файле формата Excel), достаточные для воспроизведения фармакокинетического и статистического анализа, включая данные о времени отбора образцов, концентрации

лекарственного препарата, значениях фармакокинетических параметров каждого субъекта в каждом периоде и схеме рандомизации.

5.4. Объем исследований при внесении изменений в регистрационное досье

При изменении ранее одобренного состава или технологии производства, которые могут повлиять на биодоступность, проводятся исследования биоэквивалентности *in vivo*, если не представлено иных обоснований. Всякое представленное обоснование должно основываться на общих принципах, например, указанных в Приложении 3 или при установлении приемлемой (уровня А) корреляции *in vitro/in vivo* (IVIV).

Если биодоступность измененного лекарственного препарата ранее изучена и установлена приемлемая (уровня А) корреляция между функциональными характеристиками *in vivo* и кинетикой растворения *in vitro*, то при сопоставимости профиля растворения *in vitro* между новым препаратом и ранее одобренным в тех же условиях испытания, которые использовались для установления корреляции, то исследование биоэквивалентности проводить не требуется (см. Приложение № 1).

При внесении изменений в регистрационное досье препаратов, которые не являются воспроизведенными препаратами (например, оригинальные, гибридные и другие) для проведения исследования биоэквивалентности и ТСКР в качестве референтного препарата служит ранее одобренный лекарственный препарат с прежним составом, местом производства, упаковкой и т.п.

При внесении изменений в досье генерического или гибридного препарата для исследования биоэквивалентности в качестве препарата сравнения (компаратора) используют имеющуюся на рынке серию референтного препарата. Если лекарственный препарат отсутствует

на рынке, то сравнение допускается осуществлять с ранее одобренным составом (воспроизведенного или гибридного препарата) с представлением соответствующего обоснования. При изменениях, не требующих исследования биоэквивалентности, следует руководствоваться рекомендациями и требованиями, содержащимися в иных опубликованных нормативных документах Союза.

Условные обозначения

Фармакокинетические параметры

$Ae_{(0-t)}$	общее содержание неизмененного действующего вещества в моче, собранной от момента приема до времени t
$AUC_{(0-t)}$	площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t
$AUC_{(0-\infty)}$	площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема препарата до бесконечности
$AUC_{(0-\tau)}$	равновесная AUC в интервале дозирования
$AUC_{(0-72 \text{ ч})}$	площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема препарата до 72 ч
C_{\max}	максимальная плазменная концентрация
$C_{\max,ss}$	равновесная максимальная плазменная концентрация
остаточная площадь	экстраполируемая площадь $\frac{AUC_{(0-\infty)} - AUC_{(0-t)}}{AUC_{(0-\infty)}}$
R_{\max}	максимальная скорость выведения с мочой
t_{\max}	время достижения C_{\max}
$t_{\max,ss}$	время достижения $C_{\max,ss}$
$t_{1/2}$	период полувыведения из плазмы
k_{el}	константа скорости терминальной элиминации
ОХЛП	общая характеристика лекарственного препарата

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Тест сравнительной кинетики растворения и сопоставимость
профилей растворения**

1. Общие аспекты ТСКР во взаимосвязи с биоэквивалентностью

При разработке лекарственного препарата ТСКР служит инструментом установления свойств препарата, способных повлиять и оказывающих ключевой эффект на биодоступность. По завершении разработки состава препарата и производственного процесса, ТСКР используют для контроля качества масштабирования и промышленных серий, чтобы обеспечить как однородность серий, так и сопоставимость профилей растворения с сериями, использованными в основных клинических исследованиях. Кроме того, в некоторых случаях ТСКР может служить заменой исследованиям биоэквивалентности. В связи с этим ТСКР может преследовать различные цели:

1) При экспертизе качества лекарственного препарата:

для получения характеристик серии, использованной в исследованиях биодоступности (биоэквивалентности) и основных (ключевых) клинических исследованиях, чтобы обосновать спецификации по контролю качества;

как инструмент контроля качества в целях подтверждения однородности производства;

для получения характеристик препарата сравнения, использованного в исследованиях биодоступности (биоэквивалентности) и основных клинических исследованиях.

2) Как замена исследованиям биоэквивалентности:

чтобы подтвердить (в определенных случаях) аналогичность различных составов действующего вещества и референтного лекарственного препарата (биоэвейверы, например, при внесении изменений, изменении состава в ходе разработки лекарственного препарата и воспроизведенные лекарственные препараты, см. раздел 4.2 и Приложение № 3);

чтобы установить однородность серий препаратов (исследуемого и препарата сравнения), на которых будет основываться выбор соответствующих серий для использования в исследованиях *in vivo*.

Методы испытаний необходимо разработать применительно к каждому лекарственному препарату на основании общих и (или) частных фармакопейных требований. Если указанные требования не удовлетворительны и (или) не отражают процесс растворения и всасывания *in vivo* (биорелевантность), то допустимо использовать альтернативные методы, при условии наличия у них достаточной дискриминационной способности и способности улавливать разницу между сериями с приемлемой и неприемлемой биодоступностью лекарственного препарата в условиях *in vivo*. Необходимо всегда принимать во внимание современные сведения, включая взаимодействие характеристик, основанных на БКС и лекарственной форме.

Чтобы получить полноценные профили растворения, интервалы между отбором проб должны быть достаточно частыми (не реже, чем через каждые 15 минут). В период максимального изменения профиля

растворения отборы проб рекомендуется осуществлять еще чаще. Для построения правильного профиля растворения быстро растворяющихся лекарственных препаратов, полное растворение которых укладывается в 30 минут, отборы проб необходимо осуществлять каждые 5 или 10 минут.

Если действующее вещество является хорошо растворимым, разумно предположить, что проблемы с биодоступностью не возникнут, если в дополнение к этому лекарственная форма быстро растворяется при физиологических значениях рН, а вспомогательные вещества не влияют на биодоступность. И наоборот, если действующее вещество ограничено растворимо или малорастворимо, фактором, лимитирующим скорость всасывания, может стать растворимость лекарственной формы. Аналогичная ситуация возникает, если вспомогательные вещества влияют на высвобождение и последующее растворение действующего вещества. В таких случаях необходимо проводить ТСКР в различных условиях с соответствующей схемой отбора проб.

2. Сопоставимость профилей растворения

Результаты ТСКР и основанные на них выводы (например, в обоснование биовейвера) признаются правильными, если описание профиля растворения основывалось на достаточном количестве временных точек.

В дополнение к требованиям, изложенным выше в разделе 1, в отношении лекарственных форм с немедленным высвобождением необходимо провести сравнение во временной точке «15 минут», чтобы выяснить, произошло ли полное растворение до опорожнения желудка.

Если в течение 15 минут растворилось более 85 % лекарственного препарата, профили растворения признаются сопоставимыми без дальнейшей математической обработки данных.

Если 85 % лекарственного препарата растворилось в течение 30, а не 15 минут, то необходимы три временные точки: до истечения 15 минут, на 15 минуте и в точке, когда степень высвобождения составляет около 85 %.

Рекомендации по лекарственным препаратам с модифицированным высвобождением изложены в соответствующих документах Союза.

Сопоставимость профилей растворения может быть определена с использованием фактора f_2 по следующей формуле:

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\overline{Q}_R(t) - \overline{Q}_T(t)]^2}{n}}} \right],$$

где f_2 – фактор подобия (сходимости), n – количество временных точек, $\overline{Q}_R(t)$ – среднее значение степени высвобождения (в процентах) действующего вещества в точке t (после начала исследования) из референтного препарата, $\overline{Q}_T(t)$ – среднее значение степени высвобождения (в процентах) действующего вещества в точке t (после начала исследования) из исследуемого препарата. Необходимо определить степень высвобождения исследуемого препарата и референтного препарата.

Оценка фактора подобия (сходимости) основана на следующих условиях:

минимальное количество временных точек – 3 (не считая нулевой точки отбора);

для обоих сравниваемых препаратов выбираются одинаковые временные точки;

для каждой временной точки необходимо минимум 12 значений степени высвобождения действующего вещества для обоих препаратов;

для каждого из составов допускается не более одного случая превышения среднего значения степени высвобождения 85 %.

Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) для степени высвобождения действующего вещества для первой временной точки любого из препаратов не должно превышать 20 %, а во всех последующих – не более 10 %.

Критерий приемлемости для фактора подобия составляет от 50 до 100, что подтверждает сопоставимость профилей растворения.

В случае несоответствия критерию приемлемости для f_2 профили растворения можно сравнивать, используя альтернативные методы, например расчет фактора различия f_1 , функцию распределения Вейбулла или сравнение степеней высвобождения в разных временных точках (например, по t-критерию Стьюдента).

Методы, альтернативные расчету f_2 , считаются приемлемыми, если они статистически корректны, а их использование достаточно обосновано.

Необходимо заранее определить и обосновать пределы приемлемости критерия сопоставимости, но при этом они не должны превышать 10 %. Кроме того, вариация растворения между данными исследуемого и референтного препарата также должна быть сопоставимой, однако более низкая вариация для исследуемого препарата является приемлемой.

Необходимо представить обоснование, что статистическое программное обеспечение прошло валидацию.

Необходимо дать подробное описание и объяснение всем действиям, предпринятым в ходе исследования, с представлением соответствующих обобщающих таблиц.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Требования к исследованию биоэквивалентности различных
лекарственных форм**

Несмотря на то, что настоящие Правила распространяются на лекарственные формы с немедленным высвобождением, в Приложении № 2 приводятся некоторые общие рекомендации по проведению исследования биоэквивалентности других видов лекарственных форм, а также разновидностей лекарственных форм с немедленным высвобождением.

Если исследуемый препарат содержит другую соль, сложный эфир, стереоизомер или их смесь, другое комплексное соединение или производное действующего вещества по сравнению с лекарственным препаратом сравнения, то биоэквивалентность необходимо подтвердить с помощью исследований биоэквивалентности *in vivo*. Однако если действующее вещество исследуемого препарата идентично действующему веществу референтного препарата (или содержит соли со схожими свойствами, установленными в разделе 3 Приложения № 3), то в некоторых случаях, описанных ниже и в Приложении № 3, проведение исследований биоэквивалентности *in vivo* не требуется.

Лекарственные формы для приема внутрь с немедленным высвобождением системного действия

В отсутствие условий для биоэвивера (см. Приложение № 3) в отношении таких лекарственных форм, как: таблетки, капсулы и суспензии для приема внутрь необходимо проводить исследования биоэквивалентности. В отношении таблеток, диспергирующихся в полости рта, и растворов для приема внутрь применяются специальные, описанные ниже рекомендации.

Таблетки, диспергирующиеся в полости рта

Таблетки, диспергирующиеся в полости рта (ТДП), предназначены для быстрого растворения во рту. Если действующее вещество также растворяется в слюне и способно всасываться через слизистую оболочку ротовой полости, то время приема препарата и его контакта со слизистой оболочкой являются важными факторами. После проглатывания высвободившегося действующего вещества из ТДП покрытой оболочкой, в зависимости от состава препарата, всасывание также происходит и в желудочно-кишечном тракте. Если можно подтвердить, что действующее вещество не всасывается из полости рта, а требует проглатывания для абсорбции из желудочно-кишечного тракта, то препарат может удовлетворять критериям биоэвивера на основании БКС (см. Приложение № 3). Если это не возможно подтвердить, то необходимо проводить исследование биоэквивалентности у человека.

Если ТДП являются дополнительной (новой) лекарственной формой и (или) расширением линейки дозировок, для иного состава лекарственного препарата для приема внутрь, то проводят трехпериодное исследование с целью оценить применение таблеток,

диспергирующихся в полости рта, при одновременном приеме с водой или без нее. Однако если биоэквивалентность между ТДП, принятой без воды, и препаратом сравнения, запитого водой, показана в двухпериодном исследовании, то биоэквивалентность ТДП, запиваемой водой, считается доказанной.

Если ТДП по отношению к референтному препарату, представляющему собой ТДП, является воспроизведенным или гибридным препаратом, при планировании исследования следует придерживаться следующих рекомендаций:

если референтный препарат допустимо как запивать, так и не запивать водой, то исследование биоэквивалентности должно проводиться без приема воды, поскольку это больше соответствует способу применения препарата в реальных условиях. Это особенно важно, если действующее вещество растворяется и всасывается из полости рта. Если биоэквивалентность без приема воды подтверждена, то биоэквивалентность с одновременным приемом жидкости считается доказанной;

если референтный препарат либо запивают, либо не запивают водой, то исследование биоэквивалентности проводится в соответствующих условиях (со стандартным двухпериодным перекрестным дизайном);

если референтный препарат либо запивают, либо не запивают водой, а исследуемый препарат предназначен для обоих способов приема, то сравнение проводят, запивая и не запивая исследуемый препарат водой, при этом препарат применяется в соответствии с рекомендованным способом (3-периодное исследование в трех группах в шести последовательностях).

В исследованиях по изучению ТДП, если последняя не запивается водой, рекомендуется непосредственно перед приемом препарата смочить полость рта 20 мл воды. Прием жидкости в течение 1 ч после приема препарата запрещен.

Исследование биоэквивалентности в отношении пленок, диспергирующихся в полости рта, пленок или защечных таблеток, таблеток подъязычных и таблеток жевательных проводится по аналогии с ТДП. Исследование биоэквивалентности необходимо проводить в соответствии с рекомендуемым способом применения исследуемого препарата.

Растворы для приема внутрь

Если исследуемый препарат представляет собой водный раствор для приема внутрь и содержит ту же концентрацию действующего вещества, что и зарегистрированный раствор, то проведение исследований биоэквивалентности не требуется. Однако, если вспомогательные вещества способны повлиять на моторику желудочно-кишечного тракта (например, сорбитол, маннитол и т.д.), абсорбцию (например, поверхностно активные вещества или соединения, влияющие на белки-переносчики), процесс растворения и всасывания (например, сорастворители) или стабильность действующего вещества *in vivo* и если различия между содержанием вспомогательных веществ должным образом не обоснованы прочими данными, то проводится исследование биоэквивалентности. Требования к вспомогательным веществам растворов для приема внутрь аналогичны условиям биоэвейвера (раздел 4.2 «Вспомогательные вещества» Приложения № 3).

Если биоэквивалентность исследуемого препарата, являющегося раствором для приема внутрь, должна быть подтверждена

по отношению к другому лекарственному препарату с немедленным высвобождением, то необходимо провести исследование биоэквивалентности.

Комбинированные лекарственные препараты

Требования по проведению исследования представлены в документе Союза по клинической разработке комбинированных лекарственных препаратов. Условия биовейвера в отношении комбинированных лекарственных препаратов изложены в разделе 5 Приложения 3.

