

**В.В. Писарев**  
к.х.н., info@probiotech.ru  
**М.М. Уляшова**  
к.х.н.

## ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ ЕМА

Научно-производственный центр «Пробиотек», г. Москва

**Писарев В.В., Уляшова М.М. Проведение исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в Российской Федерации в соответствии с требованиями ЕМА**

В данной статье приводится сравнительный анализ требований РФ и Европейского союза, предъявляемых к проведению исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов. Описаны подходы к валидации биоаналитических методов и рутинному анализу биологических образцов в соответствии с документами Европейского агентства лекарственных средств (ЕМА). Рассмотрены вопросы организации системы обеспечения и контроля качества при проведении исследований биоэквивалентности. Показано, что отечественные методические указания по многим вопросам соответствуют мировым стандартам, однако существуют некоторые аспекты, которые не освещены в данных указаниях, но являются достаточно важными и давно применимы в мировой практике.

**Ключевые слова:** биоэквивалентность, исследование, лекарственные препараты, дженерики.

**Pisarev V.V., Ulyashova M.M. Bioequivalence studies of drugs in the Russian Federation in accordance with the requirements of the EMA**

This article tells about a comparative analysis of requirements of the Russian Federation and the European Union for bioequivalence studies of drugs. Approaches to validation of bioanalytical methods and routine analysis of biological samples in accordance with the documents of the European Medicines Agency (EMA) are described. The issues of organizing quality assurance and quality control in bioequivalence studies are described. Local guidance on a number of matters is compliant with international standards, however there are some aspects that are not covered in those instructions which are relevant and have long existed in global practice.

**Keywords:** bioequivalence, study, drugs, generic drugs.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

БЭ — биоэквивалентность;  
ЛП — лекарственные препараты;  
ЕМА — European Medicines Agency, Европейское агентство лекарственных средств;  
GCP — Good Clinical Practice, надлежащая клиническая практика;  
ИРК — индивидуальные регистрационные карты;  
ИМТ — индекс массы тела;  
 $T_{1/2}$  — период полувыведения;  
 $C_{\max}$  — максимальная концентрация ЛП в крови;  
 $T_{\max}$  — время достижения максимальной концентрации ЛП в крови;  
 $AUC_{0-\infty}$  — площадь под фармакокинетической кривой, экстраполированная до бесконечности;  
 $AUC_{0-t}$  — площадь под фармакокинетической кривой от 0 до времени отбора последнего образца крови с определяемой концентрацией активного вещества;  
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;  
ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием;  
GLP — Good Laboratory Practice, надлежащая лабораторная практика.

**К**ак известно, большая часть лекарственных препаратов (ЛП), находящихся в обращении на территории РФ, являются не оригинальными препаратами, а их воспроизведенными аналогами, т.н. дженериками. Напомним, что оригинальный препарат — это впервые синтезированное и прошедшее полный цикл исследований лекарственное средство, активные компоненты которого защищены патентом на определенный срок. Дженерик — воспроизведенное лекарственное средство, содер-

жащее такую же фармацевтическую субстанцию или комбинацию таких же фармацевтических субстанций в такой же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство, и поступившее в обращение по окончании срока патентной защиты оригинального лекарственного средства. По последним данным, доля дженериков на российском фармрынке в настоящее время составляет от 77 до 88% [1]. При этом следует отметить, что увеличение доли воспроизведенных ЛП в общем лекарственном обороте является одной из основных тенденций развития, характерных для фармацевтических рынков всех развитых стран.

При проведении медико-биологического контроля воспроизведенных ЛП основным критерием качества, принятым как в странах Европейского союза, так и в РФ, является их биоэквивалентность оригинальным ЛП [2, 3]. Биоэквивалентность (БЭ), или фармакокинетическая эквивалентность, определяется как идентичность двух фармацевтически эквивалентных лекарственных средств по основным фармакокинетическим параметрам (степени и скорости всасывания лекарственного вещества, значению максимальной концентрации лекарственного вещества в крови) в исследованиях с участием здоровых добровольцев. При этом с точки зрения Европейского агентства лекарственных средств

(European Medicines Agency, EMA) исследования БЭ необходимы не только для того, чтобы продемонстрировать сходство между воспроизведенным и оригинальным препаратами по основным фармакокинетическим показателям. Такие исследования предоставляют также реальную возможность переноса данных об эффективности и безопасности, полученных для оригинального препарата, на воспроизведенный препарат в более сжатые сроки, чем при проведении клинических исследований [3].

