



НАСТАНОВА

ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ВАЛІДАЦІЯ БІОАНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ ТА АНАЛІЗ ДОСЛІДЖУВАНИХ ЗРАЗКІВ (ІСН М10)

СТ-Н МОЗУ 42-7.6:2026

Видання офіційне

Київ
Міністерство охорони здоров'я України
2026

ПЕРЕДМОВА

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

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

РЕКОМЕНДОВАНО ДО ПРИЙНЯТТЯ: Міністерство охорони здоров'я України.

2. ПРИЙНЯТО ТА НАДАНО ЧИННОСТІ: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 10 липня 2026 року № 923.

3. Ця настанова відповідає документу:

Настанова Комітету з лікарських засобів для медичного призначення (Committee for Medicinal Products for Human Use) ЕМА/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis» (Настанова ICH M10 з валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків)

Ступінь відповідності – модифікований (MOD).

Переклад з англійської (en).

4. ВВЕДЕНО вперше.

Зміст

	Стор.
Передмова	II
Національний вступ	VI
Сфера застосування	1
Нормативні посилання	2
Терміни та визначення понять	3
Позначки та скорочення	10
1. ВСТУП	12
1.1. Мета	12
1.2. Основні положення	12
1.3. Сфера застосування	12
2. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	13
2.1. Розробка методики	13
2.2. Валідація методики	14
2.2.1. Повна валідація	14
2.2.2. Часткова валідація	15
2.2.3. Перехресна валідація	15
3. ХРОМАТОГРАФІЯ	15
3.1. Стандартні зразки	15
3.2. Валідація	16
3.2.1. Селективність	16
3.2.2. Специфічність	17
3.2.3. Ефект матриці	18
3.2.4. Калібрувальна крива та діапазон	19
3.2.5. Правильність і прецизійність	20
3.2.5.1. Підготовка зразків контролю якості	20
3.2.5.2. Оцінка правильності і прецизійності	21
3.2.6. Ефект переносу	22
3.2.7. Допустимість розведення	22
3.2.8. Стабільність	23
3.2.9. Реінжекційна відтворюваність (відтворюваність при повторному введенні)	26
3.3. Аналіз досліджуваних зразків	27
3.3.1. Аналітичний цикл	27
3.3.2. Критерії прийнятності аналітичного циклу	28
3.3.3. Калібрувальний діапазон	30
3.3.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків	30
3.3.5. Повторна інжекція досліджуваних зразків	32
3.3.6. Інтегрування хроматограм	32
4. МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ, ЩО БАЗУЮТЬСЯ НА ЗВ'ЯЗУВАННІ ЛІГАНДІВ	32

4.1. Основні реагенти	32
4.1.1. Стандартні зразки	32
4.1.2. Критичні реагенти	33
4.2. Валідація	34
4.2.1. Специфічність	34
4.2.2. Селективність	35
4.2.3. Діапазон калібрувальної кривої	36
4.2.4. Правильність і прецизійність	37
4.2.4.1. Підготовка зразків контролю якості	37
4.2.4.2. Оцінка правильності та прицезійності	37
4.2.5. Ефект переносу	38
4.2.6. Лінійність розведення та «хук ефект» (hook effect)	38
4.2.7. Стабільність	39
4.3. Аналіз досліджуваних зразків	41
4.3.1. Аналітичний цикл	41
4.3.2. Критерії прийнятності аналітичного циклу	42
4.3.3. Калібрувальний діапазон	43
4.3.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків	43
5. ОБОВ'ЯЗКОВИЙ ПОВТОРНИЙ АНАЛІЗ ДОСЛІДЖУВАНИХ ЗРАЗКІВ	45
6. ЧАСТКОВА ТА ПЕРЕХРЕСНА ВАЛІДАЦІЯ	47
6.1. Часткова валідація	47
6.2. Перехресна валідація	48
7. ДОДАТКОВЕ ОБГОВОРЕННЯ	49
7.1. Методики для аналітів, що є ендогенними молекулами	49
7.1.1. Зразки контролю якості в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами	51
7.1.2. Селективність, відновлення та ефект матриці в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами	52
7.1.3. Паралелізм в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами	53
7.1.4. Правильність і прецизійність в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами	53
7.1.5. Стабільність в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами	54
7.2. Паралелізм	54
7.3. Відновлення (Recovery)	55
7.4. Мінімально необхідне розведення	55
7.5. Комерційні і діагностичні набори	55
7.6. Нові або альтернативні технології	57
7.6.1. Методики сухих матриць	57
8. ДОКУМЕНТАЦІЯ	58
8.1. Загальна інформація	58
8.2. Документація для звітів з валідації та біоаналітичних звітів	59

Національний додаток	71
Перелік редакційних змін та доповнень	
Національний додаток	73
Бібліографія	

НАЦІОНАЛЬНИЙ ВСТУП

Використання надійних біоаналітичних методик є ключовим етапом у розробці лікарських засобів та оцінці їх властивостей. Біоаналітичні методики, що застосовуються для кількісного визначення діючої речовини та/або її активних метаболітів у біологічних рідинах, відіграють важливу роль при оцінці та інтерпретації результатів досліджень біодоступності, біоеквівалентності, а також фармакокінетичних і токсикокінетичних досліджень.

Для отримання достовірних і відтворюваних результатів необхідно застосовувати добре охарактеризовані та повністю валідовані біоаналітичні методики. Валідація біоаналітичної методики, на відміну від звичайної аналітичної, додатково охоплює такі етапи, як відбір, обробка, транспортування, зберігання та підготовка зразків, що мають суттєве значення для розробки лікарських засобів, а також для подання цих даних у складі реєстраційних матеріалів [1, 7, 8, 10, 13].

Відповідно до Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 (zareestrovano u Ministerstvi yustitsii 19 veresnya 2005 roku za № 1069/11349), у складі реєстраційних матеріалів на лікарський засіб повинні бути надані дані випробувань, проведених для оцінки біодоступності та/або біоеквівалентності лікарських засобів і визначення фармакокінетичних характеристик [1].

У Європейському Союзі чинним є керівництво ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (EMA/CHMP/ICH/172948/2019) (далі – ICH M10), підготовлене Комітетом з лікарських засобів для медичного призначення (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) Європейського агентства з лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA) [11]. Документ визначає загальні методичні підходи до валідації біоаналітичних методик, вимоги до оцінки результатів валідації, а також вимоги до проведення аналізу біологічних зразків, отриманих під час досліджень на тваринах і людях, із встановленням критеріїв прийнятності отриманих результатів.

Враховуючи наведене, виникла необхідність у впровадженні в Україні настанови, гармонізованої з положеннями відповідної настанови ЄС, що містить актуалізовані рекомендації щодо валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків.

Ця настанова підготовлена відповідно до керівництва ICH M10 [11]. Її мета – надати рекомендації щодо проведення біоаналітичної частини

фармакокінетичних і токсикокінетичних досліджень, зокрема досліджень біодоступності та біоеквівалентності при вивченні властивостей лікарських засобів, а також при доведенні біоеквівалентності лікарських препаратів.

Положення цієї настанови слід застосовувати з урахуванням чинного законодавства України у сфері реєстрації лікарських засобів, проведення доклінічних і клінічних досліджень, а також доведення біоеквівалентності.

Організацією, відповідальною за цю настанову, є Міністерство охорони здоров'я України (МОЗ). Відповідальність за наукову достовірність даних, поданих у реєстраційних матеріалах, покладається на заявників. Біоаналітичні методики повинні бути надійно валідованими та оновлюватися відповідно до сучасних наукових досягнень, що відповідають меті дослідження.

Керівництво ICH M10 набуло чинності 21 січня 2023 року, формально замінивши попереднє керівництво ЕМА «Guideline on Bioanalytical Method Validation» (CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2), яке було чинним із 1 лютого 2012 року. Відтак, біоаналітична частина досліджень, розпочатих і проведених після 21 січня 2023 року, має відповідати вимогам ICH M10. Якщо розробка була розпочата незадовго до цієї дати (наприклад, під час ранньої клінічної фази), слід розглянути можливість переходу до вимог керівництва ICH M10.

Водночас, відповідно до документа ЕМА/449486/2023 «Implementation Strategy of ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation» [12], допускається застосування попереднього керівництва CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2 та гармонізованої з ним Настанови СТ-Н МОЗУ 42-7.8:2021 «Лікарські засоби. Біоаналітична частина дослідження» [4] у таких випадках:

- якщо станом на 21 січня 2023 року тривала завершальна фаза розробки (наприклад, III фаза клінічних випробувань із завершеними фармакокінетичними дослідженнями або, у випадку генеричних препаратів, коли валідація біоаналітичної методики вже проведена, а дослідження біоеквівалентності перебуває на завершальній стадії), такі дослідження можуть бути завершені відповідно до вимог попереднього керівництва;
- якщо (не)клінічна розробка, що є частиною реєстраційного дос'є, була завершена до 21 січня 2023 року, а подання заяви планується після цієї дати, не потрібно змінювати або повторно валідувати біоаналітичну методику відповідно до ICH M10, за умови, що застосовувалось керівництво CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2 і проведені дослідження загалом відповідають його вимогам. Це також поширюється

на завершені дослідження біоеквівалентності, результати яких передаються новим заявникам;

- якщо валідація біоаналітичної методики була проведена до 21 січня 2023 року, а дослідження біоеквівалентності заплановано на пізніший термін (наприклад, у 2024 році), методики, валідовані відповідно до CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**, можуть бути прийнятними. Це допустимо, якщо відхилення від вимог ІСН М10 є науково обґрунтованими. У таких випадках у реєстраційному досьє необхідно чітко описати відмінності між проведеною валідацією та вимогами ІСН М10 (наприклад, застосування альтернативної методології при оцінці матричного ефекту) та обґрунтувати, чому вони не впливають на достовірність отриманих даних. Водночас відсутність еквівалентних вимог до валідації, як у ІСН М10, не розглядається як прийнятна.

Ця настанова містить положення, що відповідають чинному законодавству України.

До документа внесено окремі зміни, зумовлені національними правовими вимогами та прийнятими в Україні гармонізованими нормативними документами. Відповідні зміни наведено у національному додатку «Перелік редакційних змін та доповнень» цієї настанови.

Правовий статус цієї настанови відповідає статусу відповідної настанови Європейського Союзу, з якою вона гармонізована. Документ має статус технічної настанови, що містить рекомендації для заявників (власників реєстраційних посвідчень), розробників, дослідників, виробників лікарських препаратів, експертних і регуляторних органів та інших зацікавлених сторін щодо виконання вимог законодавства України у сфері обігу лікарських засобів.

Положення цієї настанови відображають гармонізований підхід, прийнятий у ЄС підхід, заснований на сучасних наукових досягненнях у галузі біоаналітичних досліджень. Такий підхід до правового статусу наукових настанов викладено в документі «Procedure for European Union Guidelines and Related Documents within the Pharmaceutical Legislative Framework» (Doc. Ref. EMEA/P/24143/2004 Rev.1 corr) Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА) [13]. Вказаний підхід також узгоджується з позицією Світової організації торгівлі щодо застосування міжнародних стандартів.

Отже, дотримання положень цієї настанови усіма зацікавленими сторонами сприятиме належному плануванню та проведенню досліджень, полегшить експертизу реєстраційних матеріалів і сприятиме підвищенню якості, ефективності та безпеки лікарських засобів в Україні.

НАСТАНОВА
ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ
Біоаналітична частина дослідження

MEDICINAL PRODUCTS
Bioanalytical method validation

Чинна з

СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Ця настанова визначає ключові елементи, необхідні для проведення біоаналітичної частини фармакокінетичних і токсикокінетичних досліджень, зокрема досліджень біодоступності та біоеквівалентності лікарських засобів. Такі випробування проводяться на тваринах під час доклінічних досліджень та на людях у межах клінічних випробувань.

