ПРИЛОЖЕНИЕ

к Решению Совета
Евразийской экономической комиссии
от 20 г. №

И З М Е Н Е Н И Я
вносимые в Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза

В приложении № 13 к указанным Правилам:

а) пункт 86 дополнить предложением следующего содержания: «В качестве альтернативной методики при соответствующем обосновании возможно проведение исследования проникновения в кожу *in vitro* с использованием искусственной мембраны – аналога кожи человека в соответствии с типовым протоколом, предусмотренным приложением № 5 к настоящим Требованиям.»;

б) абзац второй подпункта «а» пункта 135 после слова Требованиям дополнить словами «(в качестве альтернативной методики при соответствующем обосновании возможно проведение исследования проникновения в кожу *in vitro* с использованием искусственной мембраны – аналога кожи человека в соответствии с типовым протоколом, предусмотренным приложением № 5 к настоящим Требованиям)»;

в) абзац второй пункта 155 после слова Требованиям дополнить словами «(в качестве альтернативной методики при соответствующем обосновании возможно проведение исследования проникновения в кожу

in vitro с использованием искусственной мембраны – аналога кожи человека в соответствии с типовым протоколом, предусмотренным приложением № 5 к настоящим Требованиям)»;

г) приложение № 2 изложить в следующей редакции:

«Приложение № 2

к Требованиям к качеству
и биоэквивалентности лекарственных
препаратов для местного применения
при нанесении на кожу и иных
способах локального применения

**МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРОНИКНОВЕНИЯ В КОЖУ IN VITRO (IVPT)**

I. Область применения исследований IVPT

Установление характеристического профиля проникновения лекарственного препарата с использованием дискриминативного испытания на проникновение *in vitro* (IVPT) применяется при контроле вносимых изменений в лекарственный препарат во время его жизненного цикла. Данное исследование с изучением кинетики проникновения действующего вещества в кожу допускается также проводить для обоснования эквивалентности исследуемого лекарственного препарата.

При проведении исследований эквивалентности сравниваются исследуемый и референтный лекарственные препараты вместе с негативным контролем (например, лекарственной формой лекарственного препарата с составом, соответствующим 50 %-й

дозировке исследуемого лекарственного препарата, и такими же фармацевтико-технологическими характеристиками).

IVPT проводится для оценки скорости и степени, с которой действующее вещество лекарственного препарата для местного применения становится доступным в месте действия или рядом с ним в коже, и может быть использовано для описания и сравнения скорости и степени биодоступности действующего вещества из исследуемого лекарственного препарата для местного применения и референтного препарата. Профили высвобождения в IVPT имеют значительное сходство с фармакокинетическими профилями и, соответственно, конечные точки в IVPT могут быть проанализированы в соответствии с принципами, которые используются при анализе фармакокинетических конечных точек – максимальной плазменной концентрации (C_{max}) и площади под кривой «плазменная концентрация – время» (AUC). При этом следует учитывать, что IVPT характеризуют скорость и степень абсорбции, а не распределение, метаболизм и выведение, происходящие *in vivo*. В связи с этим термин «кожная фармакокинетика», используемый в настоящем приложении, не должен пониматься как включающий все аспекты фармакокинетики, а только те, которые связаны с компонентом абсорбции, напрямую контролирующим скорость и степень, с которой местно применяемое действующее вещество становится доступным в месте действия.

Настоящее приложение содержит общие указания разработке методики исследования, ее валидации и проведению IVPT, которые представляются в сокращенном досье лекарственного препарата для местного применения и предназначены для подтверждения эквивалентности.

II. Разработка метода IVPT (дизайн исследования)

В целях минимизации риска выполнения смещенной оценки эквивалентности в протокол исследования включаются методы ослепления и рандомизации или иные обоснованные заявителем меры минимизации риска выполнения смещенной оценки, в соответствии с общими принципами проведения клинических исследований, в соответствии с актами органов Союза в сфере обращения лекарственных средств.

Разработка методики IVPT, подходящей для подтверждения эквивалентности для конкретного лекарственного препарата для местного применения, обычно включает определенную последовательность исследований и разработки. Нарушение последовательности или принципов разработки методики IVPT, соответствующей ее целевому назначению, увеличивает вероятность того, что последующие валидация, пилотные и основные исследования IVPT окажутся в конечном итоге недостаточными для подтверждения эквивалентности. Соответственно, систематические и адекватные исследования по разработке методики IVPT помогают определить параметры дизайна исследования IVPT и протокола (методики), которые адекватно описывают профили высвобождения, что позволяет в полной мере сравнить кожную фармакокинетику исследуемого лекарственного препарата для местного применения и референтного препарата. В сокращенном досье лекарственного препарата для местного применения должен быть представлен подробный, надлежащим образом структурированный отчет о разработке методики IVPT, содержащий информацию о том, как была оптимизирована методика IVPT и подтверждающий, что выбранные параметры методики IVPT являются

адекватными или необходимыми, особенно в случае, когда выбранные параметры методики отличаются от параметров, указанных в настоящем приложении. Уполномоченные органы (экспертные организации) государств – членов Евразийского экономического союза при рассмотрении отчета о разработке методики должны получить полное понимание того, почему были выбраны конкретные параметры методики IVPT и является ли полученная методика IVPT достаточно чувствительной и воспроизводимой. Этот отчет о разработке методики должен четко (однозначно) определить параметры методики, использованные для каждого набора данных, представить информацию о мерах, предпринятых для оптимизации методики IVPT, и подтвердить, что выбранные параметры методики IVPT являются наиболее подходящими.

В настоящем приложении описаны минимально необходимые методы, и, если заявитель решает использовать методы, отличные от указанных, отчет о разработке методики IVPT должен показать, почему с научной точки зрения обосновано использование альтернативного подхода, отличного от приведенного в настоящем приложении для оптимизации методики IVPT.

Ниже представлены примеры минимально необходимых методов, что поможет заявителям определить ситуации, когда информация должна быть представлена в сокращенном досье при обосновании альтернативных методов.

1. Параметры методики IVPT

Все соответствующие параметры в итоговой версии методики IVPT должны быть обобщены (например, в виде таблицы) и представлены в сокращенном досье лекарственного препарата для местного применения.

Также должна быть представлена краткая информация, поясняющая выбор итоговых параметров методики IVPT, таких как:

оборудование (например, вертикальная диффузионная ячейка (ВДЯ));

источник кожи (например, трупный материал);

тип кожи (например, задняя часть туловища);

подготовка кожи (например, получение слоя кожи при помощи дерматома);

тест на целостность кожного барьера (например, измерение трансэпидермальной потери воды (TEWL));

критерии приемлемости теста на целостность кожного барьера (например, < 15 грамм на квадратный метр в час (г/м^2/ч));

доза лекарственного препарата для местного применения (например, 15 миллиграмм на квадратный сантиметр (мг/см^2));

продолжительность дозирования (например, 6 часов);

продолжительность исследования (например, 24 часа, 48 часов и т. д.),

временные точки отбора проб из принимающей среды (например, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 и 24 часа и т. д.).

2. Выбор и обоснование параметров методики IVPT

Выбор параметров методики IVPT, таких как оборудование, источник кожи, тип кожи, подготовка кожи и процедуры тестирования целостности кожного барьера, должен быть основан на опыте исследователя или доступности оборудования (например, наличие определенных аппаратов или приборов в лаборатории), доступности поставки биоматериалов или других объективных факторов.

Если выбранные доступные параметры методики IVPT не являются приемлемыми для исследования методом IVPT конкретного лекарственного препарата, заявителю необходимо выполнить систематизированную оценку альтернативных параметров методики и в конечном итоге подтвердить, что окончательно выбранные параметры методики IVPT подходят для заданной цели. Процедуры валидации методики IVPT описаны в разделе 3 настоящего приложения.

Выбор прочих параметров методики IVPT, таких как доза лекарственного препарата для местного применения, продолжительность дозирования, продолжительность исследования (которая как правило превышает продолжительность дозирования), график отбора проб, процедуры отбора проб, состав принимающей среды и метод анализа проб могут отличаться для каждой методики IVPT, и такие параметры методик IVPT должны быть систематически разработаны, оптимизированы или подтверждены в отношении их приемлемости для соответствующего лекарственного препарата для местного применения (если применимо). Исследования по разработке методики IVPT должны также описывать, каким образом различия в параметрах методики влияют на полученный в результате профиль высвобождения IVPT, чтобы оптимальные условия исследования могли быть объективно выбраны из числа оцененных.

Выбор дозы, используемой в последующем исследовании, должен оцениваться для каждой методики IVPT на основе исследований, проведенных в ходе разработки методики IVPT. Различные дозы могут сравниваться параллельно на повторяющихся участках кожи от одного и того же набора доноров с целью оптимизации дозы для последующего исследования IVPT.

При выборе оптимальной дозы принимают во внимание следующие факторы:

постоянство нанесения дозы (при необходимости, с использованием различных методов дозирования и (или) нанесения);

воспроизводимость профилей высвобождения;

влияние дозы и продолжительности дозирования на форму профиля высвобождения;

примерный диапазон концентраций препарата в пробах принимающей среды в различные моменты времени (относительно пределов количественного определения аналитической методики для анализа проб).

Выбранный график отбора проб и продолжительность исследования должны быть достаточными для того, чтобы описать кожную фармакокинетику препарата, которая в идеале должна включать достаточно полный профиль для того, чтобы выявить максимальное (пиковое) высвобождение и его последующее снижение в нескольких последующих временных точках. Остаточный объем препарата, который остается на коже в течение всего исследования, может продолжать выделять действующее вещество в течение продолжительного периода, что приведет к сохранению профиля высвобождения даже в поздних временных точках. В таких случаях следует разработать методику IVPT, которая включает в себя удаление (например, вытирание) нанесенной на кожу дозы препарата через определенное время и продолжение мониторинга принимающей среды в течение достаточно длительного периода, в течение которого можно наблюдать и описать снижение профиля высвобождения. Частота отбора проб должна быть выбрана таким образом, чтобы обеспечить достаточное точное описание профиля высвобождения, в том числе с получением отличных от нуля данных как

минимум в восьми временных точках отбора проб на протяжении исследования (например, 48 часов).

3. Процедуры и контроль параметров методики IVPT

На этапе разработки методики должны быть определены соответствующие технические процедуры и контроль параметров. Эти процедуры включают в себя в том числе подготовку и устойчивое закрепление кожи в диффузионной ячейке, определение настроек прибора, которые регулируют температуру поверхности кожи в заданном диапазоне, выполнение теста на целостность барьера, контроль точности и правильности дозы, наносимой на каждый участок кожи.