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕБОВАНИЙ РФ И ЕС К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ЛП

В настоящее время проведение исследований биоэквивалентности ЛП в РФ регламентируется методическими указаниями Министерства здравоохранения и социального развития «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» [2].

Учитывая, что в европейских странах данный вид исследований ЛП имеет более продолжительную историю применения, несомненный интерес для специалистов представляют также и соответствующие документы, принятые в этих странах. Помимо принципов надлежащей клинической практики (Good clinical practice, GCP), к документам, регламентирующим проведение исследований БЭ в ЕС, относятся следующие руководства EMA:

- для лекарственных препаратов с немедленным высвобождением — «Guideline on the investigation of bioequivalence» [3];
- для препаратов с модифицированным высвобождением и трансдермальных лекарственных форм — «Modified release oral and transdermal dosage forms: section II (pharmacokinetic and clinical evaluation)» [4].

Следует отметить, что отечественные методические указания по проведению исследований БЭ не являются аналогом зарубежных руководств, хотя по ряду ключевых вопросов соответствуют им. Сравнительная характеристика требований РФ и EMA к исследованиям биоэквивалентности представлена в *таблице*. Рассмотрим подробнее ключевые моменты.

#### Объекты исследования

Объектами исследования (и в РФ, и в ЕС) являются как однокомпонентные, так и многокомпонентные воспроизведенные ЛП, предназначенные для приема внутрь, накожных аппликаций, ректального введения, при условии, что их действие опосредовано появлением лекарственного вещества в системном кровотоке. Оценка БЭ проводится для всех лекарственных форм, обеспечивающих как немедленное, так и постепенное высвобождение лекарственного вещества.

В качестве препарата сравнения используется преимущественно зарегистрированный оригинальный ЛП, при этом содержание действующего вещества в исследуемом ЛП и препарате сравнения не должно отличаться более чем на 5%.

С практической точки зрения важным дополнением в европейском руководстве является указание на то, что перед доставкой в клинический центр или уже в самом клиническом центре исследуемый препарат и препарат сравнения должны распределяться в индивидуальные для каждого добровольца и этапа исследования промаркированные контейнеры в соответствии со схемой рандомизации. Маркировка контейнера должна обязательно содержать информацию, идентифицирующую добровольца, а также номер этапа исследования и название препарата (в случае, если это открытое исследование). На контейнерах рекомендуется использовать отрывные этикетки, которые после приема препаратов наклеивают в индивидуальные регистрационные карты (ИРК) соответствующих добровольцев. Это позволяет свести к минимуму возможные ошибки при дозировании препаратов. Все процедуры распределения, дозирования и учета исследуемых препаратов должны быть подробно задокументированы в файле исследователя.

#### Субъекты исследования

В большинстве случаев исследования БЭ проводятся на здоровых добровольцах обоего пола. По требованиям РФ возрастной диапазон добровольцев должен составлять 18–45 лет, в Европе — старше 18 лет. Отсутствие верхней возрастной границы является преимуществом европейского руководства — это позволяет ограничить верхний предел в зависимости от фармакологических свойств ЛП. Для большинства ЛП он составляет 55 лет. Однако существуют препараты, прием которых у молодого населения с высокой вероятностью может вызывать серьезные нежелательные явления. Так, например, было показано, что у населения до 35 лет частота возникновения дистонических реакций на арипипразол в 15 раз выше, чем у пациентов в возрасте 60–80 лет, поэтому в исследование БЭ препаратов арипипразола рекомендуется включать добровольцев старше 45 лет [5].

