

## ПРИЛОЖЕНИЕ № 11

к Правилам регулирования  
обращения ветеринарных  
лекарственных средств  
на таможенной территории  
Евразийского экономического союза

### **ТРЕБОВАНИЯ** **к проведению исследований биоэквивалентности** **воспроизведенных ветеринарных лекарственных препаратов**

#### 1. Общие положения

Изучение биоэквивалентности (фармакокинетической эквивалентности) ветеринарных лекарственных препаратов является основным видом оценки воспроизведенных ветеринарных лекарственных препаратов (дженериков), не отличающихся лекарственной формой и содержанием действующего(их) вещества(в) от соответствующих оригинальных (референтных) ветеринарных лекарственных препаратов. Исследования биоэквивалентности позволяют сделать обоснованные заключения о том, что исследуемый ветеринарный лекарственный препарат по фармако-токсикологическим свойствам и клинической эффективности не будет отличаться от ранее зарегистрированного оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата.

Требования к проведению исследований биоэквивалентности воспроизведенных ветеринарных лекарственных препаратов (далее – Требования) определяют требования к объему исследований для подтверждения биоэквивалентности и оформлению документации по результатам проведенных исследований.

Требования применяются при планировании и проведении исследований по биоэквивалентности ветеринарных лекарственных

препаратов, а также при составлении регистрационного досье ветеринарного лекарственного препарата и его экспертизе.

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

## 2. План исследований

Основной целью при составлении плана исследования биоэквивалентности является получение достоверных результатов, позволяющих с необходимой степенью достоверности сделать вывод, что воспроизведенный ветеринарный лекарственный препарат будет эквивалентен оригинальному (референтному) ветеринарному лекарственному препарату (препарат сравнения) по терапевтической эффективности и безопасности. Исследования следует проводить в научно-исследовательских центрах или лабораториях, имеющих соответствующую область аккредитации в соответствии с законодательством государства-члена. Исследования биоэквивалентности, проведенные вне территории Союза, должны быть проведены в условиях, не противоречащих настоящим Требованиям.

### 2.1. Объекты исследований.

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

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

Исследования биоэквивалентности не проводятся в отношении:  
иммунобиологических ветеринарных лекарственных препаратов;  
ветеринарных лекарственных препаратов на основе биомассы, протеинов или пептидов;

ветеринарных лекарственных препаратов, концентрация которых в сыворотке или плазме крови не определяет их эффективность в месте действия;

ветеринарных лекарственных препаратов для интрацистернального или внутриматочного введения.

При исследовании биоэквивалентности в качестве референтного препарата используется только оригинальный ветеринарный лекарственный препарат.

Действующее вещество в оригинальном (референтном) и в воспроизведенном ветеринарных лекарственных препаратах должно иметь одинаковую молекулярную форму (с учетом возможности образования комплексных ассоциатов действующего вещества с противоионами и другими веществами). Качественный и количественный состав вспомогательных веществ в воспроизведенном и оригинальном (референтном) ветеринарных лекарственных препаратах может отличаться при условии, что эти различия не оказывают влияния на биодоступность и токсичность действующего(их) вещества(в). Лекарственная форма воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата должна быть такой же, как и у оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата.

В протоколе исследования должна быть представлена следующая информация об оригинальном (референтном) ветеринарном

лекарственном препарате: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственная форма, номер серии, срок годности, название производителя.

Информация о воспроизведенном ветеринарном лекарственном препарате должна включать: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственную форму, качественный состав вспомогательных веществ, номер серии, объем серии, дату производства, срок годности, название производителя.

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

Перед началом исследования биоэквивалентности необходимо провести анализ образцов воспроизведенного и оригинального (референтного) ветеринарных лекарственных препаратов на соответствие требованиям качества по содержанию и подлинности действующего(их)

вещества(в). Предпочтительно при изучении биоэквивалентности использовать оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат, в котором содержание действующего вещества отличается от воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата не более, чем на  $\pm 5\%$ .

## 2.2. Выбор дозы ветеринарного лекарственного препарата.

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

Если оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат может применяться в разных дозах, предпочтительнее использовать максимальную рекомендованную для оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата дозу. Если представлено научное обоснование нецелесообразности использования максимальной рекомендованной дозы и доказано, что оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат обладает линейной фармакокинетикой в рекомендованном диапазоне доз, можно использовать любую дозу из этого диапазона. Если фармакокинетика оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата

не линейна в рекомендованном диапазоне доз (например, вследствие низкой растворимости) следует изучать биоэквивалентность в максимальной и в минимальной рекомендованной дозе.