В качестве примера может быть приведена разработка процедуры дозирования, в которой используется пипетка с положительным смещением для дозирования объема контролируемого количества лекарственного препарата для местного применения, направленная на нанесение на кожу определенной массы (например, 15 мг/см²) лекарственного препарата для местного применения. Если внутренний диаметр отверстия в дозирующем отсеке диффузионной ячейки составляет 15 мм, а эффективная площадь дозирования составляет приблизительно 1,77 см², это соответствует целевой дозе лекарственного препарата для местного применения, составляющей приблизительно 26,5 мг на диффузионную ячейку. Эксперименты в процессе разработки методики могут установить, что в зависимости от плотности исследуемого лекарственного препарата, конкретная настройка объема на определенной модели пипетки с положительным смещением с определенным наконечником пипетки позволяет согласованно дозировать приблизительно 27,5 мг лекарственного препарата для местного применения (что, например, подтверждается многократным

повторным нанесением препарата пипеткой на лодочку для взвешивания на аналитических весах).

Такая настройка пипетки может быть оптимальной для процедуры дозирования, при которой измерительное средство для нанесения дозы на поверхность (такой как плоское дно стеклянного флакона для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) или закругленный конец стеклянного стержня или капиллярной трубки) затем используется для равномерного распределения дозы по участку кожи, закрепленному в диффузионной ячейке), и где многократное взвешивание измерительного средства для дозирования до и после распределения дозы указывает на то, что остаток лекарственного препарата для местного применения, оставшегося на дне стеклянного флакона после распределения дозы, составляет приблизительно 1,0 мг лекарственного препарата для местного применения (что указывает на то, что приблизительно 26,5 мг лекарственного препарата для местного применения будет с хорошей воспроизводимостью наноситься на каждый участок кожи). Такие характеристики технических процедур и контроль параметров методики IVPT, как, например, воспроизводимость процедуры дозирования, должны быть установлены в процессе разработки методики и могут не требовать подтверждения каждый раз при использовании той же процедуры.

4. Оценка целостности кожного барьера в IVPT: распространенные методы

Технические процедуры для теста на целостность кожного барьера следует устанавливать в процессе разработки методики IVPT.

В отношении кожного барьера существует три типа тестов на целостность барьера, однако на данный момент нет стандартных

протоколов или критериев приемлемости для любого из этих трех типов тестов на целостность барьера кожи человека. В этой связи далее приводятся оптимальные на данном этапе параметры для этих трех распространенных методов оценки целостности барьера.

Тест на целостность кожного барьера при трансэпидермальной потере воды (TEWL)

Тест на целостность кожного барьера при трансэпидермальной потере воды (TEWL) включает измерение у внешней поверхности кожи скорости, с которой вода (в виде пара) проходит через кожный барьер с нижней стороны кожного участка. Для проведения теста участок кожи закрепляется в диффузионной ячейке (например, зажимается между донорским и принимающим компартментом), при этом нижняя сторона участка кожи должна находиться в контакте с принимающей средой в принимающем компартменте (например, фосфатно-буферный солевой раствор, pH 7,4) и уравновешивается до температуры поверхности кожи 32 °C ± 1 °C. Если кожные участки достаточно велики, чтобы покрыть фланец диффузионной ячейки, в которой они закреплены, после их уравновешивания в течение нескольких часов при температуре поверхности кожи 32°C ± 1°C можно аккуратно удалить донорский компартмент, не нарушая прилегание кожного участка к нижнему фланцу диффузионной ячейки, что позволит разместить зонд TEWL непосредственно на поверхности кожи вместо размещения на донорском компартменте. Обычно выполняются как минимум три повторных измерения на каждом кожном участке, которые записываются после стабилизации измерений.

Серийно производимые устройства для измерения TEWL могут различаться по конструкции и принципам работы. Измерения TEWL,

выполненные устройствами с определенными конструкциями (например, открытая камера против закрытой камеры), могут быть относительно более восприимчивы к влиянию условий окружающей среды. Поэтому температура и влажность окружающей среды обычно контролируются настолько точно, насколько это возможно (например, наиболее подходящим является диапазон температур 21 °C ± 2 °C и диапазон влажности 50 % ± 20 % относительной влажности, если это выполнимо). Более точный контроль относительной влажности (например, строго в диапазоне от 40 % до 50 %) может снизить вариабельность измерений TEWL для устройств определенной конструкции. Определенные конструкции зондов для измерений и адаптеры для использования *in vitro* доступны от производителей устройств TEWL и могут быть более подходящими для использования, поскольку их совместимость с устройствами TEWL очевидна.

Несоответствие диаметров камеры зонда для измерений, отверстия зонда для измерений, *in vitro* адаптеров и измеряемой площади кожи, а также изменение в расстоянии от сенсоров зонда до поверхности кожи (что может быть связано с высотой (в том числе переменной) донорских компартментов) (если применимо), могут увеличить вариабельность измерений TEWL. Непостоянный контроль над выравниванием устройства для измерения TEWL по отношению к донорскому компартменту и/или кожному участку также может увеличить вариабельность измерений TEWL. Кроме того, измерения TEWL, выполненные устройствами с определенными конструкциями, могут быть относительно более восприимчивы к влиянию передачи тепла от руки, держащей зонд. Заявители должны следовать соответствующим инструкциям в руководстве пользователя производителя для конкретного устройства для измерения TEWL.

Для теста на целостность кожного барьера в тесте TEWL, как правило, критерием приемлемости (пороговым значением) является величина не более 15 грамм воды на квадратный метр в час (≤ 15 г/м²/ч) на коже туловища или бедра человека. Участки кожи, не прошедшие тест на целостность (то есть с TEWL > 15 г/м²/ч), не должны подвергаться дозированию, но могут служить в качестве контрольных кожных участков без дозирования. Может быть использовано и более высокое пороговое значение (например, ≤ 20 г/м²/ч), если это обосновано экспериментальными данными, демонстрирующими, что выбранный критерий приемлемости позволяет адекватно различать кожные участки с нарушенной целостностью барьера от участков с сохраненной целостностью барьера.

Измерения TEWL для кожных участков с сохраненной целостностью барьера могут отличаться в зависимости от устройства для измерения TEWL, способа его использования и условий окружающей среды (например, более высокая влажность или большее расстояние от поверхности кожи могут снизить значение измерения TEWL). Точный контроль факторов окружающей среды и устройства (условий) эксплуатации может минимизировать вариабельность измерений TEWL. В связи с этим, технические процедуры измерения TEWL следует оптимизировать в процессе разработки методики IVPT (или на основе предыдущей оптимизации в лаборатории, выполняющей тест). Кроме того, устройство для измерения TEWL следует надлежащим образом калибровать (производителем, а для некоторых устройств, также перед каждым набором тестов). Заявители вправе предоставить информацию о соответствующих процедурах калибровки, указанных производителем для конкретного устройства TEWL. Это допускается указывать в сокращенном досье лекарственного препарата для местного применения

вместе с отчетом о разработке методики IVPT, чтобы подтвердить целесообразность технических процедур, установленных лабораторией для измерений TEWL. При использовании теста на целостность барьера TEWL на любом этапе исследования (разработка методики IVPT, пилотное исследование, валидация и (или) подтверждающее исследование), должны контролироваться и регистрироваться температура и влажность окружающей среды лаборатории в период всего проведения теста на целостность барьера TEWL.

Тест на целостность кожного барьера с помощью тритиевой воды

Еще одним примером рекомендуемого подхода к тесту на целостность кожного барьера является исследование с помощью тритиевой воды. В этом исследовании участок кожи помещается в диффузионную ячейку (например, закрепляется в промежутке между донорским и принимающим компартментами) и уравновешивается до температуры поверхности кожи 32 °C ± 1 °C, при этом роговой слой будет открыт воздуху в донорском компартменте, а нижняя сторона кожи будет соприкасаться с принимающей средой (например, фосфатный буфер, pH 7,4).

Небольшое количество тритиевой воды (достаточное для покрытия всей поверхности участка кожи) наносится кратковременно на роговой слой кожи. Эта доза тритиевой воды оставляется на поверхности на контролируемое и относительно короткое время (например, 5 минут), после чего она удаляется с поверхности кожи (например, с помощью пипетки для удаления основной массы, а затем с помощью впитывающие лабораторной салфетки с низким ворсом). Затем отбираются проба принимающей среды через точно установленное время после удаления

тритиевой воды с поверхности кожи (например, через 30 минут после удаления 5-минутной дозы тритиевой воды с поверхности кожи).

Хотя можно использовать для анализа весь объем среды из принимающего компартмента, обычно используется только аликвота принимающей среды (например, фосфатного буфера с pH 7,4), которая переносится в соответствующий объем сцинтилляционной жидкости для подсчета. Объем аликвоты обычно зависит от типа используемой сцинтилляционной жидкости и максимального объема водного раствора, который можно смешивать со сцинтилляционной жидкостью. Сцинтилляционный счетчик используется для количественного определения радиоактивности в выбранной аликвоте, что позволяет вычислить количество тритиевой воды, проникшей в больший (общий) объем принимающей среды; вычисление выполняется с использованием удельной активности тритиевой воды для эквивалентного объема проникшего вещества на квадратный сантиметр поверхности кожи.

Критерием приемлемости (пороговым значением) обычно является примерно 1,5 эквивалентных микролитров (мкл-экв) тритиевой воды на см² (то есть около 1,5 мкл-экв/см² или примерно 1,5 мг-экв/см²) для теста на целостность кожного барьера с использованием тритиевой воды, включающего 5-минутную дозу, за которой следует 30-минутный период отбора проб (то есть, отбор проб через 30 минут после удаления дозы) на коже туловища или бедра человека. Участки кожи с результатом теста более 1,5 мг-экв/см² не пройдут тест и будут исключены из группы участков кожи, на которые наносится лекарственный препарат для местного применения. Участки кожи, не прошедшие тест на целостность барьера, не должны подвергаться дозированию, но могут служить в качестве контрольных кожных участков без дозирования. Следует обосновать и другие критерии приемлемости, если они подтверждены

экспериментальными данными, демонстрирующими, что выбранный критерий приемлемости адекватно различает участки кожи с нарушенной целостностью барьера от участков с сохраненной целостностью барьера.

При расчете результатов для теста на целостность барьера с использованием тритиевой воды, необходимо учитывать площадь поверхности, подвергшейся дозированию. Например, если используется критерий приемлемости 1,5 мг-экв/см² с диффузионной ячейкой, имеющей диаметр отверстия 15 мм и площадь поверхности кожи 1,77 см², масса тритиевой воды, с учетом донорского и принимающего компартмента, составит примерно 2,7 мг-экв/см².