Относительно количества добровольцев оба руководства сходятся в том, что их должно быть достаточно для обеспечения статистической значимости результатов исследования, поэтому на этапе разработки дизайна исследования должен быть произведен расчет объема выборки с привлечением статистических методов. Однако минимальное количество добровольцев в исследовании БЭ по российским требованиям — 18 человек, согласно EMA — не менее 12 человек. При этом стоит отметить, что цифра 12 в европейском руководстве достаточно условная, т.к. большая часть исследований БЭ в Европе проводится на 24 добровольцах и более.

Небольшие различия наблюдаются также и в требованиях к индексу массы тела (ИМТ) добровольцев, курению и методам контрацепции (*табл.*).

Ни российское, ни европейское руководства не исключают возможности проведения исследований БЭ на пациентах. EMA рекомендует исследования на пациентах, когда профиль безопасности препарата является неприемлемым

для здоровых добровольцев. В России исследования БЭ на пациентах проводятся лишь в отношении психотропных, противоопухолевых ЛП и ЛП, применяющихся при лечении ВИЧ-инфекции.

### Дизайн исследования

Согласно и российскому, и европейскому руководствам стандартный дизайн исследования БЭ — это открытое рандомизированное перекрестное исследование с однократным приемом каждого из препаратов по сбалансированной схеме с двумя периодами и двумя последовательностями приема препаратов. Многократный прием препаратов допускается в случае недостаточной чувствительности аналитического метода или когда внутрииндивидуальная вариабельность при однократном приеме выше, чем при его длительном введении. Помимо данного стандартного дизайна европейское руководство предлагает также ряд альтернативных дизайнов: для ЛП с продолжительным периодом полувыведения ( $T_{1/2}$ ) рекомендуется параллельный дизайн, для высоковариабельных ЛП — перекрестный дизайн с повторами (исследование в этом случае проводится в 4 этапа).

Интервал («период вымывания») между приемом исследуемых препаратов должен быть достаточным для выведения всей дозы ранее принятого препарата из организма. По требованию ЕМА он должен быть как минимум в пять раз больше, а по требованиям отечественного руководства — в шесть раз больше периода полувыведения активного вещества из организма. В руководстве ЕМА также приведена методика определения адекватности периода полувыведения: перед вторым приемом препарата концентрация определяемого вещества в крови добровольца не должна превышать предел количественного определения биоаналитической методики (5% и менее от максимальной концентрации ( $C_{max}$ )).

Согласно российскому руководству при проведении исследований БЭ концентрация активного вещества может определяться только в плазме, сыворотке или крови. ЕМА допускает еще и использование параметров выведения препарата с мочой, когда невозможна точная оценка профиля «концентрация в плазме/крови — время».

В основном оценка БЭ должна быть основана на измерении концентраций исходного соединения. Объясняется это тем, что  $C_{max}$  исходного соединения, как правило, является более чувствительным параметром для выявления различий в скорости всасывания препаратов, чем  $C_{max}$  метаболита. Согласно европейскому руководству использование метаболита вместо исходного соединения допустимо только в том случае, если заявитель предоставит убедительные доводы, что достоверно измерить исходное соединение после однократного приема не представляется возможным. Согласно российскому руководству измерение концентрации терапевтически активного метаболита также применимо, если исходное вещество не обладает биологической активностью (т.е. является пролекарством).

Время отбора образцов крови у добровольцев необходимо планировать так, чтобы обеспечить адекватную оценку фармакокинетических показателей и охватить достаточно большой участок кривой «концентрация — время». Согласно российскому руководству для лекарственных форм с немедленным высвобождением лекарственного вещества продолжительность наблюдения за его концентрацией при однократном приеме должна быть достаточной для оценки 80% площади под фармакокинетической кривой, экстраполированной до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ) и быть не менее чем в 4 раза больше периода полувыведения. Европейское руководство также рекомендует осуществлять забор крови в течение времени, необходимого для оценки 80% от  $AUC_{0-\infty}$ , однако разрешает в качестве альтернативы площади под фармакокинетической кривой  $AUC_{0-t}$  для оценки БЭ использовать  $AUC$ , усеченную до 72 часов ( $AUC_{0-72}$ ). Из этого следует, что для любых ЛП с медленным высвобождением, независимо от периода полувыведения действующего вещества, отбор образцов в течение более чем 72 часов не требуется. При многократном приеме ЛП длительность наблюдения за стационарными уровнями концентрации лекарственного вещества определяется интервалом дозирования.

