ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства охорони здоров’я України
22 березня 2021 року № 522

НАСТАНОВА

ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

БІОАНАЛІТИЧНА ЧАСТИНА ДОСЛІДЖЕННЯ

СТ-Н МОЗУ 42-7.8:2021

Видання офіційне

Київ
Міністерство охорони здоров’я України
2021

ПЕРЕДМОВА

1. РОЗРОБЛЕНО: Державне підприємство «Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України».

   ПЕРЕКЛАД І НАУКОВО-ТЕХНІЧНЕ РЕДАГУВАННЯ: **М. Бабенко,** канд. фарм. наук, **М. Головенко**, д-р біол. наук, професор, академік НАМН України; **Н. Жукова**, канд. фарм. наук, **О. Нагорняк**

   РЕКОМЕНДОВАНО ДО ПРИЙНЯТТЯ: Міністерство охорони здоров'я України

2. ПРИЙНЯТО ТА НАДАНО ЧИННОСТІ: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 22 березня 2021 року № 522

3. Ця настанова відповідає документу:

   Настанова Комітету з лікарських засобів для медичного призначення (Committee for Medicinal Products for Human Use) EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation» (Настанова з валідації біоаналітичної методики)

   Ступінь відповідності – модифікований (MOD)

   Переклад з англійської (en)

4. ВВЕДЕНО ВПЕРШЕ

© Міністерство охорони здоров'я України, 2021
© Державний експертний центр МОЗ

Зміст

	Стор.
Передмова	II
Національний вступ	V
Сфера застосування	1
Нормативні посилання	2
Терміни та визначення понять	4
Познаки та скорочення	7
Загальні положення	9
1. Вступ	9
2. Сфера застосування	9
3. Законодавча база	10
4. Валідація методики	12
4.1. Повна валідація аналітичної методики	12
4.1.1. Селективність	13
4.1.2. Ефект переносу	14
4.1.3. Нижня межа кількісного визначення	15
4.1.4. Калібрувальна крива	15
4.1.5. Правильність	16
4.1.6. Прецизійність	17
4.1.7. Допустимість розведення	18
4.1.8. Ефект матриці	18
4.1.9. Стабільність	19
4.2. Часткова валідація	22
4.3. Перехресна валідація	22
5. Аналіз досліджуваних зразків	23
5.1. Аналітичний цикл	23
5.2. Критерії прийнятності аналітичного циклу	24
5.3. Калібрувальний діапазон	25
5.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків	26
5.5. Інтегрування	27
6. Обов’язковий повторний аналіз досліджуваних зразків	27
7. Методики аналізу, що базуються на зв’язуванні лігандів	28
7.1. Валідація методики	28
7.1.1. Повна валідація	29
7.1.1.1. Стандартні зразки	29
7.1.1.2. Специфічність	29
7.1.1.3. Селективність	29
7.1.1.4. Ефект переносу	30
7.1.1.5. Вибір матриці	30
7.1.1.6. Мінімально необхідне розведення	31

7.1.1.7. Калібрувальна крива 31
7.1.1.8. Прецизійність і правильність 31
7.1.1.9. Лінійність при розведенні 32
7.1.1.10. Паралелізм 32
7.1.1.11. Стабільність зразків 33
7.1.1.12. Реагенти 33
7.1.1.13. Комерційні набори 33
7.2. Часткова і перехресна валідація 33
7.3. Аналіз досліджуваних зразків 34
7.3.1. Аналітичний цикл 34
7.3.2. Критерії прийнятності для аналізу досліджуваних зразків 34
7.3.3. Обов’язковий повторний аналіз досліджуваних зразків 34
8. Звіти 35
8.1. Звіт з валідації 35
8.2. Аналітичний звіт 36
Доповнення 1 38
Національний додаток 39
Перелік редакційних змін та доповнень
Національний додаток 41
Бібліографія

НАЦІОНАЛЬНИЙ ВСТУП

Використання надійних біоаналітичних методик є важливою складовою при проведенні розробки лікарського засобу та оцінці його властивостей. Біоаналітичні методики, що використовуються для кількісного визначення діючої речовини та/або її активного метаболіту в біологічній рідині, відіграють значну роль в оцінці та інтерпретації досліджень біодоступності та біоеквівалентності, у фармакокінетичних та токсикокінетичних дослідженнях. Для отримання достовірних результатів, які можна задовільно інтерпретувати, важливо використовувати добре охарактеризовані та повністю валідовані біоаналітичні методики. Валідація будь-якої аналітичної методики допомагає отримати надійні результати. При валідації біоаналітичної методики додатково оцінюються такі етапи, як відбір, обробка, транспортування, зберігання та підготовка зразків, що мають важливе значення для розробки лікарських засобів, а також для представлення цих даних у складі реєстраційних матеріалів [1, 6, 9, 10, 13].

Порядком проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення, затвердженим наказом Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 (у редакції наказу Міністерства охорони здоров'я України від 23 липня 2015 року № 460), зареєстрованим у Міністерстві юстиції 07 жовтня 2015 року за № 1210/27655 передбачено надання у складі реєстраційних матеріалів на лікарський засіб даних випробувань, проведених для оцінки біодоступності та/або біоеквівалентності лікарських засобів, визначення фармакокінетичних характеристик [1].

В ЄС прийнято Настанову з вадідації біоаналітичної методики (CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation») Європейського агентства з лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA) Комітету з лікарських засобів для медичного призначення (Committee for Medicinal Products for Human (CHMP) [10], що містить положення загального методичного підходу до проведення валідації біоаналітичних методик та вимоги до оцінки результатів валідації, а також вимоги до проведення аналізу біологічних зразків, отриманих при проведенні досліджень на тваринах та людях, та, відповідно, критерії для оцінки прийнятності отриманих результатів.

З огляду на вищевикладене, є необхідність введення в Україні настанови, що містить гармонізовані з положеннями відповідної настанови ЄС та актуалізовані рекомендації до планування, проведення та оцінки біоаналітичної частини дослідження.

Ця настанова підготовлена відповідно до Настанови з вадідації біоаналітичної методики (CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation») Європейського агентства з лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA) Комітету з лікарських засобів для медичного призначення (Committee for Medicinal Products for Human (CHMP). Мета цієї настанови – надання інформації щодо проведення біоаналітичної частини фармакокінетичних і токсикокінетичних досліджень, в тому числі досліджень біодоступності та біоеквівалентності, при вивченні властивостей лікарських засобів, а також при доказі біоеквівалентності лікарських засобів.

Також, з огляду на останні світові тенденції до гармонізації вимог, зокрема до проведення досліджень біодоступності/біоеквівалентності, до настанови внесено додатково у вигляді Доповнення 1 інформацію розділу V.E Настанови з валідації біоаналітичної методики для промисловості («Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry») підготовленої Центром оцінки та досліджень лікарських засобів та Центром ветеринарної медицини при Управлінні продуктів харчування та лікарських засобів (Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) [13] щодо використання як біоаналітичних зразків висушених плям крові. Зазначена інформація внесена з метою кращого розуміння різних регуляторних підходів, що активно використовуються при проведенні біоаналітичних досліджень.

Описанні в настанові вимоги необхідно розглядати з урахуванням діючого законодавства України в сфері реєстрації і проведення доклінічних та клінічних досліджень лікарських засобів, доказу біоеквівалентності.

Організація, відповідальна за цю настанову, – Міністерство охорони здоров'я України (далі – МОЗ).

Настанова визначає ключові елементи, що необхідні при проведенні біоаналітичної частини досліджень.

Настанова містить положення, що відповідають чинному законодавству.

До цієї настанови було внесено окремі зміни, зумовлені правовими вимогами та прийнятими в Україні гармонізованими нормативними документами. Деякі редакційні зміни було внесено безпосередньо у пункти, яких вони стосуються; ці зміни позначено іншим шрифтом та літерою ^{N}. Зміни і доповнення наведені у національному додатку «Перелік редакційних змін та доповнень» цієї настанови.

Правовий статус цієї настанови відповідає правовому статусу відповідної настанови у ЄС, з яким гармонізовано розроблену настанову. Цю настанову слід розглядати як технічний документ для надання консультацій заявникам та власникам реєстраційних посвідчень, компетентним уповноваженим

органам та/або іншим зацікавленим особам щодо найкращого та найбільш прийнятного способу дотримання положень, встановлених фармацевтичним законодавством України. Положення цієї настанови відображують гармонізований у рамках ЄС підхід, що базується на останніх наукових досягненнях у цій галузі знань.

Такий підхід до правового статусу більшості наукових настанов викладено у документі «Процедура відносно настанов та супутніх документів Європейського Союзу в межах фармацевтичного законодавства» (Doc. Ref. EMEA/P/24143/2004 Rev.1 corr «Procedure for European Union guidelines and related documents within the pharmaceutical legislative framework») Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА) [11]. Вказаний підхід відповідає позиції Світової організації торгівлі щодо застосування стандартів.

Дотримання положень цієї настанови зацікавленими сторонами сприятиме плануванню і проведенню досліджень належним чином, полегшить проведення експертизи реєстраційних матеріалів, а також підвищить якість, ефективність та безпеку лікарських засобів в Україні.

НАСТАНОВА

ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ
Біоаналітична частина дослідження

MEDICINAL PRODUCTS
Bioanalytical method validation

Чинна з 22.03.2021

СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Ця настанова визначає ключові елементи, необхідні при проведенні біоаналітичної частини фармакокінетичних та токсикокінетичних досліджень, в тому числі досліджень біодоступності та біоеквівалентності. Такі випробування проводяться на тваринах на етапі доклінічних досліджень та на людях на етапі клінічних досліджень.

В настанові викладені підходи до валідації біоаналітичних методик, призначених для кількісного визначення концентрацій аналіту та/або його активного метаболіту, що використовуються для встановлення фармакокінетичних та токсикокінетичних параметрів. Надається опис проведення біоаналітичного випробування і встановлюються критерії застосування валідованих методик в рутинному аналізі біологічних зразків, які отримують в дослідженнях. Настанова містить опис критеріїв та підходів до оцінки отриманих результатів з урахуванням властивостей аналіту.

Ця настанова рекомендується для суб'єктів господарювання, що займаються розробкою лікарських засобів, проведенням досліджень біодоступності та біоеквівалентності, формуванням реєстраційних матеріалів та проведенням процедур державної реєстрації лікарських засобів на території України, незалежно від відомчого підпорядкування та форми власності, для відповідних заявників та підприємств-виробників, продукція яких реєструється та імпортується в Україну, для науково-експертних організацій та регуляторних органів, а також експертів, аудиторів та інспекторів, що проводять експертизу протоколів клінічних випробувань та відповідних матеріалів, представлених у реєстраційних матеріалах, при державній реєстрації (перереєстрації) та внесенні змін до реєстраційних матеріалів лікарських засобів, здійснюють аудит та інспектування.

НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

У цій настанові є посилання на такі нормативні документи:

- Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» у редакції наказу Міністерства охорони здоров'я України від 23 липня 2015 року № 460, зареєстрований у Міністерстві юстиції України 07 жовтня 2015 року за № 1210/27655 із змінами.

- Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council, of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use//Official Journal of the European Communities. – L 311, 28.11.2001. – P. 67-128 (Директива 2001/83/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 6 листопада 2001 року про кодекс Співтовариства відносно лікарських засобів для медичного призначення//Official Journal of the European Communities. – L 311, 28.11.2001. – P. 67-128).

- Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (codified version) (Директива 2004/10/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про гармонізацію законів, постанов і адміністративних положень, що стосуються застосування принципів належної лабораторної практики (GLP) і перевірки їх застосування при дослідженні хімічних речовин).

- Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) (Директива 2004/9/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про інспекцію та перевірку належної лабораторної практики (GLP).

- CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation» (Настанова з валідації біоаналітичної методики).

- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) «Bioanalytical Method Validation

Guidance for Industry» (Настанова з валідації біоаналітичної методики для промисловості).

- EMA/INS/GCP/532137/2010 «Reflection Paper for Laboratories That Perform the Analysis or Evaluation of Clinical Trial Samples» (Пояснення для лабораторій, що проводять аналіз або оцінку зразків клінічних досліджень).

ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ

1. Аналіт (Analyte)

Вимірюваний специфічний хімічний компонент, який може бути вихідним лікарським засобом, біомолекулою або її похідним, метаболітом і/або продуктом розпаду в біологічній матриці.

2. Аналітична процедура (Analytical Procedure)

Аналітична процедура стосується способу проведення аналізу. Він повинен детально описувати кроки, необхідні для виконання кожного аналізу.

3. Аналітичний цикл (Analytical run)

Повний набір аналітичних і досліджуваних зразків з відповідною кількістю калібрувальних стандартів і зразків QC для їх оцінки. Декілька циклів може бути завершено в один день, або один цикл може займати декілька днів для завершення.

4. Верхня межа кількісного визначення (Upper limit of quantification – ULOQ)

Верхня межа кількісного визначення окремої аналітичної методики – це найбільша кількість аналіту в зразку, яку можна кількісно визначити з попередньо встановленою прецизійністю та правильністю.

5. Внутрішній стандарт (Internal standard)

Контрольна(і) сполука(и) (наприклад, структурно подібний аналог або сполука, мічена стабільним ізотопом), що додається до калібрувальних стандартів, зразків QC і досліджуваних зразків при відомій і постійній концентрації для корегування експериментальної варіабельності під час приготування і аналізу зразка.

6. Досліджувані зразки (Incurred samples)

Досліджувані зразки, взяті у суб’єктів або тварин, яким вводилася доза препарату.

7. Ефект матриці (Matrix effect)

Пряма або непряма зміна або вплив на відгук внаслідок присутності аналітів, не призначених для аналізу, або інших речовин, що заважають, в зразку.

8. Зразки контролю якості (Quality control (QC) sample)

Зразок матриці з внесеним аналітом у відомій концентрації, що застосовується для контролю характеристик біоаналітичної методики і оцінки цілісності та достовірності результатів аналізу досліджуваних зразків, проаналізованих в окремій серії.

9. Ефект переносу (Carry over)

Ефект переносу – це поява сигналу аналіту в зразку «бланк матриці», який аналізують після аналізу зразків з високою концентрацією аналіту.

10. Калібрувальний діапазон (Calibration range)

Діапазоном аналітичної процедури є інтервал між верхнім і нижнім рівнем концентрації аналіту в зразку (включаючи ці концентрації), для якого було продемонстровано, що аналітична процедура відповідає вимогам до прецизійності, правильності і функції відгуку.

11. Калібрувальний стандарт (Calibration standard)

Матриця, в яку було додано або введено відома кількість аналіту. Калібрувальні стандарти використовуються для побудови калібрувальних кривих.

12. Нижня межа кількісного визначення (Lower limit of quantification - LLOQ)

Нижня межа кількісного визначення індивідуальної аналітичної методики – це найменша кількість аналіту в зразку, яку можна кількісно визначити з попередньо встановленими прецизійністю і правильністю.

13. Номінальна концентрація (Nominal concentration)

Теоретична або очікувана концентрація.

14. Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків (Incurred sample reanalysis)

Аналіз частини досліджуваних зразків для визначення відтворюваності вихідних аналітичних результатів.

15. Опорні калібратори (Anchor calibrators)

Опорні калібратори – точки стандартів, які виходять із діапазону кількісного визначення і використовуються при встановленні нелінійної регресії стандартної кривої в методиках аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів.

16. Перехресна валідація (Cross validation)

Порівняння параметрів валідації двох біоаналітичних методик.

17. Повна валідація (Full validation)

Встановлення всіх параметрів валідації біоаналітичної методики визначення кожного аналіту для застосування її для аналізу зразків.

18. Правильність (Accuracy)

Правильність аналітичної процедури виражає близькість встановленого значення до значення, що приймається як дійсне

істинне значення або прийняте стандартне значення. Правильність визначається як (встановлене значення/ істинне значення)×100 %.

19. Прецизійність (Precision)

Прецизійність аналітичної методики виражає ступінь близькості (або ступінь розкиду) результатів між серією вимірювань, отриманих за встановлених умов. Прецизійність визначається як відношення стандартного відхилення до середнього значення (%).

20. Селективність (Selectivity)

Селективність – це здатність біоаналітичної методики вимірювати і розрізняти досліджуваний(і) аналіт(и) і внутрішній стандарт (IS) в присутності компонентів, які можуть бути наявні в зразку.

21. Специфічність (Specificity)

Специфічність – це здатність біоаналітичної методики однозначно вимірювати аналіт(и) в матриці в присутності інших компонентів, екзогенних або ендогенних.

22. Стабільність (Stability)

Хімічна стабільність аналіту в певній матриці в конкретних умовах для встановлених часових інтервалів.

23. Стандартна операційна процедура (СОП) (Standard Operating Procedure)

Документ, який описує регулярно повторювані операції, що стосуються якості дослідження і дозволюють проводити операції правильно і завжди однаково.

24. Функція відгуку (Response function)

Функція відгуку – це функція, яка адекватно описує зв’язок між відгуком приладу/інструменту (наприклад, площа хроматографічного піку або співвідношення висот) і концентрацією (кількістю) аналіту в зразку. Функція відгуку визначається в межах встановленого діапазону.

25. Часткова валідація (Partial validation)

Серія аналітичних експериментів, коли повторно проводяться тільки основні/значимі етапи валідації після внесення змін в раніше валідовану біоаналітичну методику.

ПОЗНАКИ ТА СКОРОЧЕННЯ

ANOVA – Analysis of Variance (*дисперсійний аналіз*)

EU (ЄС) – European Union (*Європейський Союз*)

EEA – European Economic Area (*Європейська економічна зона*)

EMA – The European Medicine Agency (*Європейське агентство з лікарських засобів*)

CHMP – Committee for Medicinal Products for Human Use (*Комітет з лікарських засобів для медичногопризначення*)

CTD – Common Technical Document (*Загальний технічний документ*)

CRF – Case report form (*індивідуальна реєстраційна форма*)

DBS – Dried blood spot (висушена пляма крові)

IS – Internal standard (*внутрішній стандарт*)

ISR – Incurred sample reanalysis (*обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків*)

HVDP – Highly variable drug products (*високоваріабельні лікарські засоби*)

FCs – Fixed Combinations (*фіксовані комбінації, лікарські засоби з фіксованою комбінацією*)

FDA Food and Drug Administration (*Управління продуктів харчування та лікарських засобів*)

GLP – Good Laboratory Practice (*належна лабораторна практика*)

GCP – Good Clinical Practice (н*алежна клінічна практика*)

LLOQ – Lower limit of quantification (*нижня межа кількісного визначення*)

NTID – Narrow therapeutic index drug (*лікарський засіб з вузьким терапевтичним індексом*)

MF	–	Matrix Factor (*матричний фактор*)
PKWP	–	Pharmacokinetics Working Party (*Робоча група з фармакокінетики*)
Ph.Eur.	–	European Pharmacopeia (*Європейська Фармакопея*)
CV	–	Coefficient of variation (*коефіцієнт варіації*)
RSD	–	Relative Standard Deviation (*Відносне стандартне відхилення*)
Within-subject CV	–	Within-subject coefficient of variation (*внутрішньосуб'єктна варіабельність*)
SmPC	–	Summary of Product Characteristics (*коротка характеристика лікарського засобу*)
QC sample	–	Quality control sample (*зразок контролю якості*)
ULOQ	–	Upper limit of quantification (*верхня межа кількісного визначення*)
ДФУ	–	Державна Фармакопея України
МОЗ	–	Міністерство охорони здоров'я
СОП	–	Стандарт операційної процедури
СТ-Н МОЗУ	–	Настанова МОЗ України
США	–	Сполучені Штати Америки

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Ця настанова визначає ключові елементи, необхідні для валідації біоаналітичних методик. Значна увага в настанові приділяється валідації біоаналітичних методик, що застосовуються для отримання кількісних значень концентрації, які використовуються для визначення фармакокінетичних та токсикокінетичних параметрів. Наведено вимоги та критерії щодо застосування валідованих біоаналітичних методик у рутинному аналізі досліджуваних зразків, отриманих в доклінічних дослідженнях на тваринах та клінічних дослідженнях на людях.

1. ВСТУП

Вимірювання концентрації діючих речовин у біологічних матрицях (таких як сироватка, плазма, кров, сеча та слина) є важливим аспектом розробки лікарських засобів. Такі дані можуть бути потрібні для підтримки заяв на нові діючі речовини та лікарські засоби, на лікарські засоби з фіксованою комбінацією, гібридні, генеричні та біоподібні лікарські засоби [N], а також для підтримки заяв на зміни до вже зареєстрованих лікарських засобів. Результати токсикокінетичних досліджень на тваринах та клінічних досліджень, включаючи дослідження біоеквівалентності, використовуються для прийняття важливих рішень, що підтверджують безпеку та ефективність діючої речовини чи лікарського засобу. Тому для отримання надійних результатів важливо, щоб застосовувані біоаналітичні методики були добре охарактеризовані, повністю валідовані та задокументовані відповідно до встановлених вимог.

Критерії прийнятності, ширші, ніж визначені в даній настанові, можуть використовуватися в особливих ситуаціях. Це повинно бути визначено заздалегідь враховуючи методику, яку планується використовувати.

2. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Ця настанова надає рекомендації щодо валідації біоаналітичних методик, що застосовуються для вимірювання концентрацій лікарських засобів в біологічних матрицях, отриманих при проведенні токсикокінетичних досліджень на тваринах і всіх фаз клінічних досліджень. Оскільки методики аналізу, що базуються на зв’язуванні лігандів значно відрізняються від хроматографічних аналітичних

методик, для валідації методик, що базуються на зв'язуванні лігандів надаються окремі рекомендації.

Додатково розглядаються конкретні аспекти аналізу досліджуваних зразків.

Крім того, дана настанова описує, коли слід проводити часткову валідацію або перехресну валідацію на додаток до повної валідації аналітичної методики.

Методики кількісного визначення концентрації біомаркерів, що використовуються при оцінці фармакодинамічних кінцевих точок, не входять до сфери застосування даної настанови.

3. ЗАКОНОДАВЧА БАЗА

Ця настанова повинна розглядатися в комплексі з Директивою 2001/83/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 6 листопада 2011 року про Кодекс Співтовариства щодо лікарських засобів для медичного призначення з внесеними змінами (введення та загальні принципи (4), частини I і II додатку I) та вимогами чинного законодавства України. Ця настанова стосується матеріалів реєстраційного досьє для лікарських засобів для медичного призначення, що подаються у відповідності з Директивою 2001/83/ЄС зі змінами і Регламентом (ЄС) № 726/2004 [6], в яких аналіз концентрацій лікарських засобів в біологічній матриці є частиною матеріалів реєстраційного досьє, також дані рекомендації розглядаються в комплексі з наказом Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 (у редакції наказу Міністерства охорони здоров'я України від 23 липня 2015 року № 460 із змінами).

Валідацію біоаналітичних методик і аналіз досліджуваних зразків для клінічних досліджень за участю людини слід проводити згідно з принципами Належної клінічної практики (Good Clinical Practice, GCP). Подальші рекомендації, які допоможуть клінічним лабораторіям розробити та підтримувати системи якості, що відповідатимуть відповідним Директивам ЄС, національним вимогам та пов'язаними із ними настановами, а також гармонізованим з ними настановам СТ-Н МОЗ^{N}, можна знайти в документі EMA/INS/GCP/532137/2010 «Reflection Paper for Laboratories That Perform the Analysis or Evaluation of Clinical Trial Samples»

(Пояснення для лабораторій, що проводять аналіз або оцінку зразків клінічних досліджень) [12].

Доклінічні (фармакотоксикологічні) дослідження, подані в реєстраційному досьє, повинні проводитися у відповідності з положеннями, що стосуються належної лабораторної практики (GLP); Директиви 2004/10/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про гармонізацію законів; постанов і адміністративних положень, що стосуються застосування принципів належної лабораторної практики і перевірки їх застосування при дослідженні хімічних речовин [7]; Директиви 2004/9/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про інспекцію та перевірку належної лабораторної практики [8] та гармонізованої з ними настанови СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 16 лютого 2009 року № 95 [2]. Як правило, валідацію біоаналітичних методик, що використовуються в доклінічних фармакотоксикологічних дослідженнях, слід проводити за принципами GLP. У разі якщо валідація методики не проводиться згідно GLP, слід чітко ідентифікувати і обговорити потенційний вплив на статус валідації. Методики, що використовуються в доклінічних дослідженнях, від яких не вимагається відповідності GLP, повинні відповідати поставленим цілям і їх розробка не обов'язкова в лабораторії GLP.

4. Валідація методики

4.1. Повна валідація аналітичної методики

Повну валідацію потрібно проводити для будь-якої аналітичної методики – нової чи тієї, що базується на літературних даних.

Основна мета валідації методики – демонстрація надійності конкретної методики для визначення концентрації аналіту в біологічній матриці, такій як кров, сироватка, плазма, сеча або слина. Крім того, якщо використовується антикоагулянт, валідацію слід проводити з використанням того ж антикоагулянту, який використовувався для обробки досліджуваних зразків. Як правило, повну валідацію потрібно проводити для кожного компоненту та матриці, що розглядаються.

В деяких випадках може бути проблематично отримати для валідації матрицю, що є ідентичною матриці досліджуваних зразків. При обґрунтуванні можна використовувати відповідну альтернативну матрицю, наприклад, синтетично підготовлену спинномозкову рідину. Основні характеристики біоаналітичної методики, що необхідні для забезпечення відтворюваності і надійності аналітичних результатів: селективність, нижня межа кількісного визначення, функція відгуку і калібрувальний діапазон (характеристика калібрувальної кривої), правильність, прецизійність, ефекти матриці, стабільність аналіту(-ів) в біологічній матриці, стабільність аналіту(-ів) і внутрішнього стандарту в основному і робочому розчинах і екстрактах протягом усього періоду зберігання і в умовах обробки.

Зазвичай проводять визначення одного аналіту або лікарського засобу, але можливе визначення більше одного аналіту. Це може стосуватися двох різних лікарських засобів, або вихідної сполуки з її метаболітами або енантіомерами або ізомерами лікарського засобу. В цих випадках принципи валідації і аналізу стосуються всіх досліджуваних аналітів.

Стандартні зразки

Під час проведення валідації методики та аналізу досліджуваних зразків у зразки «бланк матриці» буде додано досліджуваний(-і) аналіт(-и) у вигляді розчину стандартного зразка для підготовки калібрувальних стандартних зразків, зразків контролю якості і зразків для оцінки стабільності. Крім того, при використанні хроматографічних методик, відповідний внутрішній стандарт(и) (Internal standard, IS) може бути доданий під час обробки зразків.

Важливо забезпечити якість стандартного зразка і внутрішнього стандарту (IS), оскільки якість (чистота) може впливати на результат аналізу і, відповідно, на результат дослідження. Тому стандартні зразки, що використовуються під час валідації і аналізу досліджуваних зразків, необхідно отримувати із достовірного і простежуваного джерела.

Стандартні зразки, що можуть бути використані: фармакопейні стандарти, комерційно доступні стандарти або достатньо сертифіковані стандарти, підготовлені всередині лабораторії або зовнішньої некомерційної організації. В сертифікаті аналізу на стандартний зразок повинно бути вказано ступінь чистоти, умови зберігання, номер серії, закінчення терміну придатності.

Використання таких вимог не є необхідним для внутрішнього стандарту (Internal standard, IS), якщо його придатність для використання продемонстрована, наприклад, відсутністю аналітичної інтерференції для самої речовини або будь-яких її домішок. Сертифікат аналізу не вимагається.

Коли в біоаналітичній методиці визначення проводиться за допомогою мас-спектрометрії рекомендується, коли тільки можливо, використовувати внутрішній стандарт, мічений стабільним ізотопом. Однак для уникнення ізотопного обміну важливо, щоб мічений стандарт був високої ізотопної чистоти. Присутність будь-якого немміченого аналіту необхідно перевіряти, і у разі виявлення відносної кількості немміченого аналіту його потенційний вплив потрібно оцінити під час проведення валідації методики.

4.1.1. Селективність

Аналітична методика має бути придатною для того, щоб розрізнити досліджуваний(-і) аналіт(-и) і внутрішній стандарт (Internal standard, IS) від ендогенних компонентів в матриці або інших компонентів у зразку. Оцінку селективності необхідно проводити використовуючи, як мінімум, 6 індивідуальних джерел зразка «бланк матриці», які окремо аналізують і оцінюють на інтерференцію. Використання меншої кількості джерел допускається для рідкісних матриць. Зазвичай, прийнятним вважається відсутність інтерферуючих піків, коли відгук становить менше 20 % від нижньої межі кількісного визначення для аналіту і 5 % для внутрішнього стандарту.

Також може знадобитися вивчення інтерференції, спричиненої метаболітами лікарського(-их) засобу(-ів); інтерференції продуктів розпаду, що утворилися під час приготування зразка та інтерференції супутніх лікарських засобів при можливому спільному введенні

лікарських засобів. Супутні лікарські засоби, що зазвичай використовуються в досліджуваній популяції і можуть потенційно впливати, повинні братися до уваги на етапі валідації методики або на основі конкретного дослідження та конкретної сполуки.

Потрібно оцінити також можливість оберненої конверсії потенційно нестабільних метаболітів (таких, наприклад, як кислотні метаболіти в ефір, нестабільні N-оксиди або глюкуронідні метаболіти, циклічні лактони) у вихідний аналіт під час поетапних стадій аналізу (включаючи процедури екстракції і вплив джерела в мас-спектрометрії. Слід визначити ступінь оберненої конверсії і розглянути вплив на результати дослідження. Загальноприйнято, що оцінка ступеня ї конверсії неможлива на початковій стадії розробки лікарського засобу, що містить нову хімічну сполуку, коли метаболізм ще не оцінений. Однак, очікується, що у випадку необхідності та по мірі отримання додаткових знань про метаболізм діючої речовини під час розробки лікарського засобу, це питання буде враховано та проведено часткову валідацію.

Визнано, що в деяких випадках дуже важко отримати досліджувані метаболіти. Альтернативно, обернену конверсію метаболіту можна перевірити при повторному аналізі досліджуваних зразків. Однак у такому випадку потенційна обернена конверсія під час обробки зразків не може бути виключена.

4.1.2. Ефект переносу

Ефект переносу необхідно розглядати і мінімізувати під час розробки методики. Під час валідації перенос проби слід оцінювати за допомогою інжекції зразка «бланк матриці» після зразка з високою концентрацією аналіту або калібрувального стандарту з концентрацією аналіту, що рівна верхній межі кількісного визначення. Перенос у зразку «бланк матриці» після зразка з високою концентрацією аналіту (або після самого високого калібрувального стандарту), повинен складати не більше 20% від нижньої межі кількісного визначення аналіту (Lower limit of quantification, LLOQ; див. нижче) і не більше 5 % для внутрішнього стандарту. Якщо виявиться, що перенос проби неминучий, досліджувані зразки не слід рандомізувати. Необхідно передбачити конкретні міри, протестувати їх під час валідації і застосувати під час аналізу досліджуваних зразків, щоб це не впливало на правильність і прецизійність. Це може включати введення зразків «бланк матриці» після зразків з очікуваною високою концентрацією аналіту перед аналізом наступного досліджуваного зразка.

4.1.3. Нижня межа кількісного визначення

Нижня межа кількісного визначення (Lower limit of quantification, LLOQ) – це найнижча концентрацією аналіту в зразку, яку можна надійно кількісно визначити з прийнятною правильністю і прецизійністю. Нижня межа кількісного визначення вважається найнижчим калібрувальним стандартом (див. правильність і прецизійність). Крім того, сигнал аналізу зразка LLOQ повинен бути, принаймні, в 5 разів більше сигналу зразку «бланк матриці». LLOQ має бути адаптована до очікуваних концентрацій і до мети дослідження. Наприклад, для дослідження біоеквівалентності LLOQ повинна бути не вище 5 % від $C_{макс}$, тоді як така низька LLOQ може не знадобитися для дослідницьких фармакокінетичних досліджень.