У настанові викладено підходи до валідації біоаналітичних методик, призначених для кількісного визначення концентрацій аналіту (діючої речовини) та/або його активного метаболіту, що використовуються для встановлення фармакокінетичних і токсикокінетичних параметрів. Також наведено опис проведення біоаналітичного випробування та встановлено критерії застосування валідованих методик під час рутинного аналізу біологічних зразків, отриманих у дослідженнях. Настанова містить критерії та підходи до оцінки результатів, отриманих з урахуванням властивостей аналіту.

Ця настанова рекомендується для суб'єктів господарювання, що здійснюють розробку лікарських засобів, проводять дослідження біодоступності та біоеквівалентності, формують реєстраційні матеріали та беруть участь у процедурах державної реєстрації лікарських засобів на території України - незалежно від відомчого підпорядкування чи форми власності.

НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

У цій настанові є посилання на такі нормативні документи:

- Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» із змінами.
- Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council, of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use//Official Journal of the European Communities. – L 311, 28.11.2001. – P. 67-128 (Директива 2001/83/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 6 листопада 2001 року про кодекс Співтовариства відносно лікарських засобів для медичного призначення//Official Journal of the European Communities. – L 311, 28.11.2001. – P. 67-128).
- Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (codified version) (Директива 2004/10/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про гармонізацію законів, постанов і адміністративних положень, що стосуються застосування принципів належної лабораторної практики (GLP) і перевірки їх застосування при дослідженні хімічних речовин).
- Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) (Директива 2004/9/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про інспекцію та перевірку належної лабораторної практики (GLP)).
- EMA/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis» (Керівництво ICH M10 з валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків).
- EMA/449486/2023 «Implementation strategy of ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation» (Стратегія впровадження керівництва ICH M10 з валідації біоаналітичної методи).

ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ

Аналіз (Analysis):

Серія аналітичних процедур від обробки або розведення зразка до вимірювання на аналітичному приладі

Аналіт (Analyte):

Вимірюваний специфічний хімічний компонент, який може бути діючою речовиною, біомолекулою, її похідним, метаболітом або продуктом розпаду в біологічній матриці

Аналітичний цикл (Analytical run):

Повний набір аналітичних і досліджуваних зразків з відповідною кількістю калібрувальних стандартів і зразків контролю якості (далі – QC) для їх оцінки. Один або декілька циклів можуть бути виконані в один день, або один цикл може тривати декілька днів.

Біоаналітична методика (Bioanalytical Method):

Аналітична методика, що використовується для кількісного визначення аналітів у біологічних матрицях.

Біологічні діючі речовини (Biological Drugs):

Діючі речовини, що продукуються живими організмами або клітинами (наприклад, терапевтичні білки).

Біологічна матриця (Biological Matrix):

Біологічний матеріал, що включає, але не обмежується кров'ю, сироваткою, плазмою та сечею.

Бланк матриці (Blank Sample):

Зразок біологічної матриці, до якої не додається ні аналіт, ні внутрішній стандарт (далі - IS), ні додаткова чи альтернативна матриця або буфер.

Валідація (Validation):

Підтвердження того, що біоаналітична методика є придатною для виконання поставленої мети.

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

Найбільша кількість аналіту в зразку, яку можна кількісно визначити з попередньо встановленою прецизійністю та правильністю.

Вихідний розчин (Stock Solution):

Аналіт у розчиннику або суміші розчинників відомої концентрації, який використовується для приготування калібрувальних стандартів або QCs.

Відновлення (Recovery):

Ефективність екстракції аналітичного процесу, виражена у відсотках від відомої кількості аналіту, що пройшов через етапи екстракції та обробки зразка в методиці.

Відтворюваність (Reproducibility):

Ступінь співпадіння результатів при повторенні експерименту.

Відхилення (Bias):

Тенденція вимірювань до систематичного завищення або заниження значення параметра.

Внутрішній стандарт (Internal standard, IS):

Структурно подібна або стабільно мічена сполука, додана в калібрувальні стандарти, QC та досліджувані зразки у відомій та постійній концентрації для полегшення кількісного визначення цільового аналіту.

Допустимість розведення (Dilution Integrity):

Оцінка процедури розведення зразка для підтвердження, що розведення не впливає на вимірювану концентрацію аналіту.

Досліджувані зразки (Study samples):

Зразки від тварин або суб'єктів, що беруть участь у доклінічних дослідженнях або клінічних випробуваннях.

Загальна похибка (Total Error):

Сума абсолютних значень похибок правильності (%) та прецизійності (%). Загальна похибка подається у вигляді відсоткової (%) похибки.

Зведена таблиця циклу (Run Summary Table):

Табличне представлення всіх даних індивідуальних зразків, QCs і калібрувальних стандартів в межах аналітичного циклу (наприклад, для хроматографії: час утримування, відгуки аналіту і IS, концентрації і коефіцієнти розведення, якщо такі є; для методик, що базуються на зв'язуванні лігандів – відгуки концентрацій аналіту, коефіцієнти розведення).

Зв'язуючий реагент (Binding Reagent):

Реагент, який зв'язується з аналітом у біоаналітичних методиках, що базуються на зв'язуванні лігандів.

Зразки контролю якості (Quality control sample (QC))

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

Ефект матриці (Matrix effect)

Пряма або непряма зміна відгуку аналіту через присутність інших речовин у зразку.

Ефект переносу (Carry over)

Поява сигналу аналіту у зразку через залишки від попереднього зразка.

Інтерферуюча речовина (Interfering Substance):

Речовина, присутня в матриці, що може впливати на кількісне визначення аналіту.

Калібрувальна крива (Calibration Curve)

Залежність між відгуком приладу (наприклад, площею піку, висотою або сигналом) і концентрацією (кількістю) аналіту в калібрувальних стандартах в заданому діапазоні. Також може називатися - Стандартна крива.

Калібрувальний діапазон (Calibration range)

Інтервал між верхнім і нижнім рівнем концентрації (кількістю) аналіту в калібрувальних стандартах (включаючи ці концентрації).

Калібрувальний стандарт (Calibration standard)

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

Коефіцієнт розведення (Dilution Factor):

Величина, на яку розводиться зразок.

Критичний реагент (Critical Reagent):

Критично важливі реагенти методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів включають зв'язуючі реагенти (наприклад, антитіла, зв'язуючі білки, пептиди) і реагенти, що містять ферментні фрагменти, які мають безпосередній вплив на результати аналізу.

Лінійність розведення (Dilution Linearity):

Параметр, що демонструє, що методика може належним чином аналізувати зразки при концентрації, що перевищує ULOQ калібрувальної кривої, без впливу прозонового ефекту (hook effect), і що на виміряні концентрації не впливає розведення в межах калібрувального діапазону в методиках, що базуються на зв'язуванні лігандів.

Мінімально необхідне розведення (Minimum Required Dilution):

Початковий коефіцієнт розведення, за допомогою якого біологічні зразки розбавляють буферним розчином для аналізу за допомогою методик, що базуються на зв'язуванні лігандів. Мінімально необхідне розведення не обов'язково може бути остаточним розведенням, але має бути однаковим для всіх зразків, включаючи калібрувальні стандарти та QC. Однак для деяких зразків може знадобитися подальше розведення.

Методики аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів (Ligand Binding Assay (LBA)):

Методика аналізу досліджуваного аналіту з використанням реагентів, які специфічно зв'язуються з аналітом. Аналіт виявляють за допомогою реагентів, мічених, наприклад, ферментом, радіоізотопом, флуорофором або хромофором. Реакції проводяться в мікротитрованих планшетах, пробірках, дисках тощо.

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

Найменша кількість аналіту в зразку, яку можна кількісно визначити за допомогою методики з попередньо встановленими прецизійністю і правильністю.

Номинальна концентрація (Nominal concentration)

Теоретична або очікувана концентрація.

Нульовий зразок (Zero Sample)

Зразок бланку матриці з доданим внутрішнім стандартом.

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

Повторний аналіз частини отриманих зразків в окремому аналітичному циклі в інший день для підтвердження відтворюваності результатів.

Оброблений зразок (Processed Sample):

Остаточний зразок, який піддавався різним маніпуляціям (наприклад, екстракції, розведенню, концентрації).

Опорні калібрувальні стандарти/опорні точки (Anchor Calibration Standards/Anchor Points):

Доданий набір зразків з концентрацією нижче LLOQ або вище ULOQ калібрувальної кривої, що використовуються для покращення калібрувальної кривої в методиках аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів.

Паралелізм (Parallelism):

Паралелізм підтверджує, що крива відгуку послідовно розведеного зразка паралельна калібрувальній кривій. Паралелізм є характеристикою, що може виявити потенційні матричні ефекти

Перехресна валідація (Cross validation):

Оцінка потенційного відхилення між двома біоаналітичними методиками або однією біоаналітичною методикою, що використовується в різних лабораторіях, з метою визначення того, чи можна порівняти отримані дані.

Повна валідація (Full validation):

Встановлення всіх параметрів валідації для забезпечення цілісності методики при застосуванні до аналізу зразків.

Повторення (Replicate):

Одне з декількох визначень або вимірювань зразка, калібрувальних стандартів або QC.

Правильність (Accuracy)

Ступінь близькості виміряного значення до номінального або відомого істинного значення за встановлених умов (або виміряного певним методом). У цьому документі точність виражається у відсотках від номінального значення.

Правильність (%) = (виміряне значення/ номінальне значення) × 100 %.

Прецизійність (Precision)

Ступінь збігу результатів повторних вимірювань одного зразка. Виражається як коефіцієнт варіації (CV) або відносне стандартне відхилення (RSD), виражене у відсотках. $CV = (\text{стандартне відхилення} / \text{середнє значення}) \times 100 (\%)$.

Придатність системи (System Suitability):

Оцінка придатності приладу (наприклад, співвідношення сигнал/шум, форми піку, часу утримування), що проводиться шляхом аналізу попередньо підготовленого зразка із доданим аналітом перед початком аналітичного циклу, і не є частиною аналізу досліджуваних зразків.

Реаналіз (Reanalysis):

Додаткова оцінка раніше проаналізованого зразка. Також називається повторний аналіз.

Реінтегрування (Reintegration):

Зміна початкового інтегрування хроматографічного піку.

Робочий розчин (Working Solution):

Нематричний розчин, приготовлений шляхом розведення вихідного розчину у відповідному розчиннику. В основному додається до матриці для підготовки калібрувальних стандартів та контрольних зразків якості (QCs).

Селективність (Selectivity):

Здатність аналітичної методики розрізняти та вимірювати аналіт за наявності речовин, що заважають, у біологічній матриці (неспецифічна інтерференція).

Серія в біоаналізі (Batch (for Bioanalysis)):

Серія включає зразки контролю якості (QCs), досліджувані зразки, а також, за потреби, зразки бланку матриці, нульові зразки та калібрувальні стандарти, які обробляються протягом визначеного проміжку часу однією групою аналітиків з використанням одних і тих самих реагентів за однорідних умов.

Серія (для стандартних зразків і реагентів) (Batch (for Reference Standards and Reagents)):

Певна кількість матеріалу, виробленого в процесі або серії процесів, таким чином, що очікується його однорідність в заданих межах. Також називається партією (lot).

Специфічність (Specificity):

Здатність біоаналітичної методики однозначно вимірювати аналіт(и) в матриці в присутності інших компонентів, екзогенних або ендогенних.

Стабільність (Stability):

Хімічна стабільність аналіту в певній матриці в конкретних умовах протягом встановленого часу.

Стандартна крива (Standard Curve):

Зв'язок між відгуком приладу (наприклад, площею піку, висотою або сигналом) та концентрацією (кількістю) аналіту в калібрувальних стандартах у заданому діапазоні. Також називається калібрувальною кривою.

Стандартний зразок (Reference Standard):

Добре охарактеризована діюча речовина відомої чистоти та ідентичності, що використовується для підготовки калібрувальних зразків та QC.

Стандартна операційна процедура (СОП) (Standard Operating Procedure):

Детальні письмові інструкції для досягнення однаковості виконання конкретної функції та/або процесу(ів).

Сурогатна матриця (Surrogate Matrix):

Альтернатива досліджуваній матриці з обмеженою доступністю (наприклад, тканина, спинномозкова рідина, жовч) або у випадках, коли досліджувана матриця містить інтерферуючий ендогенний компонент.