По европейским требованиям, в отличие от российского руководства, исследования БЭ проводят по двум типам: «натощак» и «после приема пищи». Проведение исследования «натощак» является стандартным, т.к. это наиболее чувствительная методика для определения возможных различий между сравниваемыми препаратами. Для препаратов, которые применяются только во время или после еды, исследования БЭ проводят «после приема пищи», поскольку питательные свойства и калорийность пищи, ее объем и температура могут быть причиной физиологических изменений в желудочно-кишечном тракте, а также изменений растворимости препарата, его поступления к месту действия и системной биодоступности. Исследования же по двум типам (и натощак, и после приема пищи) рекомендуются для лекарственных форм со специфическими характеристиками, а именно микроэмульсий и суспензий. При этом для исследований «после приема пищи» состав пищи должен соответствовать рекомендуемому в инструкции на препарат сравнения. Если таких рекомендаций нет, то пища должна быть высококалорийной (800–1 000 ккал) и содержать высокий процент жиров (приблизительно 50% от общего содержания калорий).

### Критерии биоэквивалентности

Заключение о БЭ сравниваемых препаратов делается с использованием подхода, основанного на оценке 90%-ных доверительных интервалов для отношений средних значений фармакокинетических параметров  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-t}$  (в Европе последний фармакокинетический параметр для оценки БЭ не используется).

В РФ регуляторными органами согласованы и приняты единые диапазоны БЭ для всех препаратов. ЛП считаются