4.1.4. Калібрувальна крива

Відгук приладу відносно концентрації аналіту повинен бути відомим і повинен оцінюватися в визначеному діапазоні концентрацій. Калібрувальні стандарти повинні готуватися в тій же матриці, що і матриця зразків, які досліджуються, додаючи відомі концентрації аналіту в зразок «бланк матриці». Для кожного аналіту, що досліджується при валідації біоаналітичної методики, і для кожного аналітичного циклу повинна бути своя калібрувальна крива.

В ідеалі, перед проведенням валідації біоаналітичної методики необхідно знати, який діапазон концентрацій очікується. Цей діапазон повинен охоплюватись діапазоном калібрувальної кривої, що визначається концентрацією LLOQ, яка є найнижчим калібрувальним стандартом, і концентрацією верхньої межі кількісного визначення (Upper limit of quantification, ULOQ), яка є найвищим калібрувальним стандартом. Діапазон необхідно встановити для адекватного опису фармакокінетики досліджуваного аналіту.
Додатково до зразка «бланк матриці» (оброблений зразок матриці без аналіту і внутрішнього стандарту) і нульового зразка (оброблений зразок матриці з внутрішнім стандартом) необхідно використовувати мінімум шість калібрувальних стандартів різного концентраційного рівня. Кожний калібрувальний стандарт може бути проаналізований повторно.

Слід застосувати рівняння (модель), яке просто і адекватно може описати залежність відгуку приладу від концентрації аналіту. Зразок «бланк матриці» і нульовий зразок не мають враховуватися при розрахунку параметрів калібрувальної кривої.

У звіті потрібно вказати параметри калібрувальної кривої (тангенс кута нахилу і відрізок, що відсікається на осі координат у випадку

лінійної залежності). Крім того, потрібно представити регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів разом з розрахованими середніми значеннями правильності методики (див. нижче визначення Правильності). У звіті потрібно представити всі доступні (або прийнятні) криві, отримані в процесі валідації (як мінімум 3 криві).

Регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути в межах ± 15 % від номінального значення, за винятком LLOQ, для якої регресійно розраховане значення повинно бути в межах ± 20 %. Принаймні, 75 % калібрувальних стандартів, що відповідають, як мінімум, 6 калібрувальним рівням, повинні відповідати цьому критерію. У разі повторного аналізу кожного стандартного зразка, встановлені критерії (в межах ± 15 % або ± 20 % для LLOQ) також повинні виконуватися, як мінімум, для 50 % калібрувальних стандартів кожного концентраційного рівня. Якщо калібрувальний стандарт не відповідає цим критеріям, цей зразок калібрувального стандарту слід відкинути, а калібрувальну криву без даного калібрувального стандарту слід повторно оцінити, використовуючи регресійний аналіз. У разі невідповідності критерію всіх повторно проаналізованих калібрувальних стандартів LLOQ або ULOQ дану серію калібрувальних стандартів слід виключити із валідації, встановити можливе джерело відхилення, а в методику внести зміни (якщо необхідно). Якщо наступна валідаційна серія також не проходить, то слід переглянути методику перед новою валідацією.

Хоча для калібрувальної кривої бажано використовувати свіжоприготовлені калібрувальні стандарти, дозволяється використовувати раніше приготовлені і збережені стандарти, якщо це підтверджено відповідними даними про стабільність.

4.1.5. Правильність

Правильність біоаналітичної методики описує близькість встановленого значення за даною методикою до номінальної концентрації аналіту (виражається у відсотках). Правильність повинна бути оцінена на зразках з відомою концентрацією аналіту – зразках контролю якості (Quality control sample, QC sample). Зразки QC слід готувати незалежно від калібрувальних стандартів, використовуючи окремо приготовлені вихідні розчини, якщо тільки не були встановлені номінальні концентрації вихідних розчинів.

Зразки QC аналізуються по калібрувальній кривій, а отримані концентрації порівнюються з номінальним значенням. Правильність

слід представити у звіті як відсоток від номінальної концентрації. Правильність слід оцінювати для значення зразків QC, отриманих в межах одного циклу (внутрішньосерійна правильність, within-run) і між циклами (міжсерійна правильність, between-run).

Для оцінки будь-яких тенденцій, що спостерігаються з часом в рамках одного циклу, рекомендується підтвердити правильність і прецизійність зразків QC протягом, принаймні, одного циклу в розмірі, еквівалентному очікуваній аналітичній серії досліджуваних зразків.

Внутрішньосерійна правильність

Внутрішньосерійну правильність слід визначати аналізуючи в одному циклі мінімум 5 зразків кожного концентраційного рівня, принаймні, при 4 рівнях концентрацій, що охоплюють діапазон калібрувальної кривої: рівень LLOQ; в межах трикратного LLOQ (низький QC), приблизно 30 - 50 % від діапазону калібрувальної кривої (середній QC) і, щонайменше 75 % від верхнього діапазону калібрувальної кривої (високий QC). Середня концентрація повинна бути в межах 15 % від номінальних значень зразків QC, за винятком LLOQ, яка повинна бути в межах 20 % від номінального значення.

Міжсерійна правильність

Для валідації міжсерійної правильності слід оцінити LLOQ, низький, середній і високий зразки QC, як мінімум, для трьох циклів, проаналізованих принаймні у два різних дні. Середня концентрація повинна бути в межах 15 % від номінальних значень для зразків QC, за винятком LLOQ, яка повинна бути в межах 20 % від номінального значення.

Вказані у звіті дані про валідацію методики і визначення правильності та прецизійності методики повинні включати всі отримані результати, за винятком тих випадків, коли помилки були очевидними і задокументованими.

4.1.6. Прецизійність

Прецизійність аналітичної методики описує ступінь близькості значень повторних індивідуальних вимірювань аналіту. Прецизійність виражається як коефіцієнт варіації (Coefficient of variation, CV). Прецизійність слід підтвердити для LLOQ, низьких, середніх і високих зразків QC в межах одного циклу і між різними циклами, тобто використовуючи ті ж самі цикли і дані, що й для підтвердження правильності.

Внутрішньосерійна прецизійність

Для валідації внутрішньосерійної прецизійності, в одному циклі повинно бути проаналізовано, як мінімум, по п’ять LLOQ-зразків і зразків QC для кожного концентраційного рівня: LLOQ-рівень, низький, середній і високий. Значення коефіцієнту варіації в межах циклу не повинно перевищувати 15% для зразків QC, за виключенням LLOQ, для якої не повинно перевищувати 20%.

Міжсерійна прецизійність

Для валідації міжсерійної прецизійності слід оцінити LLOQ, низький, середній і високий зразки QC, як мінімум, із трьох циклів, проаналізованих, принаймні, протягом двох різних днів. Значення міжсерійного коефіцієнта варіації не повинно перевищувати 15 % для зразків QC, за винятком LLOQ, для якої CV не повинно перевищувати 20 %.

4.1.7. Допустимість розведення

Розведення зразків не повинно впливати на правильність і прецизійність. Якщо необхідно, допустимість розведення слід продемонструвати введенням в матрицю аналіту при концентрації вище ULOQ і розведенням цього зразка холостою матрицею (мінімум п’ять визначень для кожного фактора розведення). Правильність і прецизійність повинні бути в межах встановлених критеріїв, тобто в межах ± 15 %. Допустимість розведення повинна охоплювати розведення, що буде застосовуватися до досліджуваних зразків.

Оцінка допустимості розведення може проводитись при частковій валідації. Використання іншої матриці може бути прийнятним, якщо доведено, що це не впливає на прецизійність і правильність методики.

4.1.8. Ефект матриці

Ефект матриці слід досліджувати методом мас-спектрометрії, використовуючи, принаймні, 6 серій зразків «бланк матриці», отриманих від окремих донорів. Не слід використовувати об’єднану матрицю.

Для кожного аналіту і внутрішнього стандарту слід розраховувати матричний фактор (matrix factor, MF) для кожної серії матриці, визначаючи відношення площі піка аналіту в присутності матриці (аналіт додається до екстрагованого зразка «бланк матриці») до площі піку за відсутності матриці (чистого розчину аналіту). MF, нормалізований за внутрішнім стандартом має бути розрахований шляхом ділення MF аналіту на MF внутрішнього стандарту.

Коефіцієнт варіації IS-нормалізованого MF, розрахований для 6 серій матриці, не повинен перевищувати 15 %. Це визначення потрібно проводити при низькому і високому рівні концентрації (такому, що максимум в 3 рази перевищує LLOQ, і такому, що є близьким до ULOQ).

Якщо цей підхід неможливо використати, наприклад, у випадку *on-line* підготовки зразка, варіабельність відгуку від серії до серії слід оцінювати шляхом аналізу, як мінімум, 6 серій матриці при низькому і високому рівні концентрації (такому, що максимум в 3 рази перевищує LLOQ і такому, що є близьким до ULOQ). Звіт з валідації повинен включати площі піків аналіту і внутрішнього стандарту, а також розраховану концентрацію для кожного окремого зразка. Середній коефіцієнт варіації, розрахований для кожної концентрації, не повинен бути більше 15 %.

Якщо матрицю важко отримати, можна використати менше 6 різних серій матриці, але це повинно бути обґрунтовано. Однак ефекти матриці все ж потрібно досліджувати.

Якщо лікарський засіб для ін’єкцій, що вводиться суб’єктам або тваринам, містить допоміжні речовини, які відповідають за ефекти матриці (такі як поліетиленгліколь або полісорбат), то ефект матриці необхідно вивчати разом з матрицею, що містить ці допоміжні речовини, додатково до зразка «бланк матриці». Матрицю, яку використовують для такої оцінки, слід отримати від суб’єктів або тварин, яким вводили допоміжні речовини, якщо тільки не доведено, що допоміжна речовина не метаболізується та не трансформується *in vivo*. Ефект допоміжних речовин можна вивчати за допомогою визначення матричного фактора або шляхом дослідження розведення досліджуваного зразка з високою концентрацією бланком матриці, що не містить допоміжної речовини.

На додаток до нормальної матриці рекомендується досліджувати ефекти матриці на інших зразках, наприклад, на гемолізованих або гіперліпідемічних зразках плазми. Якщо потрібно аналізувати зразки із особливих популяцій (таких, як популяції з нирковою та печінковою недостатністю), також рекомендується досліджувати ефекти матриці, використовуючи матрицю з таких популяцій.