Электрические тесты на целостность кожного барьера

Существует несколько вариантов электрических тестов на целостность кожного барьера, результаты которых выражаются через измерение сопротивления, проводимости или связанные с ними электрические параметры, характеризующие токопроводимость через кожу. Тесты на электрическое сопротивление кожи называются тестами транскутанного электрического сопротивления эпидермиса (TEER). Результаты тестов могут быть представлены в единицах проводимости, которая является величиной, обратной сопротивлению. Электрические тесты на целостность кожного барьера часто предусматривают использование приборов, предназначенных для измерения индуктивности (L), емкости (C) и сопротивления (R) электронных цепей или электрических компонентов; эти приборы обычно называют LCR-метрами. LCR-метры имеют различные настройки (параметры тестирования), которые можно регулировать.

Пример оптимального подхода к тесту на целостность кожного барьера с использованием TEER заключается в установке кожи в диффузионную ячейку (например, закрепление в промежутке между донорским и принимающим компартментами) и уравновешивании до температуры поверхности кожи 32 °C ± 1 °C, при этом роговой слой будет открыт воздуху в донорском компартменте, а нижняя сторона кожи соприкасается с ионным раствором (например, фосфатный буфер с pH 7,4).

Небольшое количество ионного раствора (достаточное для покрытия всей поверхности участка кожи) наносится кратковременно на роговой слой кожи. Затем один провод или электрод от LCR-метра помещается в контакт со средой в принимающем компартменте, в то время как другой провод (электрод) помещается в контакт с раствором в донорском компартменте. После измерения сопротивления кожи (например, в кОм, нормализованное по площади, учитывая, что сопротивление обратно пропорционально площади) раствор в донорском компартменте удаляется, и поверхность кожи аккуратно промокается сухой абсорбирующей лабораторной салфеткой с низким ворсом. Кожа (все еще закрепленная в диффузионной ячейке) затем оставляется уравновешиваться с сухим воздухом на достаточный срок, чтобы нормализовать состояние гидратации рогового слоя перед нанесением исследуемого лекарственного препарата для местного применения или референтного препарата.

Результаты для теста на целостность кожного барьера с использованием TEER могут значительно варьироваться в зависимости от настроек LCR-метра (например, частоты) и технических процедур, используемых для теста. Критерий приемлемости для конкретного метода электрического теста на целостность кожного барьера следует

обосновать экспериментальными данными, демонстрирующими, что выбранный критерий приемлемости адекватно различает участки кожи с нарушенной целостностью барьера от участков с сохраненной целостностью барьера.

5. Тестирование целостности кожного барьера при IVPT. Общие положения

Порядок разработки или применения ранее разработанных технических процедур для любого метода тестирования целостности кожного барьера во время разработки методики IVPT должен учитывать три основных аспекта:

1. Технические процедуры не должны необратимо изменять кожный барьер. Допускается временное изменение влажности рогового слоя путем краткосрочного нанесения водного раствора на поверхность кожи, при условии, что будет предоставлено достаточно времени для нормализации влажности рогового слоя перед нанесением лекарственного препарата для местного применения. Процедура, описанная выше, с кратковременным (например, 5-минутным) воздействием тритиевой воды на поверхность кожи с последующим 30-минутным периодом для восстановления состояния увлажнения рогового слоя, является в этих условиях приемлемой. Напротив, 30-минутное воздействие водного раствора на поверхность кожи для электрического теста, с последующим нанесением препарата для местного применения в течение 5 минут, может быть неприемлемым без дальнейшей оценки влияния состояния увлажнения рогового слоя на чувствительность кожи к различиям в биодоступности. Аналогично, если переносная лампа устанавливается слишком близко к коже для

улучшения видимости во время выполнения процедур, тепло от лампы может изменить локальную (микро)среду кожи, чего следует избегать.

2. Критерий приемлемости должен представлять собой пороговое значение для результата теста, при котором участок кожи не проходит тест. Участки кожи, не прошедшие тест на целостность барьера, не должны подвергаться дозированию, но могут служить в качестве контрольных участков без дозирования. Участки кожи, прошедшие тест на целостность барьера, могут считаться имеющими полноценный барьер и подвергаться дозированию. Критерий приемлемости должен быть выбран на основе понимания распределения результатов теста (среди множества повторных экспериментов, выполненных для множества доноров) для конкретной процедуры тестирования целостности барьера с учетом типа и подготовки кожи в условиях, соответствующих основным исследованиям IVPT, представленным в сокращенном досье лекарственного препарата для местного применения. Цель теста на целостность барьера – выявить (и исключить) участки кожи, барьерная функция (целостность) которых нарушена. При этом отсутствует цель уменьшения природной изменчивости барьерной функции (проницаемости) человеческой кожи, которая воспроизводит реальное разнообразие в человеческой популяции. Также относительная проницаемость кожи для лекарственного препарата для местного применения может не обязательно коррелировать с проницаемостью кожи для воды, и, следовательно, искусственное ограничение изменчивости проницаемости кожи для воды (с использованием излишне строгого критерия приемлемости, который исключает значительное количество участков кожи) не обязательно приведет к уменьшению изменчивости в результатах исследований IVPT.

3. Критерий приемлемости должен позволять различать участки кожи с нарушенной целостностью барьера и участки с сохраненной целостностью барьера. Это можно продемонстрировать, измеряя целостность барьера участков кожи, закрепленных и уравновешенных по параметрам среды в диффузионной ячейке, до и после намеренного повреждения кожного барьера (например, многократным использованием клейкой ленты для удаления все большего количества рогового слоя, прокалыванием кожи несколько раз иглой диаметра 30 G, или использованием других физических или химических воздействий, повреждающих кожный барьер). Выбранный критерий приемлемости должен демонстрировать, что участки кожи, которые прошли тест до повреждения, не проходят его после повреждения.

6. Различия между разработкой и валидацией методики IVPT

Оптимизация методики IVPT до начала ее валидации

На этапе разработки методики IVPT допускается рассматривать различные схемы исследований и параметры методики. Например, если выбранные параметры исследования изначально предполагают длительность дозирования 48 часов и длительность исследования 48 часов, и профиль высвобождения измерим, но невозможно идентифицировать максимальное (пиковое) высвобождения и последующее уменьшение высвобождения на нескольких последующих временных точках, тогда может быть целесообразным рассмотреть другие параметры исследования в рамках разработки методики IVPT. Например, допускается оценивать другую целевую дозу лекарственного препарата для местного применения и (или) использовать более длительный период отбора проб. Альтернативная схема исследования

может включать более короткую длительность дозирования (например, 4 – 6 часов), после которой нанесенная доза удаляется с кожи, и принимающая среда продолжает отбираться на протяжении периода времени, достаточного для идентификации максимального (пикового) высвобождения и последующего уменьшения высвобождения в нескольких последующих временных точках. При этом, хотя более сокращенный объем нанесения дозы может помочь улучшить форму профилей высвобождения IVPT, удаление дозы лекарственного препарата для местного применения с поверхности кожи может быть достаточно сложной задачей и часто требует собственной разработки и оптимизации методики. Кроме того, дизайн таких исследований чувствительности для методики IVPT может требовать более глубокого понимания методологии IVPT исследований. Необходимо понимать, что даже несмотря на достаточные усилия, направленные на разработку методики IVPT, которая будет давать четко определенное максимальное (пиковое) высвобождение и последующее его уменьшение в нескольких последующих временных точках, для некоторых лекарственных препаратов для местного применения достижение таких условий будет невозможно, даже при длительности исследований до 96 часов (или, по крайней мере, неосуществимо для всех доноров). В таком случае отчет о разработке методики IVPT должен подробно описывать все проанализированные схемы и подходы к разработке, предпринятые для оптимизации методики IVPT.

Использование надежной аналитической методики для валидации методики IVPT

Исследования по разработке методики IVPT, являются поисковыми исследованиями и часто проводятся с использованием аналитической

методики, которая не валидирована (например, методом ВЭЖХ или ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), часто с использованием масс-спектрометрии (МС)). Также исследования по разработке методики IVPT часто проводятся таким образом, что они не совместимы с системой управления качеством (которая бы в противном случае по определению сделала бы их подходящими для поддержки валидных заключений). В связи с этим подобные разработки методик не подходят для демонстрации валидности методики IVPT или связанных с ней результатов. Следовательно, несмотря на кажущуюся избыточность, отдельные эксперименты, проведенные во время разработки методики, потребуется повторить во время валидации метода IVPT, используя подходящие контролируемые условия, такие как валидированная аналитическая методика и процедуры, совместимые с подходящей системой управления качеством.

Необходимо четко разделять и последовательно идентифицировать те эксперименты и результаты, которые были частью разработки методики IVPT отдельно от тех, которые были частью валидации методики IVPT. Необходимо также последовательно установить все соответствующие параметры методики и условия (контрольные показатели) каждой серии результатов IVPT. Информация в отчете о разработке методики должна четко демонстрировать, когда результаты для сходных серий экспериментов могли быть получены с использованием разных параметров методики. В отчете о разработке методики необходимо указать, какие наборы диффузионных ячеек оценивались параллельно или раздельно (например, в разные дни). Кроме того, должны быть указаны параметры аналитической методики, использованной для анализа проб из каждой серии экспериментов IVPT,

а также информация о том, была ли аналитическая методика валидирована (либо на момент анализа проб, либо впоследствии).

III. Валидация методики исследования IVPT

В регистрационное досье необходимо включать отчет о валидации методики исследования IVPT и оценке ее пригодности для сравнения лекарственных препаратов.

Пригодность условий исследований необходимо подтвердить с использованием серий лекарственного препарата с разными показателями качества (негативный контроль) (например, лекарственная форма препарата с составом, соответствующим 50 %-й дозировке исследуемого лекарственного препарата с такими же фармацевтико-технологическими характеристиками), в отношении которого показаны статистическое отличие от исследуемых препаратов и неэквивалентность сравнения с ними.

Допускается использовать иные серии препарата с внесенными в них показательными изменениями по сравнению с исследуемым лекарственным препаратом. Подобные показательные изменения могут относиться к количественному составу лекарственного препарата, фармацевтико-технологическим параметрам его лекарственной формы, критичных показателей качества и (или) использования незначительно модифицированных параметров производственного процесса. При выборе показателей качества для внесения изменений следует использовать имеющиеся данные о характеристиках действующего вещества, состав лекарственного препарата и фармацевтико-технологические параметры лекарственной формы лекарственного препарата. Необходимо избегать полного исключения одного или более специфичных вспомогательных веществ (например, усилителя

проникновения, консервантов) из измененной по составу и фармацевтико-технологическим параметрам лекарственной формы препарата.

Ниже представлена информация по валидации методики исследования IVPT, предназначенная в первую очередь для использования с участками кожи человека *ex vivo*.