Лекарственные формы с немедленным высвобождением системного действия, не предназначенные для приема внутрь

Настоящий раздел, в частности, касается ректальных лекарственных форм. В отношении них, как правило, проводятся исследования биоэквивалентности. Если лекарственный препарат представляет собой раствор, который содержит действующее вещество в той же концентрации, что и зарегистрированный лекарственный препарат с тем же качественным и схожим количественным содержанием вспомогательных веществ, возможен биовейвер (при этом могут применяться требования, аналогичные для растворов для приема внутрь).

Положения данного подраздела не относятся к лекарственным препаратам для ингаляций, применяемых для лечения бронхиальной астмы и ХОБЛ, а также к гормональным спреям для назального применения.

Растворы для парентерального введения

Если исследуемый препарат является водным раствором для внутривенного введения и содержит то же действующее вещество, что и зарегистрированный препарат, то проведение исследования биоэквивалентности, как правило, не требуется. Однако если одно из вспомогательных веществ способно взаимодействовать с действующим веществом (например, с образованием комплексов) или другим образом влиять на его распределение, метаболизм и выведение, требуется проведение исследования биоэквивалентности. Его можно избежать, если сравниваемые препараты содержат примерно одинаковое количество вспомогательных веществ и должным образом доказано, что имеющиеся различия в их содержании не влияют на фармакокинетику действующего вещества.

При других парентеральных путях введения, например, внутримышечном и подкожном, если исследуемый препарат имеет одинаковый тип растворителя (например, водная или масляная среда), содержит то же действующее вещество в той же концентрации и те же вспомогательные вещества в схожих количествах, что и зарегистрированный лекарственный препарат, то проведение исследований биоэквивалентности не требуется. Более того, проведение исследования биоэквивалентности водных растворов с примерно одинаковым содержанием вспомогательных веществ не требуется, если последние не влияют на вязкость.

Липосомальные, мицеллярные и эмульсионные лекарственные формы для внутривенного введения

1) Липосомальные лекарственные формы. Фармакокинетические аспекты липосомальных препаратов для внутривенного введения требуют особых подходов и в настоящих Правилах не рассматриваются.

2) Эмульсии. Эмульсии, как правило, не подлежат процедуре биовейвера.

Однако при соблюдении нижеперечисленных условий процедура биовейвера возможна:

а) лекарственная форма не предназначена для контролируемого высвобождения и (или) контролируемого распределения (векторной доставки);

б) способ и скорость введения совпадают с таковыми для зарегистрированного препарата.

В таких случаях качественный и количественный состав препарата не должен отличаться от зарегистрированного; необходимо представить обоснованные данные, подтверждающие высокую схожесть физико-химических свойств, включая фракционный состав дисперсной липидной фазы и другие значимые характеристики эмульсии, в том числе поверхностные свойства (например, ζ -потенциал и реологические свойства).

3) Если в отношении липидов для внутривенного парентерального питания представлены обоснованные данные о сопоставимости физико-химических свойств, возможна процедура биовейвера. Различия в составе могут быть обоснованы свойствами и показаниями к применению таких лекарственных форм.

4) Мицеллообразующие препараты. Мицеллярные растворы для внутривенного введения могут рассматриваться как «комплексные» растворы, поэтому они не подпадают под биовейвер.

Однако при соблюдении нижеперечисленных условий процедура биовейвера возможна:

а) при разведении препарата в соответствии с рекомендациями по его способу применения происходит быстрый распад мицелл, а лекарственная форма не предназначена для контролируемого высвобождения или распределения

б) способ и скорость введения совпадают с зарегистрированным препаратом

с) вспомогательные вещества не влияют на распределение, метаболизм и выведение действующего вещества.

В таких случаях качественный и количественный состав мицеллярного раствора непосредственно перед введением не должен отличаться от зарегистрированного препарата; необходимо представить обоснованные данные, подтверждающие схожесть физико-химических свойств. Например, критическая концентрация мицеллообразования, способность лекарственной формы к солубилизации (например, максимальная добавочная концентрация (Maximum Additive Concentration)), свободная и связанная фракция действующего вещества и размер мицелл.

Эти правила также применимы при незначительных изменениях качественного или количественного состава препарата, при условии, что такие изменения не затрагивают качественный или количественный состав поверхностно-активных веществ.

Лекарственные формы с модифицированным высвобождением системного действия

Лекарственные формы с модифицированным высвобождением для приема внутрь или трансдермального применения.

Согласно документам Союза необходимо проведение исследований биоэквивалентности.

Лекарственные формы с модифицированным высвобождением для внутримышечного и подкожного введения.

В отношении суспензий или иных лекарственных форм, предназначенных для модификации высвобождения действующего вещества для внутримышечного или подкожного введения, при подтверждении биоэквивалентности действуют правила для внесосудистых лекарственных форм с модифицированным высвобождением, например трансдермальных лекарственных форм, описанных в соответствующих документах Союза.

Лекарственные препараты местного действия, применяемые местно или наружно

Правила по изучению лекарственных препаратов местного действия (при пероральном, назальном, легочном, глазном, кожном, ректальном, вагинальном и т.д. введении), отражены в других документах Союза.

Если исследуемый препарат, представляющий собой раствор (например, капли глазные, спрей назальный (за исключением гормональных назальных спреев) или раствор для наружного применения), не отличается по виду среды растворения (водная или масляная) и содержит ту же концентрацию того же действующего вещества, что и зарегистрированный лекарственный препарат,

то подтверждать эквивалентность между ними не требуется. Незначительные различия в содержании вспомогательных веществ допустимы, если значимые фармацевтические свойства исследуемого и референтного препарата идентичны или аналогичны. Всякие качественные или количественные различия в содержании вспомогательных веществ требуют обоснования с позиций их влияния на терапевтическую эквивалентность. При отсутствии оснований способ и пути введения должны соответствовать зарегистрированному лекарственному препарату.

Если после местного применения лекарственных препаратов для местного применения в силу системной абсорбции возникает риск системных нежелательных реакций, необходимо измерить системную экспозицию. Необходимо подтвердить, что системная экспозиция исследуемого препарата не превышает таковую препарата сравнения, т.е. верхняя граница 90 % доверительного интервала не должна превышать верхнюю границу приемлемости биоэквивалентности (125,00 %).

Газы

Если препарат является газом для ингаляций, исследования биоэквивалентности не требуются.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 3
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Биолейвер, основанный на биофармацевтической
классификационной системе**

1. Введение

Биолейвер, основанный на БКС (биофармацевтической классификационной системе) направлен на уменьшение количества исследований биоэквивалентности *in vivo*, т.е. он может служить заменой биоэквивалентности *in vivo*. Проведение исследований биоэквивалентности *in vivo* можно избежать, если эквивалентность *in vivo* подтверждается обоснованными данными, полученными *in vitro*.

Основанный на БКС биолейвер ограничен высоко растворимыми действующими веществами с предсказуемой абсорбцией у человека и имеющих широкий терапевтический диапазон (см. раздел 4.1.9). Концепция применима к твердым лекарственным формам для приема внутрь с немедленным высвобождением и системным действиям, в той же лекарственной форме. При этом она не применима в отношении подъязычных, защечных лекарственных форм и лекарственных форм с модифицированным высвобождением. В отношении лекарственных форм, диспергирующихся в полости рта, данный подход применим, если исключена абсорбция из полости рта.

Биоэвиверы, основанные на БКС, своей целью преследуют установление биоэквивалентности между определенными исследуемыми препаратами и препаратами сравнения. Эти принципы могут применяться для подтверждения биоэквивалентности воспроизведенных препаратов, расширений оригинальных препаратов, при внесении изменений в досье, требующих установления биоэквивалентности; для установления биоэквивалентности между лекарственными препаратами, применявшимися в начальных фазах клинических исследований, и препаратами, выводимыми на рынок.

2. Общие требования

Биоэвивер, основанный на БКС, применим к лекарственному препарату с немедленным высвобождением, при условии выполнения всех следующих требований:

– действующее вещество хорошо растворимо и подвергается полной абсорбции (I класс по БКС, см. также раздел 3 настоящего приложения), и

– с учетом специальных требований (см. раздел 4.1 настоящего приложения) характеристики растворения *in vitro* исследуемого и референтного препарата очень быстрые (>85 % в течение 15 минут) или быстрые (85 % в течение 30 минут), и

– качественный и количественный состав вспомогательных веществ, способных повлиять на биоэквивалентность, одинаковый. В целом, целесообразно использовать одинаковые вспомогательные вещества в сопоставимых количествах (см. раздел 4.2 настоящего приложения), и

– отсутствуют риски, связанные с вероятностью принять ошибочное заключение о возможности использования процедуры

биолейвера, с учетом величины терапевтического индекса и клинических показаний к применению для данного действующего вещества в составе лекарственного препарата.

Биолейвер, основанный на БКС, также применим к лекарственному препарату с немедленным высвобождением, при условии выполнения всех следующих требований:

– действующее вещество хорошо растворимо и подвергается ограниченной абсорбции (III класс по БКС, см. также раздел 3 настоящего приложения), и

– с учетом специальных требований (см. раздел 4.1 настоящего приложения) характеристики растворения *in vitro* исследуемого и референтного препарата очень быстрые (>85 % в течение 15 минут), и

– качественный и количественный состав вспомогательных веществ, способных повлиять на биоэквивалентность, одинаковый. В целом, целесообразно использовать одинаковые вспомогательные вещества в сопоставимых количествах (см. раздел 4.2 настоящего приложения), и

– отсутствуют риски, связанные с вероятностью принять ошибочное заключение о возможности использования процедуры биолейвера, с учетом величины терапевтического индекса и клинических показаний к применению для данного действующего вещества в составе лекарственного препарата.

В целом рекомендуется более критично подходить к выполнению условий (например, место абсорбции, возможность взаимодействия с белками-переносчиками в месте абсорбции, состав вспомогательных веществ и терапевтические риски) в отношении лекарственных препаратов III класса по БКС, чем к I классу.

3. Действующее вещество

В целях описания свойств действующего вещества, подпадающего под концепцию биовейвера, в целом, достаточно данных научных публикаций о соединениях, изложенных в реферируемых (цитируемых) научных изданиях и материалах уполномоченных органов (организаций) в сфере обращения лекарственных средств.

Если действующее(ие) вещество(а) исследуемого и референтного препарата одинаковые, возможен биовейвер. Биовейвер также возможен, если исследуемый и референтный препарат содержит различные соли, при условии их принадлежности к I классу по БКС (высокая растворимость и полная абсорбция, см. разделы 3.1 и 3.2 настоящего приложения). Если исследуемый препарат содержит сложные эфиры, стереоизомеры и их смеси, комплексы или производные действующего вещества препарата сравнения, биовейвер невозможен, поскольку различия могут привести к различной биодоступности, не выявляемой с помощью экспериментов, используемых в концепции биовейвера, основанного на БКС.

Действующее вещество не должно обладать узким терапевтическим диапазоном (см. раздел 5.1.9 настоящих правил о лекарственных препаратах с узким терапевтическим диапазоном).

3.1 Растворимость

Необходимо установить и проанализировать профиль рН-растворимости действующего вещества. Действующее вещество признается хорошо растворимым, если при температуре 37 ± 1 °C его максимальная однократная доза (для лекарственного препарата с немедленным высвобождением) полностью растворяется в 250 мл буферного раствора в диапазоне рН от 1 до 6,8. Для этого требуется

провести исследование не менее чем с тремя буферными растворами с различными рН, находящимся в вышеуказанном диапазоне (предпочтительно при рН 1,2, 4,5 и 6,8) и, по возможности, при рКа, если она находится в указанном диапазоне рН. В целях однозначного определения классификационной принадлежности по растворимости могут понадобиться повторные испытания при каждом рН (например, метод встряхивания или другой подходящий). рН раствора следует определять как до, так и после добавления действующего вещества в буфер.

3.2 Всасывание (проникающая способность)

В заявлениях на биоэквивалентность, основанном на БКС, рекомендуется подтвердить полную абсорбцию у человека. С этой целью под полным всасыванием понимают абсорбцию $\geq 85\%$. Полное всасывание обычно обусловлено высокой проникающей способностью.

Наличие полного всасывания должно быть обосновано исследованиями у человека. В качестве обоснования допускается использовать результаты исследований

- абсолютной биодоступности или
- материального баланса.

При использовании метода материального баланса для вычисления всосавшейся фракции необходимо удостовериться, что метаболиты, учтенные при расчете всосавшейся фракции, образовались после абсорбции. В связи с этим при расчете общей радиоактивности, экскретируемой с мочой, необходимо удостовериться, что в желудочном или кишечном соке не произошла частичная деградация или биотрансформация неизмененного действующего вещества. Реакции метаболизма I (например, окисление)

или II (например, конъюгация) фазы могут происходить лишь после абсорбции (т.е. не в желудочном или кишечном соке). Таким образом, основываясь на данных исследований материального баланса, всасывание признается полным, если общее содержание исходного соединения в моче и его метаболитов (прошедших I и (или) II фазы метаболизма) в моче и кале составляет ≥ 85 % от принятой дозы.

Кроме того, высоко растворимые действующие вещества с неполным всасыванием (III класс по БКС) также могут подпадать под биоэквивалент, если выполняются определенные требования к составу препарата и профилю растворения *in vitro* (см. также раздел 4.2 «Вспомогательные вещества» настоящего приложения). При отнесении соединений к I классу по БКС и отсутствии обоснованных доказательств в пользу их полного всасывания к ним также предъявляются более жесткие требования (например, проведение исследований биоэквивалентности *in vivo*, иных клинических исследований).

Одним из условий биоэквивалентности между водными растворами и твердыми лекарственными формами некоторого соединения, принимаемого внутрь, является отсутствие существенных различий в абсорбции, обусловленных различиями в лекарственной форме с быстрым высвобождением.

Установленная биоэквивалентность между водной и твердой лекарственными формами немедленного высвобождения некоторого соединения, принимаемого внутрь, принимается в качестве подтверждения, поскольку свидетельствует, что ограничение абсорбции, обусловленное свойствами лекарственного препарата (с немедленным высвобождением), является незначительным. Качественные исследования проницаемости *in vitro* в том числе

с использованием стандартных образцов также свидетельствуют в пользу результатов, полученных *in vivo*.

4. Лекарственный препарат

4.1 Тест сравнительной кинетики растворения *in vitro*

4.1.1 Общие положения

При изучении свойств лекарственного препарата необходимо доказать немедленное высвобождение и сопоставимость исследуемых препаратов, т.е. подтвердить сопоставимую кинетику растворения *in vitro* между исследуемым и референтным препаратом при физиологических значениях рН в условиях эксперимента. Однако это не позволяет установить корреляцию *in vitro/in vivo*. Кинетику растворения *in vitro* следует изучить в диапазоне рН 1–6,8 (не менее, чем при трех значениях рН: 1,2, 4,5 и 6,8). Дополнительные исследования могут потребоваться при рН с наименьшей растворимостью действующего вещества. Использование каких-либо поверхностно-активных веществ не допускается.