В случае, если при введении терапевтической дозы действующее(ие) вещество(ва) в крови не достигает(ют) доступных для измерения современными методами значений, можно испытывать более высокие дозы, но не более трехкратной терапевтической дозы.

Увеличение дозы должно быть научно обосновано, в том числе должно быть доказано, что введение трехкратной дозы оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата имеет тот же профиль безопасности для данного вида животных и оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат в расширенном диапазоне доз обладает линейной фармакокинетикой.

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

Подготовку ветеринарных лекарственных препаратов к введению животным следует проводить таким образом, чтобы это не оказало влияния на результаты исследования. Если индивидуальная доза очень мала и ввести точное количество вещества технически трудно, воспроизведенный и оригинальный (референтный) ветеринарные лекарственные препараты можно предварительно растворить в небольшом количестве инертного растворителя (например, физиологического раствора или 2% раствора крахмала). Для ветеринарных лекарственных

препаратов в форме таблеток с риской допускается использование половинок таблеток в том случае, если нормативной документацией на ветеринарный лекарственный препарат предусмотрен контроль однородности дозирования половинок таблеток.

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

качественный состав лекарственных форм с разной дозировкой одинаков (за исключением красителей и ароматизаторов);

соотношение между содержанием действующего вещества и вспомогательных веществ в лекарственных формах с разной дозировкой одинаково;

технология производства ветеринарных лекарственных препаратов с разной дозировкой одинакова;

фармакокинетика действующего вещества линейна в терапевтическом диапазоне.

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

### 2.3. Кратность введения.

В протоколе исследования биоэквивалентности должно содержаться научное обоснование выбора кратности введения оригинального

(референтного) и воспроизведенного ветеринарных лекарственных препаратов.

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

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

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

имеет место насыщаемое выведение;  
чувствительность аналитического метода недостаточна для получения статистически достоверных результатов, характеризующих фармакокинетику вещества в крови после однократного введения ветеринарного лекарственного препарата.

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

#### 2.4. Путь введения.

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

одинаковый путь и место введения для испытуемого и оригинального (референтного) ветеринарных лекарственных препаратов;

если оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат выпускается в разных лекарственных формах, биоэквивалентность следует изучать для каждой лекарственной формы отдельно;

если для оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата предусмотрены разные пути введения, при планировании исследования следует либо привести научное обоснование

взаимозаменяемости разных путей введения (например, при подкожном и внутримышечном путях введения фармакокинетический профиль может быть сходным), либо проводить исследование при всех рекомендованных путях введения (например, при внутривенном и внутримышечном путях введения фармакокинетика будет различной, поэтому их нельзя считать взаимозаменяемыми).

## 2.5. Дизайн исследования.

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

### 2.5.1. Перекрестный дизайн.

Перекрестный дизайн предусматривает одновременное введение двум группам экспериментальных животных оригинального (референтного) и испытуемого ветеринарных лекарственных препаратов и затем, после определенного периода времени, группы экспериментальных животных меняют местами.

Схематично перекрестный дизайн выглядит следующим образом:

	группа I	группа II
период 1	испытуемый препарат	оригинальный (референтный) препарат
период 2	оригинальный (референтный) препарат	испытуемый препарат

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

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

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

### 2.5.2. Параллельный дизайн.

Параллельный дизайн предполагает одновременное введение двум группам экспериментальных животных испытуемого и оригинального (референтного) ветеринарных лекарственных препаратов.

Схематично параллельный дизайн выглядит следующим образом:

	группа I	группа II
период 1	испытуемый препарат	оригинальный (референтный) препарат

Параллельный дизайн целесообразно использовать в следующих случаях:

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

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

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

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

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

### 2.5.3. Повторный дизайн.

Повторный дизайн предполагает, что как минимум один период обработки повторяется.

Схематично повторный дизайн выглядит следующим образом:

	группа I	группа II
период 1	испытуемый препарат	оригинальный (референтный) препарат
период 2	оригинальный (референтный) препарат	испытуемый препарат
период 3	испытуемый препарат	оригинальный (референтный) препарат

Повторный дизайн используют в случае, если стандартный перекрестный дизайн не позволяет получить приемлемые результаты без включения в эксперимент очень большого числа экспериментальных животных, что экономически нецелесообразно. При повторном дизайне может быть три или четыре периода обработок.