После того, как все соответствующие параметры методики IVPT будут определены, необходимо провести пилотное исследование, используя итоговую валидированную методику IVPT и валидированную аналитической методику для анализа образцов. Цель пилотного исследования – подтвердить пригодность выбранных параметров методики IVPT, продемонстрировав, что используемые условия методики IVPT подходят для сравнения кожной фармакокинетики исследуемого и референтного лекарственных препаратов для местного применения. Результаты пилотного исследования, таким образом, подтверждают систематическую валидацию методики IVPT, которая представляет собой отдельный этап исследования после разработки методики IVPT.

Результаты такого пилотного исследования IVPT позволяют оценить, в том числе, необходимое количество доноров для соответствующего обеспечения мощности ключевого исследования IVPT. В дополнение к исследуемому и референтному лекарственным препаратам, в пилотном исследовании следует провести параллельную оценку с третьим лекарственным препаратом или лекарственной формой, которая заведомо отличается от референтного лекарственного препарата, чтобы подтвердить селективность методики IVPT в отношении выявления различий в биодоступности. Результаты пилотного исследования IVPT должны быть представлены на графике с границами

(линейками) погрешностей, при этом должны сравниваться профили проникновения для всех трех групп в пилотном исследовании. Следует подготовить отдельные графики для средних значений высвобождения и средних кумулятивных результатов проникновения. Эти данные следует использовать для подтверждения специфических параметров валидации метода IVPT (например, профиль и диапазон проникновения).

Следует проводить пилотное исследование IVPT с участием нескольких доноров кожи (например, 4 – 6 доноров) и использованием минимум четырех повторяющихся участков кожи от каждого донора на каждую группу лечения. По мере увеличения количества доноров, включенных в пилотное исследование, точность оценки необходимого количества доноров для адекватного обеспечения мощности ключевого исследования IVPT, как правило, улучшается. И хотя кожные лоскуты от тех же доноров, которые были оценены в пилотном исследовании, могут быть также использованы в ключевом исследовании IVPT, результаты пилотного исследования не должны объединяться с результатами ключевого исследования IVPT для целей статистического анализа.

Оборудование, методики и условия исследования, используемые в пилотном исследовании IVPT (и в итоговом ключевом исследовании IVPT), должны быть соответствующим образом валидированы или квалифицированы. Если заявитель принимает решение использовать оборудование, методики или условия исследования, отличные от указанных в настоящем приложении, заявитель должен обосновать необходимость такого выбора и его допустимость с научной точки зрения. Для обеспечения точного контроля за дозированием, отбором проб и другими параметрами исследования IVPT, а также для минимизации потенциальных источников ошибок эксперимента, следует

использовать детальные протоколы и адекватно контролируемые процедуры исследования.

Валидация методики IVPT должна включать в себя специфические квалификации и контроли (описанные ниже), выполняемые с использованием валидированной аналитической методики для анализа образцов, если это применимо. Квалификация параметра методики IVPT относится к процессу определения характеристик, которые делают параметр пригодным для выполнения своей функции в методике IVPT. Например, когда повторные измерения температуры на поверхности кожи, установленной в диффузионной ячейке, демонстрируют, что оборудование IVPT может поддерживать температуру поверхности кожи в диапазоне 32 °C ± 1 °C, результаты могут подтвердить, что оборудование квалифицировано для выполнения своей функции в методике IVPT, где параметром методики является контроль температуры поверхности кожи в диапазоне 32 °C ± 1 °C на протяжении соответствующей длительности исследования.

1. Квалификация оборудования

Подходящее оборудование для IVPT включает различные модели вертикальных диффузионных ячеек (ВДЯ) и проточных диффузионных ячеек. Принципы работы и специфические процедуры испытаний для различных типов оборудования могут значительно различаться. Для установки, эксплуатационной и производственной квалификации следует использовать соответствующие процедуры производителя.

Лабораторная квалификация каждой диффузионной ячейки должна, по крайней мере, включать все следующее:

1) измерения диффузионной площади отверстий донорного и принимающего компартмента, между которыми установлена кожа или мембрана;

2) эмпирически измеренный объем компартмента для принимающей среды в каждой вертикальной диффузионной ячейке или эмпирически измеренную длину отводящей трубки для каждой проточной диффузионной ячейки;

3) стабильность температуры, измеренной на поверхности кожи или мембраны (например, 32°C ± 1°C) на протяжении соответствующего периода времени (например, 48 часов);

4) скорость перемешивания в вертикальных диффузионных ячейках или скорость высвобождения для проточных диффузионных ячеек, если это применимо.

Если информация о диффузионной площади отверстий и объеме компартмента для принимающей среды для каждой диффузионной ячейки доступна в документации производителя оборудования, эта информация должна быть представлена для каждой применяемой диффузионной ячейки, в дополнение к эмпирическим измерениям, выполненным лабораторией, проводящей исследования IVPT. Оборудование должно контролировать температуру диффузионной ячейки таким образом, чтобы подтвердить стабильность температуры поверхности кожи или мембраны (например, 32 °C ± 1 °C) для каждой диффузионной ячейки до дозирования (например, путем измерения калиброванным инфракрасным термометром), и периодически контролировалась в течение всего эксперимента путем повторного измерения температуры поверхности кожи или мембраны контрольной диффузионной ячейки без дозировки, которая должна работать параллельно с другими аналогичными диффузионными ячейками, в

которых проводится дозирование, и которая подключена к той же водяной бане или терморегулируемой системе.

2. Квалификация мембраны (кожи)

Для исследований IVPT следует использовать кожу человека *ex vivo* в качестве мембраны. Валидность каждого участка кожи, подвергшегося дозированию в исследовании, должна быть квалифицирована с использованием соответствующей тестовой процедуры для оценки барьерной целостности рогового слоя. Приемлемые тесты на целостность барьера могут основываться на проницаемости тритиевой воды, трансэпидермальной потере воды (TEWL) или электрическом импедансе (проводимости), измеряемых на поверхности кожи. Параметры и критерии приемлемости, используемые для теста на целостность барьера кожи, должны быть обоснованы для конкретной методики и оборудования, используемой в исследовании. Кожа всех доноров, которая включена в исследование, должна быть подготовлена одинаковым образом и дерматомирована до относительно постоянной толщины, в пределах, указанных в протоколе исследования. Толщина кожи должна быть измерена и установлена для каждого участка кожи, включенного в исследование. Распределение повторяющихся участков кожи от донора каждой группе лечения должно быть по возможности случайным. Допускается уравновешивание распределения толщины кожи в каждой группе (исследуемый лекарственный препарат или референтный лекарственный препарат) с помощью процедуры, подробно описанной в протоколе исследования.

3. Квалификация принимающей среды

Состав и pH принимающей среды, используемой для исследования IVPT, должны быть квалифицированы в отношении их совместимости с кожей, а также стабильности и растворимости лекарственного препарата в этой принимающей среде. Стабильность лекарственного препарата в образцах принимающей среды должна быть верифицирована в рамках валидации аналитической методики для образцов принимающей среды. Растворимость лекарственного препарата в принимающей среде для IVPT должна быть эмпирически определена в 3 повторностях, чтобы показать, что растворимость препарата в принимающей среде превышает максимальную концентрацию образца в ключевом исследовании IVPT (оптимальным является кратное исследование). Растворимость препарата в принимающей среде для IVPT должна быть достаточной для того, чтобы проанализировать большой объем препарата, попадающего в принимающий компартмент в условиях повышенного проникновения, что происходит в рамках оценки чувствительности IVPT во время валидации методики IVPT.

Для улучшения растворимости физиологических буферных (водных) принимающих сред для гидрофобных препаратов целесообразно включение 0,1 % полиоксиэтилен (20) олеилового эфира (синоним: Олет-20, Волпо-20, Бридж-20; CAS 9004-98-2). Если требуется повысить растворимость, целесообразно незначительно увеличить концентрацию полиоксиэтилен (20) олеилового эфира (например, от 0,1 % до 0,2 %, что как правило достаточно для большинства гидрофобных препаратов, до более высоких концентраций), но не более чем до 6 %. Другие стратегии для улучшения растворимости препарата в принимающей среде, которые могут потенциально изменить

проницаемость кожи (например, включение органических растворителей и спиртов в принимающую среду), не следует применять, поскольку они могут сделать метод IVPT невалидным.

При использовании кожи человека *ex vivo* следует включать антимикробный агент в принимающую среду (например, ~ 0,1 % азида натрия или ~ 0,01 % сульфата гентамицина) для уменьшения потенциального бактериального разложения дермы и (или) эпидермиса в диффузионной ячейке, независимо от продолжительности исследования. Допускается использование и других антимикробных агентов, в этом случае информация должна быть включена в регистрационное досье лекарственного препарата для обоснования их выбора (и концентрации, при которой они были использованы).

4. Квалификация отбора проб принимающей среды

Правильность и прецизионность отбора проб принимающей среды в каждый момент времени должны быть должным образом квалифицированы. Доказательства, подтверждающие квалификацию процедуры отбора проб, должны подтверждать, что техника отбора проб позволяет согласованно отбирать постоянный объем образца из хорошо перемешанного объема принимающего компартмента при каждом отборе проб, и что техника отбора проб не приводит к искусственным погрешностям. Необходимо включить информацию, описывающую спецификации производителя оборудования по правильности и прецизионности отбора проб принимающей среды (если применимо).

Для исследований IVPT с использованием проточной диффузионной ячейки может быть целесообразно квалифицировать длину трубок и соответствующие «мертвые» объемы, чтобы точно рассчитать время задержки перед элюцией образца через трубку и его

сбором. Для исследований IVPT с использованием вертикальных диффузионных ячеек удаление всего объема принимающей среды и полная замена принимающей среды в каждый момент времени может обеспечить оптимальные условия растворимости. Отбор небольших аликвот принимающей среды для исследования IVPT может привести к неадекватным измерениям с отрицательным потоком в определенных областях исследования IVPT и создать профили высвобождения, которые трудно интерпретировать.

5. Контроль окружающей среды

Температура и влажность окружающей среды в лаборатории во время исследования должны контролироваться и документироваться. По возможности следует поддерживать контролируемый температурный диапазон 21 °C ± 2 °C и диапазон относительной влажности 50 % ± 20 %.

6. Профиль проницаемости и диапазон

Профиль высвобождения и кумулятивный профиль проницаемости для пилотного исследования IVPT должны быть построены для диапазона времени отбора проб, соответствующего продолжительности ключевого исследования IVPT. Результаты пилотного исследования IVPT должны подтвердить, что выбранные параметры исследования подходят для адекватной характеристики профиля проницаемости (кожной фармакокинетики) препарата в рамках выбранной продолжительности исследования (диапазона времени отбора проб).

В пилотном исследовании IVPT достаточно полный профиль высвобождения должен позволять идентифицировать максимальное (пиковое) высвобождение и последующее снижение высвобождения в нескольких последующих временных точках. Результаты пилотного

исследования IVPT также должны подтвердить, что частота отбора проб обеспечивает подходящее разрешение для адекватной характеристики профиля проницаемости (особенно профиля высвобождения).

