

**Производство лекарственных средств
ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК**

**Вытворчасць лекавых сродкаў
ВАЛІДАЦІЯ БІАНАЛІТЫЧНЫХ МЕТОДЫК**

Издание официальное

**Департамент фармацевтической
промышленности Министерства
здравоохранения Республики Беларусь**

Минск

Ключевые слова: лекарственное средство, биоаналитическая методика, валидация

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 РАЗРАБОТАН Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр ЛОТИОС» (Государственное предприятие «НПЦ ЛОТИОС»)

ВНЕСЕН Департаментом фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Департамента фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения Республики Беларусь от «20» декабря 2014 г. № 84

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий технический кодекс установившейся практики не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Департамента фармацевтической промышленности

Издан на русском языке

Содержание

Введение.....	IV
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	1
4. Обозначения и сокращения.....	2
5 Общие положения	3
5.1 Полная валидация.....	3
5.2 Частичная валидация.....	3
5.3 Перекрестная валидация.....	4
6 Стандартный образец.....	4
7 Валидация методики	5
7.1 Селективность (selectivity).....	5
7.2 Эффект переноса (carry-over).....	5
7.3 Нижний предел количественного определения (lower limit of quantification).....	5
7.4 Калибровочная кривая (calibration curve).....	5
7.5 Правильность, прецизионность (accuracy, precision).....	6
7.6 Допустимость разведения (dilution integrity).....	7
7.7 Эффект матрицы (matrix effect).....	7
7.8 Стабильность (stability).....	8
8 Анализ исследуемых образцов	9
8.1 Аналитический цикл.....	9
8.2 Критерии приемлемости для аналитического цикла.....	9
8.3 Калибровочный диапазон	10
8.4 Повторный анализ исследуемых образцов (reanalysis of study samples)	10
8.5 Интегрирование (группирование).....	11
9 Повторное исследование образцов.....	11
10 Методики анализа, основанные на связывании лигандов.....	11
10.1 Валидация методик.....	11
10.2 Частичная и перекрестная валидация.....	14
10.3 Анализ исследуемых образцов.....	14
11 Отчеты.....	14
11.1 Отчет о валидации.....	14
11.2 Аналитический отчет.....	15
Библиография	17

Введение

Анализ анализа в биологических матрицах (таких как сыворотка, плазма, кровь, моча и слюна) является важным аспектом при разработке лекарственного средства. Такие данные могут потребоваться при процедуре регистрации новых активных фармацевтических ингредиентов (далее – АФИ) и генерических лекарственных средств, а также при внесении изменений в зарегистрированные лекарственные средства. Результаты токсикокинетических исследований на животных и клинических испытаний, включая исследования биоэквивалентности, используются при принятии решений для подтверждения безопасности и эффективности АФИ или лекарственного средства. Поэтому, для получения надежных результатов наиболее важно, чтобы используемые биоаналитические методики были хорошо охарактеризованы, полностью валидированы и задокументированы в соответствии с установленными требованиями.

В особых ситуациях возможно использование более широких критериев приемлемости, чем те, которые установлены в настоящем техническом кодексе установившейся практики. При этом более широкие критерии приемлемости следует заранее обосновать.

При разработке настоящего технического кодекса установившейся практики были использованы руководства по валидации биоаналитических методик Европейского агентства по лекарственным средствам [1], Департамента здравоохранения США [2], методические рекомендации Министерства здравоохранения Украины [3].

ТЕХНИЧЕСКИЙ КОДЕКС УСТАНОВИВШЕЙСЯ ПРАКТИКИ

Производство лекарственных средств ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Вытворчасць лекавых сродкаў ВАЛІДАЦІЯ БІАНАЛІТЫЧНЫХ МЕТОДЫК

Manufacture of medicinal products
Bioanalytical methods validation

Дата введения 2015-04-01

1 Область применения

Настоящий технический кодекс установившейся практики (далее - технический кодекс) устанавливает правила валидации биоаналитических методик, применяемых для измерения концентрации аналита в биологических матрицах, полученных при проведении токсикокинетических исследований на животных и всех фаз клинических испытаний. Поскольку количественный анализ АФИ методами связывания лигандов значительно отличается от хроматографических аналитических методик, для валидации методик связывания лигандов приводятся отдельные рекомендации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем техническом кодексе использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА):

ТКП 030-2013 (02040) Надлежащая производственная практика

ТКП 432-2012 (02041) Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний

Примечание – При пользовании настоящим техническим кодексом целесообразно проверить действие ТНПА по каталогу, составленному на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим техническим кодексом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем техническом кодексе применяют термины с соответствующими определениями, установленные в ТКП 030, ТКП 432, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 аналит (analyte): Конкретный измеряемый химический компонент, который может быть исходным лекарственным средством, биомолекулой или их производным, метаболитом, и/или продуктом деградации в биологической матрице.

3.2 аналитический цикл (серия) (analytical run): полностью завершённый цикл анализов образцов, включающий исследуемые образцы, а также необходимое для валидации данной серии анализов соответствующее количество образцов контроля качества, калибровочных образцов, бланковых образцов и нулевых образцов. Некоторые аналитические циклы (серии) могут быть завершены в течение одного дня, или один цикл (серия) может занять несколько дней.

3.3 биологическая матрица (biological matrix): Дискретный материал биологического происхождения, который может быть отобран и обработан воспроизводимым методом. Примерами могут служить кровь, сыворотка, плазма, моча, фекалии, слюна, мокрота и различные дискретные ткани.

3.4 валидация (validation):

3.4.1 полная валидация (full validation): Установление всех параметров валидации для анализа образца для биоаналитической методики для каждого аналита.

3.4.2 частичная валидация (partial validation): проводится при модификации валидированных биоаналитических методик, которые не требуют полной ревалидации.

3.4.3 перекрестная валидация (cross validation): Сравнение параметров двух биоаналитических методик.

3.5 верхний предел количественного определения (upper limit of quantification – ULOQ): Максимальное количество аналита в образце, которое может быть количественно определено с приемлемой прецизионностью и правильностью.

3.6 внутренний стандарт (internal standard): Химическое соединение (я), близкое по структуре и физико-химическим свойствам к исследуемому ЛС, или аналог ЛС, меченный стабильными изотопами), добавленное к калибровочным образцам, образцам контроля качества и исследуемым образцам в известной и постоянной концентрации с целью количественного определения целевого аналита (ов).

3.7 Воспроизводимость (reproducibility): Прецизионность между двумя лабораториями. Она также характеризует прецизионность методики в пределах одной аналитической серии или нескольких аналитических серий, выполненных в разные дни, или характеризует прецизионность методики, полученную при выполнении одного исследования при одних тех же рабочих условиях.

3.8 исследуемые образцы (incurred samples): это образцы биологической матрицы, взятые у добровольцев, которым вводилась доза препарата.

Примечание – Термин «исследуемые образцы», используется для отражения специфики именно таких образцов, которые вместе с образцами контроля качества, калибровочными образцами, бланковыми и нулевыми образцами рассматриваются как анализируемые образцы

3.9 калибровочный стандарт (calibration standard): Биологическая матрица, в которую добавлено известное количество аналита. Калибровочные стандарты используются для построения калибровочных кривых, по которым определяются концентрации аналитов в образцах QC и исследуемых образцах.

3.10 калибровочная кривая (calibration curve): Связь между экспериментальным значением отклика и аналитической концентрацией.

3.11 количественный диапазон (quantification range): Диапазон концентраций между верхним (ULOQ) и нижним уровнем (LLOQ) концентрации аналита в образце (включая эти концентрации), для которого было продемонстрировано, что аналитическая процедура отвечает требованиям к прецизионности, правильности и функции отклика.

3.12 матричный эффект (matrix effect): Прямое или косвенное изменение или помехи наблюдаемые при регистрации отклика целевого аналита (тов) в присутствии нецелевых соединений, присутствующих в образце.

3.13 методика (method): Полное и подробное (или детальное) описание всех процедур, используемых при анализе образца.

3.14 нижний предел количественного определения (lower limit of quantification - LLOQ): Минимальное количество аналита в образце, которое может быть количественно определено с требуемой прецизионностью и правильностью.

3.15 «нулевой» образец (zero sample): Образец биологической матрицы, к которому добавлен внутренний стандарт и который используется для оценки специфичности биоаналитического метода.