Функція відгуку (Response function):

Математичний вираз, що адекватно описує взаємозв'язок між відгуком приладу/інструменту (наприклад, площа хроматографічного піку або співвідношення висот) і концентрацією (кількістю) аналіту в калібрувальних зразках. Функція відгуку визначається в межах встановленого діапазону.

Хімічні сполуки (Chemical Drugs):

Хімічно синтезовані сполуки.

Хук ефект (Hook Effect):

Перекриття відгуку через дуже високі концентрації певного аналіту. Хук ефект може виникати в методиках аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів, які використовують стадію рідиннофазної реакції для інкубації зв'язуючих реагентів з аналітом. Також називається прозоновим ефектом.

Часткова валідація (Partial validation):

Валідація на основі оцінки обраних параметрів валідації. Застосовується до методик, які були змінені після повної валідації.

Чутливість (Sensitivity):

Найнижча концентрація аналіту, яку можна виміряти з прийнятною правильністю та прецизійністю (тобто LLOQ).

ПОЗНАКИ ТА СКОРОЧЕННЯ

EU (ЄС)	– European Union (<i>Європейський Союз</i>)
EEA	– European Economic Area (<i>Європейська економічна зона</i>)
EMA	– The European Medicine Agency (<i>Європейське агентство з лікарських засобів</i>)
CHMP	– Committee for Medicinal Products for Human Use (<i>Комітет з лікарських засобів для медичного призначення</i>)
CTD	– Common Technical Document (<i>Загальний технічний документ</i>)
CRF	– Case report form (<i>індивідуальна реєстраційна форма</i>)
ICH	– International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (<i>Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для людини</i>)
IS	– Internal standard (<i>внутрішній стандарт</i>)
ISR	– Incurred sample reanalysis (<i>обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків</i>)
GLP	– Good Laboratory Practice (<i>належна лабораторна практика</i>)
GC	Gas chromatography (<i>газова хроматографія</i>)
GCP	– Good Clinical Practice (<i>належна клінічна практика</i>)
LBAs	Ligand binding assays (<i>методика аналізу, що базується на зв'язуванні лігандів</i>)
LC	Liquid chromatography (<i>рідинна хроматографія</i>)
LLOQ	– Lower limit of quantification (<i>нижня межа кількісного визначення</i>)
MF	– Matrix Factor (<i>матричний фактор</i>)
MS	Mass spectrometry (<i>мас-спектрометрія</i>)

PKWP	– Pharmacokinetics Working Party (<i>Робоча група з фармакокінетики</i>)
CV	– Coefficient of variation (<i>коефіцієнт варіації</i>)
RSD	– Relative Standard Deviation (<i>Відносне стандартне відхилення</i>)
Within-subject CV	– Within-subject coefficient of variation (<i>внутрішньосуб'єктна варіабельність</i>)
QCs	– Quality control samples (<i>зразки контролю якості</i>)
ULOQ	– Upper limit of quantification (<i>верхня межа кількісного визначення</i>)
ДФУ	– Державна Фармакопея України
МОЗ	– Міністерство охорони здоров'я
СОП	– Стандарт операційної процедури
СТ-Н МОЗУ	– Настанова МОЗ України

1.ВСТУП

1.1. Мета

Ця настанова надає рекомендації щодо валідації біоаналітичних методик кількісного визначення хімічних і біологічних лікарських засобів та їх застосування в аналізі досліджуваних зразків. Дотримання принципів, викладених у цій настанові, забезпечить якість і узгодженість біоаналітичних даних для підтримки розробки, державної реєстрації та внесення змін до матеріалів реєстраційного досьє як хімічних, так і біологічних лікарських засобів.

Метою валідації біоаналітичної методики є доказ її придатності для використання за призначенням. Відхилення від рекомендацій, наведених у цій настанові, можуть бути прийнятними за умови надання відповідного наукового обґрунтування. Заявникам рекомендується консультуватися з регуляторним(-и) органом(-ами) щодо суттєвих змін у підходах до валідації методики, коли пропонується або застосовується альтернативний підхід.

1.2. Основні положення

Вимірювання концентрації хімічних і біологічних діючих речовин та їхніх метаболітів у біологічних матрицях є важливим аспектом розробки лікарських засобів. Результати досліджень із застосуванням таких методик сприяють прийняттю регуляторних рішень щодо безпеки та ефективності лікарських засобів. Тому дуже важливо, щоб біоаналітичні методики, що використовуються, були добре охарактеризовані, належним чином валідовані та задокументовані, щоб забезпечити надійні дані для підтримки регуляторних рішень.

Настанова спрямована на сприяння розробці лікарських засобів із дотриманням принципів 3R: Reduce (зменшення кількості тварин), Refine (поліпшення умов досліджень) і Replace (заміна тваринних моделей альтернативними підходами), де це обґрунтовано.

1.3. Сфера застосування

Ця настанова описує валідацію біоаналітичних методик та аналіз досліджуваних зразків, які, як очікується, будуть використовуватися для підтримки регуляторних рішень. Настанова застосовується до біоаналітичних методик, що використовуються для вимірювання концентрацій хімічних і біологічних діючих речовин та їх метаболітів у біологічних зразках (напр., крові, плазмі, сироватці, інших біологічних рідинах або тканинах), отриманих у доклінічних токсикокінетичних дослідженнях, проведених відповідно до принципів належної лабораторної практики (GLP), доклінічних фармакокінетичних дослідженнях, проведених як заміна клінічних випробувань, а також на

всіх фазах клінічних випробувань, включаючи дослідження порівняльної біодоступності/біоеквівалентності, що подаються до регуляторних органів. Очікується, що повна валідація методики буде проведена для основної матриці, призначеної для підтримки подачі документів до регуляторних органів. Додаткові матриці повинні бути валідовані за необхідності.

Для досліджень, які не подаються для регуляторного затвердження (наприклад, попередні дослідження), заявники можуть самостійно визначати рівень кваліфікації, відповідний їх внутрішнім вимогам. Інформація в цій настанові стосується методик кількісного аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів (LBAs) і хроматографічних методиках таких як рідинна хроматографія (LC) або газова хроматографія (GC), які зазвичай використовуються в поєднанні з мас-спектрометричним детектуванням (MS).

Для досліджень, що підпадають під вимоги GLP або належної клінічної практики (GCP), біоаналіз досліджуваних зразків також повинен відповідати їхнім вимогам.

Біоаналіз біомаркерів та біоаналітичні методики, що використовуються для оцінки імуногенності, не входять до сфери дії цієї настанови.

2. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

2.1. Розробка методики

Метою розробки біоаналітичної методики є визначення дизайну, умов проведення, обмежень і придатності методики для її цільового призначення, а також забезпечення готовності методики до валідації.

До або під час розробки біоаналітичної методики заявнику рекомендується, якщо це можливо, вивчити досліджуваний аналіт (наприклад, фізико-хімічні властивості діючої речовини, *in vitro* та *in vivo* метаболізм, переважний розподіл між еритроцитами і плазмою, зв'язування з білками), а також врахувати аспекти будь-яких попередніх аналітичних методик, що можуть бути застосовані.

Розробка методики включає визначення процедур і умов, пов'язаних з кількісним визначенням аналіту. Розробка методики може охоплювати характеристики таких біоаналітичних параметрів, як: стандартні зразки, критичні реагенти, калібрувальна крива, зразки контролю якості (QCs), селективність і специфічність, чутливість, правильність, прецизійність, ступінь екстракції, стабільність аналіту, мінімально необхідне розведення.

Розробка біоаналітичного методу не вимагає ведення обширних записів або нотаток. Після розробки методики його валідація доводить, що методика підходить для аналізу зразків дослідження..

Якщо під час аналізу зразків доклінічного дослідження або клінічного випробування виникає проблема з методикою, що потребує зупинення аналізу, будь-які зміни в методиці та обґрунтування повинні бути задокументовані.

2.2. Валідація методики

2.2.1. Повна валідація

Валідація біоаналітичної методики забезпечує прийнятність виконання аналізу та надійності аналітичних результатів. Біоаналітична методика визначається як набір процедур, що використовуються для вимірювання концентрації аналіту в біологічних зразках. Повну валідацію біоаналітичної методики потрібно проводити під час створення біоаналітичної методики для кількісного визначення аналіту в клінічних і, за потреби, доклінічних дослідженнях. Повну валідацію також слід виконувати при впровадженні аналітичної методики, описаної в літературі, а також коли комерційний набір перепрофільовано для біоаналітичного використання при розробці лікарських засобів. Зазвичай визначають один аналіт, але в деяких випадках може бути доречним вимірювання кількох аналітів. Це може стосуватися двох різних лікарських засобів, вихідного лікарського засобу та його метаболітів, а також енантімерів або ізомерів лікарського засобу. У цих випадках принципи валідації та аналізу застосовуються до всіх досліджуваних аналітів. Для хроматографічних методик повна валідація повинна включати наступні показники, якщо не обґрунтовано інше: селективність, специфічність, ефект матриці, калібрувальна крива (функція відгуку), діапазон (від нижньої межі кількісного визначення (lower limit of quantification, LLOQ) до верхньої межі кількісного визначення (upper limit of quantification ULOQ), правильність, прецизійність, ефект переносу, допустимість розведення, стабільність і реінжекційна відтворюваність.

Для методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів повинні бути оцінені такі показники, якщо не обґрунтовано інше: специфічність, селективність, калібрувальна крива, діапазон (від LLOQ до ULOQ), правильність, прецизійність, ефект переносу, лінійність розведення та стабільність. За необхідності може бути проведений паралелізм, якщо доступні відповідні досліджувані зразки.

Оцінки під час валідації повинні відповідати робочому процесу аналізу зразків. Матриця для валідації повинна бути такою самою, як і матриця досліджуваних зразків, включаючи антикоагулянти та добавки. У деяких випадках може бути важко отримати матрицю ідентичну матриці досліджуваних зразків (наприклад, рідкісні матриці, такі як тканина, спинномозкова рідина, жовч або вільна фракція лікарського засобу). У

таких випадках сурогатні матриці можуть бути прийнятними для валідації аналітичної методики.

Вибір сурогатної матриці повинен бути науково обґрунтованим. Відмінності матриці у межах виду (наприклад, вік, етнічна приналежність, стать), як правило, не враховуються під час валідації методики.

Конкретний, детальний, письмовий опис біоаналітичної методики та процедури валідації повинен бути створений апріорі. Цей опис може бути у формі протоколу, плану дослідження, звіту, блокнота або стандартної операційної процедури (СОП).

2.2.2. Часткова валідація

Будь-які зміни в повністю валідованій аналітичній методиці можуть бути оцінені шляхом часткової валідації. Часткова валідація може включати як лише від одного визначення правильності та прецизійності так і до майже повної валідації (див. розділ 6.1). Показники часткової валідації повинні бути визначені відповідно до обсягу та характеру змін, внесених до методики.

2.2.3. Перехресна валідація

Перехресна валідація необхідна для того, щоб довести взаємозв'язок представлених даних, якщо використано декілька біоаналітичних методик та/або декілька біоаналітичних лабораторій. (Див. розділ 6.2).

3. ХРОМАТОГРАФІЯ

3.1. Стандартні зразки

Під час валідації методики та аналізу досліджуваних зразків у зразок бланк матриці додають досліджуваний(-і) аналіт(-и), використовуючи розчини стандартного(-их) зразка(-ів) для приготування калібрувальних стандартів і QCs. Калібрувальні стандарти та QCs повинні бути приготовлені з окремих вихідних розчинів. Проте, калібрувальні стандарти та QCs можуть бути приготовлені з одного й того самого вихідного розчину за умови, що було перевірено правильність приготування та стабільність вихідного розчину.

Під час обробки зразків до всіх калібрувальних стандартів, QCs і досліджуваних зразків повинен бути доданий відповідний внутрішній стандарт (IS). Відсутність внутрішнього стандарту повинна бути обґрунтована.