Исследуемый и референтный препарат должны соответствовать требованиям, изложенным в разделе 5.1.2 основного текста Правил. В соответствии с этими требованиями рекомендуется проводить исследование в отношении более чем одной серии исследуемых препаратов.

Сравнительные испытания растворения *in vitro* должны соответствовать требованиям фармакопеи Союза. В связи с этим необходимо представить подробное описание условий исследования и аналитических методик, включая данные по их валидации. Для статистической достоверности каждый эксперимент рекомендуется

проводить с 12 пробами (образцами) препарата. Стандартные условия исследования, например:

- прибор: лопастная мешалка или корзинка;
- объем среды растворения: 900 мл или менее;
- температура среды растворения: 37 ± 1 °С;
- скорость вращения:
 - лопастная мешалка – обычно 50 оборотов в минуту;
 - корзинка – обычно 100 оборотов в минуту;
- схема отбора проб: например, на 10, 15, 20, 30 и 45 минутах;
- буферные растворы: рН 1,0–1,2 (обычно 0,1 М HCl или имитация желудочного сока без ферментов), 4,5 и 6,8 (или имитация кишечного сока без ферментов); рН должна регулярно контролироваться; рекомендуется использовать буферные растворы по Фармакопее Союза;
- прочие условия: отсутствие поверхностно-активных веществ; применение ферментов допускается в отношении желатиновых капсул или таблеток, покрытых желатиновой оболочкой.

Необходимо представить полный отчет о проведении ТСКР *in vitro*, включая протокол исследования, сведения об исследуемых сериях и сериях сравнения, подробное описание экспериментальных условий, валидацию использованных методов, индивидуальные и средние значения, а также соответствующие обобщающие статистики.

4.1.2 Оценка результатов теста сравнительной кинетики растворения *in vitro*

Лекарственные препараты признаются очень быстро растворимыми, если 85 % заявленного содержания растворяется в течение 15 минут. В этом случае профили растворения исследуемого и референтного препарата признаются сопоставимыми без дальнейших математических расчетов.

Если процесс растворения, со степенью высвобождения 85 % от заявленного содержания действующего вещества, длится более 15 минут, но не превышает 30 минут, то необходимо доказать отсутствие значимых различий (сопоставимость). В целях подтверждения сопоставимости профилей исследуемого и референтного препарата используют критерий f_2 (см. Приложение № 1) или другие подходящие тесты. При этом объяснение различий в профилях растворения с клинических или терапевтических позиций нецелесообразно, поскольку испытание растворения не отражает корреляцию *in vitro/in vivo*.

4.2 Вспомогательные вещества

Несмотря на то, что влияние вспомогательных веществ, содержащихся в лекарственных формах с немедленным высвобождением, на биодоступность хорошо растворимых и полностью всасывающихся действующих веществ (т.е. относящихся к I классу по БКС) считается маловероятным, его нельзя полностью исключать. В связи с этим даже с действующим веществом I класса по БКС в исследуемом препарате рекомендуется использовать схожие количества тех же вспомогательных веществ, что и в препарате сравнения.

В целях исключения различного влияния на мембранные переносчики одним из условий биоэквивалентности в отношении действующего вещества III класса по БКС, является отсутствие различий по качественному и высокая сопоставимость по количественному составу вспомогательных веществ.

Таблица. Рекомендуемые критерии для установления высокой сопоставимости лекарственных препаратов по количественному составу вспомогательных веществ.

Тип вспомогательного вещества	Отличия в процентах (по массе) от общей массы лекарственного препарата не более
Наполнители	$\pm 5,0 \%$
Разрыхлители	
крахмал	$\pm 3,0 \%$
иные вещества	$\pm 1,0 \%$
Связующие вещества	$\pm 0,5 \%$
Вещества, способствующее смазыванию (лубриканты)	
стеарат магния или кальция	$\pm 0,25 \%$
иные вещества	$\pm 1,0 \%$
Вещества, способствующее скольжению	$\pm 1,0 \%$
тальк	$\pm 0,1 \%$
иные вещества	

Примечания:

1. Если вспомогательные вещества выполняют несколько функций (например, микрокристаллическая целлюлоза выполняет функцию наполнителя и разрыхлителя), то должен быть выбран наиболее жесткий критерий (в случае с микрокристаллической целлюлозой $\pm 1\%$).

2. Концентрация вспомогательного вещества в двух водных растворах лекарственных препаратов считается схожей, если разница в ней составляет не более $\pm 10\%$.

Как правило, с действующими веществами I или III класса по БКС необходимо использовать стандартные количества хорошо изученных вспомогательных веществ, а также проанализировать и объяснить возможное их влияние на биодоступность и (или) растворимость. Необходимо описать назначение каждого из вспомогательных веществ с обоснованием, что количество каждого из них находится в приемлемом диапазоне. Необходимо описать все вспомогательные вещества, способные повлиять на биодоступность (например, сорбитол, маннитол, натрия лаурилсульфат и прочие поверхностно-активные вещества), с указанием их влияния на:

- моторику желудочно-кишечного тракта;
- подверженность взаимодействию с действующим веществом (например, комплексообразование);
- проникающая способность действующего вещества;
- взаимодействие с мембранными переносчиками.

Качественный и количественный состав вспомогательных веществ, способных повлиять на биоэквивалентность, исследуемого и референтного препарата должен быть одинаковым.

5. Комбинированные лекарственные препараты

Биоэвейвер, основанный на БКС, в отношении комбинированных лекарственных препаратов с немедленным высвобождением возможен, если все действующие вещества принадлежат I или III классу по БКС, а вспомогательные вещества соответствуют требованиям, изложенным в разделе 4.2. В остальных случаях требуется проведение исследования биоэквивалентности *in vivo*.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 4
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Требования к содержанию отчета о проведенных исследованиях
биоэквивалентности и тесте сравнительной кинетики
растворения *in vitro***

Отчет об исследовании биоэквивалентности

При составлении отчета следует учитывать требования правил Надлежащей клинической практики Союза в части подготовки отчета по исследованию (Приложение №1). Все страницы отчета должны содержать идентификационный код и иметь сквозную нумерацию.

1. Титульная страница:

1.1. полное название исследования, отражающее тип исследования, названия исследуемых препаратов с указанием лекарственной формы и дозировки, а также условий приема исследуемых препаратов (например, натощак или на фоне приема пищи);

1.2. идентификационный код исследования;

1.3. наименование исследовательского центра и (или) контрактной исследовательской организации, ответственной за проведение исследования БЭ с указанием фактического адреса;

1.4. спонсор исследования БЭ с указанием его адреса;

1.5. ФИО, должность главного исследователя или исследователя(ей)-координатора(ов) (при наличии) с указанием места работы и контактных телефонов;

1.6. представитель Спонсора;

1.7. дата подписания отчета (также необходимо указать названия и даты всех более ранних отчетов в рамках данного исследования при наличии);

1.8. указание на выполнение исследований в соответствии с требованиями правил Надлежащей клинической практики Союза.

2. Страница подписей:

2.1. название исследования (согласно п.п. 1.1);

2.2. указание на проведение исследования в соответствии со стандартными операционными процедурами исследовательского центра, проводившего исследования;

2.3. фамилии и имена ответственных лиц по клинической и биоаналитической части исследований, должности по основному месту работы, подписи (с указанием даты).

3. Синописис (краткое описание исследования):

3.1. Общая информация об исследовании:

название исследования;

код исследования;

ФИО, должность главного исследователя или исследователя(ей)-координатора(ов) (при наличии);

ФИО, должность со-исследователя;

место(-а) проведения исследования: наименование, адреса и телефоны организаций, проводящих клиническую, аналитическую и статистическую части исследования;

наименование и адрес клинико-диагностической лаборатории;

даты проведения (начала и окончания) клинической, биоаналитической и статистической частей исследования;

цель исследования;

дизайн исследования (с указанием времени отмывочных периодов);

субъекты исследования: общее количество скринированных и количество включенных субъектов, количество субъектов выбывших из исследования, количество субъектов, полностью выполнивших протокол исследования и включенных в статистический анализ, пол, возрастной диапазон, этническая принадлежность;

3.2. исследуемые препараты:

3.2.1 исследуемый препарат:

торговое наименование (если применимо), международное непатентованное наименование;

лекарственная форма, дозировка;

номер серии;

дата производства;

дата истечения срока годности

производитель и страна производства или организация ответственная за контроль качества, с указанием страны-производителя;

3.2.2 референтный препарат:

торговое наименование, международное непатентованное наименование;

лекарственная форма, дозировка;

номер серии;

дата производства;

дата истечения срока годности

производитель и страна производства или организация ответственная за контроль качества, с указанием страны-производителя;

3.3. способ применения препаратов: доза, режим приема, объем жидкости для совместного приема, отмывочный период между периодами исследования;

3.4. периоды приема препаратов: даты и время начала и окончания каждого периода;

3.5. временные точки отбора образцов биоматериала (крови, мочи, слюны и т.д.);

3.6. биоаналитическая методика:

3.6.1 краткое описание методики выполнения анализов;

3.6.2 тип биологической матрицы;

3.6.3 нижний предел количественного определения;

3.6.4 линейный диапазон;

3.6.5 параметры для количественной оценки результатов;

3.7. фармакокинетические и (или) фармакодинамические критерии оценки;

3.8. статистический анализ:

3.8.1 фармакокинетический;

3.8.2 критерии биоэквивалентности;

3.8.3 безопасность;

3.9. результаты: в виде краткого описания в форме таблиц, с рассчитанными фармакокинетическими параметрами для исследуемого и референтного препаратов; представляются данные дисперсионного статистического анализа (ANOVA) для AUC и C_{\max} (отношение средних геометрических, их 90% доверительный интервал, коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности) и усредненный

фармакокинетический профиль для исследуемого и референтного препаратов в линейном и лог-линейном преобразовании;

3.10. обсуждение и выводы.

4. Содержание отчета (со сквозной нумерацией страниц).

5. Список аббревиатур и сокращений.

6. Этические вопросы:

6.1. независимый этический комитет и одобрение протокола исследований;

6.2. разрешительные документы (информация из протокола заседания независимого этического комитета).

7. Исследователи и административная структура исследования (представляется полная информация об исследователях (*curriculum vitae*) и месте проведения исследований с адресами и телефонами).

8. Клиническая часть исследования.

8.1. Титульная страница:

8.1.1 название исследования (согласно п.п. 1.1);

8.1.2 даты начала и окончания клинической фазы исследования;

8.2. Цель исследования

8.3. Введение (информация по лекарственному препарату: описание, формула, фармакокинетические и фармакодинамические данные.)

8.4. Дизайн исследования

8.5. Выбор исследуемой популяции:

8.5.1 критерии отбора в исследование:

8.5.1.1 клиническая оценка (анамнез и врачебный осмотр): приводятся в табличной форме с указанием индивидуальных данных;

8.5.1.2 клинические лабораторные тесты: приводятся в табличной форме с указанием индивидуальных результатов;

8.5.1.3 критерии включения;

8.5.1.4 критерии невключения.

8.5.2 критерии прекращения исследования или исключения субъектов из исследования;

8.5.3. метод распределения субъектов по группам исследования;

8.5.4 индивидуальные данные (пол, возраст, вес, рост, индекс массы тела) с дополнительным указанием индивидуальных значений показателей всех субъектов исследования и их описательной статистикой.

8.6. Информация о препаратах и их приеме:

8.6.1 описание исследуемого и референтного препаратов: торговое наименование (если применимо), международное непатентованное наименование, дозировка, лекарственная форма, номер серии, дата производства, дата истечения срока годности, условия хранения, наименование и адрес производителя; принимаемая субъектами доза и путь введения;

8.6.2 подтверждение соблюдения размера промышленной серии исследуемого препарата;

8.6.3 полный качественный и количественный состав исследуемого препарата, а также состав референтного препарата;

8.6.4 сертификаты анализа исследуемого и референтного препаратов (могут быть представлены спонсором в виде отдельных документов);

8.6.5 идентификация препаратов (маркировка и поставка исследуемых препаратов в исследовательский центр, сопроводительные документы и сопроводительная информация);

8.6.6 учет исследуемого и референтного препаратов в ходе исследования.

8.7. Применение препаратов:

8.7.1 выбор дозировки препарата в исследовании;

8.7.2 выбор и прием дозы препарата для каждого субъекта (дата, время, количество воды, пища, ограничения, физическая активность);

8.7.3 предшествующая и сопутствующая терапия;

8.7.4 рандомизация;

8.7.5 отмывочный период;

8.7.6 таблицы, содержащие индивидуальные данные и график приема препаратов для всех субъектов исследования.

8.8. Оценка безопасности (перечисление всех проведенных необходимых лабораторных и инструментальных методов исследований в соответствии с Приложением № 1 Правил надлежащей клинической практики Союза, тест на беременность).

8.9. Нежелательные явления и процедуры оказания медицинской помощи. Детализированное описание всех случаев возникновения, классификация, причинно-следственная связь с приемом препаратов, дата и время регистрации, длительность, принятые меры, использование сопутствующих лекарственных препаратов, влияние на проведение исследования и т.п.

8.10. Отклонения от протокола (если таковые были) и их влияние на клинические и фармакокинетические результаты.

8.11. Порядок и график отбора образцов. Представляется в виде таблиц с планируемым и реальным временем отбора образцов для всех субъектов исследования.

8.12. Сбор, приготовление, хранение и транспортировка образцов биологического материала.

9. Биоаналитический отчет и отчет по валидации биоаналитической методики.

При составлении данных отчетов следует выполнять требования правил валидации биоаналитических методик (Приложение №7 настоящих Правил) и изложенные в них требования к составлению биоаналитического отчета.

10. Статистический отчет

10.1. Титульная страница:

10.1.1 название исследования (согласно п.п. 1.1);

10.1.2 наименование, адрес организации, проводящей статистическую часть исследования;

10.1.3 даты начала и окончания статистической фазы исследования.

10.2. Введение (информация по лекарственному препарату: описание, формула, фармакокинетика, фармакодинамика).

10.3. Цель и задачи статистической фазы исследования (кратко)

10.4. Описание фармакокинетического анализа, идентификация используемых статистических программ

10.5. Построение фармакокинетической кривой

10.6. Фармакокинетическое уравнение и его анализ, используемые программы расчета

10.7. Определение базовых фармакокинетических параметров ($AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} и t_{max}) и методология расчетов

10.8. Проверка гипотезы подобия (биологической эквивалентности)

10.9. Описание процедуры статистической обработки данных, проверка нулевой и альтернативной гипотез

10.10. Результаты оценки биоэквивалентности и их интерпретация для референтного и испытуемого препарата с расчетом C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$. Данные приводятся в виде таблицы.

10.11. Статистический анализ показателей эквивалентности лекарственного средства, идентификация используемых статистических программ

10.12. Таблицы, содержащие результаты дисперсионного анализа показателей биодоступности C_{\max} , $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ и показателей биоэквивалентности испытуемого препарата f'' , f' , f . А также дополнительные параметры эквивалентности для отдельных лекарственных форм.