4.1.9. Стабільність

Дослідження стабільності слід проводити для того, щоб підтвердити, що кожен етап дослідження, від приготування зразків до аналізу, як і використані умови зберігання, не впливають на концентрацію аналіту.

Стабільність слід підтвердити для кожного етапу аналітичної методики; це означає, що умови дослідження стабільності, що включають в себе вимоги до матриці, антикоагулянту, матеріалу контейнера/упаковки, умов зберігання і проведення аналізу, повинні бути аналогічні умовам, що використовуються для реально досліджуваних зразків. Посилання на дані, опубліковані в літературі, не вважаються достатніми.

Стабільність аналіту в досліджуваній матриці оцінюється використовуючи зразки QC з низькою і високою концентраціями аналіту (бланк матриці з додаванням аналіту при концентрації, яка максимум в 3 рази перевищує LLOQ і близька до ULOQ), які аналізують одразу після приготування і після зберігання в умовах, що потрібно оцінити. Зразки QC аналізують за калібрувальною кривою, отриманою з використанням свіжоприготовлених калібрувальних стандартів, а отримані концентрації порівнюють з номінальними концентраціями. Середня концентрація на кожному рівні повинна бути в межах ± 15 % від номінальної концентрації.

Стабільність основного і робочого розчинів повинна бути перевірена при відповідному розведенні з урахуванням лінійності і діапазону вимірювань детектора.

Стабільність повинна бути досліджена при різних умовах зберігання протягом періодів часу, що дорівнюють або перевищують застосовувані до реальних досліджуваних зразків.

Слід оцінити наступні тести на стабільність:

• стабільність основного розчину і робочих розчинів аналіту і внутрішнього стандарту,

• стабільність аналіту в матриці при заморожуванні та таненні від умов зберігання в морозильній камері до кімнатної температури або температури обробки зразка,

• короткострокова стабільність аналіту в матриці при кімнатній температурі або при температурі обробки зразка,

• довгострокова стабільність аналіту в матриці при зберіганні в морозильній камері.

Крім того, за необхідності, слід провести наступні тести:

• стабільність обробленого зразка при кімнатній температурі або в умовах зберігання, що будуть використовуватися під час дослідження (сухий екстракт або в рухомій фазі),

• стабільність обробленого зразка в автосамплері при температурі інжектора або автосамплера.

Стабільність при заморожуванні/таненні: Зразки QC заморожуються і зберігаються в морозильній камері при заданій температурі, потім розморожуються при кімнатній температурі або температурі обробки. Після повного розмороження зразки повторно заморожуються в тих же умовах. В кожному циклі зразки повинні бути в замороженому стані не менше 12 годин до їх розмороження. Число циклів при дослідженні стабільності в умовах заморожування/танення повинно бути рівним або перевищувати число циклів замороження/танення досліджуваних зразків.

Довгострокова стабільність аналіту в матриці при зберіганні в морозильній камері: Зразки QC слід зберігати в морозильній камері в тих же умовах і протягом того ж періоду, що і досліджувані зразки. Для малих молекул вважається прийнятним підхід брекетингу, тобто у разі, якщо стабільність підтверджена, наприклад, при -70 °C і -20 °C, немає необхідності досліджувати стабільність при температурах між цими значеннями. Для великих молекул (таких як пептиди і білки) стабільність слід вивчати при кожній температурі, при якій досліджувані зразки будуть зберігатися. Досліджувані зразки можуть використовуватись додатково до зразків QC, але виключне використання досліджуваних зразків не вважається достатнім, оскільки номінальні концентрації цих зразків невідомі. Результати оцінки довгострокової стабільності повинні бути отримані до завершення підготовки звіту з дослідження.

Стабільність основного і робочого розчинів: Немає необхідності вивчати стабільність для кожного рівня концентрації робочих розчинів, можна застосовувати підхід брекетингу. Не потрібно вивчати стабільність внутрішніх стандартів, мічених стабільним ізотопом, якщо доведено, що будь-які реакції обміну ізотопами не відбуваються за таких самих умов, як була доведена стабільність аналіту.

У разі використання декількох аналітів у дослідженні, в тому числі в дослідженнях біоеквівалентності, слід звернути увагу на стабільність аналітів у матриці, що містить всі аналіти.

Особливу увагу слід приділити стабільності аналіту в зразках матриці, отриманих безпосередньо після відбору зразків крові у суб’єктів дослідження з подальшою їх обробкою перед зберіганням для того, щоб довести, що встановлені за допомогою аналітичної методики концентрації правильно відображають значення концентрації аналіту у суб’єкта дослідження в момент відбору зразка. Доведення цієї стабільності може бути необхідним в кожному конкретному випадку, залежно від структури аналіту.

4.2. Часткова валідація

Якщо в затверджену аналітичну методику вносяться незначні зміни, повна валідація методики може бути не потрібна (залежно від змін). Зміни, для яких може бути потрібна часткова валідація:

• передача біоаналітичної методики в іншу лабораторію,

• зміни в обладнанні,

• зміна діапазону калібрувальних концентрацій,

• обмежений об’єм зразка,

• використання іншого виду матриці,

• зміна антикоагулянту,

• зміна процедури обробки зразка,

• зміна умов зберігання,

• тощо.

Всі зміни потрібно вказати у звіті, а обсяг повторної або часткової валідації необхідно обґрунтувати. Часткова валідація може варіюватися від визначення внутрішньосерійної прецизійності і правильності до майже повної валідації.

4.3. Перехресна валідація

Якщо дані отримані з використанням різних методик в одному дослідженні і між дослідженнями, або якщо дані отримано в одному дослідженні, але із різних лабораторій при застосуванні однієї методики, необхідно порівняти отримані результати і провести перехресну валідацію застосованих аналітичних методик. Відмінності в пробопідготовці або використання іншої аналітичної методики може призвести до різних результатів у різних місцях дослідження. Перехресну валідацію слід проводити, за можливості, до початку аналізу досліджуваних зразків. Для перехресної валідації один і той же набір зразків QC або досліджуваних зразків повинен бути проаналізований обома аналітичними методиками. Для зразків QC отримане середнє значення правильності з використанням різних методик повинно бути в межах 15 % і може бути ширше, якщо це обґрунтовано. Для досліджуваних зразків різниця між двома отриманими значеннями повинна бути в межах 20 %, принаймні, для 67 % повторів. Результат перехресної валідації має вирішальне значення для визначення надійності отриманих даних та прийняття рішення про можливість їх порівняння і використання.

5. Аналіз досліджуваних зразків

Після повної валідації біоаналітичної методики може бути проведений аналіз досліджуваних зразків або проб від суб'єктів дослідження. Перед початком аналізу досліджуваних зразків потрібно перевірити придатність біоаналітичної методики.

Досліджувані зразки, зразки QC і калібрувальні стандарти повинні готуватися відповідно до валідованої біоаналітичної методики, щоб забезпечити прийнятність аналітичного циклу.

5.1. Аналітичний цикл

Аналітичний цикл повинен включати:

• зразок «бланк матриці» (оброблений зразок матриці без аналіту і без внутрішнього стандарту);

• нульовий зразок (оброблена матриця з IS);

• калібрувальні стандарти мінімум 6 рівнів концентрації;

• як мінімум 3 концентраційні рівні зразків QC (низький, середній і високий) в двократній повторності (або принаймні 5 % від кількості досліджуваних зразків, залежно від того, що більше) і досліджувані зразки, що будуть аналізуватися.

Як зазначалося раніше, калібрувальні стандарти і зразки QC повинні бути додані незалежно, використовуючи окремо приготовлені вихідні розчини, якщо тільки не було встановлено номінальну(-і) концентрацію(-ї) вихідних розчинів. Всі зразки (калібрувальні стандарти, зразки QC і досліджувані зразки) слід обробляти і екстрагувати як одну єдину серію зразків в порядку, в якому їх планується аналізувати. Одна серія складається із зразків, приготування яких проводиться одночасно, тобто послідовно обробляються без перерви в часі одним і тим аналітиком/лаборантом з використанням однакових реагентів в одних і тих же умовах. Слід уникати аналізу зразків, які готувалися окремо як декілька серій. Якщо такого підходу не можна уникнути, наприклад, через обмеження стабільності, кожна серія зразків повинна включати зразки QC низького, середнього і високого концентраційного рівня. Критерії прийнятності повинні бути заздалегідь встановлені в СОПі або в плані дослідження і повинні бути визначені для всього аналітичного циклу та окремих серії в цьому циклі.

При проведенні дослідження біоеквівалентності рекомендується аналізувати всі зразки від одного суб'єкта в одному аналітичному циклі для зниження варіабельності результатів. Зразки QC мають бути

розподілені по всьому циклу так, щоб забезпечити контроль правильності і прецизійності всього циклу.

5.2. Критерії прийнятності аналітичного циклу

Критерії прийнятності або відхилення аналітичного циклу повинні бути визначені в протоколі, в плані дослідження або в СОПі. У разі якщо весь цикл складається із декількох серій, критерії прийнятності слід застосовувати як до всього циклу, так і до окремих серій. Цикл може задовольняти критеріям прийнятності, хоча серію, можливо, доведеться відхилити, якщо для неї критерії прийнятності не виконуються.

Слід застосовувати наступні критерії прийнятності:

Правильність:

Регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути в межах ± 15 % від номінального значення, за виключенням значення LLOQ, для якого встановлена концентрація повинна бути в межах ± 20 % від номінальної. Цьому критерію повинно відповідати, принаймні, 75 % калібрувальних стандартів в кількості, як мінімум, шість. Якщо один із калібрувальних стандартів не відповідає цим критеріям, його виключають, а оцінка калібрувальної кривої і регресивного аналізу проводиться повторно уже без використання калібрувального стандарту, що не відповідає критеріям.

Якщо виключений калібрувальний стандарт – це LLOQ, то LLOQ для цього аналітичного циклу є наступний найнижчий прийнятний калібрувальний стандарт калібрувальної кривої. Якщо виключений найвищий калібрувальний стандарт, ULOQ для цього аналітичного циклу є наступний більш низький калібрувальний стандарт калібрувальної кривої. Переглянутий калібрувальний діапазон повинен охоплювати всі зразки QC (низький, середній і високий).

Значення правильності зразків QC повинні знаходитися в межах ± 15 % від номінального значення. Як мінімум, 67 % всіх зразків QC і, як мінімум, 50 % зразків QC в кожному концентраційному рівні повинні відповідати цьому критерію. Якщо ці критерії не виконуються, аналітичний цикл повинен бути відхилений, а досліджувані зразки повинні бути повторно приготовлені і проаналізовані.