3.16 образец контроля качества (quality control (QC) sample): Образец биологической матрицы с внесенным аналитом и внутренним стандартом в известной концентрации, используемый для контроля характеристик биоаналитической методики и оценки правильности и прецизионности результатов анализа исследуемых образцов, проанализированных в отдельной аналитической серии или аналитических сериях выполненных в разные дни.

3.17 обработанный образец (processed sample): Конечный экстракт (до инструментального анализа) образца, который был подвергнут различным манипуляциям (например, экстракция, разбавление, концентрирование).

3.18 образец «бланк матрицы» (blank): Образец биологической матрицы, к которому не были добавлены аналиты, который используется для оценки специфичности биоаналитической методики.

3.19 повторный анализ исследуемых образцов (incurred samples reanalysis): Анализ части исследуемых образцов для определения, являются ли воспроизводимыми первоначальные аналитические результаты.

3.20 предел обнаружения (LOD) (limit of detection (LOD): Минимальная концентрация аналита, которую биоаналитическая методика может надежно отличить от фонового шума.

3.21 правильность (accuracy): Степень близости определяемого значения и номинального или известного истинного значения при заданных условиях.

3.22 пригодность системы (system suitability): Определение характеристик прибора (например, чувствительность и время удерживания, эффективность, симметрия, асимметрия, коэффициент разделения) по анализу калибровочного образца перед запуском аналитической серии (цикла).

3.23 прецизионность (precision): Степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, полученных при многократном анализе однотипных проб, отобранных от одного и того же однородного образца, и выполненных в определенных условиях. Прецизионность определяется как отношение стандартное отклонение/среднее значение, выраженное в процентах.

3.24 селективность (selectivity): Способность биоаналитической методики измерять и различать аналит и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые, возможно присутствуют в образце.

3.25 стабильность (stability): Химическая стабильность аналита в заданной матрице при конкретных условиях для заданных временных интервалов.

4 Обозначения и сокращения

В настоящем техническом кодексе применяются следующие обозначения и сокращения:

ИФА: Иммуноферментный анализ.

ЖХ: Жидкостная хроматография.

СОП: Стандартная операционная процедура.

МС: Масс-спектрометрия.

CV: Коэффициент вариации.

EPCRS: European Pharmacopoeia Reference Standards (эталонные стандарты Европейской фармакопеи).

IS: Внутренний стандарт.

LLOQ: Нижний предел количественного определения.

MF: Матричный фактор.

QC: Образец контроля качества.

WHO: World Health Organization (всемирная организация здравоохранения).

ULOQ: Верхний предел количественного определения.

USP: U.S. Pharmacopoeia (фармакопея США).

5 Общие положения

Селективные и чувствительные аналитические методики количественного определения лекарственных средств и их метаболитов (аналитов) являются критическими для успешного проведения доклинических (биофармацевтических) исследований и клинических испытаний. Валидация биоаналитических методик включает все процедуры, которые демонстрируют, что данная методика, используемая для количественного определения аналита(тов) в определенной биологической матрице, является надежной и воспроизводимой при ее использовании для данного исследования.

Различают следующие виды валидации биоаналитических методик:

- полная валидация;
- частичная валидация;
- перекрестная валидация.

5.1 Полная валидация

Полную валидацию следует проводить в следующих случаях:

- если биоаналитическая методика разрабатывается и выполняется впервые,
- для новых лекарственных средств,
- если для количественного определения в испытание добавлены метаболиты.

Основная цель валидации методики - демонстрация надежности методики для определения концентрации аналита в биологической матрице, такой как кровь, сыворотка, плазма, моча или слюна. Кроме того, если используется антикоагулянт, валидацию следует проводить с использованием того же антикоагулянта, который используется для обработки исследуемых образцов. Как правило, полную валидацию следует проводить для каждого рассматриваемого биологического вида и матрицы.

В некоторых случаях может быть проблематичным получить для валидации матрицу, идентичную матрице исследуемых образцов. При обосновании можно использовать пригодную альтернативную матрицу, например, синтезированную цереброспинальную жидкость.

Основные характеристики биоаналитической методики, которые важны для обеспечения пригодности методики и надежности аналитических результатов:

- селективность,
- нижний предел количественного определения,
- функция отклика и калибровочный диапазон (характеристика калибровочной кривой),
- правильность,
- прецизионность,
- эффекты матрицы,
- стабильность аналита (-ов) в биологической матрице,
- стабильность аналита (-ов) и внутреннего стандарта в основном и рабочих растворах и экстрактах на протяжении всего периода хранения и в условиях обработки.

Обычно проводят определение одного аналита или действующего вещества, но возможно определение более одного аналита, например, двух различных действующих веществ лекарственных средств, или действующих веществ и их метаболитов, или энантиомеров или изомеров действующего вещества.

В этих случаях принципы валидации и анализа применяются ко всем интересующим аналитам.

5.2 Частичная валидация

Частичная валидация применяется к ранее валидированным биоаналитическим методикам. Набор

исследуемых валидационных характеристик может варьировать от определения внутрисерийной правильности и прецизионности до почти полной валидации. Типичные изменения биоаналитической методики, при которых выполняется частичная валидация, включают, по крайней мере, следующее:

- передача биоаналитической методики другой лаборатории,
- изменения в оборудовании,
- изменение диапазона калибровочных концентраций,
- ограниченный объем образца,
- использование другого вида матрицы,
- изменение антикоагулянта,
- изменение процедуры обработки образца,
- изменение условий хранения, и т.д.

Все изменения следует указать в отчете, а границы повторной валидации или частичной валидации необходимо обосновать. Набор исследуемых валидационных характеристик может варьировать от такой валидационной характеристики, как внутрисерийная правильность и прецизионность до почти полной валидации.

5.3 Перекрестная валидация

5.3.1 Перекрестная валидация применяется при сравнении валидационных параметров, когда для получения данных используются две или более биоаналитические методики в рамках одного исследования или в различных исследованиях. Примером перекрестной валидации может быть ситуация, когда оригинальная валидированная биоаналитическая методика служит образцом сравнения, а пересмотренная биоаналитическая методика – элементом сравнения. Сравнение следует производить в обоих направлениях.

5.3.2 Когда в рамках одного исследования анализы образцов проводятся на более чем одном рабочем месте или в более чем одной лаборатории, перекрестную валидацию следует проводить на каждом рабочем месте или лаборатории для обеспечения межлабораторной достоверности. Перекрестную валидацию также следует проводить, когда данные, полученные с помощью различных аналитических методик (например, ЖХ-МС-МС против ИФА (иммуноферментный анализ) в разных исследованиях, включены в пакет документов для подачи в регулирующий орган.

5.3.3 Перекрестную валидацию следует выполнять, по возможности, до начала исследования. Для перекрестной валидации при использовании разных аналитических методик должен быть проанализирован один и тот же набор образцов QC или исследуемых образцов. Для образцов QC полученное среднее значение правильности с использованием различных методик должно быть в пределах 15% и может быть шире, если это обосновано. Для исследуемых образцов различие между двумя полученными значениями должно быть в пределах 20%, по крайней мере, для 67% повторов. Результаты перекрестной валидации имеют решающее значение для принятия решения о надежности полученных данных и возможности их сравнения и использования.

6 Стандартный образец

Анализ лекарственных средств и их метаболитов в биологической матрице проводится с использованием образцов с добавками и калибровочных (стандартных) образцов, а также с образцами контроля качества (QC). Чистота стандартного образца, используемого для получения образцов с добавками, может влиять на данные испытаний. По этой причине заданный аналитический стандартный образец с известной подлинностью и степенью чистоты должен быть использован для приготовления растворов данной концентрации. Стандартный образец должен быть идентичен по химической природе (форме) аналиту. Когда это невозможно, может быть использована установленная химическая форма (свободное основание или кислота, соль или эфир) с известной степенью чистоты. Как правило, используются три типа стандартных образцов:

1. сертифицированные стандартные образцы, такие как фармакопейные стандарты (EPCRS, USP, WHO),
2. стандартные образцы, поставляемые в промышленных масштабах, и полученные от достоверных поставщиков;
3. и/или другие материалы с документальным подтверждением чистоты аналитической лабораторией или другой некоммерческой организацией.