10.13. Анализ мощности исследования с табличным представлением результатов по данным C_{\max} и $AUC_{(0-t)}$

10.14. Выводы и заключение

10.15. Список литературы (публикаций)

Отчет должен быть представлен на бумажном и электронном носителях. Любая информация должна быть доступна по запросу. Индивидуальные значения концентраций референтного и исследуемого препаратов в биологических жидкостях, а также полученные фармакокинетические показатели по всем этапам исследования представляются в виде электронных таблиц MS-Excel или иных, совместимых с данным редактором.

11. Приложения:

11.1. Индивидуальные и средние фармакокинетические профили в непреобразованных координатах. Суммарные профили референтного и исследуемого препаратов

11.2. Индивидуальные и средние фармакокинетические профили в логарифмических координатах. Суммарные профили референтного и исследуемого препаратов в логарифмических координатах

11.3. Таблицы индивидуальных и средних значений концентраций, фармакокинетических параметров и дисперсионного анализа показателей фармакокинетики референтного и исследуемого препарата.

Аналитический отчет о проведении теста сравнительной кинетики растворения (ТСКР)

1. Титульная страница:

1.1. название исследования;

1.2. наименование, адрес организации, проводящей аналитическую фазу исследования.

1.3. даты начала и окончания проведения ТСКР.

2. Содержание отчета.

3. Страница подписей (ФИО, должность по основному месту работы, подпись (с указанием даты) лиц, ответственных за проведение ТСКР)).

4. Перечень сокращений и определение терминов.

5. Материалы и оборудование

6. Препараты:

6.1. исследуемый препарат: торговое название (если применимо), международное непатентованное наименование, дозировка, лекарственная форма, номер серии, дата производства, дата истечения срока годности, условия хранения, наименование и адрес производителя;

6.2. референтный препарат: торговое название, дозировка, лекарственная форма, номер серии, дата производства, дата истечения срока годности, условия хранения, наименование и адрес производителя;

7. Аналитический стандартный образец (наименование, производитель, количественное содержание, номер серии, срок годности (переконтроля));

8. Реактивы и материалы

9. Основное и вспомогательное оборудование

10. Условия проведения ТСКР:

10.1. выбор, краткое обоснование условий и описание методики проведения ТСКР;

10.2. условия проведения ТСКР (тип аппарата, скорость вращения, температура среды, объем среды, временные точки, количество единиц препарата для растворения, помещаемых в сосуд, число единиц лекарственного препарата для каждой временной точки, используемые «синкеры», процедура отбора образцов, процедура восполнения среды растворения).

11. Маркировка образцов при проведении исследований

12. Аналитическая методика:

12.1. Таблицы, содержащие краткий обзор аналитической методики (в случае использования хроматографических методов приводятся условия хроматографического анализа: подвижная фаза, тип колонки (предколонки), скорость потока, температура колонки, температура автосамплера, объем вводимой пробы), детектор, параметры детектирования, линейный диапазон градуировочной кривой, нижний предел количественного определения, используемые градуировочные образцы (число и концентрация), образцы контроля качества (число и концентрация), способ построения и тип градуировочной зависимости;

12.2. приготовление исходного градуировочного раствора;

12.3. приготовление исходного раствора контроля качества;

- 12.4. приготовление сред растворения;
- 12.5. приготовление раствора плацебо;
- 12.6. приготовление рабочих градуировочных растворов;
- 12.7. приготовление рабочих растворов контроля качества;
13. Анализ испытуемых образцов (дата, идентификация аналитических серий (циклов), рандомизация испытуемых образцов, градуировочных образцов и образцов контроля качества в аналитических сериях (циклах), критерии приемлемости аналитических серий, таблицы, включающие результаты).
14. Обработка результатов и идентификация программных средств
15. Краткое описание валидации используемой аналитической методики.
16. Результаты проведения ТСКР:
 - 16.1. сводные таблицы, содержащие результаты по высвобождению референтного и исследуемого препаратов в каждой временной точке, для каждой единицы дозирования референтного и исследуемого препаратов и сред растворения, с расчетом средних значений и коэффициентов вариации степени высвобождения в каждой временной точки;
 - 16.2. графические изображения профилей высвобождения действующего вещества из референтного и исследуемого препаратов;
 - 16.3. отклонения, принятые меры, их обоснование;
 - 16.4. фактор сходимости f_2 и границы приемлемости;
 - 16.5. выводы и заключение.
17. Литература.
18. Приложения:
 - 18.1. программа (протокол) проведения ТСКР;

18.2. репрезентативные хроматограммы (или иные первичные данные) в количестве не менее 20% от числа выполненных анализов;

18.3. сертификаты анализа исследуемого и референтного препаратов.

19. Отчет о валидации аналитической методики при проведении ТСКР:

19.1. Титульная страница:

19.1.1 название исследования;

19.1.2 наименование, адрес организации, проводящей исследование.

19.1.3 даты начала и окончания валидации аналитической методики при проведении ТСКР.

19.2. Содержание отчета.

19.3. Страница подписей (ФИО, должность по основному месту работы, подпись (с указанием даты) лиц, ответственных за проведение валидации аналитической методики при проведении ТСКР).

19.4. Перечень сокращений и определение терминов.

19.5. Обоснование выбора метода, параметров валидации и их оценки, идентификация программных средств для расчетов

19.6. Таблицы, содержащие краткий обзор аналитического метода (в случае использования хроматографических методов приводятся условия хроматографического анализа: подвижная фаза, тип колонки (предколонки), скорость потока, температура колонки, температура автосамплера, объем вводимой пробы), детектор, параметры детектирования, линейный диапазон градуировочной кривой, нижний предел количественного определения, используемые градуировочные образцы (число и концентрация), образцы контроля качества (число

и концентрация), способ построения и тип градуировочной зависимости.

19.7. Селективность метода (идентификация выполненных аналитических серий (циклов), критерии приемлемости, результаты в виде таблиц (и хроматограмм или иных первичных данных в случае целесообразности), соответствие критериям приемлемости.

19.8. Градуировочная кривая (уравнение кривой, коэффициент корреляции, линейный диапазон, критерии приемлемости, результаты в виде таблиц (и хроматограмм или иных первичных данных в случае целесообразности), идентификация выполненных аналитических серий (циклов), соответствие критериям приемлемости.

19.9. Правильность и повторяемость в течение одного дня или аналитической серии (цикла), критерии приемлемости, результаты в виде таблиц, соответствие критериям приемлемости.

19.10. Правильность и прецизионность в разные дни, аналитические серии (циклы), критерии приемлемости, результаты в виде таблиц, соответствие критериям приемлемости.

19.11. Процедура разбавления образцов при необходимости (критерии приемлемости, результаты в виде таблиц соответствие критериям приемлемости).

19.12. Стабильность образцов (растворов):

19.12.1 стабильность хранения исходных и рабочих растворов (критерии приемлемости, результаты в виде таблиц, соответствие критериям приемлемости);

19.12.2 стабильность образцов (растворов) в процессе выполнения анализов, включая время на подготовку образцов (растворов) и время анализа.

19.13. Отклонения, принятые меры, их обоснование

19.14. Заключение

19.15. Литература

19.16. Приложение. Репрезентативные хроматограммы (или иные первичные данные), не менее 20% от числа образцов, анализируемых при валидации аналитической методики.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 5
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Фармакодинамические исследования
в рамках изучения биоэквивалентности**

Фармакодинамические исследования у здоровых добровольцев или пациентов могут быть использованы для установления эквивалентности между двумя лекарственными препаратами в случае, если фармакокинетический подход не применим. Исследование фармакодинамической эквивалентности может понадобиться, когда количественное определение содержания действующего вещества и (или) метаболита(-ов) в плазме или моче не может быть проведено с достаточной чувствительностью и прецизионностью. Кроме того, фармакодинамические исследования эквивалентности у человека необходимы, если измерение концентраций действующего вещества не может быть использовано в качестве суррогатных конечных точек для подтверждения эффективности и безопасности конкретного лекарственного препарата, например, для лекарственного препарата, оказывающего местное действие. Вместе с тем, исследования местной доступности, основанные на фармакокинетических исследованиях, проведенные отдельно либо совместно с исследованиями растворения *in vitro*, могут рассматриваться в качестве суррогатных конечных точек для подтверждения эквивалентности с точки зрения

биофармацевтического качества и высвобождения в месте действия для некоторых препаратов, оказывающих местное действие. Кроме того, исследования биоэквивалентности также необходимы, чтобы продемонстрировать эквивалентность системной экспозиции (AUC) препаратов при изучении системной безопасности.

Фармакодинамические исследования не рекомендованы для принимаемых внутрь лекарственных препаратов с системным действием, если действующее вещество проникает в системный кровоток, и при этом для оценки системной экспозиции и установления биоэквивалентности можно использовать фармакокинетический подход. Это обусловлено тем, что фармакодинамические и клинические конечные точки характеризуются более низкой чувствительностью к выявлению разницы между лекарственными препаратами в отношении их биофармацевтических свойств, высвобождения и абсорбции. Поскольку кривые зависимости «доза-эффект» для фармакодинамических и клинических конечных точек обычно более пологие, чем соответствующие кривые зависимости фармакокинетических параметров от дозы, необходимо доказать достаточную аналитическую чувствительность исследования, то есть способность различать реакцию, полученную при применении кратных доз (разница между дозами в два или даже в четыре раза). Важно проводить сравнения в дозах, вызывающих наиболее значимую реакцию, для определения которых может потребоваться проведение пилотного исследования. Фармакодинамические показатели имеют всегда большую вариабельность, чем фармакокинетические данные. Фармакодинамические показатели часто подвержены значительному влиянию эффекта плацебо, который добавляется к вариабельности и сложному дизайну исследования. В результате может потребоваться

набор большого числа пациентов для достижения достаточной статистической мощности.

При планировании, проведении и оценке результатов исследования должны соблюдаться следующие требования:

измеряемая реакция должна представлять собой фармакологический или терапевтический эффект, подтверждающий эффективность и (или) безопасность лекарственного препарата;

методика оценки эффекта должна быть валидирована с точки зрения правильности, прецизионности, воспроизводимости и специфичности;

ни исследуемый лекарственный препарат, ни референтный препарат не должны вызывать максимальную реакцию в ходе исследования, поскольку может оказаться невозможным выявить различия между действующими веществами, применяемыми в дозах, которые вызывают эффекты близкие к максимальным или максимальные; изучение зависимости «доза-эффект» может быть необходимой частью такого исследования;

реакция должна измеряться количественно, предпочтительно двойным слепым методом и результаты должны регистрироваться с помощью подходящего оборудования, позволяющего воспроизводить и регистрировать результаты повторяющихся измерений, чтобы обеспечить фиксацию (документирование) фармакодинамических эффектов, которые заменяют измерения концентрации в плазме. Если такие измерения невозможны, можно провести регистрацию по валидированным оценочным шкалам. Если данные ограничены качественными показателями (категориальными данными), требуется выполнение специального статистического анализа;

субъекты, не реагирующие на лекарственный препарат, должны быть исключены из исследования после предварительного скрининга, и в протоколе должны быть указаны критерии, по которым идентифицируются реагирующие и не реагирующие субъекты;

если возможен существенный плацебо-эффект, то сравнение между лекарственными препаратами можно проводить только с учетом априорного предположения в дизайне исследования потенциального плацебо-эффекта. При этом в схему испытания можно внести поправку на данный эффект посредством включения в исследование плацебо (в качестве предварительного этапа этого дизайна);

в дизайне исследования должна быть учтена лежащая в основе патология и анамнез болезни и приведена информация о воспроизводимости исходных условий;

следует использовать перекрестный дизайн, однако, если он не пригоден, можно использовать параллельный дизайн.

Для воспроизведенного лекарственного препарата и референтного препарата принципы формирования выборки должны оставаться такими же, как описано в разделе 5.1.3. Правил.

В исследованиях, в которых регистрируют непрерывные переменные, изменение интенсивности действия лекарственного препарата, наблюдаемое в течение некоторого промежутка времени, может быть описано таким же образом, что и в исследовании для измерения концентрации действующего вещества в плазме. Можно вывести параметры, описывающие площадь под кривой «эффект-время» (AUEC), максимальную реакцию и время, когда происходит эта реакция.

Сравнение воспроизведенного лекарственного препарата и референтного препарата может быть выполнено двумя разными способами:

а) анализ дозовой зависимости или относительной активности, которая определяется как отношение активности исследуемого препарата к активности референтного препарата;

б) анализ зависимости эффекта, который состоит из подтверждения эквивалентности (как минимум для двух уровней доз) по фармакодинамической конечной точке.

Минимальным требованием для любого из вышеперечисленных способов является оценка чувствительности. Для оценки чувствительности необходимо изучить не менее двух ненулевых уровней доз, при этом необходимо продемонстрировать, что один уровень превосходит другой. В связи с этим необходимо, в отсутствие должного обоснования, изучить более одной дозы обоих препаратов. Важно, чтобы были изучены дозы, расположенные в верхней части кривой «доза-эффект». Дозы, находящиеся на нижних участках кривой, могут быть не убедительными для подтверждения эквивалентности, так как могут являться субтерапевтическими. В равной степени доза, расположенная на вершине кривой, может оказывать равнозначный эффект по сравнению с более высокими дозами, что также не может служить подтверждением эквивалентности.

Должны быть представлены результаты с использованием обоих подходов. В обоих случаях для подтверждения эквивалентности полученные доверительные интервалы фармакодинамических параметров исследуемого препарата и референтного препарата должны быть расположены в пределах выбранных границ эквивалентности. Для относительной активности должны быть рассчитаны 90%

доверительные интервалы (как и в исследованиях биоэквивалентности), в то время как 95% доверительные интервалы рассчитываются для анализа зависимости эффекта.

Допустимый диапазон, который применяется в фармакокинетических исследованиях, в данном случае может быть неприменим. Для обоих подходов выбранный диапазон эквивалентности должен быть предусмотрен и тщательно обоснован протоколе исследования.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 6

к Правилам проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе

Сравнительные клинические исследования в рамках изучения биоэквивалентности

При некоторых обстоятельствах (например, для липосомальных лекарственных препаратов) кривые зависимости «концентрация в плазме – время» не пригодны для оценки эквивалентности двух препаратов. Несмотря на то, что фармакодинамические исследования могут быть подходящим инструментом для установления эквивалентности, иногда этот тип исследований не может быть использован из-за отсутствия значимых фармакодинамических параметров, которые могут быть достоверно измерены. В этом случае для подтверждения эквивалентности двух препаратов необходимо проведение клинических исследований. Предпочтительнее оценивать эквивалентность, проводя фармакокинетические исследования, вместо клинических, так как последние обладают меньшей чувствительностью и могут потребовать включения значительного количества субъектов для достижения достаточной статистической мощности. Например, для достижения достаточной статистической мощности, позволяющей обнаружить повышение реакции на исследуемый лекарственный препарат по сравнению с плацебо на 20 %, требуется 8600 пациентов.