### 2.5.4. Последовательный дизайн.

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

## 2.6. Биологическая модель.

Оценка биоэквивалентности ветеринарных лекарственных препаратов проводится только на целевых животных (животных, которым препарат рекомендован инструкцией по применению оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата).

Если воспроизведенный и оригинальный (референтный) ветеринарные лекарственные препараты рекомендуются для применения нескольким видам целевых животных, возможно проведение исследования биоэквивалентности только на одном из указанных видов животных, если они относятся к теплокровным животным.

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

### 2.6.1. Критерии включения животных в исследования.

При исследовании биоэквивалентности используют клинически здоровых животных.

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

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

#### 2.6.2. Помещения для животных.

Экспериментальные животные должны содержаться в одинаковых условиях в соответствии с зоогигиеническими нормативами для данного вида животных.

#### 2.6.3. Организация кормления животных.

Экспериментальные животные должны получать сбалансированный доброкачественный корм и свободный доступ к воде в соответствии с нормативами содержания для данного вида животных. В день эксперимента доступ к корму и воде может быть ограничен в соответствии с задачами исследования. Препараты для перорального введения обычно испытывают натощак, если иное не предусмотрено инструкцией по применению оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата. Обычно рекомендуется период голодной выдержки не менее 8 часов до введения препаратов.

#### 2.6.4. Карантирование.

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

проводились ранее на экспериментальных животных, этот период может быть увеличен).

#### 2.6.5. Исключение животных из опыта.

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

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

#### 2.6.6. Количество экспериментальных животных.

В исследования должны быть включены экспериментальные животные в количестве, достаточном для обеспечения статистической значимости исследования. Число животных в одной экспериментальной группе должно быть не менее 6, таким образом, для опыта с параллельным дизайном в эксперимент должно быть отобрано не менее 12 животных. Большое число экспериментальных животных может потребоваться для сравнения препаратов, обладающих значительной вариабельностью фармакокинетических параметров, а также при проведении исследований на животных, у которых не представляется возможным проводить многократный забор материала в необходимом количестве (птица, кошки). При планировании исследования следует учитывать вероятные потери (вследствие болезни, гибели, неправильного

дозирования и т.п.) отобранных в эксперимент животных, в связи с чем необходимо предусмотреть возможность замены выбывших животных.

### 3. Отбор биологических материалов

#### 3.1. Материал для исследования.

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

#### 3.2. Отбор проб.

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

#### 3.3. Объем проб.

Объем пробы биоматериала, необходимый для исследования, определяется исходя из потребностей аналитического метода и конкретного вида экспериментальных животных, на которых проводится

исследование. Половина отобранной пробы используется для анализа, другая половина хранится на случай арбитражного контроля в замороженном виде в течение периода времени, установленного протоколом исследования, но не менее 2-х месяцев с момента проведения анализа.

#### 4. Схема отбора проб

Схема отбора проб определяется формой кривой «концентрация действующего вещества – время». Выбор моментов времени отбора проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой: не менее 3-х точек для фазы первоначального возрастания концентрации и не менее 5 точек для фазы ее снижения (исключение составляют препараты для внутривенного введения). Для получения достоверного значения  $C_{max}$  отбор образцов крови в районе  $T_{max}$  должен быть достаточно частым. Продолжительность отбора проб определяется предполагаемым фармакокинетическим профилем действующего вещества. Для лекарственных препаратов с быстрым высвобождением общая продолжительность отбора проб определяется, исходя из следующих критериев:

продолжительность отбора проб должна быть не менее чем в 4 раза больше периода полувыведения;

величина площади под фармакокинетической кривой «концентрация – время» от нуля до момента отбора последней пробы ( $AUC_t$ ) для усредненного фармакокинетического профиля должна составлять не менее 80% от полной площади (от нуля до бесконечности,  $AUC_{\infty}$ ).

В случае лекарственных форм ветеринарных лекарственных препаратов пролонгированного действия продолжительность наблюдения

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

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

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

## 5. Определение аналита (маркера)

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

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

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

Установление биоэквивалентности, основанное на определении концентрации метаболита(ов), в каждом случае должно быть обосновано с учетом того, что цель исследования биоэквивалентности – сравнение характеристик *in vivo* воспроизведенного и оригинального (референтного) препаратов. В частности, если метаболиты играют значительную роль в общей активности действующего вещества, необходимо определять концентрации как исходного лекарственного вещества, так и активного метаболита и оценивать их отдельно.