У разі одночасного визначення декількох аналітів калібрувальна крива повинна бути побудована для кожного досліджуваного аналіту. Якщо аналітичний цикл є прийнятим тільки для одного аналіту, а для іншого

аналіту його потрібно відхилити, то можна використовувати дані аналіту, які прийнятні, але зразки потрібно повторно підготувати і проаналізувати для визначення відхиленого аналіту.

Якщо використовуються повторні калібрувальні стандарти і тільки один із стандартів LLOQ або ULOQ не відповідає встановленим критеріям, калібрувальний діапазон залишається незмінним.

Узагальнену (середню) оцінку правильності і прецизійності за результатами аналізу зразків QC всіх прийнятих циклів необхідно розрахувати для кожного рівня концентрацій і представити в аналітичному звіті. Якщо узагальнені середні результати правильності і прецизійності перевищують 15%, необхідно провести додаткові дослідження, що обґрунтовують це відхилення. У випадку дослідження біоеквівалентності це може призвести до відхилення даних.

5.3. Калібрувальний діапазон

Якщо до початку аналізу досліджуваних зразків відомо або припускається, що діапазон концентрацій аналіту в досліджуваних зразках вузький, то для адекватного відображення концентрацій рекомендується або звузити діапазон калібрувальної кривої з підбором відповідних концентрацій аналіту в зразках QC, або додати нові зразки QC з іншими концентраційними рівнями.

Якщо вузький діапазон концентрацій заздалегідь не передбачався, але спостерігається після початку аналізу досліджуваних зразків, то рекомендується зупинити проведення аналізу і або звузити стандартний діапазон калібрувальної кривої переглянувши існуючі концентрації зразків QC, або додати зразки QC в додаткових концентраціях до калібрувальної кривої перш ніж проводити подальший аналіз. Не потрібно повторно аналізувати зразки, проаналізовані до оптимізації стандартного діапазону кривої чи концентрації зразків QC.

Аналогічно вчиняють, якщо виявляється, що велика кількість концентрацій аналіту досліджуваних зразків перевищує ULOQ. За можливості, діапазон калібрувальної кривої необхідно розширити і додати зразки QC або змінити їх концентрації.

Принаймні, 2 рівні зразків QC повинні бути в межах діапазону концентрацій, виміряних в досліджуваних зразках. Якщо діапазон калібрувальної кривої змінено, то біоаналітична методика повинна бути повторно валідована (часткова валідація) для підтвердження функції відгуку і для забезпечення правильності і прецизійності.

5.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків

Можливі причини повторного аналізу досліджуваних зразків і критерії вибору значення, яке включають у звіт необхідно передбачити в протоколі, плані дослідження або СОПі до початку аналізу зразків. У звіті необхідно детально обговорити кількість зразків (і їх відсотковий вміст від загальної кількості), які були повторно проаналізовані.

Нижче наведено приклади причин за яких можливий повторний аналіз досліджуваного зразка:

• відхилення аналітичного циклу через невідповідність критеріям прийнятності щодо правильності калібрувальних стандартів та/або зразків QC;

• відгук внутрішнього стандарту в досліджуваному зразку суттєво відрізняється від відгуку в калібрувальних стандартах або зразках QC, якщо такий критерій заздалегідь був передбачений в СОПі;

• некоректне введення проби або несправність приладу;

• отримана концентрація вище ULOQ або нижче LLOQ в циклах, в яких самий низький калібрувальний стандартний зразок відхилений, що призводить до більш високої LLOQ порівняно з іншими циклами;

• наявність аналіту в кількості, достатній для кількісного визначення в зразках, взятих до введення дози препарату (pre-dose sample), або в зразках плацебо;

• незадовільна хроматографія.

Для досліджень біоеквівалентності звичайно повторний аналіз досліджуваних зразків за фармакокінетичними причинами недопустимий, оскільки це може вплинути на кінцевий результат такого дослідження. В цьому випадку повторний аналіз може розглядатися як частина лабораторних досліджень для визначення можливих причин отримання результатів, які розглядаються як відхилення від норми, а також для попередження подібних проблем в майбутньому.

У разі повторного аналізу зразків через позитивні зразки, взяті до введення дози або через фармакокінетичні причини, зразки повторного аналізу необхідно ідентифікувати, вказавши початкове значення, причину повторного аналізу, значення, отримані при повторному аналізі, остаточно прийняте значення і обґрунтування прийнятності даних.

У випадку несправності приладу повторна інжекція зразків можлива, якщо під час валідації була підтверджена реінжекційна

відтворюваність і стабільність зразків при інжекції. Повторна інжекція зразків повного аналітичного циклу або окремих зразків калібрувальних стандартів, або зразків QC тільки через невдачу з калібруванням або з зразками QC без жодної виявленої аналітичної причини є неприйнятною.

Безпека суб'єктів дослідження повинна бути пріоритетом серед усіх інших аспектів дослідження. Тому можливі обставини, за яких необхідні повторна підготовка та/або повторний аналіз досліджуваних зразків, наприклад, коли встановлений несподіваний або аномальний результат, який може вплинути на безпеку пацієнта.

5.5. Інтегрування

Інтегрування і повторне інтегрування хроматограм потрібно описати в СОПі. Будь-яке відхилення від цього СОПу необхідно представити в аналітичному звіті. Параметри інтегрування хроматограм, а у випадку повторного інтегрування, дані початкового і кінцевого інтегрування повинні бути задокументовані в лабораторії та бути доступними за запитом. Для отримання більш детальної інформації звертайтесь до настанови «Пояснення для лабораторій, що проводять аналіз або оцінку зразків клінічних досліджень (EMA/INS/GCP/532137/2010 «Reflection Paper for Laboratories That Perform the Analysis or Evaluation of Clinical Trial Samples») Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА).

6. Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків

Використання калібрувальних стандартів і зразків QC під час валідації не може в повній мірі імітувати фактичні досліджувані зразки. Відмінності, наприклад, при зв'язуванні з білками, зворотному перетворенні відомих і невідомих метаболітів, неоднорідності зразків або супутні лікарські засоби можуть впливати на правильність і прецизійність визначення аналіту в таких зразках під час їх обробки і зберігання. Тому рекомендується оцінити правильність визначення аналіту в отриманих зразках шляхом повторного аналізу частини досліджуваних зразків в окремих циклах в різні дні. Ступінь тестування залежить від аналіту і досліджуваних зразків і має базуватися на поглибленому розумінні аналітичної методики та аналіту. Проте, як керівництво, 10 % зразків мають бути обов'язково повторно проаналізовані, якщо їх загальна кількість менше 1000 і 5 % – при кількості зразків, що перевищує 1000. Крім того, рекомендується брати зразки близько C_{max} та у фазі елімінації.

Різниця у відсотках між початковою концентрацією та концентрацією, виміряною під час повторного аналізу, не повинна перевищувати 20 % їх середнього значення принаймні для 67 % повторів. Для розрахунків слід використовувати наступне рівняння:

$$Різниця\ \% = \frac{(повторне\ значення - початкове\ значення)}{середнє\ значення} \times 100\%$$

Значні відмінності між результатами можуть вказувати на аналітичні проблеми і мають бути досліджені. Якщо обов'язковий повторний аналіз показав відхилення результатів, необхідно вжити відповідні заходи для мінімізації неправильності (та непрецизійності).

Обов'язковий повторний аналіз зразків повинен проводитися як мінімум, в наступних випадках:

• при токсикокінетичних дослідженнях для кожного виду;

• у всіх основних дослідженнях біоеквівалентності;

• при перших клінічних дослідженнях на здорових добровольцях;

• при перших дослідженнях на пацієнтах з печінковою та/або нирковою недостатністю.

У разі досліджень на тваринах, обов'язковий повторний аналіз зразків може проводитися тільки в ранній фазі досліджень, якщо вони репрезентативні для основних досліджень з точки зору введеної дози та отриманих концентрацій.

Зразки не слід об'єднувати, оскільки об'єднання може зменшити аномальні результати.

7. Методики аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів

7.1. Валідація методики

Методики аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів або імуноферментні методики аналізу використовуються, в основному, для аналізу макромолекул. Принципи валідації і міркування щодо аналізу досліджуваних зразків, як зазначалося вище, повинні застосовуватися також і до методик, що базуються на зв'язуванні лігандів. Через притаманну для структури макромолекул складність будови, процес екстракції ненадійний, і аналізи часто виконуються без попереднього виділення досліджуваного аналіту. Крім того, ці аналізи проводять опосередковано, шляхом вимірювання реакції зв'язування макромолекули з реагентами, які використовуються в аналізі. З огляду на зазначені причини декілька питань потребують особливої уваги.

7.1.1. Повна валідація

7.1.1.1. Стандартні зразки

Макромолекули неоднорідні, а їх активність і імунореактивність може змінюватися. Референтний матеріал повинен бути належним чином охарактеризований і задокументований (наприклад, сертифікат аналізу і походження). Повинен бути придбаний найчистіший стандартний зразок, доступний в той час. Наполегливо рекомендується, щоб серія стандартного зразка, що використовується для підготовки калібрувальних стандартів і зразків QC, була тією ж, яка використовувалася для дозування в доклінічних і клінічних дослідженнях. У разі зміни серії, перед використанням необхідно провести аналітичну характеристику і біоаналітичну оцінку, для того щоб гарантувати, що робочі характеристики методики не змінились.

7.1.1.2. Специфічність

Специфічність зв’язуючого(-их) реагенту(-ів) визначається його (їх) здатністю зв’язуватися виключно з досліджуваним аналітом. Специфічність пов’язана з концепцією перехресної реактивності. В ідеалі зв’язуючий реагент повинен бути настільки специфічним, щоб була відсутня перехресна реакція зі структурно «супровідними сполуками» (наприклад, ендогенні сполуки, лізоформи, варіанти форми аналіту або фізико-хімічно подібні сполуки), або з очікуваним супутнім лікарським засобом. Під час розробки і валідації методики часто ці «споріднені молекули» недоступні. Оцінка специфічності може бути проведена після звершення початкової валідації, коли з’явиться більше даних про поведінку аналіту. Специфічність слід оцінювати на зразках QC, додаючи зростаючі концентрації наявних «споріднених молекул» або супутніх лікарських засобів, які, як очікується, будуть вводитися одночасно в матрицю зразка лікарського засобу (матриця, отримана від тварин або суб’єктів, яка ніколи раніше не підлягала впливу аналіту), а також визначаючи правильність досліджуваної макромолекули при LLOQ і ULOQ. Критерії прийнятності аналізу зразків QC повинні бути в межах 25 % від номінальних значень.