Точно так же, чтобы продемонстрировать снижение риска на 16 %, необходимо привлечь 2600 пациентов с инфарктом миокарда.

Если целью клинического исследования является доказательство эквивалентности, должны применяться те же статистические принципы, что и при исследовании биологической эквивалентности. При этом для фармакодинамических и клинических конечных точек вместо обычно применяемых в фармакокинетических исследованиях 90% доверительных интервалов требуется использование 95% доверительных интервалов. Число пациентов, включенных в исследование, будет зависеть от вариабельности измеряемых параметров и допустимого диапазона их колебаний и обычно намного больше, чем это требуется при исследовании биологической эквивалентности.

В протоколе таких исследований должны быть четко определены следующие положения:

– в качестве контрольных параметров выбирают значимые клинические конечные точки, на основании которых могут быть рассчитаны начало проявления реакции организма (если это подлежит измерению и клинически значимо) и ее интенсивность;

– размеры границ диапазона эквивалентности следует определять на основе анализа ситуации, принимая во внимание конкретные клинические условия, например, естественное течение заболевания, эффективность доступных методов лечения и выбранные искомые параметры. В отличие от исследования биологической эквивалентности (где используется стандартный допустимый диапазон), масштаб допустимого диапазона в клинических испытаниях не может быть стандартным для всех групп лекарственных средств и определяется для каждого терапевтического класса и показания;

– в настоящее время общепринятым для данного типа испытаний является использование статистических методов, основанных на определении доверительного интервала. Основная задача заключается в том, чтобы исследуемый препарат не отличался от референтного более чем на строго заданную величину.

– доверительный интервал может быть рассчитан параметрическим или непараметрическим методами;

– в дизайне исследования при возможности следует предусмотреть применение плацебо;

– в некоторых случаях целесообразно включить в финальный сравнительный анализ конечные точки по оценке безопасности.

Требования к воспроизведенному лекарственному препарату и референтному препарату должны быть такими же, как описано в подразделе 5.1.2. настоящих Правил.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 7
к Правилам проведения
исследований биоэквивалентности
воспроизведенных лекарственных
препаратов в Евразийском
экономическом союзе

**Валидация биоаналитических методик испытаний
и анализ исследуемых биообразцов**

1. Введение

Измерение концентрации действующего вещества в биологических образцах (например, сыворотке, плазме, крови, моче и слюне) — важный аспект разработки лекарственного препарата. Поэтому, в целях получения надежных результатов, используемые биоаналитические методики должны быть хорошо описанными, полностью валидированными и документированными.

В особых ситуациях допускается использовать более широкие, чем описанные в настоящем приложении, критерии приемлемости. В этом случае, основываясь на предполагаемом использовании методики, их следует установить предварительно.

В настоящем приложении представлены рекомендации по валидации биоаналитических методик, использовавшихся для измерения концентрации действующего вещества в биологических матрицах, полученных по результатам токсикокинетических исследований и всех фаз клинических исследований. Поскольку методики связывания лиганда существенно отличаются от хроматографических аналитических методов, для валидации

полимерсвязывающих методик (например, со связыванием лигандов) требуются отдельные правила.

В приложении описаны условия, при которых в дополнение к полной валидации аналитической методики необходимо провести частичную или перекрестную валидацию.

Методы количественного определения концентрации биомаркеров, используемых в качестве фармакодинамических маркеров, в настоящем приложении не рассматриваются.

2. Валидация методики

2.1. Полная валидация аналитической методики

Любая аналитическая методика, независимо от того новая она или известная, подлежит полной валидации.

Основной целью валидации методики является подтверждение его надежности для определения концентрации анализируемого вещества в биологических образцах, таких как кровь, сыворотка, плазма, моча и слюна. Более того, если при пробоподготовке использовался антикоагулянт, его же необходимо использовать для валидации. Полная валидация, как правило, проводится для каждого вида животных и типа биологических образцов, использованных в исследовании.

Иногда при проведении валидации затруднительно использовать ту же разновидность образца, которая использовалась в рамках исследования. В таких случаях, при достаточном обосновании, допустимо использовать альтернативные биологические образцы, например, модельную спинномозговую жидкость.

Основными характеристиками биоаналитической методики, необходимыми для подтверждения ее приемлемости и надежности аналитических результатов, являются селективность, нижний предел

количественного определения, функция отклика и диапазон применения (воспроизводимость параметров градуировочной кривой), правильность, прецизионность, влияние матрицы (эффекты матрицы), стабильность анализируемых веществ в биологических образцах и стабильность анализируемого вещества(веществ) и внутреннего стандарта (ВС) при хранении, в рабочих растворах, в извлечениях в течение всего периода хранения и пробоподготовки.

Изучению, как правило, подлежит одно анализируемое вещество или действующее вещество, но в некоторых случаях определяют концентрацию нескольких анализируемых веществ. Это могут быть как два разных вещества, так и исходное соединение с его метаболитами или энантиомеры (изомеры) действующего вещества. В таких случаях принципы валидации и анализа справедливы для всех исследуемых анализируемых веществ.

Стандартные образцы

Для приготовления градуировочных растворов, образцов для контроля качества и образцов для изучения стабильности в целях проведения валидации методики и анализа испытуемых образцов к холостому биологическому образцу (биологическому образцу, не содержащему анализируемого вещества), используя растворы стандартного(ых) образца(ов), добавляют исследуемое(ые) анализируемое(ые) вещество(а). В дополнение к этому при пробоподготовке для хроматографических методов допускается добавлять соответствующий ВС.

Необходимо удостовериться в пригодности стандартного образца и ВС, поскольку их качество (чистота) может повлиять на результаты анализа и на результаты исследования. Поэтому стандартные образцы, используемые для валидации и анализа испытуемых образцов, должны

быть получены из надежных и проверенных источников. К таким стандартным образцам относятся сертифицированные стандартные образцы, например, фармакопейные, коммерческие стандартные образцы или аттестованные стандартные образцы, приготовленные самостоятельно или внешней некоммерческой организацией. Для подтверждения чистоты и представления сведений об условиях хранения, сроке годности, номере серии стандартного образца необходим сертификат его анализа.

Если пригодность ВС подтверждена, например, отсутствием влияния анализируемого вещества и его примесей, то использование сертифицированных стандартных образцов ВС не требуется (в сертификатах анализа нет необходимости).

При использовании в качестве биоаналитического метода масс-спектрометрии (МС), по возможности, следует использовать стабильные меченые изотопом ВС. При этом необходимо, чтобы меченый стандарт обладал высокой изотопной чистотой и в нем не происходили реакции изотопного обмена. Необходимо провести проверку на наличие незаявленных анализируемых веществ, при обнаружении последних следует оценить возможное их влияние на валидацию методики.

2.1.1. Селективность (избирательность).

Аналитическая методика должна обладать способностью дифференцировать анализируемое вещество и ВС от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца. Селективность методики необходимо подтвердить, используя не менее 6 различных источников соответствующих холостых образцов, каждый из которых не содержит анализируемого вещества (с экспериментальным подтверждением). В отношении редких разновидностей биологических образцов допустимо использовать меньшее количество источников.

Отсутствие искажающего влияния компонентов холостого биологического образца, констатируется, как правило, если их сигнал по нижнему пределу количественного определения не превышает 20 % для анализируемого вещества и 5 % – для ВС.

В некоторых случаях может также понадобится исследовать степень влияния метаболитов действующего вещества, а также продуктов деградации, образующихся при пробоподготовке, и одновременно применяемых лекарственных препаратов. На этапе валидации аналитической методики или на этапе анализа конкретного исследования и анализируемого вещества необходимо принять во внимание лекарственные препараты, применявшиеся исследуемой популяцией как сопутствующие.

Если применимо (для нестабильных метаболитов, например, кислых метаболитов в эфире, нестабильных N-оксидов или глюкуронидов, соединений с лактонной структурой), необходимо оценить возможность обратного преобразования метаболита в исходное анализируемое вещество на различных этапах анализа (включая процедуры пробоподготовки или в извлечении для МС-анализа). Необходимо установить степень обратного преобразования и проанализировать его влияние на результаты исследования. На ранних этапах разработки нового химического соединения, когда его метаболизм еще не изучен, такую оценку осуществить невозможно. Тем не менее, после получения в процессе разработки новых данных о метаболизме действующего вещества необходимо учитывать проблему обратного преобразования, что требует проведения частичной валидации.

В некоторых случаях достаточно сложно получить доступ к стандартным образцам исследуемых метаболитов. С другой стороны,

обратное преобразование метаболита можно оценить, проводя повторный анализ активных образцов (образцов, содержащих анализируемые вещества, взятых от субъектов или животных). Однако в этом случае нельзя исключить обратное преобразование в процессе пробоподготовки.

2.1.2. Влияние переноса.

При разработке методики необходимо принимать во внимание и минимизировать перенос анализируемого вещества от пробы к пробе. В процессе валидации необходимо оценить эффект переноса, вводя холостые образцы после образцов с высокой концентрацией или градуировочных стандартных образцов верхних уровней количественного определения. Перенос в холостой образец после стандартного раствора с высокой концентрацией не должен превышать 20% величины нижнего предела количественного определения (НПКО, см. ниже) и 5% – для ВС. Если очевидно, что перенос неизбежен, исследуемые образцы не рандомизируют. Для того чтобы перенос не повлиял на правильность и прецизионность, необходимо в ходе валидации предусмотреть специальные меры. Например, после образцов с ожидаемой высокой концентрацией и до начала анализа очередного испытуемого образца вводить холостые образцы.

2.1.3. Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения (НПКО) – есть наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью. НПКО считается наименьшим градуировочным стандартным образцом (см. «Правильность» и «Прецизионность»). При этом сигнал анализируемого вещества из образца с НПКО должен не менее чем в 5 раз превосходить величину

сигнала холостого образца. НПКО необходимо адаптировать к ожидаемым концентрациям и цели исследования. Например, в исследовании биоэквивалентности НПКО не должен быть выше, чем 5% от C_{\max} (минимальной величины C_{\max} из всей выборки субъектов).

2.1.4. Градуировочная кривая (линейность).

Необходимо оценить функцию отклика градуировочной кривой для всех концентраций анализируемого вещества; при этом изучению подлежит определенный диапазон концентраций. Градуировочные стандартные образцы готовят путем добавления анализируемого вещества с известными концентрациями к холостой пробе с использованием той же ее разновидности, которая будет получена в исследовании. Каждому анализируемому веществу, изучаемому при валидации аналитической методики, и каждому аналитическому циклу должна соответствовать отдельная градуировочная кривая.

В идеале, до начала проведения валидации аналитической методики необходимо установить ожидаемый диапазон концентраций. Этот диапазон должен перекрываться аналитической областью применяемой методики, задаваемой НПКО как наименьшего градуировочного стандарта и верхним пределом количественного определения (ВПКО) как наибольшего. Диапазон необходимо задать с целью надлежащего описания фармакокинетики изучаемого анализируемого вещества.

Помимо холостого образца (подвергнутый обработке биологический образец, не содержащий анализируемого вещества или ВС) и нулевых образцов (подвергнутые обработке биологические образцы, содержащие ВС) необходимо использовать не менее шести

различных градуировочных концентраций. Каждый градуировочный стандарт допускается анализировать повторно.

Необходимо использовать зависимость, которая просто и надежно позволяет описать функцию отклика аналитического сигнала от концентрации анализируемого вещества. При вычислении параметров градуировочной кривой холостые и нулевые образцы не учитывают.

В отчете необходимо описать параметры градуировочной кривой (для линейной регрессии: угол наклона и свободный член (при необходимости последнего)). В дополнение к этому, наряду с рассчитанными средними значениями правильности (определение правильности см. ниже), необходимо представить экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов. В отчете необходимо представить все имеющиеся или приемлемые кривые (но не менее трех), полученные в ходе валидации.

Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$). Этому критерию должны соответствовать не менее 75% градуировочных стандартов в не менее чем шести различных концентрациях. Если используются повторности, этим критериям (в пределах $\pm 15\%$ или $\pm 20\%$ для НПКО) должны соответствовать не менее 50% испытанных образцов для каждой концентрации градуировочных стандартов. Если градуировочный стандарт не соответствует этим критериям, его необходимо исключить, а градуировочную кривую пересчитать без учета этого стандарта (в том числе провести повторный регрессионный анализ). Если все повторности градуировочных стандартов НПКО или ВПКО были

забракованы, то валидацию соответствующей серии градуировочных растворов не проводят. Необходимо, при этом, установить причины браковки, а методику, при необходимости, доработать. Если валидация следующей серии также не проходит, то до начала новой валидации необходимо пересмотреть методику.

Несмотря на то, что градуировочную кривую желательно строить с использованием свежеприготовленных образцов, при наличии надлежащих данных по стабильности допускается использовать ранее приготовленные и подвергшиеся хранению градуировочные образцы.

2.1.5. Правильность.

Правильность аналитической методики выражает близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям анализируемого вещества; как правило, она выражается в процентах. Правильность необходимо оценивать по образцам для контроля качества (образцы для КК) – образцам, к которым добавлено заранее известное количество анализируемого вещества. Образцы для КК готовят независимо от градуировочных стандартов, используя различные предварительно приготовленные исходные растворы.

Образцы для КК анализируют по градуировочной кривой, экспериментальные значения концентраций сравнивают с номинальными. Правильность в отчете выражают в виде процента от номинальных значений. Правильность необходимо определять по концентрациям образцов для КК, получаемым как внутри одного цикла (правильность внутри цикла), так и между разными циклами (правильность между циклами).

С целью оценки любых временных тенденций внутри одного цикла целесообразно подтвердить правильность и прецизионность анализа образцов для КК не менее чем в одном цикле, соответствующем

по величине планируемому аналитическому циклу для испытываемых образцов.

Правильность внутри цикла.

Правильность внутри цикла определяют путем анализа внутри одного цикла не менее 5 образцов одной концентрации для не менее, чем четырех различных концентраций, входящих в диапазон применения методики: рекомендуемые концентрации – НПКО, тройная величина НПКО (нижний уровень), около 30-50% от верхней границы определяемых концентраций (средний уровень) и не менее 75% от верхней границы определяемых концентраций (верхний уровень). Среднее значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений для образцов для КК; однако для НПКО пределы допускаются расширить до 20 % от номинальных значений.

Правильность между циклами.

Для валидации правильности между циклами необходимо оценить НПКО, нижний, средний и верхний уровни образцов для КК из не менее чем трех проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем двух различных дней. Среднее значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений для образцов для КК; однако для НПКО пределы допускаются расширить до 20 % от номинальных значений.

В отчет о валидации методики при определении правильности и прецизионности необходимо включить все полученные результаты, за исключением документированных промахов.