7. Прецизионность и воспроизводимость

Результаты оценки профиля высвобождения и кумулятивной проницаемости из пилотного исследования IVPT (и последующего ключевого исследования IVPT) должны быть рассчитаны, занесены в таблицу и представлены для каждой диффузионной ячейки в каждый момент времени, с суммарной статистикой для описания среднего значения у каждого донора, стандартного отклонения и коэффициента вариации в процентах (% CV) для повторных измерений, а также среднего значения между разными донорами, соответствующей стандартной ошибки и % CV. Полученные результаты для всех исходных значений данных, используемых в расчетах, должны быть представлены в ясной и организованной форме, чтобы облегчить воспроизведение расчетов результатов оценки высвобождения и кумулятивной проницаемости. Дизайн исследования должен быть описан достаточно подробно и однозначно, а индивидуальные значения должны быть четко связаны с конкретными донорами, повторными измерениями, группами лечения, временными точками и др.

8. Истощение дозы

Количество перешедшего препарата в принимающую среду должно быть определено в каждой диффузионной ячейке как кумулятивная общая проницаемость препарата в принимающей среде за время проведения IVPT. Это может быть выражено в процентах от номинального количества препарата в нанесенной дозе (которое может

быть оценено на основе номинальной концентрации препарата в топическом продукте и приблизительной массы топического продукта, нанесенного на кожу).

Например, если на мембрану было нанесено 10 мг лекарственного препарата для местного применения, содержащего 5 % препарата, количество препарата в нанесенной дозе может быть оценено как 0,5 мг (или 500 мкг). Если за 48 часов исследования IVPT в принимающую среду перешло в общей сложности 10 мкг препарата, можно будет оценить, что доза в 500 мкг была истощена примерно на 10 мкг, что составляет примерно 2 % истощения дозы. Таким образом, средний процент истощения дозы может быть оценен (без учета содержания в коже) и должен быть указан в отчете.

9. Установление чувствительности и селективности

Дискриминирующая способность методики IVPT подтверждается двумя параметрами: чувствительность и селективность. Исследования чувствительности IVPT обязательно проводятся во время разработки методики IVPT для установления таких параметров методики IVPT, как величина дозы, продолжительность дозы, продолжительность исследования и т. д. Однако анализ результатов этих исследований носит качественный характер, и их не нужно повторять на этапе валидации методики IVPT. Исследования чувствительности следует проводить ближе к концу этапа разработки методики IVPT, целью этих исследований является включение итоговых параметров методики IVPT для целевой дозы и продолжительности дозы, которые будут использоваться в основном исследовании таким образом, чтобы исследования чувствительности методики IVPT позволяли подтвердить валидность итоговой методики IVPT. Исследования чувствительности

IVPT представлены в настоящем разделе с точки зрения валидации методики IVPT (а не ее разработки). Такой подход позволяет исключить разобщение данных о чувствительности методики IVPT (исследование которой выполняется для установления пригодности итоговых параметров методики IVPT) и о селективности методики IVPT (исследование которой выполняется после установления итоговых параметров методики IVPT и основано на пилотном исследовании IVPT, как части валидации методики IVPT). За исключением альтернативных объемов доз или продолжительностей доз, используемых в исследовании чувствительности IVPT, необходимо чтобы параметры методики IVPT были согласованы во всех исследованиях чувствительности IVPT, пилотных и основных исследованиях (включая анатомическую область, указанную в протоколе исследования (например, задняя часть туловища), источник кожи и подготовку кожи).

Чувствительность методики IVPT

Чувствительность методики IVPT – это способность методики IVPT обнаруживать изменения в кожной фармакокинетике препарата в зависимости от различий в доставке в кожу препарата. Если методика IVPT последовательно демонстрирует более высокие и более низкие профили высвобождения (то есть более высокие и более низкие значения для конечных точек IVPT) в ответ на увеличенную и уменьшенную доставку препарата соответственно (или в ответ на другие условия, которые, как ожидается, увеличат или уменьшат доставку препарата соответственно), такая методика IVPT считается чувствительной. Существует несколько потенциальных подходов, с помощью которых можно выявить различия в доставке препарата, которые следует дифференцировать с помощью подходящей дискриминирующей

методики IVPT. Независимо от используемого подхода, различия в профилях проникновения IVPT не обязательно должны быть строго пропорциональны различиям в количестве дозы, продолжительности дозы или силе продукта. Например, трехкратные различия в количестве дозы (даже если они находятся за пределами рекомендуемого диапазона целевых доз) могут обеспечить различные кривые высвобождения, но могут не привести к трехкратным различиям в конечных точках IVPT, поскольку кожный барьер может ограничивать скорость как *in vitro*, так и *in vivo*.

Если целевая доза для решающего исследования IVPT составляет 10 мг/см², в три раза меньшая доза будет составлять ~ 3 мг/см², а в три раза большая доза – 30 мг/см². Таким образом, исследование чувствительности IVPT может сравнить профили высвобождения для доз 3, 10 и 30 мг/см² препарата для местного применения. Аналогично, если целевая доза для решающего исследования IVPT составляет 15 мг/см², в три раза меньшая доза будет составлять 5 мг/см², а в три раза большая доза – 45 мг/см²; таким образом, исследование чувствительности IVPT может сравнить профили высвобождения для доз 5, 15 и 45 мг/см² препарата для местного применения.

Следует проводить исследование чувствительности IVPT с использованием нескольких доноров кожи (например, 4 – 6 доноров кожи) и с минимальным количеством четырех повторных срезов кожи от каждого донора для каждой группы лечения.

Изменение количества дозы. Исследование разработки методики IVPT с разными количествами доз может доказать, что методика IVPT чувствительна к различиям в доставке препарата. Этот подход хорошо подходит для препаратов для местного применения, содержащих летучие

компоненты, которые испаряются из состава после нанесения на кожу. Изменение количества дозы для таких препаратов для местного применения эффективно изменяет толщину наносимой дозы. Большинство летучих компонентов из дозы, нанесенной более тонким слоем будут испаряться быстрее (по сравнению с дозой, нанесенной более толстым слоем), и более «тонкая» доза будет доставлять меньше препарата в кожу (и (или) в течение более короткого времени) по сравнению с более «толстой» дозой.

Изменение количества дозы может быть эффективной техникой для модификации различий в доставке препарата для формул с летучими компонентами, такими как гели, лосьоны и многие кремы. Однако изменение количества дозы может не обязательно вызывать заметные различия в доставке препарата для местного применения, таких как мази на основе вазелина, или других типов препаратов для местного применения, которые не испаряются на коже или могут не испытывать дозозависимых различий в метаморфозе, которые могут изменять скорость и степень доставки препарата.

Изменение длительности дозы. Для многих препаратов для местного применения более эффективным как правило является изменение длительности аппликации дозы, а не количество нанесенной дозы, чтобы вызвать различия в доставке препарата и связанные с этим изменения в кожной фармакокинетике препарата. Исследование разработки методики IVPT с контролируемым количеством дозы (например, 15 мг/см^2), наносимой на разное время (например, 2 часа, 6 часов и 12 часов), может быть подходящим для представления доказательств того, что методика IVPT чувствительна к различиям в доставке для многих препаратов для местного применения.

Вариант, описанный в этом примере, поддержит дизайн исследования IVPT, где доза препарата для местного применения 15 мг/см² наносится на 6 часов (целевое время для исследования IVPT), а затем удаляется. Нанесенную дозу допускается удалять с помощью серии ватных тампонов, один или несколько из которых могут быть сухими, а один или несколько могут быть увлажненными (например, мыльным раствором или водой). Изначально (сухой) тампон обычно удаляет основную часть дозы, а последующие тампоны используются для удаления остатков дозы (то есть остатка топического продукта, который в противном случае продолжал бы доставлять препарат в кожу) и (или) для ополаскивания кожи.

Чтобы подтвердить доказательство чувствительности исследования IVPT, профиль проницаемости, полученный при целевой длительности дозы для исследования IVPT (например, 6 часов), должен быть сравнен с более короткой длительностью дозы (например, 2 часа), которая, как ожидается, воспринимается как уменьшенная доставка препарата, и также должен быть сравнен с более длительной длительностью дозы (например, 12 часов), которая, как ожидается, воспринимается как увеличенная доставка препарата. Таким образом, три длительности дозы, сравниваемые в исследовании чувствительности IVPT, предназначены для того, чтобы вызвать заметные изменения в кожной фармакокинетике препарата в зависимости от различий в доставке препарата и, таким образом, подтвердить доказательство чувствительности метода IVPT.

Конкретные длительности доз выбираются на основе первичного исследования IVPT, проведенного в ходе разработки методики IVPT, которое описывает профиль проницаемости, когда доза остается на коже на более длительное время (например, 24 или 48 часов). Важной особенностью результатов такого исследования IVPT является

длительность начальной фазы профиля проницаемости, когда высвобождение увеличивается с относительно быстрой скоростью.

Например, если такое исследование показывает, что высвобождение увеличивается по крутому наклону до примерно 12 часов, а затем продолжает доставлять препарат с постепенно увеличивающейся скоростью, это может свидетельствовать о том, что профиль проницаемости для дозы длительностью более 12 часов (например, 24 часа) может незначительно отличаться от профиля для 12-часовой длительности дозы, особенно при сравнении относительно небольшого числа доноров и повторов (например, четыре донора с четырьмя повторами для каждой длительности дозы). Это также может свидетельствовать о том, что 12-часовая длительность дозы может быть хорошим выбором для самой длинной из трех длительностей доз в исследовании чувствительности IVPT.

Целевая длительность дозы должна быть выбрана на основе следующих соображений:

чувствительность аналитической методики определения образцов;

способность получить профиль проницаемости, который может быть заметно отличим от профиля, полученного при более длительной (12-часовой) длительности дозы, (или) отмеченное использование топического продукта (которое может указывать на необходимость повторного нанесения топического продукта каждые 4 – 6 часов).

Самая короткая из трех длительностей доз в исследовании чувствительности IVPT должна быть выбрана на основе чувствительности аналитической методики определения образцов и его способности производить профиль проницаемости, который может заметно отличаться от профиля, полученного при целевой (6-часовой) длительности дозы.

Изменение концентрации продукта. Для валидации чувствительности, специфичности и селективности методики *in vitro* теста высвобождения(IVRT) обычно готовят измененные составы с различной концентрацией. В то время как может показаться удобным использовать эти измененные составы для попытки демонстрации чувствительности и селективности методики IVPT, это не всегда может давать ожидаемые результаты. В некоторых случаях эта стратегия может приводить к заметным различиям в профилях проницаемости, однако, во многих случаях, полученные профили проницаемости могут не быть заметно отличимыми при сравнении относительно небольшого числа доноров и повторов (например, четыре донора с четырьмя повторами для каждого уровня концентрации лекарственного препарата для местного применения). В общем, изменение концентрации лекарственного препарата для местного применения для поддержки демонстрации чувствительности методики IVPT не рекомендуется, поскольку она может не всегда приводить к ожидаемому увеличению или уменьшению доставки действующего вещества. Однако в определенных ситуациях составы с большей и меньшей концентрацией (по сравнению с номинальной концентрацией RS) могут подходяще увеличивать и уменьшать доставку действующего вещества и кожную фармакокинетику по сравнению с номинальной концентрацией топического продукта.