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

#### 6. Аналитический метод

Для определения концентрации действующих веществ в плазме, сыворотке или цельной крови могут быть использованы различные методы (физико-химические, иммунологические, микробиологические и

др.), обеспечивающие возможность получения достоверных данных о концентрации действующего(-их) вещества(-в) с учетом чувствительности метода, отвечающего общим требованиям избирательности, точности, воспроизводимости. Метод должен позволять определять концентрации аналита, соответствующие терапевтическим уровням (нижняя градуировочная концентрация должна быть не более 5% от  $C_{\max}$ ) и быть линейным в ожидаемом диапазоне концентраций.

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

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

- линейность в необходимом диапазоне концентраций;
- эффекты биосубстрата;
- предел детектирования (LOD);
- предел количественного детектирования (LOQ);
- специфичность (селективность);
- точность;
- прецизионность;
- стабильность аналита в процессе анализа;
- степень экстракции аналита из биосубстрата.

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

## 7. Анализ фармакокинетических данных

Оценка биодоступности ветеринарного лекарственного препарата или его основного биологически активного метаболита (если исследуемые препараты представляют собой про-лекарства) основывается на сравнении значений фармакокинетических параметров, оцененных непосредственно по данным «концентрация (C) - время (t)» для воспроизведенного и оригинального (референтного) ветеринарных лекарственных препаратов.

### 7.1. Однократное введение ветеринарных лекарственных препаратов.

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

При достаточной длительности наблюдения, когда  $AUC_t > 80\% AUC_{\infty}$ , для оценки полноты всасывания исследуемого препарата следует

использовать значения  $AUC_t$ , а при условии, что  $AUC_t < 80\% AUC_{\infty}$  – значения  $AUC_{\infty}$ .

Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривает вычисление индивидуальных отношений  $AUC_t$  или  $AUC_{\infty}$  (соответственно  $f'$  и  $f$  – оценки относительной степени всасывания) и  $C_{max}$  ( $f''$ ) - для любых лекарственных форм, отношений  $C_{max}/AUC_t$  или  $C_{max}/AUC_{\infty}$  как характеристик скорости всасывания - для обычных форм, а для форм пролонгированного действия - продолжительность периода времени, в течение которого концентрация ветеринарного лекарственного препарата превышает 75% от  $C_{max}$  ( $T > 75\% C_{max}$ ).

7.2. Многократное введение ветеринарных лекарственных препаратов.

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

В условиях достижения равновесного состояния (ss), реализующихся при повторяющемся введении ветеринарных лекарственных препаратов в одинаковой дозе с одним и тем же интервалом дозирования ( $\tau$ ), индивидуальные фармакокинетические профили следует охарактеризовать значениями площади под кривой «концентрация – время» в пределах интервала дозирования после установления стационарного распределения препарата –  $AUC_{\tau,ss}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/AUC_{\tau,ss}$ ,

значениями минимальной концентрации ( $C_{\min}$  – концентрация в конце интервала дозирования),  $C_{\text{trough}}$  (концентрация вещества в равновесном состоянии непосредственно перед введением следующей дозы), а также разности между значениями  $C_{\max}$  и  $C_{\min}$ , отнесенной к средней стационарной концентрации ( $C_{\text{ss}} = AUC_{\tau, \text{ss}}/\tau$ ). Также вычисляют индивидуальные значения отношений  $AUC_{\tau, \text{ss}}$  и  $C_{\max}$  для исследуемого препарата и препарата сравнения (соответственно  $f'$  и  $f''$ ).

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

## 8. Статистическая оценка биоэквивалентности

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

Первостепенное значение для оценки биоэквивалентности имеет минимизация риска ложноположительного результата биоэквивалентности. Статистический анализ испытания биоэквивалентности должен подтвердить маловероятность клинически значимого различия между биодоступностью воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата и оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата сравнения.

Статистический метод для анализа биоэквивалентности основывается на определении 90-процентного доверительного интервала для отношений логарифмически преобразованных средних арифметических (воспроизведенный ветеринарный лекарственный

препарат / оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат) рассматриваемых фармакокинетических параметров, а также на выполнении двух односторонних тестов при 5% уровне значимости.