2.1.6. Прецизионность.

Прецизионность аналитической методики — это степень близости результатов между отдельными повторными измерениями,

выражающаяся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации). Прецизионность необходимо подтвердить для НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровня концентрации образцов для КК как внутри одного цикла, так и между разными циклами, то есть для тех же циклов и данных, что и при подтверждении правильности.

Прецизионность внутри цикла.

При оценке прецизионности внутри цикла необходимо использовать не менее 5 образцов одной концентрации для НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровня концентрации образцов для КК внутри одного цикла. Относительное стандартное отклонение внутри одного цикла не должно превышать 15 % для образцов для КК; для НПКО оно не должно превышать 20 %.

Прецизионность между циклами.

При оценке прецизионности между циклами необходимо определить НПКО, нижний, средний и верхний уровни концентраций образцов для КК из не менее чем трех проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем двух различных дней. Относительное стандартное отклонение между циклами не должно превышать 15 % для образцов для КК; для НПКО оно не должно превышать 20 %.

2.1.7. Отсутствие влияния разбавления образцов.

Степень разбавления образцов не должна влиять на параметры правильности и прецизионности методики. По возможности, валидацию разбавления образцов необходимо проводить путем добавления к матрице анализируемого вещества в концентрации, выше верхней границы определяемых концентраций, и разведением полученного образца холостой пробой (не менее пяти определений на каждое

разбавление). Правильность и прецизионность должны находиться в пределах установленных критериев приемлемости (не более $\pm 15\%$). Диапазон применения должен включать разбавление, применяемое к испытываемым образцам.

Оценку диапазона применения можно произвести в рамках частичной валидации. Допускается использовать иную матрицу, если показано, что она не влияет на прецизионность и правильность.

2.1.8. Эффект матрицы.

При применении МС-методик необходимо оценить эффект матрицы, используя не менее шести серий холостых образцов от разных субъектов (источников).

Путем вычисления отношения максимальной площади в присутствии матрицы (определяется путем анализа подготовленного холостого образца с добавленной известной концентрацией анализируемого вещества) к максимальной площади в отсутствии матрицы (чистый раствор анализируемого вещества в той же концентрации) для каждой серии матрицы для всех анализируемых веществ и ВС необходимо рассчитать эффект матрицы (ЭМ). Необходимо рассчитать нормализованный ЭМ по ВС (как частное от деления ЭМ анализируемого вещества на ЭМ ВС). Относительное стандартное отклонение нормализованного ЭМ по ВС, рассчитанное для шести биологических образцов, не должен превышать 15%. Измерения осуществляют для нижнего и верхнего уровня концентраций образцов для КК.

При неприменимости такого подхода, например, при пробоподготовке в режиме реального времени, необходимо оценить вариабельность откликов между сериями путем анализа не менее шести серий матрицы, в которую добавлено анализируемое вещество

на нижнем и верхнем уровне концентрации образцов для КК. В отчете о валидации необходимо представить площади пиков анализируемого вещества и ВС, а также рассчитанные концентрации каждого образца. Относительное стандартное отклонение для серии не должно превышать 15 %.

Если матрица малодоступна, допускается использовать менее шести различных серий матриц, однако такой подход необходимо обосновать. В этом случае также необходимо оценить эффект матрицы.

Если лекарственный препарат, предназначенный для парентерального введения субъектам или животным, содержит вспомогательные вещества, способные вызвать эффект матрицы, например, полиэтиленгликоль или полисорбат, эффект матрицы, в дополнение к холостой матрице, оценивают, используя матрицу, содержащую вышеуказанные вспомогательные вещества. Если не доказано, что упомянутые вспомогательные вещества подвергаются метаболизму или биотрансформации *in vivo*, матрицу для анализа получают от субъектов или животных, которым вводили эти вспомогательные вещества. Влияние вспомогательных веществ можно оценить путем вычисления ЭМ или проведением исследования разведения испытуемого образца с высокой концентрацией в холостой матрице, не содержащей вспомогательные вещества.

В дополнение к стандартным биологическим образцам эффект матрицы рекомендуется оценивать на «нестандартных» образцах (например, образцы гиперлипидемической плазмы или плазмы, полученной из крови, подвергшейся гемолизу). Если анализу подлежат образцы от особых групп пациентов (например, с почечной или печеночной недостаточностью), эффект матрицы рекомендуется оценить, используя биологические образцы от таких пациентов.

2.1.9. Стабильность.

Чтобы удостовериться, что каждый этап прободготовки и последующего анализа образцов, а также условия их хранения не повлияли на постоянство сохранения концентрации анализируемого вещества, проводят исследование стабильности.

Стабильность необходимо оценить для каждого этапа аналитической методики, то есть удостовериться, что условия, для которых проведены исследования стабильности, такие как биологический образец, наличие антикоагулянта, материал контейнера (упаковки), хранение и условия анализа аналогичны реальным условиям анализа испытуемых образцов. Ссылка на источники публикаций не является достаточным условием.

Стабильность анализируемого вещества в исследуемом образце оценивают, используя нижние и верхние образцы для КК, которые исследуют сразу после их приготовления и после хранения в условиях, в которых проводится работа с испытуемыми образцами. Как правило, образцы для КК анализируют по градуировочной кривой, рассчитанной по свежеприготовленным градуировочным растворам; полученные концентрации сравнивают с номинальными. Правильность для каждой из концентраций (для средних значений) должна находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинального.

Необходимо, учитывая линейный диапазон и диапазон измерения детектора, испытать стабильность исходных и рабочих растворов после соответствующих разведений.

Исследования стабильности необходимо проводить при различных условиях хранения (например, используя подход «наихудшего случая»), по срокам равным или превышающим сроки хранения фактических анализируемых исследуемых образцов.

Необходимо провести следующие испытания стабильности:

– стабильность исходных и рабочих растворов анализируемого вещества и ВС;

– стабильность замороженного и размороженного биологического образца, содержащего анализируемое вещество (перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру или температуру условий пробоподготовки не менее чем в 3 циклах «замораживание-размораживание»);

– краткосрочная стабильность анализируемого вещества в биологическом образце при комнатной температуре или температуре условий пробоподготовки;

– естественное хранение биологического образца, содержащего анализируемое вещество (в замороженном виде).

Кроме того, если применимо, необходимо провести следующие испытания:

– стабильность образца после пробоподготовки при комнатной температуре или в условиях хранения, которые будут использоваться во время анализа;

– стабильность подготовленных образцов в устройстве для автоматического ввода пробы, при температуре инжектора или автодозатора.

Стабильность при замораживании и размораживании. Образцы для КК хранят замороженными в морозильной камере при предусмотренной температуре и затем размораживают при комнатной температуре или температуре пробоподготовки. После полного размораживания образцы заново замораживают в тех же условиях. В каждом цикле образцы должны находиться в замороженном состоянии в течение, по меньшей мере, 12 часов

до их размораживания. Количество циклов стабильности замораживания-размораживания должно быть равным или превышать количество таких циклов для испытуемых образцов.

Естественное хранение замороженного биологического образца, содержащего анализируемое вещество. Образцы для КК необходимо заморозить в тех же условиях и хранить в таких условиях столько же, сколько и испытуемые образцы, или дольше. В отношении низкомолекулярных органических соединений допускается использовать подход, основанный на исследовании крайних вариантов (метод брекитинга), например, если стабильность подтверждена при температурах -70 и -20 °С, исследовать стабильность при температурах, попадающих в этот диапазон, не требуется. Стабильность крупных молекул (например, пептидов и белков) необходимо подтвердить для каждой из температур, при которых будет осуществляться хранение биологических образцов. В дополнение к образцам для КК допускается использовать испытуемые образцы, однако использование только испытуемых образцов является недостаточным, поскольку номинальные концентрации анализируемого вещества в них не известны. Результаты изучения стабильности при естественных условиях хранения должны быть получены до составления отчета.

Стабильность исходных и рабочих растворов. Подтверждать стабильность рабочих растворов для каждой концентрации не требуется, можно ограничиться подтверждением стабильности крайних вариантов. Подтверждать стабильность внутренних стандартов, меченных стабильными изотопами, не требуется, если показано, что в условиях, для которых подтверждена стабильность анализируемого вещества, не происходит реакций изотопного обмена.

В отношении исследования с несколькими анализируемыми веществами, включая отдельные исследования биоэквивалентности, необходимо подтвердить стабильность каждого анализируемого вещества в биологическом образце, содержащем все анализируемые вещества.

В целях подтверждения того, что определяемые аналитической методикой концентрации анализируемого вещества отражают его истинные значения в биологических образцах субъекта в момент их отбора, необходимо уделить особое внимание изучению стабильности анализируемого вещества в биологическом образце, полученном сразу после отбора образцов и в течение последующей пробоподготовки вплоть до помещения их в условия хранения. Необходимость подтверждения такой стабильности следует рассматривать в частном порядке, ориентируясь на химическую структуру анализируемого вещества.

2.2. Частичная валидация.

При незначительных изменениях ранее валидированной аналитической методики, в зависимости от характера таких изменений, в проведении полной валидации, как правило, нет необходимости. К изменениям, в отношении которых допускается проведение частичной валидации, являются трансфер биоаналитической методики в другую лабораторию, замена оборудования, изменения диапазона применения, ограниченный объем биологических образцов, изменения разновидности биологического образца или вида животного, замена антикоагулянта, изменения процедуры пробоподготовки, условий хранения и др. В отчете необходимо отразить все произошедшие изменения и обосновать объем повторной или частичной валидации.

Объем частичной валидации может предполагать объем работ, начиная с минимального объема только по оценке прецизионности и правильности внутри цикла, и заканчивая проведением почти полной валидации.

2.3. Перекрестная валидация.

Если данные получены с помощью разных методов (методик) в рамках группы исследований или в рамках одного исследования в различных лабораториях с использованием одной и той же методики, необходимо сравнить полученные данные и провести перекрестную валидацию использованных методов (методик). В рамках многоцентрового исследования различия в пробоподготовке или использование иного аналитического метода может привести к различным результатам. По возможности, перекрестную валидацию необходимо провести до анализа испытуемых образцов. В рамках перекрестной валидации необходимо провести анализ образцов для КК или испытуемых образцов с помощью обоих аналитических методов (методик). Полученные с помощью различных методов (методик) средние значения правильности для образцов для КК не должны различаться более чем на $\pm 15\%$, однако, при достаточном обосновании, они могут различаться на большую величину. Погрешность между двумя значениями испытуемых образцов должна укладываться в 20% диапазон от их среднего значения для не менее чем 67% повторностей.

3. Анализ испытуемых образцов

По завершении полной валидации аналитической методики приступают к анализу испытуемых образцов. До начала анализа испытуемых образцов необходимо провести проверку пригодности биоаналитической методики.

С целью обеспечения приемлемости аналитического цикла пробоподготовку испытуемых образцов, образцов для КК и градуировочных растворов необходимо осуществлять в соответствии с валидированной аналитической методикой.

3.1. Аналитический цикл

Аналитический цикл состоит из холостого образца (подвергнутый обработке биологический образец, не содержащий анализируемого вещества или ВС) и нулевого образца (подвергнутый обработке биологический образец, содержащий ВС), градуировочных растворов с не менее чем 6 концентрациями, образцов для КК с не менее, чем 3 концентрациями (нижний, средний и верхний уровни) в двух повторностях (или не менее 5 % от количества испытуемых образцов, в зависимости от того, что больше) и испытуемых образцов, подлежащих анализу. Если номинальная(ые) концентрация(и) исходных растворов не установлена(ы), градуировочные растворы и образцы для КК необходимо готовить отдельно, используя разные приготовленные исходные растворы. Все образцы (градуировочные растворы, образцы для КК и испытуемые образцы) подлежат пробоподготовке как единая серия образцов в порядке, в котором они должны анализироваться. Единая серия представляет собой образцы, подлежащие пробоподготовке в одно и то же время, то есть последовательной непрерывной обработке одним и тем же аналитиком с использованием одинаковых реактивов в сходных условиях. Следует избегать анализа отдельно приготовленных образцов в качестве нескольких серий в одном аналитическом цикле. Если этого избежать не удастся, например, вследствие ограничений по стабильности при пробоподготовке, то каждая серия должна включать образцы для КК как минимум трех уровней концентрации (нижнего, среднего

и верхнего). В стандартной операционной процедуре (СОП) или рабочих документах по исследованию необходимо заранее установить критерии приемлемости для всего аналитического цикла и отдельных его серий.

В целях снижения вариабельности результатов анализ всех образцов от одного субъекта в исследованиях биоэквивалентности рекомендуется осуществлять в рамках одного аналитического цикла. Образцы для КК необходимо распределить по циклу таким образом, чтобы доказать правильность и прецизионность для всего цикла.

3.2. Критерии приемлемости аналитического цикла.

В протоколе, плане исследования или в СОП необходимо установить критерии приемлемости или неприемлемости аналитического цикла. Если весь цикл состоит из нескольких серий, критерии приемлемости должны распространяться на весь цикл и (или) на каждую серию в отдельности. Цикл может быть приемлем, несмотря на неприемлемость серии в связи с несоблюдением критериев.

Должны быть установлены следующие критерии приемлемости:

Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных растворов должны находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$). Этому критерию должны соответствовать не менее 75% градуировочных растворов для, как минимум, шести различных концентраций. Если результат для градуировочного раствора не соответствует этим критериям, этот результат должен быть исключен, а градуировочная кривая должна быть пересчитана без учета этого результата (повторный регрессионный анализ).

Если отклоненный результат относится к градуировочному раствору с уровнем НПКО, то для такого аналитического цикла в качестве НПКО будет служить следующий наименьший приемлемый градуировочный раствор из диапазона линейности. Если результат для градуировочного раствора с максимальной концентрацией неприемлем, то для такого аналитического цикла в качестве ВПКО будет служить следующий наибольший приемлемый градуировочный раствор из диапазона линейности. Пересчитанный аналитический диапазон должен охватывать все образцы для КК (нижнего, среднего и верхнего уровня).

Значения правильности образцов для КК должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений. Этому критерию должны соответствовать не менее 67% образцов для КК и не менее 50% для каждой концентрации. Если эти критерии не соблюдаются, аналитический цикл необходимо забраковать, а исследуемые образцы подвергнуть повторной пробоподготовке и анализу.

При одновременном определении нескольких анализируемых веществ, каждому из них должна соответствовать отдельная градуировочная кривая. Если аналитический цикл по одному из анализируемых веществ является приемлемым, но неприемлем по другому, допускается использовать данные по концентрации приемлемого анализируемого вещества, однако для определения концентрации отклоненного анализируемого вещества образцы необходимо подвергнуть повторной пробоподготовке и анализу.

Если при повторном использовании градуировочных растворов один из них – НПКО или ВПКО – оказывается неприемлемым, аналитический диапазон методики не меняется.