Для каждого стандартного образца должны быть представлены поставщик и номер партии, срок годности, сертификаты при наличии и/или внутреннее и внешнее подтверждение подлинности и чистоты.

Использование сертифицированных стандартов не является необходимым для внутреннего стандарта (IS), если его пригодность к применению продемонстрирована, например, отсутствием аналитической интерференции вещества или каких-либо его примесей с аналитом (-ами). Сертификат анализа не требуется.

В случае, когда биоаналитическая методика основана на методе масс-спектрометрии (MS) рекомендуется использовать внутренний стандарт, меченный стабильным изотопом. Важно, чтобы

меченый стандарт был высочайшей изотопной чистоты, чтобы избежать изотопного обмена.

7 Валидация методик

7.1 Селективность (selectivity)

Селективность - это способность аналитической методики дифференцировать и определять аналит в присутствии других компонентов пробы (внутреннего стандарта (IS), эндогенных компонентов матрицы или других компонентов). Для определения селективности методики, проводят анализ соответствующих образцов «бланк-матрицы» (плазма, моча или другие матрицы) в количестве не менее шести образцов. Использование меньшего количества образцов допускается для редких матриц. Для каждого образца «бланк-матрицы» должно быть проверено наличие мешающих пиков, при этом селективность должна быть обеспечена на нижнем пределе количественного определения (LLOQ)..

Как правило, приемлемым является отсутствие мешающих пиков или незначительная интерференция, когда отклик сигнала мешающего пика составляет не более 20% от нижнего предела количественного определения для аналита и 5% для внутреннего стандарта.

Потенциальные мешающие вещества в биологической матрице включают эндогенные матричные компоненты, метаболиты, продукты распада, и при фактическом исследовании сопутствующие лекарственные средства и другие экзогенные ксенобиотики. Если методика предназначена для количественного определения более одного аналита, каждый аналит должен быть оценен, чтобы гарантировать отсутствие интерференции.

Следует оценивать также возможность обратной конверсии потенциально нестабильных метаболитов (таких, например, как кислотные метаболиты в эфир, нестабильные N-оксиды или глюкуроновые метаболиты, циклические лактоны) в исходный аналит во время поэтапных стадий анализа (включая процедуры экстракции и воздействие источника в масс-спектрометрии (MS)). При этом необходимо определить степень обратной конверсии и рассмотреть влияние ее на результаты исследования. Общепринято, что оценка степени обратной конверсии невозможна на ранней стадии разработки нового лекарственного средства, когда метаболизм еще не оценивался. Однако ожидается, что при необходимости и по мере получения дополнительных знаний о метаболизме действующего вещества во время разработки лекарственного средства, этот вопрос будет принят во внимание, и проведена частичная валидация.

В некоторых случаях очень сложно получить интересующие метаболиты. Обратную конверсию метаболита можно проверить при повторном анализе исследуемых образцов. Но, в данном случае не может быть исключена потенциальная обратная конверсия во время обработки образцов.

7.2 Эффект переноса (carry-over)

Во время разработки методики необходимо учитывать и минимизировать эффект переноса. В процессе валидации перенос пробы следует оценивать с помощью инъекции образца «бланк матрицы» после образца с высокой концентрацией аналита или калибровочного стандарта с концентрацией аналита, равной верхнему пределу количественного определения. Перенос в образце «бланк матрицы», который хроматографирован после образца с высокой концентрацией аналита (или после самого высокого калибровочного стандарта), должен составлять не более 20% от нижнего предела количественного определения аналита (LLOQ; см. ниже) и не более 5% для внутреннего стандарта. Если оказывается, что перенос пробы неизбежен, необходимо предусмотреть особые меры, чтобы исключить влияние переноса на правильность и прецизионность. Например, после образцов с ожидаемой высокой концентрацией аналита перед анализом следующего исследуемого образца можно включить инъекцию образца «бланк матрицы». Эти методы необходимо протестировать во время валидации и применить во время анализа исследуемых образцов.

7.3 Нижний предел количественного определения (lower limit of quantification)

Нижний предел количественного определения (LLOQ) представляет собой наименьшую концентрацию аналита в образце, которая может быть количественно определена с приемлемыми прецизионностью и точностью. LLOQ считается самым низким калибровочным стандартом. Кроме того, сигнал аналита для образца LLOQ должен быть, по крайней мере, в 5 раз больше сигнала бланк-матрицы. LLOQ должны быть адаптированы к ожидаемой концентрации аналита и цели исследования. В качестве примера, для исследований биоэквивалентности LLOQ должен быть не выше, чем 5% от C_{max} , в то время как такой низкий LLOQ может не требоваться для поисковых фармакокинетических исследований.

7.4 Калибровочная кривая (calibration curve)

Калибровочная кривая характеризует связь между откликом прибора и известной концентрацией аналита. Калибровочная кривая должна быть построена для каждого аналита в образце. Для

надлежащего определения взаимосвязи между концентрацией и откликом должно быть использовано достаточное количество калибровочных стандартов. Калибровочные образцы должны готовиться с использованием той же матрицы, что и матрица образцов, предназначенных для исследования, с использованием добавок известных концентраций аналита в образец «бланк матрицы». При валидации биоаналитической методики для каждого аналита и каждой аналитической серии должна быть своя калибровочная кривая.

В идеале, перед выполнением валидации биоаналитической методики следует знать диапазон ожидаемых (рабочих) концентраций аналита. Этот диапазон должен охватываться диапазоном калибровочной кривой, включающим концентрацию соответствующую LLOQ и концентрацию соответствующую верхнему пределу количественного определения (ULOQ). В дополнение к образцу «бланк матрицы» (обработанному образцу матрицы без аналита и внутреннего стандарта) и «нулевому» образцу (обработанному образцу матрицы с добавленным внутренним стандартом) следует использовать минимум шесть калибровочных стандартов разных концентрационных уровней по шесть повторений для каждого уровня. Следует применить уравнение (модель), которое просто и адекватно может описать зависимость отклика прибора от концентрации аналита. Образец «бланк матрицы» и «нулевой образец не следует учитывать для расчета параметров калибровочной кривой.

В отчете следует указывать параметры калибровочной кривой и вид (уравнение) калибровочной зависимости. Кроме того, следует представлять значения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по результатам измерений (back-calculated) вместе с рассчитанными средними значениями правильными методики. В отчете следует приводить все полученные в процессе валидации (или приемлемые) кривые (как минимум три кривые).

Значения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по результатам измерений (back-calculated) должны быть в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения, за исключением LLOQ, для которого back-пересчитанное значение должно быть в пределах $\pm 20\%$. По крайней мере, 75% калибровочных образцов, соответствующих, как минимум, 6 калибровочным уровням, должны соответствовать этому критерию.

В случае повторного анализа каждого калибровочного образца, установленные критерии (в пределах $\pm 15\%$ или $\pm 20\%$ для LLOQ) также должны выполняться, как минимум, для 50% калибровочных образцов каждого концентрационного уровня. В случае, когда калибровочный образец не соответствует этим критериям, этот калибровочный образец следует отбросить, а калибровочную кривую без данного калибровочного образца следует повторно оценить, используя регрессионный анализ. В случае несоответствия критерию обратного расчета всех повторно проанализированных калибровочных образцов LLOQ или ULOQ данную серию калибровочных стандартов следует исключить из валидации, установить возможный источник отклонения и внести в методику изменения (если необходимо). Если при повторной валидации отрицательный результат повторится, то следует пересмотреть методику и провести новую валидацию.

Для получения калибровочной кривой предпочтительно использовать свежеприготовленные калибровочные образцы, хотя допускается использовать ранее приготовленные и хранящиеся калибровочные образцы, если это подтверждено соответствующими данными о стабильности.

7.5 Правильность и прецизионность (accuracy, precision)

7.5.1 Правильность биоаналитической методики описывает близость среднего значения результатов испытаний, полученных по данной методике, к истинному значению (концентрации) аналита. Правильность определяется при анализе образцов, содержащих известное количество аналита. Правильность следует определять путем анализа в одном цикле минимум 5 образцов каждого концентрационного уровня. Рекомендуется использовать не менее четырех концентраций из диапазона ожидаемых концентраций: уровень LLOQ; в пределах трехкратного LLOQ (низкий QC), приблизительно 50% от диапазона калибровочной кривой (средний QC) и, по крайней мере, не менее 75% верхнего диапазона калибровочной кривой (высокий QC). Среднее значение концентрации не должно превышать 15 % от истинного значения, за исключением LLOQ, где оно не должно отличаться более чем на 20 %. Отклонение среднего значения концентрации от истинного является мерой правильности.