7.1.1.3. Селективність

Селективність методики аналізу, що базується на зв’язуванні лігандів – це здатність вимірювати досліджуваний аналіт за наявності неспоріднених сполук в матриці. Як правило, будь-яка екстракція відсутня, що обумовлено притаманними макромолекулі властивостям. До того ж, неспоріднені сполуки, присутні в матриці, наприклад,

фрагменти ферментів, гетерофільні антитіла або ревматоїдний фактор, можуть перешкоджати досліджуваному аналіту в аналізі, що базується на зв’язуванні лігандів. Селективність перевіряється шляхом додавання аналіту до матриці, отриманої, як мінімум з 10 джерел, в концентрації, рівній або близькій до LLOQ. Ці джерела повинні включати ліпемічні та гемолізовані зразки. Також потрібно включати джерела від популяцій з відповідними захворюваннями. Селективність слід оцінювати на нижній межі методики аналізу, де проблеми виникають у більшості випадків. Також доцільно оцінювати селективність при більш високих концентраціях аналіту. У разі залежності інтерференції від концентрації, важливо встановити мінімальний поріг концентрації, коли інтерференція виникає. Можливо, буде необхідно відкоригувати нижню межу кількісного визначення перед початком валідації. Правильність повинна бути в межах 20 % (при LLOQ – 25 %) від номінальної концентрації, принаймні, в 80 % оцінюваних матриць.

7.1.1.4. Ефект переносу

Якщо використовуються автоматизовані системи обробки рідини, потенціал для переносу слід досліджувати розміщуючи зразки «бланк матриці» після зразків з високою концентрацією аналіту або калібрувального стандарту на верхній межі кількісного визначення.

7.1.1.5. Вибір матриці

Вимірювання деяких молекул може бути неможливим в складних матрицях без екстракції через високі інтерференції з високими рівнями структурно споріднених ендогенних сполук. Хоча застосування екстрагованої матриці (наприклад, деревного вугілля, імунної афінності) або альтернативної матриці (наприклад, протеїнових буферів, діалізованої сироватки) не рекомендується, застосування таких матриць може бути необхідним, коли немає іншої можливості кількісного визначення досліджуваного аналіту. Калібрувальна стандартна крива може бути приготовлена в цих сурогатних матрицях. Зразки QC повинні бути приготовлені в матриці реальних зразків, а правильність повинна бути розрахована для підтвердження відсутності ефекту матриці.

7.1.1.6. Мінімально необхідне розведення

Оскільки деякі матриці можуть проявляти високий фоновий сигнал, може бути потрібним визначити мінімально необхідне розведення. Мінімально необхідне розведення – це найменше розведення, до якого потрібно розвести зразок в буфері, щоб оптимізувати правильність і прецизійність в аналізі циклу шляхом зменшення співвідношення сигнал/шум. Зразки з внесеною кількістю аналіту слід готувати в тій же матриці, що і досліджувані зразки для визначення мінімально необхідного розведення.

7.1.1.7. Калібрувальна крива

Функція відгуку калібрувальної кривої вимірюється опосередковано і, як правило, нелінійна і часто сигмоїдальна. Мінімум 6 калібрувальних стандартів повинні виконуватись двічі. Калібрувальні стандарти повинні розташовуватись приблизно рівномірно на логарифмічній шкалі в межах очікуваного діапазону. Додатково до калібрувальних стандартів «опорні калібратори» поза межами діапазону кількісного визначення можуть бути використанні для полегшення точнішого опису кривої. При валідації слід оцінювати мінімум 6 незалежних циклів. Результати повинні бути представлені в таблиці для представлення загальної робасності регресійної моделі калібрувальної кривої. Калібрувальний стандарт може бути виключений із кривої через визначену технічну помилку (наприклад, помилка при відмірюванні піпеткою).

Визначені регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути в межах 20 % від номінального значення (25 % при LLOOQ і ULOQ), принаймні, для 75 % калібрувальних стандартів. Для «опорних калібраторів» не потрібні критерії прийнятності, оскільки вони знаходяться за межами кількісного діапазону кривої.

7.1.1.8. Прецизійність і правильність

Для оцінки правильності і прецизійності зразки QC повинні бути не свіжоприготовленими, а повинні бути замороженими і обробленими тим же способом, що і для аналізу досліджуваних зразків. Принаймні, 5 зразків QC (очікуваний LLOQ; зразок концентрації якого менше трикратного LLOQ; середній; високий; очікуваний ULOQ) мають бути використані для оцінки правильності, прецизійності і повної невизначеності результатів аналізу. Валідація повинна імітувати реальний аналіз досліджуваних зразків, тобто, якщо досліджуваний зразок вимірюється двічі (використовуючи 2 лунки), як рекомендовано, то і під час валідації зразки QC необхідно

проаналізувати двічі (використовуючи 2 лунки на зразок QC). Вимірювання слід виконувати для щонайменше 6 незалежних циклів протягом декількох днів. Щодо внутрішньосерійної та міжсерійної правильності, середня концентрація повинна бути в межах 20 % від номінального значення кожного рівня концентрації (25 % при LLOQ і ULOQ). Внутрішньосерійна та міжсерійна прецизійність не повинна перевищувати 20 % (25 % при LLOQ і ULOQ). Крім того, загальна похибка (тобто сума абсолютного значення відносної похибки у відсотках і коефіцієнта варіації у відсотках) не повинна перевищувати 30 % (40 % при LLOQ і ULOQ).

7.1.1.9. Лінійність при розведенні

Через вузький діапазон калібрувальної стандартної кривої необхідно довести за допомогою зразків QC, що досліджуваний аналіт присутній в концентраціях, що перевищують діапазон кількісного визначення (вище ULOQ), може бути точно виміряний при кількісному аналізі після розведення зразком «бланк матриці» для попадання концентрацій аналіту в валідований діапазон для аналізу. Додатковою причиною для проведення експериментів з розведенням є виявлення можливої прозони (проаглютинаційної зони) або «хук ефекту» (hook effect), тобто пригнічення сигналу, спричинене високими концентраціями аналіту. Регресійно розрахована концентрація для кожного розведення повинна бути в межах 20 % від номінальної концентрації після поправки на розведення, а прецизійність кінцевих концентрацій за всіма розведеннями не повинна перевищувати 20 %.

7.1.1.10. Паралелізм

Якщо досліджувані зразки доступні, слід оцінити паралелізм між калібрувальною стандартною кривою і серійно розведеними досліджуваними зразками для виявлення можливого ефекту матриці або різної спорідненості з метаболітами. Досліджуваний зразок з високою концентрацією аналіту (переважно близькою до C_{max}) повинен бути розведений, принаймні, до трьох концентрацій «бланком матриці». Прецизійність між зразками в серії розведень не повинна перевищувати 30 %. У випадку, якщо зразок не розводиться лінійно (тобто не паралельно) потрібно заздалегідь визначити процедуру представлення результату у звіті. Якщо досліджувані зразки недоступні під час валідації методики, паралелізм слід оцінювати, як тільки досліджувані зразки стануть доступними.

7.1.1.11. Стабільність зразків

Стабільність аналіту оцінюють використовуючи зразки на низькому і високому рівні зразків QC, описаних вище (розділ 4.1.9.). Як уже згадувалося раніше, дослідження стабільності повинно охоплювати короткочасну стабільність при кімнатній температурі або при температурі обробки зразка, а також стабільність при заморожуванні/таненні. Крім того, довгострокову стабільність при заморожуванні слід вивчати при кожній температурі, при якій зберігатимуться досліджувані зразки.

Середня концентрація на кожному рівні повинна бути в межах 20 % від номінальної концентрації.

7.1.1.12. Реагенти

Критичні реагенти, включаючи реагенти зв'язування (наприклад, зв'язуючі білки, аптамери, антитіла або кон'юговані антитіла) і ті, що містять ферментативні компоненти, мають прямий вплив на результати кількісного аналізу, і тому їх якість має бути гарантована. Відповідно, при зміні серії реагентів під час валідації або аналізу зразків аналітичні показники методики повинні бути перевірені для впевненості в тому, що вона не змінилася в порівнянні з оригінальною або попередньою серією.

Для доведення стабільності виконання методики слід детально документувати умови, що гарантують підтримання стабільності як для некритичних реагентів (наприклад, буферів, розчинників або реагентів окислення), так і, що більш важливо, для критичних реагентів.

7.1.1.13. Комерційні набори

Комерційні набори можуть бути розроблені для інших цілей, а не для досліджень фармакокінетики. Тому,комерційні набори необхідно повторно валідувати для підтвердження того, що зразки LLOQ і QC в реальному діапазоні концентрацій, які будуть використовуватись для аналізу зразків, працюють достовірно і точно. Принципи валідації перелічені вище застосовуються.

7.2. Часткова і перехресна валідація

Всі аспекти валідації, описані в попередніх розділах 4.2 і 4.3 застосовуються до методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів.

7.3. Аналіз досліджуваних зразків

7.3.1. Аналітичний цикл

Найчастіше для методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів застосовуються мікротитраційні планшети. Аналітичний цикл може включати декілька окремих планшетів, але кожен планшет повинен містити індивідуальний набір калібрувальних стандартів і зразків QC для компенсації відмінностей в експлуатаційних характеристиках планшетів. Ємкість пробовідбірника на деяких платформах може бути обмежена. Тоді може бути прийнятним, щоб набір калібрувальних стандартів був розміщений на першу і останню платформи, а зразки QC – окремо на кожну платформу.

Рекомендується аналізувати досліджуваний зразок двічі, тобто використовуючи 2 лунки замість 1.

7.3.2. Критерії прийнятності для аналізу досліджуваних зразків

Регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні знаходитися в межах 20 % від номінального значення, за винятком LLOQ і ULOQ, для яких вони повинні знаходитися в межах 25 %. Принаймні, 75 % калібрувальних стандартів, як мінімум, по 6 калібрувальних рівнях, повинні відповідати цьому критерію. Ця вимога не застосовується до «опорних калібраторів», що не входять в діапазон калібрувальних кривих.

Кожен планшет повинен включати щонайменше 3 рівня зразків QC (низький, середній і високий), як мінімум, в дублікаті. Також під час валідації дослідження QC-зразки повинні імітувати аналіз досліджуваних зразків щодо кількості лунок, використаних на досліджуваний зразок. Принаймні, 67 % зразків QC і 50 % на кожному рівні концентрації повинні бути в межах 20 % від номінального значення. Відхилення від цього критерію повинні бути обґрунтовані.

7.3.3. Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків

Всі міркування щодо обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків, описані в попередньому розділі 6 застосовуються до методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів. Концентрація, отримана для початкового аналізу, і концентрація, отримана при повторному аналізі, повинна бути в межах 30 % від їх середнього значення, принаймні, для 67 % повторів.

8. Звіти

Інформація щодо проведених аудитів/інспекції повинна бути включена у звіт(и).