Для каждой концентрации образцов для КК необходимо рассчитать средние значения правильности и прецизионность всех принятых циклов и включить их в аналитический отчет. Если средние значения правильности и значения прецизионности превышают 15 %, необходимо провести дополнительное расследование с целью объяснения таких отклонений. Подобные результаты при исследованиях биоэквивалентности могут привести к неприемлемости данных.

3.3. Аналитический диапазон (Calibration range)

Если до начала анализа испытуемых образцов известно или ожидается, что диапазон концентраций анализируемого вещества в испытуемых образцах будет узкий, то в целях надлежащего расчета концентраций в испытуемых образцах рекомендуется либо сузить аналитический диапазон и адаптировать концентрации образцов для КК к нему, либо включить новые образцы для КК с соответствующими концентрациями.

Если узкого диапазона результатов анализа не ожидается, но он наблюдается после начала анализа образцов, рекомендуется остановить анализ и либо сузить установленный аналитический диапазон с пересмотром существующих концентраций образцов для КК, либо перед возобновлением анализа испытуемых образцов включить в аналитический диапазон образцы для КК с дополнительными концентрациями. Повторный анализ образцов, проанализированных до оптимизации аналитического диапазона или концентраций образцов для КК, не требуется.

Это правило также применимо, если выясняется, что большое количество концентраций анализируемого вещества в испытуемых образцах превышает верхнюю границу определяемых концентраций. В этом случае, по возможности, необходимо расширить аналитический

диапазон и включить дополнительные образцы для КК или изменить их концентрацию.

В диапазон концентраций, установленный для испытуемых образцов, должны входить не менее двух концентраций образцов для КК. Если аналитический диапазон изменяется, в целях расчета функции отклика и подтверждения правильности и прецизионности биоаналитическая методика подлежит повторной (частичной) валидации.

3.4. Повторный анализ испытуемых образцов.

До начала анализа образцов в протоколе, плане исследования или СОП необходимо установить возможные причины повторного анализа испытуемых образцов и критерии выбора значений, подлежащих включению в отчет. В отчете об исследовании необходимо обосновать количество образцов (и их долю от общего количества), подвергнувшихся повторному анализу.

Ниже представлены некоторые причины повторного анализа испытуемых образцов:

- забраковка аналитического цикла вследствие невыполнения критериев приемлемости в отношении правильности градуировочных растворов и (или) образцов для КК;

- аналитический сигнал ВС значительно отличается от сигнала, полученного для градуировочных растворов и образцов для КК (если такие критерии заранее установлены в СОП);

- ошибки при введении образцов или неисправность аналитического оборудования;

- циклы, в которых: 1) градуировочный образец с нижним уровнем был исключен из градуировочной кривой, 2) рассчитанные концентрации превышают верхнюю границу определяемых

концентраций, 3) рассчитанные концентрации находятся ниже НПКО для данного цикла, что привело к увеличению его НПКО по сравнению с другими циклами;

– обнаружение анализируемого вещества в биологическом образце, полученной до приема (введения) лекарственного препарата или в холостых образцах на уровнях НПКО;

– несоответствие критериям приемлемости при проверке пригодности хроматографического анализа.

Повторный анализ испытуемых образцов по фармакокинетическим причинам в исследованиях биоэквивалентности является, как правило, неприемлемым, поскольку он может повлиять на результаты исследования и исказить их. В этом случае повторный анализ можно рассматривать как часть лабораторного расследования с целью выявления возможных причин аномальных результатов и предотвращения возникновения подобных проблем в будущем.

Если повторный анализ проведен вследствие обнаружения анализируемого вещества в биологических образцах до применения лекарственного препарата или по фармакокинетическим причинам, необходимо описать образцы, подвергнутые повторному анализу, и представить данные о начальных значениях; причинах повторного анализа; значениях, полученных в ходе повторного анализа; принятые в итоге значения и обоснования приемлемости.

Если в ходе валидации доказана удовлетворительная прецизионность для повторной инъекции и стабильность подготовленных образцов в устройстве для автоматического ввода проб, при неисправности оборудования допускается повторная инъекция образцов. Повторная инъекция всего аналитического цикла

или отдельных образцов градуировочных растворов или образцов для КК в силу элементарного брака при градуировке или образцов для КК без какой-либо установленной аналитической причины не допустима.

Безопасность субъектов исследования должна превалировать над любыми другими его аспектами. Поэтому могут возникнуть иные обстоятельства, требующие повторной пробоподготовки и (или) повторного анализа отдельных испытуемых образцов, например, если обнаружены неожиданные или резко выделяющиеся результаты, которые могут повлиять на безопасность пациента.

3.5. Интегрирование (обработка хроматограмм).

В СОП необходимо описать интегрирование и повторное интегрирование хроматограмм. В аналитическом отчете необходимо объяснить любые отклонения от данного СОП. Параметры интегрирования хроматограмм и, в случае повторного интегрирования, начальные и конечные данные интегрирования необходимо документировать в лаборатории и представлять по запросу.

4. Повторный анализ активных испытанных образцов

Использование градуировочных растворов и образцов для КК во время валидации не всегда имитирует реальные испытуемые образцы. Различия в ходе пробоподготовки и хранения (например, в связывании с белками, обратное преобразование известных и неизвестных метаболитов, неоднородность (гетерогенность) образцов или применение сопутствующих лекарственных препаратов) могут повлиять на правильность и прецизионность определения анализируемого вещества в таких образцах. В связи с этим рекомендуется оценивать правильность активных испытанных образцов путем их повторного анализа в отдельных циклах в другие дни. Объем

исследования зависит от свойств анализируемого вещества и испытываемых образцов и должен основываться на глубоком понимании аналитической методики (метода) и анализируемого вещества. Тем не менее, следует ориентироваться на следующее правило: если количество образцов не превышает 1000, повторному анализу подлежат 10 % образцов, если превышает – 5 % от общего числа испытываемых образцов. Следует использовать образцы, соответствующие C_{\max} и фазе элиминации.

Относительная погрешность между исходно полученной концентрацией и концентрацией, полученной при повторном анализе, не должна превышать 20 % в не менее чем 67 % случаев. При расчетах необходимо пользоваться следующей формулой:

$$\text{Относительная погрешность} = \frac{(\text{повторное значение} - \text{исходное значение})}{\text{среднее значение}} \times 100\%$$

Относительная погрешность, превышающая 20%, может свидетельствовать об аналитических погрешностях и подлежит расследованию.

Если при анализе активных испытанных образцов выявлены разнородные результаты, необходимо установить их причины и принять надлежащие меры для минимизации неудовлетворительной правильности и прецизионности.

Повторный анализ активных испытанных образцов необходимо осуществлять, как минимум, в следующих случаях:

- в токсикокинетических исследованиях для каждого вида животных;
- во всех опорных (регистрационных) исследованиях биоэквивалентности;
- во всех клинических исследованиях, впервые проводимых у человека;

– во всех клинических исследованиях, впервые проводимых у пациентов;

– во всех клинических исследованиях, впервые проводимых у пациентов с печеночной и (или) почечной недостаточностью.

Повторный анализ активных испытанных образцов в исследованиях на животных может проводиться только в исследованиях ранней фазы при условии, что он является репрезентативным для опорных исследований относительно введенной дозы и полученной концентрации.

Образцы не подлежат смешиванию друг с другом, поскольку это может ограничить выявление резко выделяющихся результатов.

5. Полимерсвязывающие методы (методы связывания лиганда).

5.1. Валидация методики.

При изучении фармакокинетики лекарственных препаратов на основе макромолекул наиболее часто используются методы, основанные на связывании лиганда (МСЛ), или иммунохимические методы. Принципы валидации и рекомендации по анализу испытуемых образцов следует, в целом, применять и к МСЛ. Однако, такие методики могут вызывать ряд затруднений. Ввиду присущих макромолекулам свойств и их сложной структуры процесс пробоподготовки (извлечения) затруднителен, поэтому анализ, как правило, проводят без предварительного выделения анализируемого вещества. Кроме того, эти методики не позволяют напрямую определить содержание (концентрацию) самих макромолекул, а косвенно измеряют результат реакции их связывания с реактивами, использующимися в методе (методике).

5.1.1. Полная валидация

5.1.1.1. Стандартные образцы

Макромолекулы являются гетерогенными, поэтому их активность и иммунореактивность может варьировать. Стандартный материал должен быть хорошо описан и документирован (например, должен иметь сертификат анализа и документы, подтверждающие его происхождение). Необходимо использовать наиболее чистый стандартный образец из доступных. При приготовлении градуировочных стандартов и образцов для КК настоятельно рекомендуется использовать ту же серию стандартного образца, которая использовалась в доклинических и клинических исследованиях. При смене серии перед ее использованием необходимо провести описание ее аналитических характеристик и оценить ее биоаналитическую пригодность, чтобы удостовериться, что функциональные свойства метода (методики) не нарушены.

5.1.1.2. Специфичность

Под специфичностью связывания с реактивом(ами) понимается его(их) способность связываться исключительно с изучаемым анализируемым веществом. Специфичность связана с концепцией перекрестной реактивности. В идеальном случае, связывающий реактив должен быть специфичным и не обладать перекрестной реактивностью со «структурно родственными соединениями» (например, эндогенными соединениями, изоформами, вариантными формами анализируемого вещества и аналогичными по физико-химическим свойствам соединениями) и ожидаемыми сопутствующими лекарственными препаратами. При разработке метода и его валидации, как правило, такие «родственные молекулы» отсутствуют. Изучение специфичности допускается осуществлять после завершения валидации и накопления данных о свойствах анализируемого вещества. Специфичность следует испытывать, используя образцы для КК, путем прибавления

в биологические образцы, никогда ранее не содержавшие действующего вещества (биологические образцы, полученные от животных или субъектов, которым никогда не вводили анализируемое вещество), возрастающих концентраций доступных «родственных молекул» или лекарственных препаратов, которые, как ожидается, будут применяться одновременно, а также путем определения правильности при анализе рассматриваемой макромолекулы как на уровнях НПКО, так и верхней границы определяемых концентраций. Критерии приемлемости методики для образцов для КК должны находиться в пределах $\pm 25\%$ от номинальных значений.

5.1.1.3. Селективность

Селективность методики связывания лиганда – это способность определять рассматриваемое анализируемое вещество в присутствии неродственных соединений в биологическом образце. Ввиду присущих макромолекулам свойств их извлечение, как правило, не проводят. В связи с чем, неродственные соединения, содержащиеся в биологическом образце, например, ферменты, осуществляющие их деградацию, гетерофильные антитела или ревматоидный фактор могут оказывать влияние на результат количественного определения при данном анализе. Селективность испытывают путем прибавления не менее 10 источников биологических образцов на уровнях НПКО или близких к ним. Такие источники должны включать гиперлипидемические и гемолизованные образцы. Настоятельно рекомендуется включить источники, полученные у популяции пациентов с соответствующим заболеванием. Селективность следует изучить на уровне НПКО или близком к нему. Также целесообразно изучить селективность при более высоких концентрациях анализируемого вещества. Если влияние носит концентрационно

зависимый характер, необходимо установить минимальную концентрацию, при которой такое влияние значимо. Значения правильности должны находиться в пределах $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ при НПКО) от номинальной концентрации v , по меньшей мере, 80% изученных биологических образцов.

5.1.1.4. Эффект переноса

При использовании автоматизированных дозирующих устройств необходимо изучить возможность переноса путем помещения холостых образцов после образцов с высокой концентрацией анализируемого вещества или градуировочного стандарта верхней границы определяемых концентраций.

5.1.1.5. Выбор разновидности биологического образца

Ввиду значительного влияния на результат анализа высоких концентраций структурно родственных эндогенных соединений определение некоторых макромолекул без предварительного их извлечения из сложных биологических образцов невозможно. Несмотря на то, что использование извлечений из биологических образцов (например, с использованием сорбции на угле, иммуноаффинных сорбентов) или альтернативных матриц (например, модельные белковые буферные растворы, диализированная сыворотка) не рекомендуется, в некоторых случаях это является вынужденной мерой, поскольку иная стратегия определения рассматриваемого анализируемого вещества отсутствует. Градуировочную стандартную кривую допускается строить с помощью таких «модельных образцов». Образцы для КК следует готовить в фактическом биологическом образце с оценкой правильности, подтверждающей отсутствие эффекта матрицы.

5.1.1.6. Минимально необходимое разведение

Поскольку биологические образцы могут давать высокий фоновый сигнал, может потребоваться установление минимально необходимого разведения. Минимально необходимое разведение – это наименьшее разведение, до которого следует развести образец в буферном растворе, для целей оптимизации правильности и прецизионности аналитического цикла путем снижения соотношения аналитический сигнал/фоновый сигнал. Для определения минимально необходимого разведения образцы следует готовить в той же разновидности биологического образца, что и испытываемые образцы.

5.1.1.7. Градуировочная кривая

Зависимость сигнала от концентрации (измеряемого косвенно) при построении градуировочной кривой, как правило, является нелинейной, обычно сигмовидной. Следует использовать, по меньшей мере, 6 градуировочных стандартов в не менее чем двух повторностях. Градуировочные стандарты следует примерно равномерно распределить на логарифмической шкале в пределах ожидаемого аналитического диапазона. Помимо градуировочных стандартов, для построения кривой можно использовать якорные точки, лежащие вне области аналитического диапазона. В ходе валидации следует изучить, по меньшей мере, 6 независимых градуировочных циклов. Чтобы установить совокупную устойчивость регрессионной модели градуировочной кривой, результаты следует занести в таблицу. Исключать градуировочный стандарт из кривой вследствие технической ошибки (промаха) допускается при выявлении ее причины (например, ошибка отмеривания дозатором). Целевые концентрации градуировочных стандартов, рассчитанные из градуировочной кривой методом пересчета, должны находиться в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения ($\pm 25\%$ для НПКО и верхней границы

определяемых концентраций) для не менее чем 75% проанализированных градуировочных стандартов. Якорные калибраторы не требуют установления критериев приемлемости, поскольку они не входят в область аналитического диапазона.