7.5.2 Правильность подразделяется на внутрисерийную (within-run accuracy) и межсерийную (between-run accuracy). Внутрисерийная правильность оценивается при выполнении одного аналитического цикла, а межсерийная правильность (between-run accuracy) оценивается при выполнении по крайней мере трех аналитических циклов, выполняемых в рамках одного исследования. Внутрисерийную правильность следует определять путем анализа в одном цикле минимум 5 образцов каждого концентрационного уровня, по крайней мере, при 4 уровнях концентраций, которые охватывают диапазон калибровочной кривой: уровень LLOQ; в пределах трехкратного LLOQ (низкий QC), приблизительно 50% от диапазона калибровочной кривой (средний QC) и, по крайней мере, не менее 75% верхнего диапазона калибровочной кривой (высокий QC). Средняя концентрация должна быть в пределах 15% от номинальных значений образцов QC, за исключением LLOQ, которая должна быть в пределах 20% от номинального значения. Для валидации межсерийной правильности следует оценить LLOQ, низкий, средний и высокий образцы QC, по крайней мере, для трех серий (циклов), проанализированных, по

крайней мере, в течение двух разных дней. Средняя концентрация должна быть в пределах 15% от номинальных значений для образцов QC, за исключением LLOQ, которая должна быть в пределах 20% от номинального значения.

7.5.3 Прецизионность аналитической методики описывает близость индивидуальных значений повторных измерений аналита, когда процедура неоднократно применяется к нескольким образцам однородного объема биологической матрицы. Прецизионность должна быть измерена при не менее пяти определениях концентраций. Рекомендуется использовать не менее трех концентраций из диапазона ожидаемых концентраций. Прецизионность, определенная на каждом уровне концентрации, не должна превышать 15 % от коэффициента вариации (CV), за исключением LLOQ, где она не должна превышать 20 % от CV. Прецизионность подразделяется на внутрисерийную (within-run, intra-batch) прецизионность, которая оценивает прецизионность, полученную при выполнении одного аналитического цикла, а также межсерийную (between-run, inter batch) прецизионность, полученную при выполнении минимум трех аналитических циклов, выполняемых в рамках одного исследования.

7.6 Допустимость разведения (dilution integrity)

Разведение образцов не должно влиять на правильность и прецизионность методики. При необходимости, допустимость разведения следует продемонстрировать введением в матрицу аналита при концентрации выше ULOQ и разведением этого образца «бланк-матрицей» (минимум пять определений для каждого разведения). Правильность и прецизионность должны быть в пределах установленных критериев, т.е. в пределах $\pm 15\%$. Изучаемая допустимость разведения должна охватывать разведение, которое, при необходимости, будет применяться к исследуемым образцам.

Оценка допустимости разведения может проводиться при частичной валидации. Возможно использование другой матрицы при условии, что это не влияет на прецизионность и правильность методики.

7.7 Эффект матрицы (matrix effect)

Эффект матрицы необходимо исследовать при использовании методов масс-спектрометрии с использованием, по крайней мере, 6 серий «бланк-матрицы», полученных от отдельных доноров. Не следует применять объединенную матрицу.

Матричный фактор (MF) следует рассчитывать для каждого аналита и внутреннего стандарта (IS) и для каждой серии матрицы путем вычисления отношения площади пика аналита в присутствии матрицы (аналит добавляется к подготовленному (экстрагированному) образцу «бланк матрицы») к площади пика в отсутствии матрицы (чистого раствора аналита). Следует рассчитывать также MF, нормализованный по внутреннему стандарту (IS), путем деления MF аналита на MF внутреннего стандарта. Коэффициент вариации IS-нормализованного MF, рассчитанного для 6 серий матрицы, не должен превышать 15%. Это определение следует выполнить при низком и высоком уровне концентрации (максимум в 3 раза превышающем LLOQ и близком к ULOQ).

Если этот подход нельзя использовать, например, в случае on-line подготовки образца, вариабельность отклика от серии к серии следует оценивать путем анализа, как минимум, 6 серий матрицы, при низком и высоком уровне концентрации (максимум в 3 раза превышающем LLOQ и близком к ULOQ). Отчет о валидации должен включать площади пика аналита и внутреннего стандарта, а также рассчитанную концентрацию для каждого отдельного образца. Средний коэффициент вариации (CV), рассчитанный для каждой концентрации, должен быть не более 15%.

Если матрицу трудно получить, можно использовать менее 6 различных серий матрицы, но это требует обоснования.

Если рецептура, предназначенная для инъекции человеку или животным, содержит вспомогательные вещества, которые отвечают за матричные эффекты (такие как полиэтиленгликоль или полисорбат), то, кроме «бланк матрицы», дополнительно необходимо изучить матричные эффекты матрицы, содержащей эти вспомогательные вещества. Матрицу, используемую для этой оценки, следует получить от человека или животных, которым вводили вспомогательное вещество, если только не продемонстрировано *in vivo*, что вспомогательное вещество не метаболизируется или трансформируется. Эффект вспомогательных веществ можно изучать посредством определения матричного фактора или путем исследования разведения исследуемого образца с высокой концентрацией «бланк-матрицей», не содержащей вспомогательное вещество.

В дополнение к исследованиям стандартной матрицы рекомендуется исследовать эффекты матрицы на других образцах, например, гемолизованных или гиперлипидемических образцах плазмы. Если должны анализироваться образцы, взятые, например, у субъектов с почечной или печеночной недостаточностью, рекомендуется исследовать матричные эффекты, используя матрицу, взятую у этих субъектов.

7.8 Стабильность (stability)

7.8.1 Исследование стабильности необходимо проводить для того, чтобы гарантировать, что каждый этап исследования, от приготовления образца до анализа, так же, как и условия хранения, не оказывают влияния на концентрацию аналита.

Стабильность следует подтвердить для каждого этапа биоаналитической методики; это означает, что условия, при которых исследуется стабильность, включающие в себя требования к матрице, антикоагулянту, материалу контейнера/упаковки, условиям хранения и проведения анализа, должны быть идентичны тем, которые применяются для реально исследуемых образцов. Ссылка на данные, опубликованные в литературе, не считается достаточной.

7.8.2 Стабильность аналита в исследуемой матрице оценивается с использованием образцов QC с низкой и высокой концентрациями аналита («бланк матрицы» с добавлением аналита при концентрации, максимум, в три раза выше LLOQ и близкой к ULOQ), которые анализируют сразу после приготовления и после хранения в предназначенных условиях. Образцы QC анализируют с использованием калибровочной кривой, полученной с применением свежеприготовленных калибровочных образцов, а полученные концентрации сравнивают с номинальными концентрациями. Средняя концентрация на каждом уровне должна быть в пределах $\pm 15\%$ от номинальной концентрации.

Стабильность основного и рабочих стандартных растворов должна быть проверена при соответствующем разведении с учетом линейности и диапазона измерений.

Стабильность должна быть исследована при различных условиях хранения и охватывать определенные промежутки времени, равные или превышающие фактические, применяемые к образцам в реальном эксперименте.

Следует оценивать следующие тесты на стабильность:

- стабильность основного и рабочих стандартных растворов аналита и внутреннего стандарта;
- стабильность образцов в процессе замораживания/размораживания (при замораживании аналита в матрице в условиях хранения в морозильной камере и размораживании при комнатной температуре или температуре обработки образца),
- краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре или температуре обработки образца;
- долговременная стабильность аналита в матрице при хранении в морозильной камере.

Кроме того, при необходимости, следует провести следующие тесты:

- стабильность обработанного образца при комнатной температуре или в условиях хранения, которые будут применяться во время исследования (например, в виде сухого остатка или конечного экстракта, используемого непосредственно перед анализом подготовленных образцов);
- стабильность подготовленного образца в автосамплере при используемой температуре.