Важливо, щоб стандартний зразок був добре охарактеризований, а якість (наприклад, чистота, ідентичність) стандартного зразка та придатність IS були забезпечені, оскільки якість впливатиме на результат аналізу і,

відповідно, на дані дослідження. Стандартний зразок, який використовують під час валідації та аналізу досліджуваних зразків, повинен бути отриманий з автентичного та простежуваного джерела. Стандартний зразок повинен бути ідентичним до досліджуваного зразка. Якщо це неможливо, встановлена форма (наприклад, сіль або гідрат) відомої якості може бути використана.

Прийнятними стандартними зразками є фармакопейні стандарти, комерційно доступні стандарти або достатньо сертифіковані стандарти, підготовлені всередині лабораторії або зовнішніми організаціями. В сертифікаті аналізу або еквівалентній альтернативі на стандартний зразок повинно бути вказано ступінь чистоти, умови зберігання, закінчення терміну придатності та номер серії.

Сертифікат аналізу не вимагається для IS, якщо продемонстровано придатність для використання, наприклад, відсутністю аналітичної інтерференції для самої речовини або будь-яких її домішок.

Рекомендується використання, коли це можливо, в якості IS аналіту, міченого стабільним ізотопом, якщо застосовується мас-селективний детектор,. Однак, важливо, щоб мічений стандарт мав високу ізотопну чистоту і щоб не відбувалася реакція ізотопного обміну. Наявність неміченого аналіту повинна бути перевірена, і якщо його виявлено, то під час валідації методики повинен бути оцінений його потенційний вплив.

Вихідні та робочі розчини повинні бути приготовлені тільки зі стандартних зразків, термін придатності яких не перевищує зазначений у сертифікаті аналізу (або термін придатності, або дату повторного аналізу).

3.2. Валідація

3.2.1. Селективність

Селективність – це здатність аналітичної методики розрізняти і вимірювати аналіт у присутності інтерферуєючих речовин біологічних зразках бланку матриці.

Селективність повинна бути оцінена з використанням зразків бланку матриці (оброблені зразки матриці без додавання аналіту або IS, отриманих щонайменше з 6 індивідуальних джерел (негемолізованих і неліпемічних). Використання меншої кількості джерел може бути прийнятним у випадку рідкісних матриць. Також потрібно оцінити селективність для IS.

Оцінка селективності повинна продемонструвати, що не спостерігається значної реакції, пов'язаної з інтерферуєючими компонентами протягом часу(-ів) утримування аналіту або IS в зразках бланку матриці. Відгук,

зумовлений інтерферуючими компонентами не повинен перевищувати 20% для аналіту і 5% для IS в зразку LLOQ для кожної матриці.

Для дослідження селективності ліпемічних матриць потрібно використовувати принаймні одне джерело матриці. Щоб бути науково значущою, матриця, що використовується для цих тестів, повинна бути максимально репрезентативною до очікуваних зразків дослідження. Природна ліпемічна матриця з аномально високим рівнем тригліцеридів повинна бути отримана від донорів. Хоча рекомендується використовувати ліпемічну матрицю від донорів, якщо її важко отримати, матриця може бути збагачена тригліцеридами, навіть якщо вона не буде репрезентативною до досліджуваних зразків. Однак, якщо діюча речовина впливає на метаболізм ліпідів або якщо досліджувана популяція пацієнтів є гіперліпемічною, використання зразків з додаванням тригліцеридів не рекомендується. Ця оцінка не є необхідною для доклінічних досліджень, якщо тільки діюча речовина не впливає на метаболізм ліпідів або вводиться тваринам конкретної лінії з гіперліпемією.

Для дослідження селективності в гемолізованих матрицях повинно бути використано принаймні одне джерело матриці. Гемолізовані матриці повинні бути отримані шляхом розведення матриці з гемолізованою цільною кров'ю (принаймні 2% об'єм/об'єм) для отримання візуально видимого гемолізованого зразка.

3.2.2. Специфічність

Специфічність – це здатність біоаналітичної методики виявляти і розрізняти аналіт від інших речовин, у тому числі супровідних речовин (наприклад, речовини, що структурно подібні до аналіту, метаболіти, ізомери, домішки, продукти розпаду, що утворюються під час пробопідготовки, або супутні лікарські засоби, які, як очікується, будуть використовуватися для лікування пацієнтів із передбачуваними показаннями).

Якщо передбачається присутність супровідних речовин у досліджуваній біологічній матриці, вплив таких речовин повинен бути оцінений під час валідації методики або, альтернативно, у досліджуваних зразках взятих до введення дози (pre-dose). У випадку методик рідинної хроматографії з мас-селективним детектуванням, оцінка впливу таких речовин може включати порівняння молекулярної маси інтерферуючої супровідної речовини з аналітом і хроматографічне розділення супровідної речовини від аналіту.

Відгуки виявлені та пов'язані з інтерферуючими компонентами не повинні перевищувати 20% для аналіту і 5% для IS в зразку LLOQ.

Можливість зворотного перетворення метаболіту у вихідний аналіт під час послідовних етапів аналізу (включаючи процедури екстракції або в мас-селективному джерелі) також повинна бути оцінена, коли це необхідно (наприклад, потенційно нестабільні метаболіти, такі як складні ефіри, в складні/кислотні метаболіти, нестабільні N-оксиди або глюкуронідні метаболіти, комплекси з лактонним кільцем). Визнано, що така оцінка неможлива на ранніх стадіях розробки лікарського засобу на основі нової хімічної сполуки, коли метаболізм ще не оцінений. Однак очікується, що це питання буде досліджено і за необхідності проведена часткова валідація. Ступінь зворотної конверсії, якщо такий є, повинен бути встановлений і його вплив на результати дослідження повинен бути розглянутий у біоаналітичному звіті.

3.2.3. Ефект матриці

Ефект матриці визначається як зміна відгуку аналіту через інтерферуєючий і часто неідентифікованими компонент(-и) у зразку бланку матриці. Під час валідації методики необхідно оцінити ефект матриці між різними незалежними джерелами/серіями. Ефект матриці повинен бути оцінений, аналізуючи принаймні 3 повтори низьких і високих QC, кожен з яких готують з використанням матриці щонайменше з 6 різних джерел/серій. Для кожного окремого джерела/серії матриці, що оцінюється, правильність повинна бути в межах $\pm 15\%$ від номінальної концентрації, а прецизійність (коефіцієнт варіації, CV%) не повинна перевищувати 15 %. Використання меншої кількості джерел/серій може бути прийнятним у випадку рідкісних матриць.

Ефект матриці також повинен бути оцінений у відповідних популяціях пацієнтів або особливих популяціях (наприклад, з печінковою або нирковою недостатністю) коли це можливо. Під час валідації методики рекомендується проводити додаткову оцінку ефекту матриці з використанням зразків гемолізованої або ліпемічної матриці в кожному конкретному випадку, особливо якщо очікується, що ці умови можуть виникнути під час дослідження.

3.2.4. Калібрувальна крива та діапазон

Калібрувальна крива підтверджує залежність між номінальною концентрацією аналіту і відгуком аналітичної системи/фону на аналіт. Калібрувальні стандарти, приготовлені шляхом додавання в матрицю відомої кількості аналіту(-ів), охоплюють калібрувальний діапазон і складають калібрувальну криву. Калібрувальні стандарти повинні бути підготовлені в тій же біологічній матриці, що і досліджувані зразки. Діапазон калібрування визначається LLOQ, який є найнижчим калібрувальним стандартом, і ULOQ), який є найвищим калібрувальним

стандартом. Окрема калібрувальна крива повинна бути для кожного досліджуваного аналіту і під час валідації методики і в кожному аналітичному циклі .

Калібрувальна крива повинна бути побудована з використанням зразка бланку матриці, нульового зразка (зразок бланку матриці з додаванням IS) і щонайменше 6 калібрувальних стандартів різного концентраційного рівня, включаючи LLOQ та ULOQ.

Повинна бути використана проста регресійна модель, що адекватно описує залежність "концентрація-відгук". Вибір регресійної моделі повинен бути описаний. Модель регресії, схема вагових коефіцієнтів та перетворення повинні бути визначені під час валідації методики. Зразок бланку матриці та нульовий зразок не повинні бути включені у визначення рівняння регресії для калібрувальної кривої. Кожен калібрувальний стандарт може бути проаналізований двічі, у такому випадку в регресійному аналізі повинні бути використані дані всіх прийнятних повторів.

Параметри калібрувальної кривої повинні бути представлені у звіті (наприклад, тангенс кута нахилу і відрізок, що відсікається на осі координат у випадку лінійної залежності). Обернено розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути представлені разом з розрахованими середніми значеннями правильності та прецизійності. Усі прийнятні криві, отримані під час валідації, на основі щонайменше 3 незалежних циклів протягом декількох днів, повинні бути представлені. Правильність обернено розрахованих концентрацій кожного калібрувального стандарту повинна бути в межах $\pm 20\%$ від номінальної концентрації для LLOQ і в межах $\pm 15\%$ на всіх інших рівнях. Принаймні 75 % калібрувальних стандартів, що відповідають, як мінімум, 6 калібрувальним рівням, повинні відповідати вищезазначеним критеріям.

У випадку використання повторів, критерії (в межах $\pm 15\%$ або $\pm 20\%$ для LLOQ) також повинні бути виконані для щонайменше 50 % проаналізованих калібрувальних стандартів для кожного концентраційного рівня. У випадку, якщо калібрувальний стандарт не відповідає цим критеріям, цей зразок калібрувального стандарту повинен бути відхилений, а калібрувальна крива без цього калібрувального стандарту оцінена повторно, включно з регресійним аналізом. Для циклів правильності і прецизійності, якщо всі повтори калібрувального стандарту LLOQ або ULOQ в циклі відхилені, то цикл повинен бути відхилений, можливе джерело відхилення визначене і методика переглянута, за необхідності. Якщо наступний валідаційний цикл також не проходить, то методика повинна бути переглянута перед повторною валідацією.

Калібрувальна крива повинна бути підготовлена з використанням свіжоприготовлених калібрувальних стандартів принаймні в одному оцінюванні. Надалі заморожені калібрувальні стандарти можуть використовуватися протягом визначеного періоду їхньої стабільності.

3.2.5. Правильність і прецизійність

3.2.5.1. Підготовка зразків контролю якості

QCs призначені для імітації досліджуваних зразків і повинні бути приготовлені шляхом додавання відомої кількості аналіту до матриці, з подальшим зберіганням у таких же умовах, як і досліджувані зразки, та аналізом для оцінки достовірності аналітичної методики.

Калібрувальні стандарти та QCs повинні бути приготовлені з окремих вихідних розчинів, щоб уникнути помилкових результатів, не пов'язаних з аналітичними характеристиками методики. Якщо калібрувальні стандарти та QCs все ж були приготовлені з одного й того самого вихідного розчину, правильність і стабільність вихідного розчину повинна бути перевірена. Можна використовувати одне джерело зразка бланку матриці, яке не повинно мати інтерференції та ефекту матриці, як описано в розділі 3.2.3.

QCs для оцінки циклів правильності та прецизійності під час валідації методики повинні бути приготовлені принаймні для 4 рівнів концентрації в межах діапазону калібрувальної кривої: значення LLOQ, в межах трикратного LLOQ (низький QC), приблизно 30 - 50% діапазону калібрувальної кривої (середній QC) і щонайменше 75% ULOQ (високий QC).

Для валідаційних циклів, що не стосуються правильності та прецизійності, низькі, середні та високі QCs можуть бути проаналізовані двічі. Ці QCs, разом з калібрувальними стандартами, будуть основою для прийняття або відхилення циклу.

3.2.5.2. Оцінка правильності і прецизійності

Правильність і прецизійність повинні бути визначені шляхом аналізу QCs в межах кожного циклу (внутрішньосерійна, within-run) і в різних циклах (міжсерійна, between-run). Правильність і прецизійність повинні бути оцінені з використанням одних і тих самих циклів та даних.