5.1.1.8. Прецизионность и правильность

Для оценки прецизионности и правильности не следует использовать свежеприготовленные образцы для КК, их необходимо предварительно заморозить и работать с ними также, как при анализе испытуемых образцов. В целях оценки правильности, прецизионности и общей ошибки метода (методики) следует использовать, по меньшей мере, 5 образцов для КК: ожидаемый уровень НПКО, уровень не более, чем в 3 раза превышающий НПКО, средний, верхний уровень и ожидаемая верхняя граница определяемых концентраций. Валидация должна имитировать реальный анализ испытуемых образцов, т.е. если в соответствии с рекомендациями испытуемые образцы подвергаются двукратному определению (например, используя 2 лунки), то в ходе валидации образцы для КК следует подвергать двукратному анализу (т.е. используя 2 лунки на каждый образец для КК). Измерения следует проводить, по меньшей мере, в 6 независимых аналитических циклах в течение нескольких дней. В отношении правильности внутри цикла и между циклами средние значения концентраций должны укладываться в $\pm 20\%$ от номинального значения для каждого уровня ($\pm 25\%$ для НПКО и верхней границы определяемых концентраций). Более того, общая ошибка (т.е. сумма абсолютного значения относительной ошибки, выраженной в процентах и коэффициента вариации, выраженного в процентах) не должна превышать 30% (40% для НПКО и верхней границы определяемых концентраций)

5.1.1.9. Линейность разведения образцов

Ввиду узости аналитического диапазона кривой градуировочного стандарта, необходимо, используя образцы для КК, подтвердить, что рассматриваемое анализируемое вещество, присутствующее в концентрациях, превышающих область количественного определения (выше верхней границы определяемых концентраций), можно точно измерить с помощью методики после разведения образца холостой матрицей, чтобы получить концентрации анализируемого вещества, укладывающиеся в валидированный аналитический диапазон. Дополнительной причиной проведения экспериментов с разведением служит обнаружение потенциальных прозон или «эффекта сползания», т.е. подавления сигнала, обусловленного высокими концентрациями анализируемого вещества. Концентрация для каждого разведения, вычисленная методом пересчета, должна находиться в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения после поправки на разведение, прецизионность конечных концентраций всех разведений не должна превышать 20%.

5.1.1.10. Параллелизм

При наличии испытуемых образцов в целях выявления возможного эффекта матрицы или различающейся аффинности к метаболитам необходимо оценить параллелизм между соответствующими значениями на градуировочной кривой и результатами испытуемых образцов, подвергшихся серийному разведению. Испытуемый образец с высокой концентрацией (предпочтительно, близкой к C_{\max}) следует развести с помощью холостого образца минимум в 3 раза. Прецизионность между образцами в сериях разведений не должна превышать 30%. Если образцы разведены нелинейно (непараллельно), необходимо заранее определить процедуру представления результатов. Если в ходе валидации метода

(методики) испытуемые образцы недоступны, параллелизм следует изучить, как только станут доступны испытуемые образцы.

5.1.1.11. Стабильность

Стабильность анализируемого вещества изучают, используя образцы для КК с низкими и высокими уровнями концентраций с помощью вышеописанного способа (раздел 2.1.9). Как указывалось ранее, при изучении стабильности необходимо установить краткосрочную стабильность при комнатной температуре или температуре пробоподготовки и стабильность при «замораживании-размораживании». Кроме того, следует изучить естественную стабильность в замороженном состоянии при каждой температуре, при которой будут храниться образцы.

Среднее значение каждой концентрации должно находиться в пределах $\pm 20\%$ от номинального.

5.1.1.12. Реактивы

Ключевые реактивы, включая связывающие реактивы (например, связывающие белки, аптамеры, антитела или конъюгированные антитела), а также реактивы, содержащие соединения с ферментативной активностью, оказывают прямое влияние на результаты анализа, вследствие чего необходимо обеспечить их качество. Соответственно, при изменении серии реактива в ходе валидации методики или анализа образцов необходимо подтвердить правильность аналитических функций метода (методики), чтобы убедиться, что она после использования исходной или предыдущей серии не нарушалась.

В целях обеспечения отсутствия влияния на аналитические функции метода (методики) во времени необходимо документировать условия, гарантирующие поддержание стабильности как второстепенных реактивов (например, буферных растворов,

растворителей и модификаторов значений pH), так и, что более важно, ключевых реактивов (реагентов).

5.1.1.13. Коммерческие наборы

Коммерческие наборы необходимо повторно валидировать, чтобы обеспечить правильность и прецизионность при анализе образцов уровня НПКО и образцов для КК в аналитическом диапазоне, который будет использоваться для анализа испытуемых образцов. Применяются принципы валидации, описанные выше.

5.2. Частичная валидация и перекрестная валидация.

Все вопросы валидации, рассмотренные в разделах 2.2 и 2.3, применимы к методикам связывания лиганда.

5.3. Анализ испытуемых образцов.

5.3.1. Аналитический цикл.

Наиболее часто при МСЛ используется планшет для микропроб. Аналитический цикл может состоять из нескольких планшетов, однако каждый из них должен содержать отдельный комплект градуировочных стандартов и образцов для КК для компенсации различия между характеристиками планшетов. Некоторые платформы вмещают ограниченное количество образцов. В связи с этим допустимо помещать комплект градуировочных стандартов в первую и последнюю платформы, а образцы для КК размещать в каждой платформе.

Рекомендуется анализировать испытуемые образцы по меньшей мере в 2 повторностях.

5.3.2. Критерии приемлемости анализа испытуемых образцов

Концентрации градуировочных стандартов, вычисленные методом пересчета, должны находиться в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения (за исключением НПКО и верхней границы определяемых концентраций, которые должны укладываться в $\pm 25\%$). Этот критерий

должен выполняться, по меньшей мере, для 75% проанализированных градуировочных стандартов, минимальное количество которых для установления аналитического диапазона должно быть не меньше 6. Настоящее требование не распространяется на якорные калибраторы.

Каждый планшет должен включать не менее 3 концентраций образцов для КК (низкого, среднего и верхнего уровня), по меньшей мере, в двух повторностях. Кроме того, при валидации образцы для КК должны имитировать анализ испытуемых образцов по количеству лунок на каждый испытуемый образец. По меньшей мере, 67% проанализированных образцов для КК и 50% образцов каждой концентрации должны укладываться в диапазон $\pm 20\%$ от номинального значения. Все несоответствия данному критерию необходимо обосновать.

5.3.3. Повторный анализ активных испытанных образцов

Все вопросы относительно повторного анализа ранее испытанных образцов, рассмотренные в разделе 4, применимы и к методикам связывания лиганда. Концентрации, полученные при первичном и повторном анализах, должны лежать в пределах $\pm 30\%$ от их среднего значения для не менее чем 67% повторов.

6. Отчетность.

В отчет(ы) необходимо включить сведения о проведенных аудитах (инспекциях), если таковые проводились.

6.1. Отчет о валидации

При высокой детализации сведений, отражаемых в отчете о валидации, достаточно указать ссылки на СОП по соответствующим процедурам, необходимым для анализа. В противном случае, данные СОП необходимо приложить к отчету.

Все первичные документы должны быть доступны в их исходном формате и по запросу эксперта.

Все отклонения от протокола валидации необходимо документировать.

Минимальные требования к содержанию отчета о валидации:

- резюме валидации;
- описание использованной аналитической методики и, если применимо, ее источник (ссылки на литературу (публикации) и (или) модификация методики);
- описание методики количественного определения (анализируемое вещество, ВС, пробоподготовка, анализ);
- стандартные образцы (происхождение, номер серии, сертификат анализа, стабильность и условия хранения);
- градуировочные растворы (стандарты) и образцы для КК (разновидность биологического образца, антикоагулянт (если применимо), приготовление с указанием дат и условий хранения);
- критерии приемлемости цикла;
- анализ:
 - таблица всех аналитических циклов с указанием дат и приемлемости или неприемлемости цикла с описанием причин последней;
 - таблица результатов градуировки всех приемлемых аналитических циклов, включая аналитический диапазон, функцию отклика, экспериментально рассчитанные концентрации и значения правильности;
 - таблица результатов анализа образцов для КК всех приемлемых аналитических циклов (прецизионность и правильность внутри цикла

и между циклами); необходимо четко обозначить значения, находящиеся вне критериев приемлемости;

данные по стабильности исходных и рабочих растворов, образцов для КК, охватывающие использованные условия хранения;

данные о селективности, НПКО, эффекте переноса, эффекте матрицы (если применимо) и линейности;

– непредвиденные результаты, полученные в ходе валидации с полным обоснованием принятых мер;

– отклонения от методики и (или) СОП (описание отклонений, влияние их на результаты исследования, дополнительные данные).

В отчете о валидации необходимо указать результаты всех отдельных измерений, проведенных для градуировочных растворов (стандартов) и образцов для КК.

6.2. Аналитический отчет.

В аналитический отчет необходимо включить ссылку на отчет(ы) о валидации, соответствующий(е) анализу испытуемых образцов. Кроме того, в нем необходимо представить подробное описание анализа испытуемых образцов.

При высокой детализации сведений, отражаемых в аналитическом отчете, достаточно указать ссылки на СОП по соответствующим процедурам, необходимым для анализа. В противном случае, данные СОП необходимо приложить к отчету.

Все первичные документы должны быть доступны в их исходном формате и по запросу эксперта.

В аналитическом отчете необходимо описать все отклонения от плана анализа, аналитической методики или СОП.

Минимальные требования к содержанию аналитического отчета:

- стандартные образцы (происхождение, номер серии, сертификат анализа, стабильность и условия хранения);
- градуировочные растворы (стандарты) и образцы для КК (условия хранения);
- критерии приемлемости цикла (краткое описание, ссылка на соответствующий протокол или СОП);
- описание количественного определения (краткое описание);
- схема движения образцов (даты приема и содержание, состояние образцов при приеме, место и условия хранения, если применимо);
- анализ испытываемых образцов:
 - состав аналитического цикла:
 - таблица всех аналитических циклов и исследуемых образцов с указанием дат и результатов;
 - таблица результатов градуировки всех приемлемых аналитических циклов;
 - таблица результатов анализа образцов для КК всех приемлемых аналитических циклов; необходимо четко обозначить значения, находящиеся вне критериев приемлемости;
 - забракованные аналитические циклы (идентификационные данные, дата анализа, причины брака),
- отклонения от методики и (или) СОП (описание отклонений, влияние на результат исследования, дополнительные данные),
- повторный анализ, за исключением повторного анализа вследствие аналитических причин, таких как забракованный цикл (таблица идентификации образцов, причины повторного анализа, первичные значения и значения, полученные при повторном анализе).

Результаты повторного анализа активных испытанных образцов допускается представить в отчете о валидации, или в аналитическом отчете, или отдельным приложением.

В аналитический отчет об исследовании биоэквивалентности необходимо включить хроматограммы из полных аналитических циклов, так чтобы они включали не менее 20% субъектов, а также соответствующие образцы для КК и градуировочные растворы (стандарты).

В аналитическом отчете прочих исследований необходимо представить репрезентативные хроматограммы. Дополнительные хроматограммы должны быть доступны по запросу.

Определения

Активные образцы (Incurred samples): Испытуемые образцы, полученные от субъектов или животных, которым вводили лекарственный препарат.

Анализируемое вещество (Analyte): Отдельное химическое соединение, подлежащее количественному определению; может представлять собой неизмененное действующее вещество, биологическую молекулу или ее производное, метаболит и (или) продукт деградации в биологическом образце.

Аналитическая методика (Analytical Procedure): Подробное описание каждого этапа и способа проведения анализа.

Аналитический диапазон (Calibration range): Интервал между высокой и низкой концентрацией (содержанием) анализируемого вещества в образце (включая указанные концентрации), для которых показано, что аналитическая методика удовлетворяет требованиям по прецизионности, правильности и постоянству функции отклика.

Аналитический цикл (Analytical run): Полный комплект испытуемых образцов с соответствующим количеством градуировочных растворов и образцов для КК для их валидации. В один день может быть проведено несколько циклов; один цикл может длиться в течение нескольких дней.

Верхняя граница определяемых концентраций (Upper limit of quantification (ULOQ)): Наибольшее количество анализируемого вещества в образце, которое поддается количественному определению с заранее заданной правильностью и прецизионностью.

Внутренний стандарт (IS) (Internal standard): Контрольное соединение (например, структурно схожий аналог или соединение, меченное стабильным изотопом), добавляемое к градуировочным

растворам, образцам для КК и испытуемым образцам в заранее установленных постоянных концентрациях с целью поправки на экспериментальную вариабельность при пробоподготовке и анализе образцов.

Градуировочный раствор (стандарт) (Calibration standard): Биологический образец, к которому добавили известное количество анализируемого вещества. Градуировочные растворы (стандарты) используют для построения градуировочной кривой.

Нижний предел количественного определения (НПКО) (Lower limit of quantification (LLOQ)): Наименьшее количество анализируемого вещества в образце, которое поддается количественному определению с заранее заданной правильностью и прецизионностью.

Номинальная концентрация (Nominal concentration): Теоретическая или ожидаемая концентрация.

Образец для контроля качества (КК) (Quality control (QC) sample): Образец, содержащий анализируемое вещество, используемый для оценки пригодности биоаналитической методики и оценки целостности и правильности результатов анализа испытуемых образцов в неизвестной концентрации из одной серии.

Перекрестная валидация (Cross validation): Сравнение валидационных параметров двух биоаналитических методик.

Повторный анализ активных испытанных образцов (Incurred sample reanalysis): Анализ части активных испытанных образцов с целью определения, насколько сопоставимы результаты первичного анализа.

Полная валидация (Full validation): Определение валидационных параметров, подлежащих использованию для анализа каждого

анализируемого вещества в образце с помощью биоаналитической методики.

Правильность (Accuracy): Выражает близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям анализируемого вещества. Правильность оценивается по величине процентной меры правильности, рассчитанной как $\frac{\text{полученное значение}}{\text{истинное значение}} \times 100\%$, и по относительной величине систематической погрешности.

Прецизионность (Precision): Степень разброса между сериями измерений, проведенных в заранее установленных условиях. Прецизионность характеризуется величиной относительного стандартного отклонения (отношение стандартного отклонения к среднему, выражаемое в процентах).

Селективность (Selectivity): Способность биоаналитической методики определять и различать исследуемое анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые, могут содержаться в образце.

Специфичность (Specificity): Способность биоаналитической методики однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других соединений (эндогенных или экзогенных) в биологическом образце.

Стабильность (Stability): Химическая стабильность анализируемого вещества в определенном образце в определенных условиях в течение определенного периода времени.

Стандартная операционная процедура (Standard Operating Procedure): Документ, в котором содержится описание регулярно осуществляемых операций, значимых для качества исследования, и позволяющий проводить их правильно и единообразно.

Функция отклика (Response function): Функция, которая надлежащим образом описывает зависимость аналитического сигнала (например, площади пиков) от концентрации (содержания) анализируемого вещества в образце. Функция отклика определяется для аналитического диапазона.

Частичная валидация (Partial validation): Серии аналитических экспериментов, в которых после модификации валидированной биоаналитической методики часть параметров подвергаются валидации.

Эффект матрицы (Matrix effect): Прямое или косвенное влияние или воздействие на результаты анализа, обусловленные наличием в биологическом образце непредусмотренных анализом анализируемых веществ или иных влияющих на него веществ.

Эффект переноса (Carry over): Появление сигнала анализируемого вещества в холостом образце после проведения анализа образца с высокой концентрацией анализируемого вещества.

Якорные калибраторы (Anchor calibrators): Стандартные точки вне диапазона количественного определения, используемые с целью подбора нелинейной регрессии стандартной кривой в МСЛ.