Селективность методики IVPT

Селективность IVPT – это способность методики IVPT различать кожную фармакокинетику препарата между референтным лекарственным препаратом (RS) и исследуемым лекарственным препаратом для местного применения или составом, который

демонстрирует различия в доставке исследуемого лекарственного препарата по сравнению с референтным лекарственным препаратом. Пилотное исследование IVPT с параллельной оценкой референтного лекарственного препарата, исследуемого препарата для местного применения и третьего лекарственного препарата для местного применения или состава, который известен или разработан для того, чтобы быть отличным от референтного лекарственного препарата, может представить подтверждающие доказательства, что методика IVPT селективна к различиям в доставке препарата. Информация о партиях всех лекарственных препаратов для местного применения, использованных в разработке методики IVPT, валидации и пилотных исследованиях, если применимо, должна быть представлена в отчетах о исследовании. Информация о лекарственных препаратах для местного применения должна включать, но не ограничиваться, сведения о составе партии, дате производства, размере партии, измененных технологических процессах (если применимо) и, если доступно, данные о биоактивности и однородности состава. Оценку несоответствия допускается основывать на качественном или количественном сравнении профилей проницаемости и (или) конечных точек IVPT.

10. Робастность

Основу изучения робастности, составляет гипотеза о том, что тестовая система работает последовательно, когда все параметры системы (например, температура, скорость перемешивания) находятся в пределах номинальных настроек. Ценность изучения робастности заключается в том, что оно может подтвердить, продолжает ли система обеспечивать последовательные результаты при небольших изменениях конкретных переменных, таким образом определяя допустимые рабочие

диапазоны этих переменных. Однако вариабельность, присущая проницаемости человеческой кожи, как *in vitro*, так и *in vivo*, может не соответствовать основному предположению о последовательности тестовой системы.

Тем не менее, результаты исследований, проведенных в ходе разработки методики IVPT и подтверждающих робастность методики или системы IVPT, должны быть задокументированы, если они имеют отношение к делу. Например, методика IVPT может быть устойчива к значительным изменениям скорости перемешивания в рецепторном компартменте. Аналогично, профиль проницаемости препарата через кожу человека может оказаться устойчивым к определенным различиям в концентрации топического продукта. В конечном итоге, поскольку не всегда может быть возможно валидировать робастность параметров методики IVPT, процедуры исследования IVPT должны быть контролируемы с максимально возможной точностью.

IV. Валидация аналитической методики для определения образцов

Поскольку в ходе исследований, проводимых при разработке методики IVPT, могут использоваться невалидированные аналитические методики для определения образцов, необходимо чтобы все исследования, проводимые в рамках валидации методики IVPT, использовали валидированную аналитическую методику для определения образцов. При валидации методики IVPT следует использовать валидированную аналитическую методику для определения образцов (например, при использовании метода ВЭЖХ-МС или СВЭЖХ/МС). В этой связи подходы к выбору аналитической методики для изучения образцов при выполнении исследования методикой IVPT включены в настоящий раздел.

Протоколы исследований и отчеты, связанные с методикой IVPT, отличаются от тех, которые используются для аналитической методики для определения образцов, применяемой для количественного определения концентраций препарата в образцах принимающей среды IVPT. Валидация аналитической методики для определения образцов сама по себе не демонстрирует валидность методики IVPT. Отдельные соответствующие отчеты должны быть представлены для валидации аналитической методики для определения образцов (например, методом ВЭЖХ-МС или СВЭЖХ-МС) и для валидации методики IVPT.

Любые результаты исследований методики IVPT, проведенных в ходе разработки методики с использованием другой аналитической методики для определения образцов, чем та, которая в конечном итоге была валидирована, не могут подтвердить валидность методики IVPT. В отчете о валидации методики IVPT должна быть предоставлена информация со ссылками на отдельную валидацию аналитической методики для определения образцов, и при этом должно быть четко указано, что все соответствующие результаты в отчете о валидации методики IVPT были получены с использованием валидированной аналитической методики для определения образцов (в отличие от аналитической методики для определения образцов с параметрами, отличающихся от тех, которые были валидированы).

Процедуры анализа образцов в принимающей среде (например, обычно с использованием системы ВЭЖХ-МС или СВЭЖХ-МС) должны выполняться с использованием хроматографического программного обеспечения (например, системы управления данными хроматографии) с документальным следом (audit trail) и должны включать калибровочную кривую с большим количеством точек (6 – 8 концентраций) с соответствующими образцами для контроля качества. Такие процедуры

должны быть валидированы в соответствии с Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств, утвержденным Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113.

Валидация аналитической методики для определения образцов в принимающей среде должна включать соответствующие квалификации стабильности при разведении (если применимо), а также оценки стабильности при самой высокой температуре в принимающей среде в течение самого длительного периода; самая высокая температура может быть выше 32 °C, так как температура принимающей среды часто выше температуры на поверхности кожи, а самый длительный период может быть самым длинным интервалом между временными точками отбора проб для методик, в которых вся принимающая среда заменяется в каждой временной точке отбора проб, или он может быть дольше в сценариях, предусматривающим частичный отбор проб принимающей среды (например, 34 °C в течение 48 часов).

Если образцы подвергаются определенной, специфической пробоподготовке для анализа (например, концентрирование путем высушивания и перерастворение образцов из принимающей среды в меньшем объеме и увеличения чувствительности аналитической методики, или путем разведения образцов из принимающей среды в пределах валидированной градуировочной кривой аналитической методики для образцов), эти процедуры должны быть валидированы (например, путем квалификации стабильности при разведении во время валидации аналитической методики для определения образцов). Стабильность препарата в образце из принимающей среды должна быть валидирована в матрице принимающей среды, которая была подвергнута

воздействию нижней стороны кожи (мембраны) в диффузионной ячейке при условиях, соответствующих ключевому исследованию IVPT.

V. Ключевое исследование IVPT

Протокол ключевого исследования IVPT должен учитывать требования, относящиеся к исследованиям биоэквивалентности с учетом их применимости к данному типу исследований.

1. Производство и хранение лекарственного препарата

Производство исследуемого лекарственного препарата должно соответствовать требованиям Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза, утвержденных Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77, а их хранение и учет должны производиться в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утвержденными решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 (далее – Правила биоэквивалентности).

Отбор конкретных единиц (упаковок) исследуемого и референтного лекарственных препаратов должен осуществляться случайным образом из соответствующих серий, при этом, помимо отбора препарата для собственно исследования IVPT, должен также обеспечиваться отбор достаточного количества образцов лекарственного препарата для хранения, на случай необходимости проведения повторных или контрольных исследований, в том числе по запросу уполномоченных органов (экспертных организаций).

2. Контроль процедур исследования

Любые процедуры исследования, которые могут так и иначе повлиять на результаты, должны контролироваться надлежащим образом. Кроме того, любые особые ситуации, возникшие в ходе исследования, которые могут повлиять на интерпретацию результатов исследования, а также любые отклонения от протокола исследования или стандартных операционных процедур (СОП), должны быть надлежащим образом задокументированы.

Контроль процедур, связанных с участками кожи *ex vivo*, включает в себя последовательный контроль подготовки кожи (например, дерматомирование участков кожи) и толщины кожных участков, установленных на диффузионные ячейки, а также условий хранения кожи, включая продолжительность заморозки кожи и количество циклов замораживания-оттаивания, которым подвергалась кожа. Кожа от всех доноров должна быть взята из одной и той же анатомической области, для каждого донора должны быть указаны демографические данные (возраст, раса, пол и др.). Исследования чувствительности IVPT, пилотные и ключевые исследования должны проводиться с использованием кожи из одной и той же анатомической области. В противном случае, если на различных этапах используется кожа из разных анатомических областей, результаты исследований чувствительности и пилотных исследований IVPT могут не подтвердить надлежащим образом дискриминационную способность метода IVPT, используемого для ключевого исследования, поскольку параметры метода не будут согласованы между соответствующими исследованиями. Аналогично, если под участок кожи добавляется поддерживающая мембрана, не ограничивающая скорость

проникновения (например, фильтрующая мембрана, используемая в валидированной методике IVRT для такого же лекарственного препарата), то она должна согласованно использоваться для всех исследований чувствительности IVPT, пилотных и ключевых исследований.

Контроль процедур, связанных с дозированием, включает контроль площади нанесения дозы, количества дозы, техники дозирования, продолжительности дозирования, а также процедуры ослепления и рандомизации для дозирования. Исследуемый и референтный лекарственный препараты должны дозироваться идентичным и согласованным образом для всех диффузионных ячеек в исследовании. Различия в технике дозирования могут изменить трансформацию лекарственной формы на участке кожи, а несоответствия в технике дозирования на каждой диффузионной ячейке могут значительно повлиять на площадь дозирования и привести к ошибкам в расчете параметров высвобождения.

Контроль процедур, связанных с отбором проб, включает контроль точности времени отбора проб, техники отбора проб, продолжительности отбора проб и замены принимающей среды, объема или скорости высвобождения, а также обработки и хранения проб.

Контроль процедур, связанных с ключевым исследованием, должен включать недозированный контрольный участок кожи от каждого донора, который должен быть установлен в диффузионную ячейку, которая во всех отношениях должна обрабатываться идентично дозированным участкам кожи, включая отбор проб принимающей среды во всех временных точках для того, чтобы гарантировать, что концентрации препарата, отслеживаемая в принимающей среде, обусловлена дозой, нанесенной в ключевом исследовании IVPT, а не с

посторонней контаминацией кожи конкретного донора соответствующим препаратом, который мог проникнуть в принимающую среду в ходе исследования. Также следует проводить отбор «нулевого» образца до начала дозирования из каждой диффузионной ячейки, что позволит выявить потенциальную контаминацию, связанную с конкретным участком кожи и (или) конкретной диффузионной ячейкой.