8.1. Звіт з валідації

Залежно від рівня деталізації інформації, представленої у звіті з валідації, може бути достатньо посилання на СОПи для відповідних процедур аналізу. В іншому випадку ці СОПи повинні бути додані до звіту.

Всі вихідні дані повинні бути доступні в оригінальному форматі і надаватися за запитом.

Будь-яке відхилення від протоколу валідації повинно бути зафіксовано.

Звіт з валідації повинен містити щонайменше таку інформацію:

• резюме характеристик валідації;

• детальна інформація про застосовувану аналітичну методику і за необхідності джерела аналітичної методики (посилання на джерела літератури та/або зміни в процедурі);

• детальна інформація про процедуру кількісного аналізу (аналіт, внутрішній стандарт, попередня обробка зразка, екстракція та аналіз);

• стандартні зразки (походження, номер серії, сертифікат аналізу, стабільність і умови зберігання);

• калібрувальні стандарти і зразки QC (матриця, антикоагулянт, якщо застосовується, приготування, дати приготування і умови зберігання);

• критерії прийнятності циклу;

• аналіз:
- таблиця всіх аналітичних циклів із зазначенням дат аналізу, прийнятих або відхилених, та причин відхилення;
- таблиця результатів калібрування всіх прийнятних аналітичних циклів, включаючи калібрувальний діапазон, функцію відгуку, регресійно розраховані концентрації і правильність;
- таблиця результатів аналізу зразків QC для всіх прийнятних аналітичних циклів (внутрішньосерійна і міжсерійна прецизійність та правильність); значення, що не відповідають критеріям прийнятності, потрібно чітко виділити;

- дані зі стабільності основного розчину, робочого розчину, QC, що охоплюють застосовувані умови зберігання;
- дані з селективності, LLOQ, ефекту переносу, ефекту матриці, якщо використовується, допустимості розведення;

• неочікувані результати, отримані під час валідації з повним обґрунтуванням вжитих дій;

• відхилення від методики та/або СОП (опис відхилень, вплив на дослідження, підтверджувальні дані).

Всі вимірювання з індивідуально розрахованими концентраціями повинні бути представлені у звіті з валідації.

8.2. Аналітичний звіт

Аналітичний звіт повинен включати посилання на звіт(и) з валідації, що застосовується для аналізу досліджуваних зразків. Крім того, він повинен включати детальний опис аналізу досліджуваних зразків.

Якщо аналітичний звіт надає детальну інформацію, достатньо посилання в аналітичному звіті на специфічні для аналізів СОП. Інакше СОПи повинні додаватися до аналітичного звіту.

Всі вихідні дані повинні бути доступні в їх оригінальному форматі і надаватися за вимогою.

Будь-які відхилення від протоколу, аналітичної процедури і СОП повинні також обговорюватися в аналітичному звіті.

Аналітичний звіт повинен містити щонайменше таку інформацію:

• стандартні зразки (походження, серія, сертифікат аналізу, стабільність, умови зберігання);

• калібрувальні стандарти і зразки QC (умови зберігання);

• критерії прийнятності циклу (короткий опис, посилання на специфічний протокол або СОП);

• процедура кількісного аналізу (короткий опис);

• простежуваність зразка (дати отримання і вміст, стан зразка при отриманні, місце і умови зберігання, якщо необхідно);

• аналіз досліджуваного зразка;

- склад аналітичного циклу;

• таблиця, в якій вказані всі аналітичні цикли і досліджувані зразки з зазначенням дат аналізів і результати;

- таблиця результатів аналізу калібрувальних стандартів всіх (прийнятних) аналітичних циклів;
- таблиця результатів зразків QC для всіх (прийнятних) аналітичних циклів; значення, що не відповідають критеріям прийнятності, повинні бути чітко виділені;

• відхилені аналітичні цикли (ідентичність, дата аналізу, причина відхилення);

• відхилення від методики та/або СОП (опис відхилень, вплив на дослідження, підтверджувальні дані);

• повторний аналіз, виключаючи повторний аналіз через аналітичні причини, такі як відхилений цикл (таблиця ідентифікації зразка, причина повторного аналізу, первинні значення і значення, отримані при повторному аналізі).

Результати обов’язкового повторного аналізу досліджуваних зразків можна представити або у звіті з валідації, або в аналітичному звіті, або в окремому звіті.

Для дослідження біоеквівалентності всі хроматограми з циклів, які включають 20 % суб’єктів, у т. ч. відповідні зразки QC і калібрувальні стандарти, повинні бути додані до аналітичного звіту. Для інших досліджень до звіту слід додати репрезентативні хроматограми. Додаткові хроматограми повинні бути доступні за запитом.

Доповнення 1

Висушені плями крові

Технологія висушеної плями крові (dried blood spot, DBS) розробляється вже кілька років. Переваги DBS включають зменшення об’єму зразків крові необхідного для аналізу лікарського засобу, а також простоту відбору зразків, зберігання та транспортування. Перш ніж використовувати DBS в регуляторних дослідженнях, необхідна додаткова валідація цього підходу до відбору зразків. Ця валідація повинна, як мінімум, вирішувати вплив таких факторів: температури зберігання та обробки, однорідності формування кров’яних плям зі зразка, гематокриту, стабільності, переносу та відтворюваності, включаючи обов’язковий повторний аналіз зразків (incurred sample reanalysis, ISR). Під час розробки лікарських засобів необхідно провести кореляційні дослідження з традиційним відбором проб.

НАЦІОНАЛЬНИЙ ДОДАТОК
(довідковий)

Перелік редакційних змін та доповнень

Ця настанова розроблена на підставі настанови з валідації біоаналітичної методики (CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation») Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА) розробленої Комітетом з лікарських засобів для медичного призначення (CHMP) [10].

Організація, відповідальна за цю настанову, – Міністерство охорони здоров'я (далі – МОЗ) України.

Настанова містить положення, що відповідають чинному законодавству.

До цієї настанови було внесено окремі зміни, зумовлені правовими вимогами та прийнятими в Україні гармонізованими нормативними документами. Деякі редакційні зміни було внесено безпосередньо у пункти, яких вони стосуються; ці зміни позначено іншим шрифтом та літерою ^{N}.

До настанови внесено такі редакційні зміни та додаткову інформацію:

- назву цієї настанови наведено відповідно до вимог ДСТУ 1.5:2015 «Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів» [4], а позначення – відповідно до вимог стандарту СТ МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення» [3];

- додатково введено такі структурні елементи настанови, як «Передмова», «Національний вступ», «Сфера застосування», «Нормативні посилання», «Терміни та визначення понять», «Познаки та скорочення», а також Доповнення 1 відповідно до інформації, викладеної в документі [13], та національний додаток «Бібліографія», оформлені відповідно до вимог ДСТУ 1.5:2015 «Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів» [4] та ДСТУ 1.7:2015 «Національна стандартизація. Правила та методи прийняття та застосування міжнародних і регіональних нормативних документів» [5]. Розділ «Зміст» цієї настанови подано з урахуванням додаткових структурних елементів;

- кожний структурний елемент та його номер у даній настанові відповідають таким у настанові з валідації біоаналітичної методики

(CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation») [10];

- розділ «Терміни та визначення понять» викладено на підставі розділу «Definition» настанови з валідації біоаналітичної методики (CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation») [10]. Цей розділ не позначено номером та викладено після розділу «Нормативні посилання». Усі терміни у розділі «Терміни та визначення понять» наведено в алфавітному порядку;

- у розділі «Нормативні посилання» додатково наведено бібліографічний опис нормативних документів, що згадуються у даній настанові;

- у національному додатку «Бібліографія» додатково наведено бібліографічний опис нормативних документів, на які є посилання у даній настанові;

- у цій настанові назву «валідація біоаналітичної методики» («Guideline on bioanalytical method validation») замінено на «біоаналітична частина дослідження», оскільки в настанові висвітлені не тільки питання валідації біоаналітичної методики, а також наведено вимоги та критерії щодо застосування валідованих біоаналітичних методик у рутинному аналізі досліджуваних зразків, отриманих в доклінічних дослідженнях на тваринах та клінічних дослідженнях на людях;

- додатково до посилань на настанови ЄС зроблено посилання на відповідні гармонізовані документи, затверджені в Україні;

- в розділ 1 додатково внесено уточнення щодо типів лікарських засобів для яких можуть проводитись дослідження з вимірюванням концентрації діючих речовин в біологічних матрицях;

- додатково настанову доповнено інформацією з настанови з валідації біоаналітичної методики для промисловості («Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry») підготовленої Центром оцінки та досліджень лікарських засобів та Центром ветеринарної медицини при Управлінні продуктів харчування та лікарських засобів (Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) щодо можливості використання технології висушених плям крові при проведенні біоаналітичної частини дослідження. Дана інформація представлена в Доповненні 1 [13].

НАЦІОНАЛЬНИЙ ДОДАТОК
(довідковий)

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» у редакції наказу Міністерства охорони здоров'я України від 23 липня 2015 року № 460, зареєстрований у Міністерстві юстиції України 07 жовтня 2015 року за № 1210/27655.

2. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 16 лютого 2009 року № 95.

3. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 14 вересня 2005 року № 471 «Про затвердження документів з питань стандартизації фармацевтичної продукції».

4. ДСТУ 1.5-2015 Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів.

5. ДСТУ 1.7-2015. – Національна стандартизація. Правила та методи прийняття та застосування міжнародних і регіональних нормативних документів.

6. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council, of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (Директива 2001/83/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 6 листопада 2001 року про кодекс Співтовариства відносно лікарських засобів для медичного призначення).

7. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (codified version) (Директива 2004/10/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про гармонізацію законів; постанов і адміністративних положень, що стосуються застосування принципів належної лабораторної практики і перевірки їх застосування при дослідженні хімічних речовин).

8. Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) (Директива 2004/9/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про інспекцію та перевірку належної лабораторної практики).

9. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Notice to Applicants V. 2A - Procedures for marketing authorisation CHAPTER 1 MARKETING AUTHORISATION (Правила, що регулюють лікарські препарати в Європейському Союзі. – Том 2А. – Процедури реєстрації РОЗДІЛ 1 РЕЄСТРАЦІЯ).

10. CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation» (Настанова з валідації біоаналітичної методики).

11. EMEA/P/24143/2004 Rev.1 corr «Procedure for European Union guidelines and related documents within the pharmaceutical legislative framework, 2005» (Процедура відносно настанов та супровідних документів Європейського Союзу в рамках фармацевтичного законодавства, 2005).

12. EMA/INS/GCP/532137/2010 «Reflection Paper for Laboratories That Perform the Analysis or Evaluation of Clinical Trial Samples» (Пояснення для лабораторій, що проводять аналіз або оцінку зразків клінічних досліджень).

13. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) «Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry» (Настанова з валідації біоаналітичної методики для промисловості).