7.8.2.1. Стабильность при замораживании/размораживании

Образцы QC замораживаются и хранятся в морозильной камере при заданной температуре, затем размораживаются при комнатной температуре или температуре обработки. После полного размораживания образцы повторно замораживаются в тех же условиях. В каждом цикле образцы должны быть в замороженном состоянии не менее 12 часов до их размораживания. Число циклов при исследовании стабильности в условиях замораживания/размораживания должны быть равными или превышать число циклов замораживания/оттаивания исследуемых образцов в реальном эксперименте, но не менее 3-х циклов.

7.8.2.2. Долговременная стабильность аналита в матрице при хранении в морозильной камере

Образцы QC следует хранить в морозильной камере в тех же условиях и в течение того же периода времени, что и исследуемые образцы. Для малых молекул считается приемлемым подход группирования (брекетинг-подход), т.е. в случае, если стабильность подтверждена, например, при -70°C и -20°C , нет необходимости исследовать стабильность при температурах между этими значениями. Для больших молекул (таких как пептиды и протеины) стабильность следует изучать при каждой температуре, при которой исследуемые образцы будут храниться. Исследуемые образцы можно использовать в дополнение к образцам QC, но исключительное использование исследуемых образцов не считается достаточным, поскольку номинальные концентрации этих образцов не известны. Результаты оценки долговременной стабильности должны быть получены до завершения подготовки отчета об исследовании.

7.8.2.3. Стабильность основного и рабочих растворов

Нет необходимости исследовать стабильность рабочих растворов для каждого уровня концентрации, можно применять метод группирования. Не требуется исследование стабильности внутренних стандартов, меченых стабильным изотопом, если показано, что для аналита отсутствуют какие-либо реакции по обмену изотопами.

В случае исследования с использованием нескольких аналитов и, в частности, в исследованиях биоэквивалентности следует обратить внимание на стабильность аналитов в матрице, содержащей все аналиты.

Следует уделить особое внимание стабильности аналита в образцах матрицы, полученных непосредственно после отбора крови у субъектов исследования с последующей их обработкой перед

хранением для того, чтобы доказать, что установленные при помощи аналитической методики концентрации правильно отражают значения концентрации аналита у субъекта исследования в момент отбора образца. Демонстрация этой стабильности может потребоваться в индивидуальном порядке в зависимости от структуры аналита.

8 Анализ исследуемых образцов

После полной валидации биоаналитической методики можно выполнять анализ исследуемых образцов. Перед началом анализа исследуемых образцов следует проверить пригодность хроматографической или иной инструментальной системы для выполнения анализов.

Исследуемые образцы, образцы контроля качества (QC) и калибровочные образцы следует подготовить в соответствии с валидированной биоаналитической методикой. Образцы контроля качества (QC) и калибровочные образцы используются для оценки приемлемости аналитического цикла (циклов).

8.1 Аналитический цикл

Аналитический цикл включает:

- анализ образца «бланк матрицы» (обработанный образец матрицы без аналита и без внутреннего стандарта (IS));
- анализ «нулевого» образца (обработанная матрица с IS);
- анализ калибровочных образцов, содержащих, как минимум, шесть уровней концентрации в не менее чем двух повторениях для каждого концентрационного уровня.
- анализ как минимум трех образцов контроля качества QC с разными концентрационными уровнями (низкий, средний и высокий) как минимум в двукратной повторности (или не менее 5% от количества исследуемых образцов, смотря, что больше) и исследуемых образцов, которые будут анализироваться.

Калибровочные образцы и образцы контроля качества (QC) должны быть приготовлены независимо с использованием отдельно приготовленных основных растворов. Все образцы (калибровочные стандарты, образцы QC и исследуемые образцы) должны быть обработаны как единая серия и подготовлены к анализу в порядке, в котором их планируется анализировать. Одна серия состоит из образцов, приготовление которых проводится одновременно, т.е. последовательно обрабатываются без перерыва во времени одним и тем же аналитиком/лаборантом с использованием одних и тех же реагентов в одних и тех же условиях. В одном аналитическом цикле следует избегать анализа образцов, которые готовились отдельно как несколько серий. Если такой подход неизбежен, например, из-за ограничений по стабильности, каждая серия образцов должна включать образцы QC низкого, среднего и высокого концентрационного уровня. Критерии приемлемости должны быть установлены заранее в СОП, протоколе или в плане исследований для всего аналитического цикла и отдельных серий в цикле.

При проведении исследований биоэквивалентности рекомендуется анализировать все образцы от одного субъекта в одном аналитическом цикле для снижения вариабельности результатов. Образцы QC следует распределить среди всех образцов выполняемой аналитической серии таким образом, чтобы обеспечить контроль правильности и прецизионности в процессе выполнения всей аналитической серии.

8.2 Критерии приемлемости для аналитического цикла

Критерии приемлемости/отклонения должны быть установлены в протоколе, в плане исследования или в СОП. В случае если аналитический цикл состоит из нескольких серий, критерии приемлемости/отклонения должны быть применены ко всему циклу и к отдельным сериям. Цикл в целом может удовлетворять критериям приемлемости, хотя серия, возможно, будет отклонена, если для нее критерии приемлемости не выполняются.

Следует применять следующие критерии приемлемости:

8.2.1 Правильность

Значения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по результатам измерений (back-calculated) должны быть в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения, за исключением значения LLOQ, для которого установленная концентрация должна быть в пределах $\pm 20\%$ от номинальной. Этому критерию должно соответствовать, по крайней мере, 75% калибровочных образцов. Если один из калибровочных образцов не отвечает этим критериям, его исключают. Оценка калибровочной кривой проводится повторно без использования калибровочного образца, не соответствующего критериям.

Если исключенным калибровочным образцом является образец, соответствующий LLOQ (самая низкая концентрация калибровочной кривой), то в качестве LLOQ для этого аналитического цикла принимается следующий самый низкий приемлемый калибровочный образец используемой калибровочной кривой. Если исключается калибровочный образец с самой высокой концентрацией, соответствующий ULOQ, то для этого аналитического цикла в качестве ULOQ принимают калибровочный образец с концентрацией, предшествующей на калибровочной кривой исключенной. Полученный с учетом исключения калибровочный диапазон должен охватывать все концентрации образцов контроля качества QC (низкий, средний и высокий).

Значение правильности, полученное для образцов QC должно находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения. Как минимум, 67% всех образцов QC и, как минимум, 50% образцов QC для каждого используемого концентрационного уровня должно соответствовать этому критерию. Если эти критерии не выполняются, аналитический цикл должен быть отклонен, а исследуемые образцы должны быть повторно подготовлены и проанализированы.

В случае одновременного определения нескольких аналитов калибровочная кривая должна быть построена для каждого аналита. Если в аналитическом цикле данные удовлетворительны только для одного аналита, а данные для другого аналита неудовлетворительны, то можно использовать данные для того аналита, для которого результаты удовлетворительны. Для того аналита, результаты которого не удовлетворительные, необходимо повторно подготовить и проанализировать образцы.

Если калибровочные стандарты готовятся и используются в нескольких повторностях и только один стандарт LLOQ или ULOQ не соответствует установленным критериям, калибровочный диапазон остается неизменным.

Итоговое (среднее) значение правильности и прецизионности по результатам анализа образцов QC всех принятых аналитических циклов необходимо рассчитать для каждого уровня концентраций и отразить в аналитическом отчете. В случае если итоговое значение правильности и прецизионности превышает отклонение в 15%, необходимо провести дополнительные исследования для обоснования этого отклонения. В случае исследований биоэквивалентности это может привести к отклонению полученных данных.

8.3 Калибровочный диапазон

Если до начала анализа исследуемых образцов известно или предполагается, что диапазон концентраций аналита в исследуемых образцах уже, чем диапазон калибровочной кривой, то для адекватного отображения концентраций рекомендуется или сузить диапазон калибровочной кривой с подбором соответствующих концентраций аналита в образцах QC, или добавить новые образцы QC с другими концентрационными уровнями.

Если узкий диапазон концентраций заранее не предвиделся, но наблюдается после начала анализа исследуемых образцов, то рекомендуется остановить проведение анализа. Для продолжения анализа исследуемых образцов необходимо выполнить одну из перечисленных процедур:

- сужение диапазона калибровочной кривой,
- изменение существующих концентраций образцов QC,
- добавление образцов QC в дополнительных концентрациях к существующей кривой.