Кроме того, предполагается, что исследователи проводят валидационные и ключевые исследования IVPT в рамках системы управления качеством, которая включает, но не ограничивается, следующими документированными процедурами:

подбор, обучение, квалификация и распределение обязанностей персонала, участвующего в исследовании;

менеджмент исследования и обязанности каждого из руководителей в исследовании;

контроль качества (QC) и обязанности персонала, вовлеченного в QC;

обеспечение качества (QA) и обязанности персонала, вовлеченного в QA;

использование стандартных операционных процедур (СОП);

использование протоколов исследования;

использование отчетов о исследовании;

техническое обслуживание и контроль среды и систем объекта исследования;

квалификация и калибровка инструментов и компьютеризированных систем;

практика ведения документации, включая, но не ограничиваясь, следующими аспектами: оперативное документирование процедур

исследования и фиксирование особых ситуаций или отклонений от процедур, указанных в протоколе исследования или соответствующих СОП;

ведение соответствующей документации, которая позволяет восстановить события и процедуры исследования, включая учет обращения с образцами и хранение записей (например, журналы отслеживания образцов), журнальные записи для процедур анализа образцов, контроль материалов и реагентов для исследования и контроль электронных данных;

архивирование документов исследования.

3. Процедура ослепления

Процедура ослепления должна быть детально описана в протоколе исследования и в итоговом отчете. Упаковка исследуемого и референтного лекарственного препарата (а также препарата негативного контроля при его наличии) должна быть внешне идентичной для того, чтобы обеспечить адекватное ослепление исследователя и участников исследования, вовлеченных в обращение с образцами лекарственного препарата.

4. Рандомизация

Метод рандомизации должен быть описан в протоколе исследования IVPT, а план (таблица) рандомизации должен быть представлен по запросу уполномоченного органа (экспертной организации). Предпочтительно, чтобы план (таблицу) рандомизации генерировала независимая третья сторона, которая также должна хранить этот документ с надлежащими предосторожностями на протяжении всего исследования, чтобы минимизировать предвзятость. Допускается чтобы

заявитель генерировал план (таблицу) рандомизации, если он не участвует в упаковке и маркировке исследуемого и референтного лекарственного препаратов, используемых в исследовании. Запечатанная копия плана (таблицы) рандомизации должна храниться в месте проведения исследования и быть доступной во время инспекций для того, чтобы можно было проверить принадлежность каждого участка кожи (мембраны) соответствующей группе.

5. Дозирование

В ключевом исследовании IVPT исследуемый и референтный лекарственные препараты должны наноситься в чередующемся порядке на последовательных диффузионных ячейках (участках кожи от каждого донора). Для каждого донора можно случайным образом определить одну из двух возможных последовательностей дозирования, представленных ниже:

а) ABABAB...;

б) BABABA...

6. Дизайн исследования

Ключевое исследование IVPT направлено на сравнение кожной фармакокинетики действующего вещества исследуемого и референтного лекарственного препаратов с использованием кожу человека *ex vivo* с сохраненным кожным барьером, установленную на квалифицированной системе диффузионных ячеек. В ключевом исследовании IVPT должен использоваться дизайн, который предусматривает прямое сравнение исследуемого и референтного лекарственного препарата с использованием участков кожи от одного и того же набора доноров, у каждого из которых используется одинаковое количество

повторяющихся участков кожи для каждой группы (нанесение дозы либо исследуемого, либо референтного лекарственного препарата), либо одинаковых искусственных мембран. В процессе всего ключевого исследования должны быть использованы одни и те же параметры методики IVPT.

Дизайн ключевого исследования IVPT, методология и конструктивные особенности диффузионных ячеек, связанные с точностью отбора проб, должны четко контролироваться. Например, может быть целесообразно поочередно наносить дозу на последовательные диффузионные ячейки и синхронизировать временные точки отбора проб с временем дозирования для этой диффузионной ячейки, чтобы обеспечить согласованные промежутки времени между дозированием и отбором проб всех диффузионных ячеек.

7. Критерии включения

В общем случае должны применяться следующие критерии включения: здоровая, неизмененная, с сохраненным барьером, кожа от доноров мужского и (или) женского пола в возрасте не менее 18 лет. Критерии включения, связанные с демографическими данными доноров (например, возраст, раса, пол и др.), должны быть указаны в протоколе исследования, а демографическая информация должна быть указана для каждого донора в итоговом отчете. Заявитель вправе добавить дополнительные критерии, если это обосновано.

Следует использовать единый источник и метод заготовки для всей используемой в исследовании кожи. Анатомическая область, указанная в протоколе исследования (например, задняя часть туловища), должна быть одинаковой для всех доноров, чья кожа включена в исследование.

В протоколе исследования необходимо указать критерии включения (приемлемости) для участков кожи на основе результата теста на целостность барьера, который должен быть представлен для каждого участка кожи.

В протоколе исследования необходимо предусмотреть критерии включения, связанные с температурой и продолжительностью хранения кожи, а также количеством циклов замораживания-оттаивания, все из которых должны быть представлены для кожи каждого донора.

В протоколе исследования также необходимо предусмотреть критерии включения, связанные с процедурами изъятия и обработки кожи и толщиной кожи (например, кожа, снятая дерматомом толщиной 500 мкм ± 250 мкм), используемой в исследовании IVPT.

8. Критерии невключения

В общем случае должны применяться следующие критерии невключения.

Кожа субъектов с известными (в анамнезе) дерматологическими заболеваниями не должна включаться в исследование. Кожа с татуировками, растяжками или любыми видимыми признаками аномалий не должна включаться в исследование. Кожа со значительной плотностью волосяного покрова не должна включаться в исследование. Заявитель вправе добавить дополнительные критерии.

Несмотря на то, что мягкое мытье или ополаскивание поверхности кожи допустимо, погружение кожи в водный раствор более чем на несколько минут может повредить кожный барьер и его следует избегать; такие участки кожи не должны включаться в исследование. Кроме того, кожа, подвергшаяся бритью лезвием, абразивной полировке, удалению верхнего слоя с помощью ленты или очищению спиртами,

растворителями или другими сильными растворами, которые могут повредить кожный барьер, не должна включаться в исследование.

Кожа от доноров со значительным фоновым уровнем препарата или других соединений, которые могут мешать количественному определению препарата в образцах принимающей среды, не должна включаться в исследование.

Кожа от доноров с высокой частотой отрицательных результатов теста на целостность кожного барьера для разных участков кожи может быть исключена из исследования, и вместо нее может быть использована кожа от альтернативного донора.

9. Конечные точки в исследовании IVPT

Конечные точки ключевого исследования IVPT основаны на параметрах, которые характеризуют скорость и степень, с которой препарат проникает в кожу и через нее и становится доступным в принимающей среде. В частности, скорость проникновения препарата характеризуется потоком (J), а степень проникновения препарата характеризуется общим количеством действующего вещества, проникшим в кожу к концу исследования (A_{total}).

Поток (скорость проникновения препарата) должен быть нанесен на следующий график: J по оси Y в единицах массы/площади/времени (например, нанограммы (нг)/см²/час) по отношению ко времени на оси X. Профили высвобождения обычно напоминают фармакокинетические профили плазменной концентрации, однако важно отметить, что поток — это скорость, а не концентрация. Степень проникновения препарата также должна быть нанесена на следующий график: общее количество действующего вещества, проникшее в кожу (A_{total}) по оси Y в единицах массы/площади (например, нг/см²) по отношению ко времени на оси X.

Поток должен быть рассчитан на основе всех следующих параметров:

концентрации в принимающей среде (например, 2,0 нг/мл) в каждой временной точке;

точного, эмпирически измеренного объема данной диффузионной ячейки (например, 6,0 мл), который может отличаться между отдельными ячейками;

площади нанесения дозы (например, 1 см²);

продолжительности времени, в течение которого принимающий компартмент принимал препарат.

Например, если образец с указанными выше параметрами был отобран через 2 часа после дозирования, тогда J будет рассчитан на основе приведенных выше значений как:

$$J = \frac{2{,}0\ {}^{нг}/_{мл} \times 6{,}0\ мл}{1\ см^2 \times 2\ ч} = 6\ {}^{нг}/_{см^2 \times ч}$$

Этот поток должен быть рассчитан и представлен для каждой диффузионной ячейки для каждого интервала отбора проб и нанесен на график на весь период проведения исследования, чтобы сформировать профиль высвобождения для каждой диффузионной ячейки. Рассчитанная выше скорость может быть нанесена на график в 2-часовой временной точке или в середине между 0 и 2 часами (то есть через 1 час).

Кроме того, для каждой диффузионной ячейки должно быть рассчитано и представлено общее количество действующего вещества, проникшее в кожу к концу эксперимента (A_{total}). Эта кумулятивная масса препарата, которая проникла (в общей сложности за все время исследования), должна быть представлена как фактическая конечная

точка A_{total}, а не как расчетная величина с использованием правила трапеции для расчета площади под кривой высвобождения.

Необходимо сравнить максимальный поток (J_{max}) на пике профиля высвобождения препарата и A_{total} для исследуемого и референтного лекарственного препарата для местного применения. В некоторой степени это аналогично сравнению C_{max} и AUC для препаратов системного действия, поскольку пара конечных точек в каждом случае позволяет сравнить скорость и степень, с которой препарат из каждого типа препаратов (действующих местно или системно) становится доступным в месте действия.

Для каждой конечной точки IVPT должен быть рассчитан доверительный интервал (ДИ) для разницы значений на основе:

а) натурального логарифма максимального высвобождения (J_{max});

б) натурального логарифма общего количества действующего вещества, проникшего в кожу к концу эксперимента (A_{total}).

Полученные в логарифмической шкале доверительные интервалы должны быть затем путем обратного преобразования представлены в исходной шкале в виде доверительного интервала для отношений средних геометрических значений.

Заявитель несет ответственность за корректное определение количества доноров, необходимых для адекватного обеспечения мощности ключевого исследования IVPT, однако следует выполнить минимум четыре повторности дозирования на донора для каждой группы (исследуемый лекарственный препарат или референтный лекарственный препарат).

По завершении исследования, если количество повторностей для участков кожи одинаково для всех доноров в группах исследуемого лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата в

исследовании IVPT, следует провести статистический анализ для сбалансированного дизайна. Если участки кожи или диффузионные ячейки были исключены из окончательного статистического анализа из-за отклонений или особых ситуаций в ходе исследования, и полученный набор данных несбалансирован, следует провести статистический анализ для несбалансированного дизайна. Аналогичный подход применяется в случае использования искусственных мембран с учетом того, что в данном случае неприменимо понятие внутрииндивидуальных различий.

Параметры конечных точек в IVPT соответствуют критериям эквивалентности при условии, что 90 %-ные доверительные интервалы параметров эквивалентности (J_{max}) и (A_{total}), рассчитанных вышеуказанным методом как отношение показателей исследуемого лекарственного препарата к соответствующим средним показателями референтного лекарственного препарата находятся в интервале от 80,00 до 125,00 %, если заявителем не обоснованы иные границы эквивалентности.