Внутрішньосерійна правильність і прецизійність повинні бути оцінені, аналізуючи щонайменше 5 повторень на кожному рівні концентрації QCs у кожному аналітичному циклі. Міжсерійна правильність і прецизійність повинні бути оцінені шляхом аналізу кожного рівня концентрації QCs щонайменше в 3 аналітичних циклах протягом хоча б двох днів. Для того, щоб мати можливість оцінити будь-які зміни в часі в межах одного циклу,

рекомендується довести правильність і прецизійність QCs хоча б в одному з циклів в обсязі, еквівалентному запланованому аналітичному циклу досліджуваних зразків. Представлені дані з валідації методики та визначення правильності і прецизійності повинні включати всі отримані результати, включаючи окремі QCs, що не відповідають критеріям прийнятності, за винятком тих випадків, коли помилки є очевидними і задокументованими. Дані внутрішньосерійної правильності та прецизійності повинні бути представлені для кожного циклу. Якщо критерії внутрішньосерійної правильності або прецизійності не виконуються у всіх циклах, повинна бути розрахована загальна оцінка внутрішньосерійної правильності та прецизійності для кожного рівня QCs. Міжсерійна (середня) прецизійність і правильність повинні бути розраховані шляхом об'єднання даних всіх циклів.

Калібрувальні криві для цих оцінок повинні бути підготовлені з використанням свіжододаних калібрувальних стандартів принаймні в одному циклі. Якщо свіжододані калібрувальні стандарти не використовуються в інших циклах, потрібно довести стабільність заморожених калібрувальних стандартів.

Правильність на кожному рівні концентрації повинна бути в межах $\pm 15 \%$ від номінальної концентрації, за винятком LLOQ, де вона повинна бути в межах $\pm 20 \%$. Прецизійність (%CV) концентрацій, визначених на кожному рівні, не повинна перевищувати 15 %, за винятком LLOQ, де вона не повинна перевищувати 20 %. Для валідаційних циклів, в яких не виконуються критерії правильності і виконуються критерії прецизійності щонайменше 2/3 загальної кількості QCs і щонайменше 50 % на кожному рівні концентрації повинні бути в межах $\pm 15 \%$ від номінальних значень.

3.2.6. Ефект переносу

Ефект переносу – це зміна вимірної концентрації через залишки аналіту з попереднього зразка, що залишаються в аналітичному інструменті.

Ефект переносу повинен бути оцінений та мінімізований під час розробки методики. Під час валідації ефект переносу повинен бути оцінений шляхом аналізу зразків бланку матриці після калібрувального стандарту з концентрацією аналіту, що відповідає ULOQ. Перенос у зразок бланку матриці після найвищого калібрувального стандарту не повинен перевищувати 20 % від відгуку LLOQ для аналіту і 5 % від відгуку для IS. Якщо виявляється, що перенос неминучий, досліджувані зразки не повинні бути рандомізовані. Необхідно передбачити конкретні міри, протестувати їх під час валідації і застосувати під час аналізу досліджуваних зразків, щоб ефект переносу не впливав на правильність і прецизійність. Це може включати введення зразків бланку матриці після

зразків з очікуваною високою концентрацією аналіту перед наступним досліджуванним зразком.

3.2.7. Допустимість розведення

Допустимість розведення – це оцінка процедури розведення зразка, коли це необхідно, для підтвердження того, що вона не впливає на правильність і прецизійність вимірюваної концентрації аналіту. Для розведення слід використовувати ту саму матрицю з того самого виду, що використовується для приготування QCs.

Розведені зразки контролю якості повинні бути підготовлені з концентрацією аналіту в матриці, що перевищує значення ULOQ, а потім розводитись холостою матрицею. За один цикл повинно протестувати щонайменше 5 повторів для кожного коефіцієнта розведення, щоб визначити, чи правильно і точно виміряні концентрації в межах калібрувального діапазону. Коефіцієнт(и) розведення та концентрації, що застосовуються під час аналізу досліджуваного зразка, повинні бути в межах діапазону коефіцієнтів розведення та концентрацій, оцінених під час валідації. Середня правильність розведених зразків контролю якості повинна бути в межах $\pm 15\%$ від номінальної концентрації, а прецизійність (%CV) не повинна перевищувати 15 %.

У випадку рідкісних матриць може бути прийнятним використання сурогатної матриці для розведення. Повинно бути доведено, що це не впливає на прецизійність і правильність.

3.2.8. Стабільність

Оцінка стабільності повинна бути проведена для підтвердження того, що кожен крок, зроблений під час підготовки, обробки та аналізу зразків, а також умови зберігання не впливають на концентрацію аналіту.

Умови зберігання та аналітичні умови, що застосовуються для дослідження стабільності, такі як час і температури зберігання зразків, зразок бланку матриці, антикоагулянт і матеріали контейнера, повинні відповідати умовам, що використовуються для досліджуваних зразків. Посилання на літературні дані не вважаються достатніми. Валідація термінів зберігання повинна проводитися для QCs, що зберігалися протягом часу, що дорівнює або перевищує період зберігання досліджуваних зразків.

Стабільність аналіту в матриці оцінюється з використанням QCs низької та високої концентрації. Аліквоти низької та високої концентрації QCs аналізують в нульовий момент часу і після застосування умов зберігання, що повинні бути оцінені. Для кожного рівня концентрації повинен бути підготовлений один вихідний зразок контролю якості (до розведення). Для кожної досліджуваної концентрації, вихідний зразок повинен бути

розділений мінімум на 3 аліквоти, які будуть зберігатися, зазнавати впливу та аналізуватися.

QCs для вивчення стабільності повинні бути проаналізовані за калібрувальною кривою, отриманою зі свіжододаних калібрувальних стандартів у циклі з відповідними свіжододаними QCс або QCс, для яких була доведена стабільність. Середня концентрація на кожному рівні QCс повинна бути в межах $\pm 15\%$ від номінальної концентрації. Якщо концентрації досліджуваних зразків постійно перевищують ULOQ діапазону калібрування, QCс з високою концентрацією аналіту необхідно скоригувати, щоб відобразити ці вищі концентрації. Вважається, що це може бути неможливим в доклінічних дослідженнях через обмеження розчинності.

Випробування заморожування/танення, короткострокової та довгострокової стабільності аналіту в матриці повинні бути проведені з додаванням до матриці всіх досліджуваних сполук для лікарських засобів, що містять декілька діючих речовин і мають спеціально визначені схеми прийому.

Повинні бути оцінені наступні тести на стабільність:

1. Стабільність аналіту в матриці

Стабільність при заморожуванні/таненні в матриці

Для оцінки впливу повторного вилучення зразків із морозильної камери стабільність аналіту повинна бути оцінена після декількох циклів заморожування і розмороження. QCс з низькою та високою концентраціями аналіту повинні бути розморожені та проаналізовані в тих же умовах, що й досліджувані зразки. Між циклами розмороження зразки повинні бути витримані у замороженому стані щонайменше 12 годин. QCс для оцінки стабільності заморожування/танення повинні бути оцінені з використанням свіжоприготовлених калібрувальних стандартів і QCс або QCс, стабільність яких доведена. Кількість валідованих циклів заморожування/танення повинна дорівнювати або перевищувати кількість циклів заморожування/танення, які пройшли досліджувані зразки, але щонайменше три цикли повинні бути проведені.

Короткострокова стабільність (Bench-top stability) в матриці

Експерименти з короткострокової стабільності в матриці повинні бути розроблені і проведені з урахуванням лабораторних умов поводження з досліджуваними зразками.

QCс з низькою та високою концентраціями аналіту повинні бути розморожені так само, як і досліджувані зразки, і витримані на столі при тій же температурі і принаймні стільки ж часу, що і досліджувані зразки.

Загальний час перебування на столі повинен бути неперервним; неприпустимо використовувати додатковий вплив лабораторних умов (тобто, час від кожної оцінки заморожування/танення не повинен додаватися).

Довгострокова стабільність у матриці

Повинна бути підтверджена довгострокова стабільність аналіту в матриці, що зберігається в морозильній камері. QCs з низькою та високою концентраціями аналіту повинні зберігатися в морозильній камері за тих самих умов зберігання і принаймні протягом того самого часу, що й досліджувані зразки.

Для хімічних діючих речовин стабільність при одній температурі (наприклад, -20°C) може бути екстрапольована на більш низькі температури (наприклад, $-70/-80^{\circ}\text{C}$).

Для біологічних діючих речовин може застосовуватися підхід брикетингу, наприклад, якщо стабільність була доведена при $-70/-80^{\circ}\text{C}$ та при -20°C , то немає необхідності досліджувати стабільність при температурах між цими двома точками, при яких будуть зберігатися досліджувані зразки.

2. Стабільність аналіту в оброблених зразках

Повинна бути визначена стабільність оброблених зразків, включаючи час до завершення аналізу (в автосамплері/приладі). Наприклад:

- Стабільність обробленого зразка в умовах зберігання, які будуть використовуватися під час аналізу досліджуваних зразків (сухий екстракт або на стадії інжекції).
- Стабільність обробленого зразка в приладі/автосамплері при температурі інжектора або автосамплера.

Загальний час зберігання обробленого зразка повинен бути обов'язково неперервним (тобто, час зберігання в автосамплері та в інших місцях визначається окремо).

3. Стабільність аналіту та IS у вихідному та робочих розчинах

Стабільність вихідного і робочих розчинів аналіту та IS повинна бути визначена в умовах зберігання, що використовуються під час аналізу досліджуваних зразків, використовуючи найнижчу та найвищу концентрацію цих розчинів. Вони повинні бути оцінені за відгуком детектора. Стабільність вихідного та робочих розчинів повинна бути перевірена з відповідним розведенням, беручи до уваги лінійність та діапазон вимірювання детектора. Якщо стабільність змінюється залежно від концентрації, необхідно оцінити стабільність усіх концентрацій вихідного і робочих розчинів. Якщо для стабільного ізотопно міченого

внутрішнього стандарту не відбувається ізотопного обміну за тих самих умов зберігання, що й для аналіту, для якого доведено стабільність, то немає необхідності в додатковому визначенні стабільності для внутрішнього стандарту. Якщо термін придатності стандартного зразка втрачає термін дії або минула дата повторного аналізу, стабільність вихідних розчинів, виготовлених раніше з цією серією стандартного зразка, визначають за датою закінчення терміну придатності або датою повторного аналізу, встановленою для вихідного розчину. Практика приготування вихідних і робочих розчинів зі стандартних зразків лише для подовження терміну придатності стандартного зразка є неприйнятною.

Крім того, повинен бути проведений наступний тест, якщо це застосовується:

4. Стабільність аналіту в цільній крові

Достатня увага повинна бути приділена стабільності аналіту у зразках матриці (крові) безпосередньо після відбору зразків у суб'єктів і перед підготовкою до зберігання для підтвердження того, що концентрації, отримані аналітичною методикою, відображають концентрації аналіту в крові суб'єкта на момент відбору зразка.

Якщо матрицею є плазма, стабільність аналіту в крові повинна бути оцінена під час розробки методики (наприклад, використовуючи методику дослідження в крові) або під час валідації методики. Результати повинні бути представлені у звіті з валідації.

3.2.9. Реінжекційна відтворюваність (відтворюваність при повторному введенні)

Відтворюваність методики оцінюють за допомогою повторних вимірювань QCs і зазвичай включають в оцінку правильності та прецизійності. Однак, якщо зразки можуть бути повторно введені (наприклад, у разі перебоїв у роботі приладу або з інших причин, таких як несправність обладнання), реінжекційна відтворюваність повинна бути оцінена для встановлення придатності оброблених зразків і забезпечення їх зберігання до повторної інжекції.

Реінжекційну відтворюваність оцінюють шляхом реінжекції циклу, який складається з калібрувальних стандартів і щонайменше 5 повторів QCs з низькою, середньою та високою концентраціями аналіту після зберігання. Прецизійність і правильність повторно введених QCs визначають придатність оброблених зразків.

Результати повинні бути включені до Звіту з валідації або надані в Біоаналітичному звіті дослідження, в якому вони були отримані.