Повторный анализ образцов, проанализированных до оптимизации диапазона калибровочной кривой или концентраций образцов QC, не требуется.

Точно так же поступают, если очевидно, что большое количество концентраций аналита исследуемых образцов оказывается выше ULOQ. По возможности, диапазон калибровочной кривой следует расширить, количество образцов QC добавить или изменить их концентрации.

По крайней мере, два уровня концентраций образцов QC должны попадать в диапазон концентраций, полученный при анализе исследуемых образцов. Если диапазон калибровочной кривой изменен, то биоаналитическая методика должна быть повторно валидирована (частичная валидация) для подтверждения функции отклика, соответствия критериям правильности и прецизионности.

8.4 Повторный анализ исследуемых образцов (reanalysis of study samples)

Причины проведения повторного анализа исследуемых образцов и критерии для выбора значений, должны быть приведены в протоколе, плане исследования или СОП еще до начала анализа образцов. В отчете об исследовании необходимо детально рассмотреть вопрос о количестве образцов (и их процентном отношении от общего количества), которые были повторно проанализированы.

Ниже приведен ряд причин, по которым возможен повторный анализ исследуемого образца:

- отклонение аналитического цикла по причине несоответствия критериям приемлемости калибровочных стандартов и/или образцов QC;
- отклик внутреннего стандарта в исследуемом образце существенно отличается от отклика в калибровочных стандартах или образцах QC, если такой критерий заранее предусмотрен в СОП;
- некорректное введение пробы или неисправность оборудования;
- установленные ошибки, допущенные в процессе пробоподготовки;
- полученная концентрация выше ULOQ или ниже LLOQ в циклах, в которых самый низкий калибровочный образец отклонен, что приводит к более высокой концентрации LLOQ по сравнению с другими циклами;
- наличие аналита в образцах, взятых до введения дозы препарата (pre-dose sample), или в плацебо-образцах, в концентрациях, пригодных для количественного определения;
- неудовлетворительная хроматография.

В исследованиях биоэквивалентности, как правило, повторный анализ исследуемых образцов по фармакокинетическим причинам недопустим, поскольку он может повлиять на конечный результат такого исследования. Однако повторный анализ можно рассматривать как часть лабораторных исследований для

установления возможных причин при получении результатов, которые рассматриваются как отклонение от нормы и предотвращения подобных проблем в будущем.

При проведении повторного анализа образцов по фармакокинетической причине, образцы следует идентифицировать, указав первоначальное значение, причину повторного анализа, значения, полученные при повторном анализе, окончательно принятое значение и обоснование приемлемости данных.

Повторная инъекция образцов возможна в случае отказа прибора, если во время валидации была подтверждена воспроизводимость и стабильность образцов при инъекции. Повторная инъекция всех образцов аналитического цикла или отдельных калибровочных образцов или образцов QC просто по причине неудовлетворительности результатов, без указания какой-либо определенной аналитической причины, неприемлема.

Уровень безопасности субъектов исследования должен быть приоритетным по отношению к любым другим аспектам исследования. Поэтому возможны обстоятельства, когда необходимы повторная подготовка и/или повторный анализ исследуемых образцов, например, когда установлен нетипичный неожиданный результат, который может повлиять на безопасность пациента.

8.5 Интегрирование

Интегрирование и критерии для повторного интегрирования хроматограмм следует предварительно описать в СОП или протоколе. Любое отклонение от СОП должно быть рассмотрено в аналитическом отчете. В лаборатории следует протоколировать параметры интегрирования хроматограмм, а в случае реинтегрирования, протоколировать данные первичного и окончательного интегрирования. Эти данные должны быть доступны по требованию.

9 Повторный анализ исследуемых образцов (incurred samples reanalysis)

Использование калибровочных образцов и образцов QC во время валидации не может в полной мере имитировать исследуемые образцы. Различия могут быть обусловлены, например, связыванием с белками, обратным преобразованием известных и неизвестных метаболитов, неоднородностью образцов или сопутствующим лечением.

Эти различия могут повлиять на правильность и прецизионность определения аналита в образцах во время их обработки и в период хранения. Поэтому рекомендуется оценить правильность определения аналита в исследуемых образцах (incurred-samples) путем повторного анализа части исследуемых образцов, выполняемого в виде отдельных аналитических циклов и в разные дни. Количество образцов для повторного анализа зависит от аналита и исследуемых образцов и определяется используемой аналитической методикой, а также физико-химическими свойствами аналита. Как правило, повторно должно быть проанализировано 10% образцов, если их общее количество менее 1000 образцов, и дополнительно 5% от количества образцов, которое превышает 1000. К тому же, рекомендуется для повторного анализа отбирать образцы в области максимальной концентрации ($C_{\text{макс}}$) и в период элиминации.

Концентрация, полученная при первичном анализе, а также концентрация, полученная при повторном анализе, не должна отличаться более, чем на 20% от их среднего значения, как минимум, для 67% образцов, которые были проанализированы повторно. Если повторно проанализированные образцы демонстрируют отклоняющиеся результаты, должны быть предприняты соответствующие шаги для установления причин отклонения и минимизации полученных различий при повторных анализах.

Образцы подвергаются повторному анализу как минимум, в следующих случаях:

- при токсико-кинетических исследованиях для каждого вида;
- во всех основных исследованиях биоэквивалентности;
- при первичных клинических испытаниях на здоровых добровольцах;
- при первичных испытаниях на пациенте;
- при первичных испытаниях на пациентах с печеночной и/или почечной недостаточностью.

Что касается исследований на животных, повторный анализ образцов может проводиться только в исследованиях на ранней фазе, если они репрезентативны для основных исследований в отношении вводимой дозы, а также достигнутых концентраций.

Образцы не следует объединять, эта операция уменьшает количество отклоняющихся от нормы результатов.

10 Методики анализа, основанные на связывании лигандов

10.1 Валидация методик

Методики, основанные на связывании лигандов (LBA) или иммуноферментные методики применяются, главным образом, для анализа макромолекул. К методикам, основанным на связывании лигандов должны применяться те же принципы валидации, которые описаны в предыдущих разделах. Однако эти методики имеют некоторые особенности. В связи с присущей для структуры макромолекул сложностью строения, неэффективностью экстракции, анализы часто выполняются без предварительного

выделения исследуемого аналита. Кроме того, нельзя напрямую измерить концентрацию исследуемого аналита, расчеты производятся косвенно, путем измерения реакции связывания макромолекулы с реагентами, которые используются в анализе. По этим причинам несколько вопросов требуют особого внимания.

10.1.1 Полная валидация

10.1.1.1. Стандартные образцы

Макромолекулы неоднородны, а их активность и иммунореактивность могут различаться. Стандартные образцы следует должным образом описать и документально оформить (например, протокол анализа и источник происхождения). Следует использовать самый чистый стандартный образец, имеющийся в наличии. Настоятельно рекомендуется, чтобы партия стандартного образца, используемого для приготовления калибровочных стандартов и образцов QC, была той же, что и используемая для дозирования в доклинических и клинических исследованиях. В случае смены партии стандартного образца, аналитическая характеристика и биоаналитическая оценка должна проводиться до начала использования, для того, чтобы гарантировать неизменность характеристик методики.

10.1.1.2. Специфичность

Специфичность связывающего (их) реагента (ов) определяется способностью связываться исключительно с анализируемым веществом. Специфичность основана на концепции перекрестной реактивности. В идеале связывающий реагент должен быть настолько специфичным, чтобы отсутствовала перекрестная реакционная способность с «сопутствующими соединениями» по структуре (например, эндогенные соединения, изоформы, варианты форм аналита или физико-химические подобные соединения), или с предполагаемым одновременно используемым другим лекарственным средством. Во время разработки и валидации методики эти «родственные молекулы» часто недоступны. Оценку специфичности можно проводить после завершения первоначальной валидации, когда становятся доступными дополнительные данные о свойствах аналита. Специфичность следует оценивать, используя образцы QC, добавляя по нарастающей концентрации имеющихся «родственных молекул» или лекарственных веществ, которые, как ожидается, будут вводиться одновременно, в матрицу образца (предполагается, что матрица образца никогда ранее не подвергалась воздействию аналита), а также посредством измерения достоверности исследуемой макромолекулы при LLOQ и ULOQ. Критерии приемлемости анализа образцов QC должны быть не более 25% от номинальных значений.