**Таблица. Сравнительная характеристика требований РФ и ЕС к исследованиям биоэквивалентности**

Критерий	РФ	ЕМА
<b>Объекты исследования биоэквивалентности</b>		
Лекарственные препараты (ЛП)	ЛП системного действия для приема внутрь, наружной аппликации, ректального введения; ЛП с немедленным и с модифицированным высвобождением; однокомпонентные и комбинированные ЛП	
Препарат сравнения	Преимущественно оригинальный зарегистрированный ЛП, при этом содержание действующего вещества в исследуемом ЛП и препарате сравнения не должно отличаться более чем на 5%	
<b>Субъекты исследования биоэквивалентности</b>		
Субъекты	Здоровые добровольцы обоего пола	
Возраст	18–45 лет	Старше 18 лет (как правило, 18-55 лет)
Масса тела	+/- 15% от нормального диапазона для ИМТ (18–25 кг/м <sup>2</sup> )	ИМТ в диапазоне от 18,5 до 30 кг/м <sup>2</sup>
Курение	Не более 10 сигарет в сутки	Некурящие
Минимальное количество	18	В руководстве 12 (но исследования проводят, как правило, на 24 и более)
Тест на беременность	Отрицательный тест на беременность для женщин	
Методы контрацепции	Барьерные методы контрацепции	Разрешаются гормональные контрацептивы
Исследование БЭ с участием пациентов	Только в отношении психотропных, противоопухолевых ЛП и ЛП, применяющихся при ВИЧ-инфекции	Для препаратов с непротым профилем безопасности ЛП
<b>Дизайн исследования биоэквивалентности</b>		
Стандартный дизайн	Открытое рандомизированное перекрестное исследование с однократным приемом каждого из препаратов по сбалансированной схеме с двумя периодами и двумя последовательностями приема препаратов	
Многократный прием ЛП	В случае недостаточной чувствительности аналитического метода; когда внутрииндивидуальная вариабельность при однократном приеме выше	
Альтернативные дизайны	Информация отсутствует	Для ЛП с продолжительным периодом полувыведения ( $T_{1/2}$ ) рекомендуется параллельный дизайн; для высоковариабельных ЛП – перекрестный дизайн с повторами (4 периода)
Определяемое вещество, если действующее вещество в ЛП активно	Исходное вещество	
Определяемое вещество, если активен метаболит	Активный метаболит	Исходное вещество предпочтительно
Виды биологического материала, используемого для определения концентрации вещества	Плазма; сыворотка; цельная кровь	Плазма; сыворотка; цельная кровь; моча
Продолжительность забора биологического материала	Минимум $4 \times T_{1/2}$ и должна быть достаточной для оценки $80\% AUC_{0-\infty}$	Должна быть достаточной для оценки $80\% AUC_{0-\infty}$ , но не превышать 72 часа (для форм с немедленным высвобождением)
Период вымывания	Не менее $6 \times T_{1/2}$	Не менее $5 \times T_{1/2}$
Проведение исследования «натощак» и «после приема пищи»	«Натощак»	Исследования по двум типам
<b>Критерии биоэквивалентности</b>		
$AUC_{0-t}$	80,00–125,00%	80,00–125,00% *для препаратов с узким терапевтическим индексом 90,00–111,11%
$C_{max}$	75,00–133,00%	80,00–125,00% *для препаратов с узким терапевтическим индексом 90,00–111,11% **для высоковариабельных препаратов (intra-subject CV > 30%) может быть расширен до диапазона 69,84–143,19% при условии проведения исследования по перекрестному дизайну с повторами
$C_{max}/AUC_{0-t}$	75,00–133,00%	Не используется
<b>Резко выделяющиеся наблюдения (Outliers)</b>		
Резко выделяющиеся наблюдения (Outliers)	Могут не приниматься в расчет при условии, что справедливость их исключения доказана при помощи специальных статистических тестов	Не могут исключаться на основе статистического анализа или по ФК причинам, за исключением: 1) у добровольца очень низкие концентрации определяемого вещества после приема препарата сравнения ( $AUC < 5\%$ от среднего геометрического значения $AUC$ ); 2) у добровольца концентрация до приема препарата > 5% от $C_{max}$
Примечание. Intra-subject CV — коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности.		

биоэквивалентными, если границы оцененного доверительного интервала для  $AUC_{0-t}$  находятся в пределах 80,00–125,00%. Для показателей  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-t}$ , характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляют 75,00–133,00%. Однако для препаратов с узким терапевтическим индексом (например, дигоксин, теofilлин, карбамазепин), которые могут иметь существенно различающиеся клинические эффекты даже при небольшом изменении дозы, использование подобного подхода может привести к заключению о БЭ препаратов, в то время как на самом деле они небиоэквивалентны. Этого недостатка лишено европейское руководство, согласно которому для лекарственных препаратов с узким терапевтическим диапазоном допустимый интервал для  $AUC_{0-t}$  и  $C_{max}$  должен быть сужен до 90,00–111,11%. Обратная ситуация наблюдается для высоковариабельных препаратов (препараты, для которых внутрииндивидуальная вариабельность фармакокинетического параметра превышает 30%). Для таких препаратов большие различия в значении концентраций считаются клинически незначимыми, и поэтому интервал БЭ для оценки  $C_{max}$  может быть расширен до 69,84–143,19%, при этом степень расширения интервала зависит от коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности.

#### **Резко выделяющиеся наблюдения (outliers)**

При проведении исследований БЭ может быть обнаружено, что у одного или нескольких добровольцев различия между параметрами или их отношениями значимо отличаются от таковых у основной группы (для их обозначения используется английский термин «outliers»). Согласно российскому руководству такие данные могут не приниматься в расчет при условии, что справедливость их исключения из оценки БЭ доказана при помощи специальных статистических тестов.