Статистический анализ проводят в предположении о логнормальном распределении параметров  $AUC$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC$  и нормальном распределении остальных параметров за исключением  $t_{max}$ . В предположении о логнормальном распределении, сравнение средних значений параметров для исследуемого воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата и оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата проводится на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строятся для отношений соответствующих средних значений.

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

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

различия между ветеринарными лекарственными препаратами;

индивидуальные различия между экспериментальными животными (межиндивидуальные различия);

последовательность введения ветеринарных лекарственных препаратов;

периоды исследования.

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

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

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

Процедура статистического сравнения состоит в вычислении параметрических двусторонних 90%-ных доверительных интервалов для отношений соответствующих средних значений для воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата и оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата. Ветеринарные лекарственные препараты считаются биоэквивалентными, если границы оцененного доверительного интервала для  $AUC_t$  или  $AUC_{\infty}$ , а также  $AUC_{t,ss}$  находятся

в пределах 80–125%. Для ветеринарных лекарственных препаратов с  $C_{\max}$  и  $C_{\max}/AUC_t$ ,  $C_{\max}/AUC_{\infty}$  или  $C_{\max}/AUC_{\tau,ss}$ , характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляют 75 – 133%.

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

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

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

## 9. План исследования биоэквивалентности

План исследования биоэквивалентности должен содержать следующую информацию:

наименование исследования;

наименование и адрес организации, проводящей исследование, и место проведения исследования;

фамилию, имя, отчество (при наличии) руководителя исследования, и лиц, участвующих в проведении исследований;

цель исследования;

задачу исследования;

срок начала и планируемый срок окончания исследования;

сведения об оригинальном (референтном) ветеринарном лекарственном препарате: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственная форма, номер серии, срок годности, название разработчика и производителя;

сведения о воспроизведенном ветеринарном лекарственном препарате: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственная форма, качественный состав вспомогательных веществ, номер серии, объем серии, дата производства, срок годности, название разработчика и производителя;

принципы использования экспериментальных животных, а также обоснование выбора используемых в исследовании видов экспериментальных животных, их возраста, пола, массы тела, критерии включения/исключения экспериментальных животных, порядка их замены;

методы исследования с обоснованием их выбора;

выбор анализа и обоснование этого выбора;

дизайн исследования и его обоснование;

количество экспериментальных животных в группе, способа(ов) и пути(ей) введения экспериментальным животным исследуемого лекарственного препарата, кратности применения и продолжительности фазы исследования на экспериментальных животных и аналитической фазы, периодичности оценки состояния экспериментальных животных и отбора проб, оцениваемые показатели в процессе исследования и методики их оценки, обоснование их выбора;

правовые нормы исследования;

описание биологического материала, отбираемого для проведения исследования, способов его отбора и хранения, их обоснование;

описание аналитического метода;

описание методов фармакокинетического анализа;

описание процедур статистического анализа и оценки биоэквивалентности с указанием использованных программных средств;

описание критериев биоэквивалентности;

порядок внесения изменений в план исследования;

порядок составления отчета по данному виду исследования;

библиографические данные и другая дополнительная информация (в случае наличия).

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

Вносимые изменения в документ, определяющий порядок проведения исследования биоэквивалентности, утверждаются руководителем исследования, а отклонения от документа, определяющего порядок проведения исследования (незапланированные события, непредвиденные обстоятельства, упущения), записываются,

пронумеровываются, подписываются, датируются в приложении с указанием причин и оценкой влияния на результаты исследования.

## 10. Финальный отчет

Отчет об исследовании биоэквивалентности должен содержать утвержденный план проведения исследований, отклонения от плана исследования (если они имели место) и всю документацию по проведению исследования.