3.3. Аналіз досліджуваних зразків

Аналіз досліджуваних зразків може бути проведений після завершення валідації, проте, потрібно розуміти, що деякі параметри можуть бути завершені на пізніших етапах (наприклад, довгострокова стабільність). На момент подання даних до регуляторного органу валідація біоаналітичної методики повинна бути завершена. Досліджувані зразки, QCs та калібрувальні стандарти повинні оброблятися відповідно до валідованої аналітичної методики. Якщо оцінюється придатність системи, повинен використовуватися заздалегідь визначений конкретний план дослідження, протокол або СОП. Придатність системи, включно з підготовкою обладнання та робочими характеристиками приладу, повинна бути визначена, використовуючи зразки, що не залежать від калібрувальних стандартів та QCs для даного циклу. Досліджувані зразки не повинні використовуватися для визначення придатності системи. повинен контролюватися, Для визначення існування системної варіабельності IS потрібно контролювати його відгук в досліджуваних зразках. Див Таблицю 1 для отримання інформації щодо документації.

3.3.1. Аналітичний цикл

Аналітичний цикл складається зі зразка бланку матриці (оброблений зразок матриці без аналіту і IS, нульового зразка (оброблена матриця з IS, калібрувальних стандартів для мінімум 6 рівнів концентрації, щонайменше 3 рівні QCs (низький, середній і високий) в двох повторах (або щонайменше 5 % від кількості досліджуваних зразків, залежно від того, що більше) і досліджуваних зразків, що будуть аналізуватися. QCs повинні бути розподілені в циклі таким чином, щоб забезпечити правильність і прецизійність всього циклу. Досліджувані зразки завжди повинні бути розподілені між QCs.

Калібрувальні стандарти та QCs повинні бути додані незалежно, використовуючи окремо приготовлені вихідні розчини, якщо правильність і стабільність вихідних розчинів не була перевірена. Усі зразки (калібрувальні стандарти, QCs та досліджувані зразки) повинні оброблятися та екстрагуватися як одна серія зразків у тому порядку, в якому вони будуть аналізуватися. Не рекомендується аналізувати зразки, що були оброблені як кілька окремих серій, в одному аналітичному циклі. Якщо такого підходу не можна уникнути, наприклад, через обмеження короткострокової стабільності, кожна серія зразків повинна включати низькі, середні та високі QCs.

Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності рекомендується аналізувати всі зразки одного суб'єкта разом в одному аналітичному циклі, щоб зменшити варіабельність.

Вплив будь-якого переносу, що виникає під час аналізу досліджуваних зразків, повинен бути оцінений і представлений у звіті (див. розділ 3.2.6). Якщо виявлено перенос, його вплив на виміряні концентрації повинен бути мінімізований (наприклад, нерандомізація досліджуваних зразків, введення зразків бланку матриці після зразків з очікувано високою концентрацією) або придатність представлених концентрацій повинна бути обґрунтована у біоаналітичному звіті.

3.3.2 Критерії прийнятності аналітичного циклу

Критерії прийнятності або відхилення аналітичного циклу повинні бути визначені в протоколі, в плані дослідження або в СОПі. Якщо цикл складається з декількох серій, критерії прийнятності повинні застосовуватися як до всього циклу, так і до окремих серій. Цикл може відповідати критеріям прийнятності, навіть якщо одна з серій в цьому циклі відхилена через невідповідність критеріям прийнятності серії. Калібрувальні стандарти відхиленої серії не можуть бути використані для підтвердження прийнятності інших серій у межах аналітичного циклу.

Регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути в межах $\pm 15\%$ від номінального значення, за виключенням значення LLOQ для якого встановлена концентрація повинна бути в межах $\pm 20\%$. Принаймні 75 % концентрацій калібрувальних стандартів, які повинні включати щонайменше шість рівнів концентрації, повинні відповідати цим критеріям. Якщо використовується більше шести рівнів калібрувальних стандартів і один з них не відповідає критеріям, цей калібрувальний стандарт повинен бути відхилений, а калібрувальна крива без цього калібрувального стандарту повинна бути оцінена повторно і проведено новий регресійний аналіз.

Якщо відхилено калібрувальний стандарт, що відповідає LLOQ, то новою нижньою межею для цього аналітичного циклу буде наступний найнижчий прийнятний калібрувальний стандарт калібрувальної кривої. Цей новий стандарт нижньої межі калібрування збереже свої початкові критерії прийнятності (тобто $\pm 15\%$). Якщо відхилено калібрувальний стандарт, що відповідає ULOQ, то для цього аналітичного циклу буде використовуватися наступний прийнятний найвищий калібрувальний стандарт. Переглянутий калібрувальний діапазон повинен охоплювати принаймні три рівні концентрації QC's (низький, середній і високий). Досліджувані зразки, що виходять за межі переглянутого діапазону, повинні бути проаналізовані повторно. Якщо використовуються повторні калібрувальні стандарти і тільки один із стандартів LLOQ або ULOQ не відповідає встановленим критеріям, калібрувальний діапазон залишається незмінним.

Щонайменше 2/3 від загальної кількості QCs і щонайменше 50 % на кожному рівні концентрації повинні бути в межах ± 15 % від номінальних значень. Якщо ці критерії не виконуються, аналітичний цикл повинен бути відхилений. Нова аналітична серія повинна бути підготовлена для всіх досліджуваних зразків у межах відхиленого аналітичного циклу для подальшого аналізу. У випадках, коли відхилення циклу пов'язано з визначеною технічною причиною, зразки можуть бути повторно введені.

Аналітичні цикли, що містять зразки, які розведені і повторно проаналізовані, повинні включати розведені зразки контролю якості для перевірки правильності та прецизійності методики розведення під час аналізу досліджуваних зразків. Концентрація розведених зразків контролю якості повинна перевищувати концентрацію розведених досліджуваних зразків (або значення ULOQ), і вони повинні бути розведені з використанням однакового коефіцієнта розведення. Якщо в одному аналітичному циклі використовується кілька коефіцієнтів розведення, то зразки контролю якості потрібно розводити тільки за найвищим і найнижчим коефіцієнтами розведення. Критерії прийнятності внутрішньосерійної правильності розведених зразків контролю якості впливають лише на прийнятність розведених зразків, а не на результат аналітичного циклу.

Коли одночасно аналізується кілька аналітів, для кожного досліджуваного аналіту повинна бути одна калібрувальна крива. Якщо аналітичний цикл є прийнятним для одного аналіту, але повинен бути відхилений для іншого аналіту, то слід використовувати дані для прийнятого аналіту. Визначення відхиленого аналіту вимагає повторної екстракції та аналізу тільки для аналіту, який повторно аналізують. У звіті необхідно представити тільки дані для цього повторно проаналізованого аналіту.

Повинні бути представлені регресійно розраховані концентрації калібрувальних стандартів і QCs проведених та прийнятих циклів. Загальна (міжсерійна) правильність і прецизійність QCs всіх прийнятих циклів повинна бути розрахована для кожного рівня концентрації і представлені в аналітичному звіті (див. Розділ 8 "Документація" і Таблицю 1). Якщо загальна середня правильність та/або прецизійність не відповідає критерію 15 %, повинно бути проведено розслідування для визначення причини відхилення. У випадку порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності це може призвести до відхилення даних.

3.3.3. Калібрувальний діапазон

Якщо до початку аналізу досліджуваних зразків відомо або передбачається вузький діапазон концентрацій аналіту, то для

адекватного відображення концентрацій досліджуваних зразків рекомендується або звузити діапазон калібрувальної кривої з підбором відповідних концентрацій аналіту в QCс, або додати нові QCс з іншими рівнями концентрацій, якщо це необхідно.

Якщо після початку аналізу зразків, отриманих при передбачуваній терапевтичній дозі(-ах), спостерігається непередбачуване скупчення досліджуваних зразків на одному кінці калібрувальної кривої, аналіз необхідно зупинити і або звузити стандартний діапазон калібрувальної кривої (тобто провести часткову валідацію) з переглядом існуючих концентрацій аналіту в QCс, або додати нові QCс з додатковими концентраціями до початкової кривої в межах діапазону вимірювань перед продовженням аналізу досліджуваного зразка. Немає необхідності повторно аналізувати зразки, що були проаналізовані до оптимізації діапазону калібрувальної кривої або концентрацій QCс.

Те саме стосується випадків, коли велика кількість концентрацій аналіту в досліджуваних зразках перевищує значення ULOQ. Діапазон калібрувальної кривої повинен бути змінений, якщо це можливо, і додані або змінені концентрації зразків контролю якості. Якщо неможливо змінити діапазон калібрувальної кривої або кількість зразків з концентрацією вище ULOQ невелика, зразки повинні бути розведені відповідно до валідованої методики розведення.

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

3.3.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків

Можливі причини повторного аналізу досліджуваних зразків, кількість повторів та критерії вибору значення, яке включають у звіт, повинні бути передбачені в протоколі, плані дослідження або СОПі до початку фактичного аналізу зразків. Для досліджуваних зразків, в яких аналізують декілька аналітів, не слід відхиляти прийнятний результат для одного аналіту, якщо інший аналіт не відповідає критеріям прийнятності.

Кількість зразків (і відсоток від загальної кількості зразків), що були повторно проаналізовані, повинні бути представлені і обговорені в біоаналітичному звіті. Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності в окремій таблиці повинні бути представлені значення з відхилених циклів.

Деякі приклади причин для повторного аналізу досліджуваного зразка:

- відхилення аналітичного циклу через невідповідність критеріям прийнятності щодо правильності калібрувальних стандартів та/або правильності і прецизійності QCs;
- відгук IS значно відрізняється від відгуку для калібрувальних стандартів та QCs (як визначено в СОПі);
- отримана концентрація перевищує ULOQ;
- отримана концентрація нижча переглянутого LLOQ в циклах, де найнижчий калібрувальний стандарт було виключено з калібрувальної кривої, що призвело до вищого значення LLOQ порівняно з іншими циклами;
- некоректне введення проби або несправність приладу;
- розведений досліджуваний зразок знаходиться нижче LLOQ;
- наявність аналіту в кількості, достатній для кількісного визначення в зразках, взятих до введення дози (pre-dose sample), або в зразках плацебо;
- незадовільна хроматографія (як визначено в СОП).

Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності повторний аналіз досліджуваних зразків за фармакокінетичними причинами (наприклад, концентрація зразка не відповідає очікуваному профілю) неприйнятний, оскільки це може вплинути на результат дослідження.

Будь-які повторно проаналізовані зразки повинні бути вказані в біоаналітичному звіті, а також повинні бути вказані початкове значення, причина повторного аналізу, значення, отримані в результаті повторних аналізів, остаточне прийняте значення і обґрунтування його прийнятності. Крім того, повинна бути надана зведена таблиця загальної кількості зразків, які були повторно проаналізовані з кожної причини. У випадках, коли перший аналіз дає непідзвітний результат, достатньо провести один повторний аналіз (наприклад, концентрація вище ULOQ або несправність приладу). У випадках, коли значення потрібно підтвердити (наприклад, у зразках, взятих перед дозуванням з вимірюваною концентрацією), необхідно провести повторні визначення, якщо дозволяє об'єм зразка.

Безпека суб'єктів дослідження повинна бути пріоритетом над будь-якими іншими аспектами випробування. Тому, можуть виникнути інші обставини, за яких необхідно провести повторний аналіз конкретних досліджуваних зразків з метою дослідження безпеки.

3.3.5. Повторна інжекція досліджуваних зразків

Повторна інжекція проаналізованих зразків може бути здійснена в разі виходу з ладу обладнання, якщо відтворюваність повторної інжекції була підтверджена під час валідації або представлена в біоаналітичному звіті,

де вона була проведена. Повторна інжекція повного аналітичного циклу або окремих калібрувальних стандартів чи QCs тільки тому, що калібрувальні стандарти чи QCs відхилені, без будь-якої ідентифікованої аналітичної причини, є неприйнятною.

3.3.6. Інтегрування хроматограм

Інтегрування та реінтегрування хроматограм повинні бути описані в плані дослідження, протоколі або СОПі. Будь-яке відхилення від процедур, описаних апріорі, повинні бути представлені в біоаналітичному звіті. Список реінтегрованих хроматограм, включаючи будь-яке інтегрування вручну і причини реінтегрування повинні бути включені в біоаналітичний звіт. Первинні та реінтегровані хроматограми, а також первинні та повторні результати інтегрування повинні бути збережені для подальшого використання та подані у біоаналітичному звіті для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності.

4. МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ, ЩО БАЗУЮТЬСЯ НА ЗВ'ЯЗУВАННІ ЛІГАНДІВ

4.1. Основні реагенти

4.1.1. Стандартні зразки

Стандартний зразок повинен бути належним чином охарактеризований і задокументований (наприклад, сертифікат аналізу і походження). Біологічний лікарський засіб має дуже складну структуру, і на його реакційну здатність зі зв'язуючими реагентами для біоаналізу можуть впливати зміни в процесі виробництва діючої речовини. Рекомендується, щоб промислова серія стандартного зразка, яку використовують для приготування калібрувальних стандартів і QCs, була отримана з тієї самої серії діючої речовини, яку використовували для дозування в доклінічних дослідженнях та клінічних випробуваннях, коли це можливо. Якщо змінюється серія стандартного зразка для біоаналізу, перед використанням повинна бути проведена біоаналітична оцінка з QCs з вихідного матеріалу і нового матеріалу, щоб переконатися, що робочі характеристики методики знаходяться в межах критеріїв прийнятності.

4.1.2. Критичні реагенти

Критичні реагенти, включаючи зв'язуючі реагенти (наприклад, зв'язуючі білки, аптамери, антитіла або кон'юговані антитіла) і реагенти, що містять ферментні фрагменти, безпосередньо впливають на результати кількісного аналізу, а тому їх якість повинна бути підтверджена. Критичні реагенти зв'язують аналіт і після взаємодії призводять до появи сигналу приладу, що відповідає концентрації аналіту. Критичні реагенти повинні бути ідентифіковані та кількісно визначені.

Надійне забезпечення критично важливими реагентами повинно бути враховане на ранніх стадіях розробки методики, незалежно від того, чи виготовлені вони в лабораторії (in-house), чи придбані на комерційній основі. Специфікація для критичного реагенту повинна включати, як мінімум, ідентифікацію, джерело, номер серії/партії, чистоту (якщо застосовується), концентрацію (якщо застосовується) та стабільність/дату повторного аналізу/умови зберігання (див. Таблицю 1). Можуть бути вказані додаткові характеристики.

Для забезпечення відповідності між первинними та новими серіями критичних реагентів необхідна процедура управління життєвим циклом критичних реагентів. Придатність реагентів повинна бути оцінена за допомогою біоаналітичної методики. Очікується, що незначні зміни в критичних реагентах не вплинуть на придатність методики, тоді як значні зміни можуть суттєво вплинути на придатність. Якщо зміна незначна (наприклад, змінено джерело одного реагенту), для визначення характеристик достатньо однієї порівняльної оцінки точності та прецизійності. Якщо зміна значна, то необхідні додаткові валідаційні експерименти. В ідеалі під час оцінювання змін метод з новими реагентами порівнюють безпосередньо з методом зі старими реагентами. До значних змін належать, зокрема, зміна методу виробництва антитіл, додатковий забір крові у тварин для отримання поліклональних антитіл, а також нові клони або новий постачальник для виробництва моноклональних антитіл.

Дати повторних випробувань і параметри валідації повинні бути задокументовані для обґрунтування продовження терміну використання або заміни критичного реагенту. Дослідження стабільності реагентів повинно ґрунтуватися на результатах біоаналітичної методики та загальних рекомендаціях щодо умов зберігання реагентів. Його можна продовжити після закінчення терміну придатності, наданого постачальником. Параметри ефективності повинні бути задокументовані, щоб обґрунтувати продовження або заміну критично важливого реагенту.

4.2. Валідація

Найчастіше для методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів, використовують мікротитровані планшети, а досліджувані зразки можна аналізувати, використовуючи формат аналізу з 1 або більше лунок на зразок. Формат аналізу повинен бути зазначений у протоколі, плані дослідження або СОПі. Якщо розробка та валідація методики проведена з використанням 1 або більше лунок на зразок, то аналіз досліджуваного зразка також повинен бути проведений з використанням 1 або більше лунок на зразок, відповідно. Якщо для кожного зразка використовується кілька лунок, концентрація зразка, що включається до звіту повинна бути визначена або шляхом обчислення середнього значення відгуку з

повторюваних лунок, або шляхом усереднення концентрацій, розрахованих за кожним відгуком. Оцінка даних повинна бути проведена на основі концентрацій, що включаються до звіту.

4.2.1. Специфічність

В методиках аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів, специфічність пов'язана з концепцією перехресної реактивності. Важливо, щоб реагент специфічно зв'язувався з цільовим аналітом, але не вступав у перехресну реакцію зі співіснуючими структурно спорідненими молекулами (наприклад, ендогенними сполуками, ізоформами або структурно спорідненими супутніми лікарськими засобами). Специфічність оцінюється шляхом додавання до зразків «бланк матриці» споріднених молекул при максимальній концентрації (концентраціях) структурно спорідненої молекули, що очікується в досліджуваних зразках.

Правильність цільового аналізу при значеннях LLOQ та ULOQ повинна бути досліджена в присутності споріднених молекул у максимальній концентрації (концентраціях), що очікується в досліджуваних зразках. Відгук зразків «бланк матриці» з додаванням споріднених молекул повинен бути нижче значення LLOQ. Правильність цільового аналізу в присутності споріднених молекул повинна бути в межах $\pm 25\%$ від номінальних значень.

У разі неспецифічності, вплив на методику повинен бути оцінений шляхом збільшення концентрації молекул, що заважають, у зразку «бланк матриці» та вимірювання правильності цільового аналізу при LLOQ та при ULOQ. Важливо визначити мінімальну концентрацію спорідненої молекули, при якій виникає інтерференція. Під час аналізу зразка повинні бути застосовані відповідні заходи для зменшення впливу, наприклад, може бути необхідним відповідно скоригувати межі кількісного визначення (LLOQ/ULOQ) або розглянути можливість застосування нової методики.

Під час розробки і валідації методики ці "споріднені молекули" часто недоступні. Додаткова оцінка специфічності може бути проведена після завершення основної валідації.

4.2.2. Селективність

Селективність – це здатність методики виявляти і диференціювати досліджуваний аналіт за наявності неспецифічних компонентів матриці. Матриця може містити неспецифічні матричні компоненти, такі як фрагменти ферментів, гетерофільні антитіла або ревматоїдний фактор, які можуть заважати визначенню досліджуваного аналіту.

Селективність повинна бути оцінена на нижній межі кількісного визначення, де проблеми виникають у більшості випадків, але

рекомендується також оцінити селективність при більш високих концентраціях аналіту. Тому селективність оцінюють, використовуючи зразки «бланк матриці», отримані щонайменше з 10 окремих джерел, а також використовуючи окремі матриці холостих зразків на рівні LLOQ і на високому рівні зразка QC. Використання меншої кількості джерел може бути прийнятним у випадку рідкісних матриць. Відгук зразків «бланк матриці» повинен бути нижче LLOQ принаймні у 80 % окремих джерел.

Правильність повинна бути в межах $\pm 25\%$ LLOQ і в межах $\pm 20\%$ високого рівня зразка QC від номінальної концентрації щонайменше у 80 % оцінених окремих джерел.

Селективність повинна бути оцінена в ліпемічних та гемолізованих зразках (див. розділ 3.2.1). Для ліпемічних і гемолізованих зразків тести можна оцінювати один раз, використовуючи одне джерело матриці. Селективність повинна бути оцінена у зразках, отриманих від відповідних груп пацієнтів (наприклад, пацієнтів з нирковою або печінковою недостатністю, пацієнтів із запальними або імуноонкологічними захворюваннями, якщо застосовується). У випадку відповідних груп пацієнтів повинно бути принаймні п'ять окремих пацієнтів.

4.2.3. Діапазон калібрувальної кривої

Калібрувальна крива демонструє залежність між номінальною концентрацією аналіту і відгуком аналітичної платформи на нього. Калібрувальні стандарти, приготовлені шляхом розведення матриці з відомою кількістю аналіту, охоплюють калібрувальний діапазон і складають калібрувальну криву. Калібрувальні стандарти повинні бути приготовлені в тій же біологічній матриці, що і досліджувані зразки. Калібрувальний діапазон визначається LLOQ, який є найнижчим калібрувальним стандартом, і ULOQ, який є найвищим калібрувальним стандартом. Для кожного аналіту, який досліджують під час валідації методики, і для кожного аналітичного циклу повинна бути одна калібрувальна крива. За необхідності, використання сурогатної матриці повинно бути науково обґрунтованим.

Калібрувальна крива повинна бути побудована з використанням щонайменше 6 рівнів концентрацій калібрувальних стандартів, включаючи стандарти LLOQ і ULOQ, а також зразок «бланк матриці». Зразок «бланк матриці» не повинен бути включений в розрахунок параметрів калібрувальної кривої. Зразки «опорних калібраторів» з концентраціями нижче LLOQ і ULOQ калібрувальної кривої також можуть бути використані для покращення опису кривої. Залежність між відгуком і концентрацією для калібрувальної кривої найчастіше описують за допомогою 4- або 5-параметричної логістичної моделі, якщо

є точки даних поблизу нижньої і верхньої асимптоти. Інші моделі повинні бути належним чином обґрунтовані.

Мінімум 6 незалежних циклів повинні бути оцінені протягом декількох днів, враховуючи фактори, які можуть впливати на міжсерійну варіабельність.

Правильність і прецизійність регресійно розрахованих концентрацій кожного калібрувального стандарту повинна бути в межах $\pm 25\%$ від номінальної концентрації для LLOQ та ULOQ, і в межах $\pm 20\%$ для всіх інших рівнів. Щонайменше 75 % калібрувальних стандартів, за винятком «опорних калібраторів», і щонайменше 6 рівнів концентрації калібрувальних стандартів, включаючи LLOQ та ULOQ повинні відповідати вищезазначеним критеріям. Для «опорних калібраторів» не вимагаються критерії прийнятності, оскільки вони знаходяться за межами кількісно вимірюваного діапазону кривої.

Калібрувальну криву рекомендується готувати з використанням свіжододаних калібрувальних стандартів. Якщо свіжододані калібрувальні стандарти не використовуються, можуть бути використані заморожені калібрувальні стандарти протягом визначеного періоду їхньої стабільності.

4.2.4. Правильність і прецизійність

4.2.4.1. Підготовка зразків контролю якості

QCs призначені для імітації досліджуваних зразків і повинні бути приготовлені шляхом розведення матриці з відомою кількістю аналіту, зберігатися в умовах, передбачених для досліджуваних зразків, і аналізуватися для оцінки валідності аналітичної методики.

Серії розведень для приготування QCs повинні бути повністю незалежними від серій розведень для приготування калібрувальних стандартних зразків. Їх можна готувати з того самого вихідного розчину (або робочого розчину) за умови, що було перевірено точність приготування та стабільність. Стандартні зразки повинні бути приготовлені щонайменше на 5 рівнях концентрації в межах діапазону калібрувальної кривої: Аналіт повинен бути визначений на рівні LLOQ, в межах трикратного перевищення LLOQ (низький QC), на рівні середнього геометричного значення діапазону калібрувальної кривої (середній QC) і принаймні на рівні 75 % від ULOQ (високий QC) та на рівні ULOQ.

Для валідаційних циклів, в яких не виконуються критерії правильності і виконуються критерії прецизійності, низькі, середні та високі QCs можуть бути проаналізовані двічі. Ці QCs, разом з калібрувальними стандартами, будуть основою для прийняття або відхилення циклу.

4.2.4.2. Оцінка правильності та прицезійності

Правильність і прецизійність повинна бути визначена шляхом аналізу QCs в межах кожного циклу (внутрішньосерійна) і в різних циклах (міжсерійна). Правильність і прецизійність повинна бути оцінена з використанням тих самих циклів та даних.