По руководству ЕМА «outliers» не могут исключаться на основе статистического анализа или по фармакокинетическим причинам, за исключением двух случаев:

- у добровольца концентрация лекарственного вещества в крови до приема препарата составляет > 5% от  $C_{max}$ ;
- у добровольца очень низкие концентрации определяемого вещества после приема препарата сравнения ( $AUC < 5\%$  от среднего геометрического значения  $AUC$  в группе); исключение данных по этой причине допустимо только в исключительных случаях и может подвергнуть сомнению правомерность исследования.

#### **Процедура «Биоэвейвер»**

Руководство ЕМА допускает применение метода «Биоэвейвер» — процедуры, по которой проводится государственная регистрация воспроизведенных ЛП на основе биофармацевтической классификационной системы и результатов сравнительных исследований *in vitro* с использованием теста «Растворение». В РФ данная процедура пока не предусмотрена.

## **КЛЮЧЕВЫЕ МОМЕНТЫ КАЧЕСТВЕННОГО ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЭ**

Методические указания содержат подробное описание процедуры определения биоэквивалентности ЛП с учетом многих нюансов. Однако существуют некоторые практические аспекты, которые не освещены в руководствах, но являются достаточно важными при проведении данного типа клинических исследований. Основываясь на собственном опыте, рассмотрим несколько ключевых моментов качественного проведения исследований БЭ.

Клинический центр, проводящий исследования биоэквивалентности, должен иметь собственную базу данных здоровых добровольцев и тщательно следить за периодичностью участия добровольцев в клинических исследованиях (не чаще чем раз в три месяца). Возможность здоровых добровольцев участвовать в исследовании должна подтверждаться данными, полученными при использовании стандартных лабораторных тестов, сборе анамнеза и общеклинического обследования. При выборе добровольца для каждого последующего исследования стоит тщательно проанализировать информацию об участии добровольца в предыдущем исследовании, особенно в случае его досрочного выбывания, выявить причину (отказ от дальнейшего сотрудничества, появление нежелательных реакций при приеме ЛП, несоблюдение условий протокола исследования).

На протяжении всего исследования, особенно при приеме препаратов и заборе образцов крови, важным моментом является правильная и быстрая идентификация добровольцев — для этих целей могут использоваться специальные идентификационные браслеты или бейджи, содержащие необходимый минимум информации — инициалы добровольца, номер при скрининге, рандомизационный номер.

Поскольку большая часть исследований БЭ проводится «натощак», необходим тщательный контроль приема пищи до приема препаратов — для этого добровольцев необходимо госпитализировать в клинический центр как минимум за 10 часов до приема исследуемых препаратов.

Прием исследуемых препаратов должен проводиться строго под контролем исследователей. При приеме твердых лекарственных форм необходимо следить, чтобы они принимались целиком, не ломались и не разжевывались. Дозирование жидких лекарственных форм должно осуществляться с использованием шприцов. Хорошей практикой является проверка ротовой полости добровольца после приема препарата. Также важным является, чтобы добровольцы запивали препараты одинаковым количеством жидкости.

Особое внимание при проведении исследований БЭ следует уделять питанию и поведению добровольцев после приема препарата. Ключевым моментом является стандартизация потребления пищи и жидкости (одинаковое меню) как после приема исследуемого препарата, так и препарата сравнения. Протоколом исследования должны быть четко установлены определенные часы приема пищи. Добровольцы не

должны принимать другие лекарственные препараты в определенный период до и во время исследования, а также должны воздерживаться от пищи и напитков, которые могут влиять на циркуляцию препарата в организме, а также функцию пищеварительного тракта, печени и почек. Если биодоступность препарата зависит от времени прохождения лекарственного вещества по пищеварительному тракту и от регионального кровообращения, то в таких случаях понадобится стандартизация физической активности добровольцев.

Поскольку целью исследования БЭ является оценка фармакокинетических параметров, важным моментом является четкое соблюдение временного графика забора образцов крови. Любая ошибка регистрации времени забора проб крови вносит дополнительный вклад в вариацию фармакокинетических параметров, используемых при оценке БЭ. Для того чтобы избежать данных ошибок, в палатах, в которых лежат добровольцы, и процедурном кабинете должны быть установлены предварительно синхронизированные электронные часы.