Расширение границ эквивалентности для 90 %-го доверительного интервала (максимально до интервала 69,84 – 143,19 %) допускается в случае высокой внутрииндивидуальной вариабельности, наблюдаемой для лекарственных препаратов с низкой дозировкой и ограниченной диффузией, если это клинически обосновано.

Оценка расширенных критериев приемлемости выполняется в соответствии с подразделом 11 раздела III Правил биоэквивалентности.

Исследование признается успешным исключительно при соблюдении следующих условий:

а) для критериев эквивалентности параметров IVPT (J_{max}) и (A_{total}):

90 %-й доверительный интервал для отношения средних исследуемого лекарственного препарата к негативному контролю должен быть полностью вне интервала 80,00 – 125,00 %;

90 %-й доверительный интервал для отношения средних референтного препарата к негативному контролю должен быть полностью вне интервала 80,00 – 125,00 %;

б) для приведенных в отчете дополнительных параметров проникновения (время до максимальной скорости абсорбции (t_{max}) и время задержки высвобождения) выполняются следующие условия:

время задержки высвобождения (если таковое имеется) для исследуемого препарата и референтного препарата должно быть одинаковым (то есть отличия должны составлять не более +/- 10 %);

любые различия в параметрах проникновения должны быть оценены с точки зрения их влияния на эквивалентность;

в) установлен материальный баланс. Необходимо представить расчет:

накопленного количества действующего вещества, проникшего в принимающую среду (A_{total});

общего количества действующего вещества, удерживаемого (S_{total}) в образцах кожи;

количества действующего вещества, оставшегося на оборудовании, применяемом для очистки или оборудовании, используемом в эксперименте (R_{total}).

В случае если общее накопление действующего вещества, проникшего в принимающую среду, составляет 90 – 110 %, не требуется никакого дополнительного обоснования материального баланса. В случае наличия значительной вариабельности показателей причины ее возникновения необходимо детально проанализировать и пояснить.

Допускается (если применимо) отдельно анализировать количество действующего вещества, удерживаемого в разных слоях кожи (роговом слое и эпидермисе), чтобы оценить распределение действующего вещества в коже человека.

VI. Подача информации о исследованиях IVPT в составе сокращенного регистрационного досье

Для исследований IVPT лекарственных препаратов, подаваемых в составе регистрационного досье с целью подтверждения биоэквивалентности, должны быть представлены детализированные протоколы исследований, соответствующие стандартные операционные процедуры (СОП) и подробные отчеты по валидации методики IVPT (включая пилотное исследование IVPT) и ключевому исследованию IVPT. Кроме того, должен быть представлен подробный отчет, описывающий разработку методики IVPT. Эти протоколы, СОП и отчеты должны быть представлены в подразделе 5.3.1.2 модуля 5 регистрационного досье и должны описывать экспериментальные процедуры, контроль исследования, процедуры управления качеством и анализ данных.

Протоколы исследований, СОП и отчеты, связанные с методикой IVPT, отличаются от тех, которые используются для аналитической методики для количественного определения концентраций препарата в образцах в принимающей среде IVPT (например, при использовании метода ВЭЖХ-МС или СВЭЖХ-МС). Соответственно, должны быть поданы отдельные протоколы и СОП для валидации аналитической методики. Отчеты по разработке и валидации аналитической методики, отчеты по анализу образцов в пилотных и ключевых исследованиях IVPT, а также связанные СОП и протоколы, относящиеся к анализу

образцов для исследования IVPT, должны быть представлены в подразделе 5.3.1.4 модуля 5 регистрационного досье.»;

д) дополнить приложением № 5 следующего содержания:

«Приложение № 5

к Требованиям к качеству
и биоэквивалентности лекарственных
препаратов для местного применения
при нанесении на кожу и иных
способах локального применения

**ТИПОВОЙ ПРОТОКОЛ
ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОНИКНОВЕНИЯ В КОЖУ
IN VITRO (IVPT) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННОЙ
МЕМБРАНЫ – АНАЛОГА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

I. Общие положения

Настоящий протокол применяется при оценке проникновения активных фармацевтических субстанций через искусственную мембрану – аналог кожи человека (далее – искусственная мембрана). Он применяется для исследований при разработке и оптимизации состава лекарственных препаратов для местного применения при нанесении на кожу и иных способах локального применения, а также для оценки эквивалентности исследуемого лекарственного препарата с референтным лекарственным препаратом.

Настоящий типовой протокол составлен на примере работы с вертикальной диффузионной ячейкой с применением искусственных мембран, но может быть применен к другим видам исследований

методом IVPT. Допускается использование альтернативных методик исследований с применением искусственных мембран на другом виде оборудования (например, PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay, параллельный анализ проницаемости через искусственную мембрану с использованием 96-луночного планшета, проточная диффузионная ячейка, горизонтальная камера Уссинга, система MIVO (multi in vitro organ device или мультиорганное устройство *in vitro* с имитацией пульсации кровеносного русла) и др.). При выборе альтернативной методики с применением иного оборудования кроме вертикальной диффузионной ячейки должны быть приведены соответствующие условия исследования на примере тех, которые описаны ниже, а в случае специфичности подхода – добавлены другие условия, которые не указаны в данном типовом протоколе.

II. Порядок проведения исследования

1. Подготовка системы и контроль температуры

1. Включение и настройка оборудования.

Включите циркуляционные водяные бани установки и выставите температуру на 32 °C. Температура должна контролироваться на протяжении всего исследования и составлять 32 ± 1 °C

2. Приготовление принимающей среды.

Подготовьте принимающую среду, профильтруйте и продегазируйте раствор под вакуумом не менее 30 минут для удаления не растворившихся включений и пузырьков воздуха.

3. Поддержание температуры в донорском и принимающем компартментах.

Температура поверхности мембраны в донорском компартменте должна поддерживаться на уровне 32 ± 1 °C для моделирования условий человеческой кожи.

2. Подготовка и сборка вертикальной диффузионной ячейки

1. Установка мембраны.

Поместите искусственную мембрану (например, 25 мм) между донорским и принимающим компартментами, при помощи зажима соедините и зафиксируйте ячейку. Убедитесь, что лицевая сторона мембраны (имитирующая кожу) обращена к донорскому компартменту.

2. Заполнение принимающего компартмента.

Заполните принимающий компартмент принимающей средой, допуская заполнение сверх нормы для вытекания среды через боковые трубки для удаления пузырьков воздуха. Наклоните платформу для обеспечения полного удаления пузырьков воздуха.

3. Закрепление шприцов.

Подсоедините к отверстиям для отбора проб шприцы объемом 5 мл, заполненные принимающей средой. Эти шприцы будут использоваться для отбора проб на протяжении всего эксперимента.

4. Температурный контроль.

Дождитесь, пока температура принимающей среды в принимающем компартменте достигнет 32 °C, что может занять около 30 минут. Регулярно проверяйте отсутствие пузырьков.

3. Подготовка лекарственного препарата

1. Подготовка исследуемого и референтного лекарственных препаратов.

Убедитесь, что доза наносимого лекарственного препарата находится в диапазоне 2 – 15 мг/см² поверхности мембраны.

2. Нанесение лекарственного препарата.

Нанесите, например, 500 мкл лекарственного препарата в донорский компартмент с помощью точного дозирующего устройства. Зафиксируйте время нанесения лекарственного препарата.

4. Подготовка принимающей среды

1. Приготовление буферного раствора.

В качестве рекомендуемой принимающей среды следует использовать фосфатный буферный раствор с pH 7,4, инертность которого доказана по отношению к искусственной мембране в рамках валидации аналитической методики. Стабильность и растворимость активной фармацевтической субстанции в принимающей среде также должна быть доказана в ходе валидации методики. Допускается добавление специальных модификаторов для улучшения растворимости, если это научно обосновано. Выбор другой принимающей среды и введение иных модификаторов должно быть надлежащим образом обосновано заявителем.

5. Отбор проб и анализ

1. Проверка условий проведения эксперимента.

Перед каждым отбором пробы проверяйте отсутствие пузырьков воздуха в принимающем компартменте.

2. Отбор проб.

В заданные временные точки (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 26 часов) снимите шприц объемом 5 мл и замените его на шприц объемом

3 мл. Отберите 1,0 ± 0,1 мл пробы из принимающего компартмента и отбросьте отобранную аликвоту.

3. Аналитический отбор.

Повторно закрепите шприц объемом 3 мл на отверстии для отбора проб и отберите 500 ± 100 мкл образца из каждого принимающего компартмента ячейки. Используйте один и тот же шприц на протяжении всего эксперимента для каждого принимающего компартмента ячейки. Перед новым отбором шприц должен быть промыт соответствующей принимающей средой.

4. Восполнение раствора.

После отбора пробы обратно закрепите шприц объемом 5 мл и восполните принимающую среду, следя за отсутствием пузырьков воздуха.

5. Фильтрование проб.

Отобранные пробы должны быть профильтрованы. Материал фильтра должен обеспечивать отсутствие адсорбции и быть инертным по отношению к активной фармацевтической субстанции.

6. Подготовка стандартов для количественного определения исследуемого вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

1. Приготовление исходного растворов.

Возьмите требуемую навеску стандартного образца (мг) и растворите в соответствующем растворителе для получения исходного раствора. Запишите точную навеску взятого стандартного образца и объем растворителя.

2. Приготовление рабочих калибровочных растворов.

Для приготовления рабочих калибровочных растворов из исходного раствора в качестве растворителя используется принимающая среда.

3. Стабильность растворов.

Стабильность калибровочных растворов должна быть доказана в ходе проведения валидации аналитической методики.

7. Контроль качества и рандомизация

1. Метод контроля контаминации.

Проводите параллельный эксперимент с холостой мембраной (без нанесения лекарственного препарата) для контроля потенциальной контаминации в процессе отбора проб.

2. Контроль качества и целостности искусственной мембраны.

Качество и целостность искусственной мембраны устанавливается производителем и отражается в сертификате или протоколе испытания при производстве искусственной мембраны.

3. Ослепление и рандомизация.

Убедитесь, что упаковки исследуемого препарата, референтного препарата и негативного контроля идентичны внешне. Описывайте методы и схемы рандомизации в протоколе исследования для поддержки ослепления.

8. Валидация аналитических методик количественного определения активной фармацевтической субстанции

1. Выбор метода и методики.

Для количественного определения активной фармацевтической субстанции должен быть выбран чувствительный метод анализа

(например, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС) с валидированной аналитической методикой.

2. Сведения о валидации методик должны соответствовать:

для биоаналитических методик – требованиям, изложенным в приложении № 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утвержденным Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85;

для аналитических методик – требованиям Руководства по валидации аналитическим методик проведения испытаний лекарственных средств, утвержденного Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113.

3. Подтверждение стабильности.

Стабильность активной фармацевтической субстанции в принимающей среде должна быть подтверждена на весь период исследования IVPT, включая пробоподготовку, до начала количественного анализа.».