10.1.1.3. Селективность

Селективностью методики, основанной на связывании лигандов, является способность измерять анализируемое вещество в присутствии не связанных соединений в матрице (как правило, из-за свойств макромолекул, экстракция не применяется).

К тому же не связанные соединения, представленные в матрице, например, фрагменты ферментов, гетерофильные антитела или ревматоидный фактор, могут создавать помехи интересующему аналиту при использовании методики, основанной на связывании лигандов. Селективность тестируется добавлением аналита к матрице, полученной, как минимум, от 10 источников, в концентрации, равной или близкой к LLOQ. Эти источники должны включать липидемические или гемолизированные образцы. Также требуется включать источники от популяций с соответствующими заболеваниями. Селективность следует оценивать на нижнем пределе количественного определения методики, когда в большинстве случаев возникают проблемы. Возможна также оценка селективности при более высоких концентрациях аналита. В случаях, когда интерференция зависит от концентрации, важно установить минимальный порог концентрации, когда интерференция обнаруживается. До валидации методики лиганд-связывания может потребоваться корректировка нижнего предела количественного определения в связи с уменьшением минимального порога. Правильность должна находиться в пределах 20% (при LLOQ - 25%) от номинальной концентрации, по крайней мере, в 80% оцененных матрицах.

10.1.1.4. Эффект переноса

Если используются автоматизированные системы обработки жидкости, возможность переноса следует изучать путем анализа образцов «бланк матрицы» после образцов с высокой концентрацией аналита или калибровочного стандарта на верхнем пределе количественного определения.

10.1.1.5. Выбор матрицы

Измерение некоторых макромолекул может быть невозможно в сложных матрицах без экстракции ввиду большого мешающего влияния (интерференции) структурно связанных эндогенных соединений. Не смотря на то, что не рекомендуется применять экстракционные матрицы (например, древесный уголь, иммунную аффинность) или альтернативные матрицы (например, протеиновые буферы, диализированную сыворотку), использование таких матриц может потребоваться в случае отсутствия другой альтернативы количественного определения исследуемого аналита. Стандарты для калибровочной кривой можно приготовить с использованием этих суррогатных матриц. Образцы QC следует готовить с использованием реальных матриц; правильность рассчитывают, демонстрируя отсутствие матричного эффекта.

10.1.1.6. Минимально требуемое разведение

Некоторые матрицы могут демонстрировать высокий фоновый сигнал. Для устранения этого

эффекта может понадобиться разведение. Минимально требуемое разведение - это наименьшее разведение, до которого необходимо развести образец в буфере, чтобы оптимизировать правильность и прецизионность в серии анализа путем снижения соотношения сигнал/шум. Образцы с внесенным количеством аналита следует готовить в той же матрице, что и исследуемые образцы для определения минимально необходимого разведения.

10.1.1.7. Калибровочная кривая

Функция отклика калибровочной кривой измеряется косвенно и, как правило, не является линейной, часто сигмоидальна. Для описания аналитического отклика необходимо использовать как минимум 6 калибровочных стандартов в двух повторах. Концентрацию аналита в калибровочных стандартах устанавливают таким образом, чтобы равномерно распределить их на логарифмической шкале в границах предполагаемого диапазона. Для более точного описания зависимости аналитического отклика от концентрации аналита возможно использование дополнительных калибровочных стандартов, концентрация которых выходит за пределы диапазона количественного определения. При валидации следует оценивать минимум 6 независимых циклов. Результаты должны быть представлены в таблице для представления общей робастности регрессионной модели калибровочной кривой. Калибровочный стандарт может быть исключен из данных по причине установленной технической ошибки (например, ошибка при отмеривании пипеткой). Значения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по результатам измерений должны быть в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения ($\pm 25\%$ при LLOQ и ULOQ), по крайней мере, для 75% калибровочных стандартов. Для дополнительных калибровочных стандартов не требуются критерии приемлемости, поскольку они находятся за пределами количественно оцениваемого диапазона калибровочной кривой.

10.1.1.8. Прецизионность и правильность

Для оценки правильности и прецизионности образцы QC должны быть не свежеприготовленными, а должны быть заморожены и обработаны тем же способом, что и для анализа исследуемых образцов. Для оценки правильности и прецизионности, а также неопределенности результатов анализа следует использовать, по крайней мере, 5 образцов QC (предполагаемый LLOQ; образец, концентрация которого менее трехкратного LLOQ; средний; высокий; предполагаемый ULOQ). Валидация должна имитировать реальный анализ исследуемых образцов. Например, если исследуемый образец измеряется дважды (т.е. 2-х кратно приготовленный), как рекомендовано, то и во время валидации образцы QC следует анализировать и готовить таким же образом. Измерения следует выполнять по всем циклам в течение нескольких дней. Принимая во внимание внутрисерийную и межсерийную правильность, средняя концентрация должна находиться в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения на каждом уровне концентрации ($\pm 25\%$ для LLOQ и ULOQ). Внутрисерийная и межсерийная прецизионность должна находиться в диапазоне 20% (25% при LLOQ и ULOQ). Кроме того, общая ошибка (т.е. сумма абсолютного значения относительной ошибки в процентах и коэффициента вариации в процентах) не должна превышать 30% (40% при LLOQ и ULOQ).

10.1.1.9. Линейность при разведении

При необходимости, допустимость разведения следует продемонстрировать введением в матрицу аналита при концентрации выше ULOQ и разведением этого образца «бланк-матрицей» (минимум пять определений для каждого разведения). При узком диапазоне калибровочной кривой при использовании образцов QC необходимо продемонстрировать, что в тех случаях, когда концентрация определяемого аналита, превышает диапазон количественного определения (выше ULOQ), аналит может количественно точно определяться после разведения образцом «бланк матрицы» (до концентраций аналита в валидированном диапазоне). Еще одной причиной для проведения экспериментов по разведению является обнаружение возможной прозоны или «хук эффекта» ("hook effect"), т.е. уменьшение сигнала, вызванного высокими концентрациями аналита. Значения концентраций, рассчитанные по результатам измерений для каждого разведения должны быть в пределах 20% от номинальной концентрации после поправки на разведение, а прецизионность конечных концентраций по всем разведениям не должна превышать 20%.

10.1.1.10. Параллельность

Если исследуемые образцы имеются в наличии, следует оценивать параллельность между калибровочной кривой и кривой, построенной с использованием разведенных исследуемых образцов для обнаружения возможного матричного эффекта или сродства к метаболитам. Исследуемый образец с высокой концентрацией аналита (предпочтительно близкой к $C_{макс}$) следует разбавлять «бланк матрицей» как минимум для получения трех концентраций. Прецизионность между образцами в серии разведений не должна превышать 30%. В случае, если образец не разводится линейно (т.е. кривая не параллельна калибровочной кривой) заранее должен быть установлен порядок представления результатов. Если исследуемые образцы отсутствуют в наличии во время валидации методики, параллельность следует оценивать, как только исследуемые образцы станут доступными.

10.1.1.11. Стабильность образцов

Стабильность аналита оценивается с использованием образцов с низким и высоким концентрациями аналита. Как упоминалось ранее, исследование стабильности должно охватывать кратковременную стабильность при комнатной температуре или при температуре обработки образцов, а

также стабильности при замораживании/размораживании. Кроме того, долгосрочную стабильность при замораживании следует изучать при каждой температуре, при которой исследуемые образцы будут храниться. Может быть использован бреккетинг-подход.

Средняя концентрация на каждом концентрационном уровне должна быть в пределах 20% от номинальной. Несоответствие этому критерию следует обосновать.

10.1.1.12. Реактивы

Критичные реактивы, включая реагенты связывания (например, связывающие протеины, аптамеры, антитела или конъюгированные антитела), и те, которые содержат ферментные компоненты, оказывают прямое влияние на результаты количественного анализа, и поэтому их качество должно быть гарантировано. Таким образом, при изменении партии реагентов во время проведения валидации или анализа образцов должны быть проверены аналитические характеристики методики, чтобы гарантировать их неизменность по сравнению с исходной или предыдущей партией.