Точное количество образцов крови, необходимое для оценки фармакокинетических профилей исследуемых препаратов, не указано ни в европейском, ни в российском руководствах. При этом стоит отметить, что данный показатель может сильно повлиять на точность расчета фармакокинетических параметров. С целью получения надежной оценки параметров  $C_{\max}$  и  $AUC_{0-t}$  в схеме отбора образцов должно быть предусмотрено как минимум 18–20 точек с более частым их отбором вблизи предполагаемого  $T_{\max}$ . Кроме того, схема отбора образцов должна быть составлена таким образом, чтобы предусматривать 1–2 отбора проб до достижения  $C_{\max}$  и 3–4 отбора – во время фазы элиминации.

Хорошей практикой является разделение отобранных образцов биологической жидкости в дублирующиеся пробирки и доставка их в биоаналитическую лабораторию в два этапа. Эта процедура является дополнительной страховкой от потери образцов при транспортировке.

## ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ИССЛЕДОВАНИЯ БЭ

На сегодняшний день в России не существует нормативных документов, касающихся разработки и валидации биоаналитических методов, применяемых в клинических исследованиях ЛП. В то же время в европейских странах валидация биоаналитических методов является обязательной частью надлежащего проведения исследований фармакокинетики и БЭ и регламентируется руководством «Guideline on bioanalytical method validation» [6]. При этом стоит отметить, что методология валидации биоаналитических методик имеет значительные отличия от методологии валидации обычных методик контроля качества ЛП, что связано со сложным составом биологической матрицы, необходимостью проведения пробоподготовки, а также значительно более низкими концентрациями вещества в анализируемой матрице.

Согласно данному европейскому руководству основные характеристики биоаналитического метода, являющимися ключевыми для гарантии приемлемости и достоверности аналитических данных, служат:

- селективность;
- чувствительность;
- линейность;
- достоверность;
- точность;
- оценка степени извлечения анализируемого вещества;
- тест на разведение;
- оценка матрикс-эффекта;
- оценка полноты элюирования (carry-over тест);
- различные типы стабильности (краткосрочная стабильность, долгосрочная стабильность, стабильность при замораживании/оттаивании биологических образцов, стабильность образцов после пробоподготовки).

Для оценки каждого из этих параметров выбирается соответствующий метод, заранее описываемый в протоколе валидации. По окончании процедур валидации составляется валидационный отчет, и только в случае соответствия каждого из вышеописанных параметров критериям приемлемости разработанную методику можно использовать для осуществления рутинного анализа биологических образцов. При этом стоит помнить, что любое изменение биоаналитического метода перед анализом образцов и во время его проведения может потребовать повторной частичной валидации. При необходимости сравнения результатов определения анализируемого вещества, полученных в разных лабораториях, проводят кросс-валидацию.

Ввиду того что концентрация действующего вещества до приема препарата, поддающаяся обнаружению, должна составлять 5% и менее от  $C_{\max}$ , нижний предел определения метода должен позволять определить содержание действующего вещества в концентрации, составляющей 1/20 от  $C_{\max}$  и ниже.

Для определения концентрации лекарственных веществ в биологической жидкости могут быть использованы различные физико-химические, иммунологические и микробиологические методы. Наиболее часто используются методы высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и газовой хроматографии. Для европейских исследований золотым стандартом является высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), поскольку данный метод в сравнении с другими методами ВЭЖХ обеспечивает наиболее высокую селективность, чувствительность и производительность. Единственным недостатком, ограничивающим его применение в РФ, является высокая стоимость рутинного анализа биологических образцов.

Другое обязательное требование ЕМА при проведении анализа биологических образцов – использование внутреннего стандарта – является одним из самых распространенных способов оценки повседневного контроля воспроизводимости работы ВЭЖХ систем и устраняет погрешность

ввода пробы и некоторые другие ошибки, связанные с подготовкой образца.