В отчете по изучению биоэквивалентности должна быть представлена следующая информация:

наименование исследования;

дата и номер, позволяющие идентифицировать данный отчет;

название, адрес организации, проводившей исследование;

Ф.И.О., должность и ученая степень (при наличии) руководителя исследования и лиц, участвующих в проведении исследования;

даты начала и завершения исследования;

цель и задачи исследования;

резюме – краткое описание проведенного исследования и полученных результатов;

оглавление, включая перечень приложений, таблиц;

перечень сокращений и при необходимости терминов, используемых в отчете;

сведения об оригинальном (референтном) ветеринарном лекарственном препарате: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственная форма, номер серии, срок годности, название разработчика и производителя;

сведения о воспроизведенном ветеринарном лекарственном препарате: торговое наименование, международное непатентованное наименование (при наличии) или общепринятое (группировочное) наименование, содержание действующего вещества, лекарственная форма, качественный состав вспомогательных веществ, номер серии, объем серии, дата производства, срок годности, название разработчика и производителя;

вид, возраст, количество экспериментальных животных в каждой группе, пол, показатели массы тела, источник питания; при необходимости – причины исключения животных из опыта;

дизайн исследования, режим дозирования, кратность и путь введения оригинального (референтного) и воспроизведенного ветеринарных лекарственных препаратов;

описание хода исследования с указанием использованных материалов и методов;

описание использованного способа расчета фармакокинетических параметров;

обоснование исключения резко выделяющихся результатов (при необходимости);

результаты определения содержания действующего(их) вещества(в) в биологическом материале, полученные для каждого экспериментального животного, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;

статистические критерии, использованные для оценки биоэквивалентности, и результаты этой оценки. Для каждого из сравниваемых препаратов необходимо представить все значения индивидуальных концентраций и фармакокинетических параметров, наряду с данными описательной статистики, включая геометрическое

среднее, медиану, арифметическое среднее, стандартное отклонение, коэффициент вариации, максимальные и минимальные значения. Индивидуальные кривые «концентрация – время» следует представить на линейной или логарифмической шкалах. Необходимо описать метод получения фармакокинетических параметров из исходных данных и количество точек в терминальной логарифмической фазе, использованных для оценки константы скорости терминальной элиминации (которая используется для достоверной оценки  $AUC_{0-\infty}$ );

обсуждение результатов исследований и выводы.

В качестве приложения к отчету по изучению биоэквивалентности должен быть представлен аналитический отчет, который должен содержать:

обоснование выбора аналита и метода определения аналита в биосубстрате;

описание использованного оборудования, средств измерения и реактивов;

описание метода;

описание пробоподготовки;

метрологические характеристики метода;

фактические результаты, полученные в процессе валидации метода;

хроматограммы, подтверждающие представленные результаты валидации (стандартные образцы во всем испытанном диапазоне концентраций, контрольные образцы, стандартные образцы в биосубстрате);

опытные хроматограммы, включая контрольные образцы биоматериала, полученные до начала исследования – «нулевые пробы», подтверждающие представленные результаты исследования.

## 11. Список обозначений

$AUC$  – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время»;

$AUC_t$  – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в интервале времени от 0 до момента (t) отбора последней пробы биоматериала;

$AUC_{\infty}$  – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в интервале времени от 0 до бесконечности;

$AUC_{\tau,ss}$  – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в пределах интервала дозирования в стационарных условиях (ss) при многократном введении ветеринарного лекарственного препарата;

$C$  – концентрация действующего вещества;

$C_{max}$  – максимальная концентрация действующего вещества;

$C_{min}$  – минимальная концентрация действующего вещества;

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

$C_t$  – концентрация действующего вещества в момент t;

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

$CV$  – коэффициент вариации;

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

$f'$  – относительная степень всасывания ветеринарного лекарственного препарата, определяемая отношением  $AUC_{tT}/AUC_{tR}$  или  $AUC_{\tau,ss,T}/AUC_{\tau,ss,R}$ .

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

$k_{el}$  – константа элиминации ветеринарного лекарственного препарата;

$t$  – время от момента приема (введения) ветеринарного лекарственного препарата;

$t_{\max}$  – время достижения максимальной концентрации действующего вещества;

$R$  – оригинальный (референтный) ветеринарный лекарственный препарат;

$T$  – воспроизведенный ветеринарный лекарственный препарат;

$T_{1/2}$  – период полувыведения ветеринарного лекарственного препарата;

$T > C_{ss}$  – период времени, в течение которого концентрация ветеринарного лекарственного препарата превышает  $C_{ss}$ ;

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

$\mu_T$  – генеральное среднее показателя для воспроизведенного ветеринарного лекарственного препарата;

$\mu_R$  – генеральное среднее показателя для оригинального (референтного) ветеринарного лекарственного препарата;

$\sigma^2$  – средний квадрат «ошибки», или остаточная внутрииндивидуальная вариация;

$\tau$  – интервал дозирования.

---