Условия, гарантирующие поддержание стабильности как некритических реагентов (например, буферы, разбавители или подкисления реагентов) так и, что более важно критических реагентов должны быть задокументированы, чтобы убедиться, что характеристики методики не изменяются с течением времени.

10.1.1.13. Коммерческие наборы

Могут использоваться коммерческие наборы, предназначенные для других целей, а не только для исследования фармакокинетики. Поэтому, коммерческие наборы необходимо ревалидировать для того, чтобы гарантировать, что образцы LLOQ и QC, которые будут использоваться в реальном диапазоне концентраций, позволят достоверно и точно проводить анализ образца. При этом применяются принципы валидации, перечисленные выше.

10.2 Частичная и перекрестная валидация

Все аспекты валидации, описанные в предыдущих разделах, применимы к методикам, основанным на связывании лигандов.

10.3 Анализ исследуемых образцов

10.3.1 Аналитический цикл

Чаще всего для лиганд-связывания (LBA) используются пластины микротитра. В одном аналитическом цикле может использоваться несколько отдельных пластин, но каждая пластина должна содержать индивидуальный набор калибровочных стандартов и образцов QC для компенсации различий в эксплуатационных характеристиках пластин. Емкость образцов на некоторых пластинах может быть ограничена. Тогда приемлемо, чтобы набор калибровочных стандартов был нанесен на первую и последнюю пластину, а образцы QC - отдельно на каждую пластину. Рекомендуется готовить и анализировать исследуемый образец дважды.

10.3.2 Критерии приемлемости для анализа исследуемых образцов

Значения концентраций калибровочных стандартов, рассчитанные по результатам измерений (back-calculated) должны находиться в диапазоне 20% от номинального значения, за исключением LLOQ и ULOQ, для которых значения концентраций должны находиться в пределах 25%. По крайней мере, 75% калибровочных стандартов (минимально - 6), должны отвечать этому критерию. Это требование не применяется к дополнительным калибровочным стандартам, не входящим в диапазон калибровочных кривых.

Каждая пластина должна включать, как минимум, 3 концентрации образцов QC (низкую, среднюю и высокую), как минимум, в 2 повторах. Во время валидации анализ образцов QC должен имитировать анализ исследуемых образцов. По крайней мере, 67% образцов QC и 50% на каждом уровне концентрации должны быть в пределах 20% от номинального значения. Отклонения от этого критерия следует обосновать.

10.3.3 Повторный анализ исследуемых образцов

Все рекомендации в отношении повторного анализа исследуемого образца, приведенные в ранее, применимы к анализам лиганд-связывания. Концентрация, полученная в ходе первоначального анализа, и концентрация, полученная при повторном анализе, должны находиться в пределах 30% от среднего значения, по крайней мере, для 67% повторов.

11 Отчеты

11.1 Отчет о валидации

В зависимости от уровня детализации информации, представленной в отчете о валидации, может быть достаточно ссылки на СОПы по соответствующим аналитическим процедурам, или эти СОПы следует приложить к отчету.

Все исходные данные должны быть доступны в своем оригинальном формате и предоставляться по запросу.

Любое отклонение от протокола валидации следует регистрировать.

Отчет о валидации должен включать, как минимум, следующую информацию:

- резюме характеристик валидации;
 - подробную информацию о применяемой аналитической методике и, при необходимости, источнике аналитической методики (ссылки на источники литературы и/или изменения в процедуре);
 - подробную информацию о процедуре количественного анализа (аналит, внутренний стандарт (IS), предварительная обработка образца, экстракция/выделение и анализ);
 - стандартные образцы (происхождение, номер партии, сертификат анализа, стабильность и условия хранения);
 - калибровочные стандарты и образцы QC (матрица, при необходимости, антикоагулянт, приготовление, даты приготовления и условия хранения);
 - критерии приемлемости цикла;
 - анализ:
 - 1) таблица всех аналитических циклов с указанием дат анализа, принятых или отклоненных (с указанием причины отклонения);
 - 2) таблица результатов калибровки по всем принятым аналитическим циклам, включая калибровочный диапазон, функцию отклика, обратно рассчитанные концентрации и правильность;
 - 3) таблица результатов анализа образцов QC по всем принятым аналитическим циклам (внутрисерийная и межсерийная прецизионность и правильность); следует четко обозначить значения, несоответствующие критериям приемлемости;
 - 4) данные о стабильности основного раствора, рабочего раствора, образцов QC, охватывающие применяемые условия хранения;
 - 5) данные о селективности, LLOQ, эффекте переноса, матричном эффекте, если необходимо, допустимости разведения;
 - непредвиденные данные, полученные во время валидации с полным обоснованием принятых мер;
 - отклонения от методики и/или СОПов (описание отклонений, влияние на исследование, вспомогательные данные).
- Все измерения с индивидуально рассчитанными концентрациями должны быть представлены в отчете о валидации.

11.2 Аналитический отчет

Аналитический отчет должен включать ссылку на отчет(ы) о валидации, относящийся к анализу исследуемых образцов. Кроме того, следует включать подробное описание анализа исследуемых образцов.

Если аналитический отчет предоставляет подробную информацию, достаточно ссылки в аналитическом отчете на СОПы, специфичные для анализов. Иначе СОПы должны прилагаться к аналитическому отчету.

Все исходные данные должны быть в наличии в их оригинальной форме и предоставляться по запросу.

Любое отклонение от протокола, аналитической процедуры и СОПов должны также обсуждаться в аналитическом отчете.

Аналитический отчет должен включать, по крайней мере, следующую информацию:

- о стандартных образцах (происхождение, партия, сертификат анализа, стабильность, условия хранения);
- о калибровочных стандартах и образцах QC (условия хранения);
- критерии приемлемости цикла (краткое описание, ссылка на специфический протокол или СОП);
- о процедуре количественного анализа (краткое описание);
- о прослеживаемости образца (даты получения и содержание (концентрация), условиях обращения с образцами при их получении, место и условия хранения, если необходимо);
- анализ исследуемого образца:
 - состав аналитической серии (цикла);
 - таблица, в которой указаны все аналитические серии и исследуемые образцы с указанием дат анализов и результаты;
 - таблица результатов анализа калибровочных стандартов всех принятых аналитических серий (циклов);
 - таблица результатов анализа образцов QC по всем принятым аналитическим сериям; значения, не отвечающие критериям приемлемости, должны быть четко отмечены;
 - отклоненные аналитические серии (циклы) (идентичность, дата анализа, причина отклонения);
 - отклонения от методики и/или СОПов (описание отклонений, влияние на исследование, вспомогательные данные);
 - повторный анализ, исключая повторный анализ по аналитическим причинам, таким как

ТКП 554-2014 (02041)

отклоненная серия (цикл) (таблица идентификации образца, причина повторного анализа, первичные значения и значения, полученные при повторном анализе).

Результаты повторного анализа исследуемых образцов можно представить или в отчете о валидации, или в аналитическом отчете, или в отдельном отчете. Для исследований биоэквивалентности все хроматограммы, полученные при сериях (циклах), которые включают 20% субъектов, включая соответствующие образцы QC и калибровочные стандарты, следует приложить к аналитическому отчету. Для других исследований к отчету следует приложить репрезентативные хроматограммы. Дополнительные хроматограммы должны быть доступны по запросу.

В отчет(ы) должна быть включена информация о проведенных аудитах/инспекциях.

Библиография

- [1] EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Guideline on validation of bioanalytical methods. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
(Руководство по валидации биоаналитических методик. Европейского агентства по лекарственным средствам, Лондон, 2009)
- [2] Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
(Руководство для промышленности. Валидация биоаналитической методики. Департамент здравоохранения и социальных служб США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, Центр по оценке и исследованиям лекарственных средств (CDER), Центр ветеринарной медицины (ЦВМ), 2001.)
- [3] Методические рекомендации Министерства здравоохранения Украины
Валидация биоаналитического метода, Киев, 2013

«Минсклиттеркаст»
Директор Государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС»,
д.м.н., профессор

Гапанович В.Н.

Зав. отделом исследований и разработок
Государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС»

Потапова И.Н.

Ведущий научный сотрудник отдела исследований и
разработок Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС», к.т.н.

Шкут В.М.

Старший научный сотрудник отдела исследований и
разработок Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»

Гирстун С.И.