Анализ биологических образцов каждого добровольца должен проводиться в составе одной аналитической серии по одной и той же калибровочной кривой. Для валидации методики в процессе анализа аналитическая серия, помимо анализируемых образцов, также должна содержать как минимум:

- образцы чистой биоматрицы;
- «нулевые» образцы (чистая биоматрица с добавлением известного количества внутреннего стандарта);
- калибровочные стандарты;
- образцы контроля качества.

При расчете значений концентраций по калибровочной кривой нельзя допускать экстраполяции выше или ниже калибровочного уровня. Образцы с концентрациями определяемого вещества, выше верхнего предела количественного определения, должны разводиться соответствующей биологической жидкостью, не содержащей лекарственного препарата, и повторно анализироваться.

## КОНТРОЛЬ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Большое внимание при проведении исследований БЭ, как и других клинических исследований, должно уделяться системе обеспечения и контроля качества.

В мировой практике четкие правила проведения качественных клинических исследований выработаны и закреплены в документах GCP. В РФ в качестве государственного стандарта утвержден перевод GCP на русский язык – это принятый в 2005 г. национальный стандарт РФ «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005 [7]. На биоаналитическом этапе клинических исследований БЭ необходимым является также соблюдение требований «Надлежащей лабораторной практики» (Good laboratory practice, GLP).

Согласно принципам GCP и GLP все этапы исследования БЭ должны проводиться в соответствии с утвержденным протоколом исследования и стандартными операционными процедурами спонсора или компании – организатора исследования (контрактной исследовательской организации). Обязательными регуляторными требованиями являются:

- надлежащее ведение документации исследований;
- обучение персонала;
- регулярное техническое обслуживание, калибровка и проверка оборудования, используемого в исследовании;
- валидация используемого программного обеспечения.

Основой для признания результатов проведенных исследований достоверными является обязательный мониторинг и аудит всех этапов исследования, начиная с подготовки пакета документов и заканчивая финальным отчетом. Мониторинг исследования должен гарантировать, что исследование проводится надлежащим образом путем проведения *следующих мероприятий*:

- проверка квалификации главного исследователя и другого персонала, проводящего исследование;
- контроль за хранением и использованием исследуемых препаратов;
- проверка приема исследуемых лекарственных препаратов и соблюдения графика забора образцов крови (как минимум на одном этапе исследования);
- контроль непрерывного и точного заполнения всей документации исследования, включая ИРК, а также их правильного хранения в соответствии с требованиями;
- сравнение данных в первичной документации с данными, введенными в ИРК, и проверка их достоверности;
- проверка наличия всех необходимых документов.

Целью аудита, независимого от рутинного мониторинга, должна быть оценка проведения исследования и соблюдения предписаний протокола, стандартных операционных процедур, норм GCP/GLP и действующих нормативных требований.

В заключение хочется отметить, что от того, насколько ответственно исследователи подойдут к выполнению этих несложных рекомендаций при планировании и проведении исследований биоэквивалентности, зависит успешность выполнения их основной задачи – доказательства того, что клинически значимая разница между значениями биодоступности исследуемого препарата и препарата сравнения является маловероятной.



### ЛИТЕРАТУРА

1. Петров Я. Создание брендированных дженериков как вариант развития портфеля российских производственных фармкомпаний в свете ФЦП «Фарма-2020». Обзор российского рынка брендированных дженериков // INPHARMACIA. – 2011. – №5 (92). – С. 9–15.
2. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств // Методические указания Министерства здравоохранения и социального развития РФ. – 2008. – 32 с.
3. Guideline on the investigation of bioequivalence // The European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use (CHMP). – London, 20 January 2010. – [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf).
4. Note for guidance on modified release oral and transdermal dosage forms: section II (pharmacokinetic and clinical evaluation) // The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for proprietary medicinal products (CPMP). – London, 28 July 1999. – [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003126.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003126.pdf).
5. Guidance on Aripiprazole (Draft) // U.S. Food and Drug Administration. – November 2007. – <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm082554.pdf>.
6. Guideline on bioanalytical method validation. // The European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 21 July 2011. – [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
7. Надлежащая клиническая практика // Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 52379-2005.