Правильність і прецизійність повинна бути визначена, аналізуючи щонайменше 3 повтори в кожному циклі на кожному рівні концентрації зразків контролю якості (LLOQ, низька, середня, висока, ULOQ) у щонайменше 6 циклах протягом 2 або більше днів. Дані звіту з валідації методики та визначення правильності і прецизійності повинні включати всі отримані результати, за винятком тих випадків, коли помилки є очевидними і задокументованими. Дані внутрішньосерійної правильності та прецизійності повинні бути представлені для кожної серії. Якщо критерії внутрішньосерійної правильності або прецизійності не виконуються в усіх серіях, повинна бути розрахована загальна оцінка внутрішньосерійної правильності та прецизійності для кожного рівня QCs. Міжсерійна (проміжна) прецизійність і правильність повинна бути розрахована шляхом об'єднання даних усіх серій.

Загальна внутрішньосерійна та міжсерійна правильність на кожному рівні концентрації повинна бути в межах $\pm 20\%$ від номінального значення, за винятком LLOQ та ULOQ, які повинні бути в межах $\pm 25\%$ від номінального значення. Внутрішньосерійна та міжсерійна прецизійність концентрацій QCs, визначених на кожному рівні, не повинна перевищувати 20% , за винятком LLOQ та ULOQ, де вона не повинна перевищувати 25% .

Для валідаційних циклів, в яких не виконуються критерії правильності і виконуються критерії прецизійності, принаймні $2/3$ загальної кількості QCs і щонайменше 50% на кожному рівні концентрації повинні бути в межах $\pm 20\%$ від номінальних значень.

Крім того, слід оцінити загальну похибку (тобто суму абсолютних значень похибок правильності (%) і прецизійності (%)). Сумарна похибка не повинна перевищувати 30% (40% для LLOQ та ULOQ).

4.2.5. Ефект переносу

Ефект переносу, як правило, не є проблемою для методик аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів. Однак, якщо аналітична платформа схильна до переносу, потенціал переносу повинен бути досліджений шляхом розміщення зразків «бланк матриці» після калібрувального стандарту ULOQ. Відгук зразків «бланк матриці» повинен бути нижче значення LLOQ.

4.2.6. Лінійність розведення та «хук ефект» (hook effect)

Через вузький діапазон кількісного визначення в багатьох методиках аналізу, що базуються на зв'язуванні лігандів, досліджувані зразки можуть потребувати розведення для досягнення концентрацій аналіту в межах діапазону аналізу. Лінійність розведення повинна бути оцінена, щоб підтвердити: (i) що на виміряні концентрації не впливає розведення в межах калібрувального діапазону і (ii) що на концентрації зразка вище ULOQ калібрувальної кривої не впливає «хук ефект» (тобто пригнічення сигналу спричинене високими концентраціями аналіту), що призводить до помилкового результату.

Для приготування QCs для розведення повинна бути використана та сама матрицю, що й для досліджуваного зразка.

Лінійність розведення повинна бути доведена шляхом створення QC для розведення, тобто внесення в матрицю аналіту з концентрацією вище ULOQ, аналізуючи його в нерозведеному вигляді (для виявлення «хук ефекту») і розведенням цього зразка (щонайменше до 3 різних коефіцієнтів розведення) «бланком матриці» до концентрації в межах калібрувального діапазону. Для кожного досліджуваного коефіцієнта розведення повинно бути проведено щонайменше 3 незалежно підготовлені серії розведень, використовуючи кількість повторень, яка буде використана в аналізі зразка. Відсутність або наявність зниження відгуку («хук ефект») перевіряють у розведених QCs і, якщо він спостерігається і не може бути усунутий за допомогою належних коригувальних заходів, повинні бути вжиті заходи для мінімізації цього ефекту під час аналізу досліджуваних зразків.

Розрахована середня концентрація для кожного розведення повинна бути в межах $\pm 20\%$ від номінальної концентрації після поправки на розведення, а похибка не повинна перевищувати 20 %.

Коефіцієнт(и) розведення, який(і) застосовують під час аналізу досліджуваного зразка, повинен знаходитися в межах діапазону коефіцієнтів розведення, оцінених під час валідації.

4.2.7. Стабільність

Оцінка стабільності повинна бути проведена, щоб переконатися, що кожен крок, зроблений під час підготовки, обробки та аналізу зразка, а також умови зберігання не впливають на концентрацію аналіту.

Умови зберігання та аналізу, що застосовуються для випробувань стабільності, такі як час і температура зберігання зразків, матриця зразка, антикоагулянт і матеріали контейнера, повинні відповідати умовам, що застосовуються для досліджуваних зразків. Посилання на літературні дані не вважається достатнім. Валідація термінів зберігання повинна бути

проведена для QCs, які зберігалися протягом часу, що дорівнює або перевищує термін зберігання досліджуваного зразка.

Стабільність аналіту в досліджуваній матриці повинна бути оцінена з використанням низької та високої концентрацій QCs. Аліквоти QCs низької та високої концентрацій аналізують у нульовий момент часу та після застосування умов зберігання, які підлягають оцінюванню. На кожному рівні концентрації повинен бути приготовлений один вихідний QC. Для кожної протестованої концентрації вихідний зразок повинен бути розділений щонайменше на три аліквоти, які буде збережено, піддано стресовому впливу та проаналізовано.

QCs аналізують за калібрувальною кривою, отриманою зі свіжоприготовленими калібрувальних стандартів у циклі з відповідними свіжоприготовленими QCs або QCs, стабільність яких доведена. Хоча використання свіжоприготовлених калібрувальних стандартів і зразків QCs є рекомендованим підходом, визнано, що в деяких випадках для макромолекул може бути необхідним заморожувати їх на ніч. У таких випадках повинно бути надано обґрунтоване пояснення та доведено стабільність між заморожуванням-таненням. QCs повинні зберігатися замороженими щонайменше 12 годин між циклами розморожування. Середня концентрація на кожному рівні QCs повинна бути в межах $\pm 20\%$ від номінальної концентрації.

Оскільки для багатьох методик, що базуються на зв'язуванні лігандів може знадобитися розведення зразка через вузький калібрувальний діапазон, концентрації досліджуваних зразків можуть бути постійно вищими за ULOQ калібрувальної кривої. В такому випадку концентрація QCs повинна бути скоригована з урахуванням застосованого розведення зразка, щоб відобразити фактичний діапазон концентрацій зразка.

Для лікарських засобів, що містять декілька діючих речовин та спеціально маркованих схем лікування, випробування на довгострокову стабільність аналіту в матриці при заморожуванні-таненні, зберіганні при кімнатній температурі повинні бути проведені з матрицею, до якої додані всі компоненти дози у кожному конкретному випадку.

Як зазначено в розділі 3.2.8, дослідження стабільності повинно охоплювати короткострокову (bench top) стабільність при кімнатній температурі або температурі підготовки зразка, а також стабільність при заморожуванні-таненні. Крім того, повинна бути вивчена довгострокова стабільність.

Для хімічних лікарських засобів стабільність при одній температурі (наприклад, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) може бути екстрапольована на більш низькі температури (наприклад, $-70/-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Для біологічних лікарських засобів може застосуватись підхід брекетингу, наприклад, якщо стабільність була доведена при $-70/-80^{\circ}\text{C}$ і при -20°C , то немає необхідності досліджувати стабільність при температурах між цими двома точками, при яких будуть зберігатися досліджувані зразки.

4.3. Аналіз досліджуваних зразків

Аналіз досліджуваних зразків можна проводити після завершення валідації, однак, зрозуміло, що деякі параметри можуть бути завершені на більш пізній стадії (наприклад, довгострокова стабільність). На момент подання даних до регуляторного органу валідація біоаналітичної методики повинна бути завершена. Досліджувані зразки, QCs та калібрувальні стандарти повинні оброблятися відповідно до валідованої аналітичної методики. Очікувані вимоги щодо документації наведено в Таблиці 1.

4.3.1. Аналітичний цикл

Аналітичний цикл складається зі зразка «бланк матриці», калібрувальних стандартів щонайменше на 6 рівнях концентрацій, щонайменше 3 рівні зразків контролю якості (низький, середній і високий), що застосовуються у вигляді двох наборів (або щонайменше 5 % від кількості досліджуваних зразків, залежно від того, що більше), і досліджуваних зразків, які підлягають аналізу. Зразок «бланк матриці» не має бути включений в розрахунок параметрів калібрувальної кривої. QCs повинні бути розміщені в циклі таким чином, щоб забезпечити правильність і прецизійність всього циклу, враховуючи, що досліджувані зразки завжди повинні бути розміщені між зразками QCs.

Найчастіше для методик, що базуються на зв'язуванні лігандів використовують мікротитраційні планшети. Аналітичний цикл може складатися з одного або декількох планшетів. Як правило, кожен планшет містить індивідуальний набір калібрувальних стандартів і QCs. Якщо кожен планшет містить власні калібрувальні стандарти і QCs, то кожен планшет має бути оцінений окремо. Однак для деяких платформ кількість зразків може бути обмежена. В такому випадку набори калібрувальних стандартів можуть бути розміщені на першому і останньому планшетах, але QCs повинні бути розміщені на кожному окремому планшеті. QCs повинні бути розміщені принаймні на початку (до) і в кінці (після) досліджуваних зразків на кожній платформі. QCs на кожній пластині і кожна калібрувальна крива повинні відповідати критеріям прийнятності для аналітичного циклу (див. розділ 4.3.2). Для розрахунку концентрацій калібрувальні стандарти повинні бути об'єднані для проведення одного регресійного аналізу. Якщо об'єднана калібрувальна крива не відповідає критеріям прийнятності, весь цикл відхиляється.

4.3.2. Критерії прийнятності аналітичного циклу

Критерії прийнятності або відхилення аналітичного циклу повинні бути визначені в протоколі, в плані дослідження або в СОП. Якщо цикл складається з декількох серій, критерії прийнятності повинні застосовуватися як до всього циклу, так і до окремих серій. Цикл може відповідати критеріям прийнятності, навіть якщо одна з його серій відхилена через невідповідність критеріям прийнятності циклу. Калібрувальні стандарти відхиленої серії не можуть бути використані для підтвердження прийнятності інших серій у межах аналітичного циклу.

Розраховані концентрації калібрувальних стандартів повинні бути в межах $\pm 20\%$ від номінального значення на кожному рівні концентрації, за винятком LLOQ та ULOQ, для яких вони повинні бути в межах $\pm 25\%$. Принаймні 75 % калібрувальних стандартів з щонайменше 6 рівнями концентрації повинні відповідати цьому критерію. Ця вимога не поширюється на стандартні зразки «опорних калібраторів». Якщо використовується більше 6 калібрувальних стандартів і один з них не відповідає цим критеріям, цей калібрувальний стандарт повинен бути відхилений, а калібрувальна криву без цього калібрувального стандарту оцінена повторно і виконаний новий регресійний аналіз.

Якщо відхиленням калібрувальним стандартом є стандарт, що відповідає LLOQ, то новою нижньою межею для цього аналітичного циклу буде наступний найнижчий прийнятний калібрувальний стандарт калібрувальної кривої. Якщо відхилено найвищий калібрувальний стандарт, новою верхньою межею для цього аналітичного циклу є наступний прийнятний найвищий калібрувальний стандарт калібрувальної кривої. Нові калібрувальні стандарти нижньої і верхньої межі кількісного визначення зберігають свої початкові критерії прийнятності (наприклад, $\pm 20\%$). Переглянутий калібрувальний діапазон повинен охоплювати всі зразки контролю якості (низький, середній і високий). Досліджувані зразки за межами переглянутого калібрувального діапазону повинні бути повторно проаналізовані.

Кожен цикл повинен містити щонайменше 3 рівні зразків контролю якості (низький, середній і високий). Під час аналізу досліджуваних зразків калібрувальні стандарти та QCс повинні імітувати аналіз досліджуваного зразка з урахуванням кількості лунок, використаних для досліджуваного зразка. Принаймні 2/3 зразків QCс і 50 % на кожному рівні концентрації повинні бути в межах $\pm 20\%$ від номінального значення на кожному рівні концентрації. Відхилення від цих критеріїв повинні бути обґрунтовані і заздалегідь визначені в СОП або протоколі.

Загальна середня правильність і прецизійність QCс усіх прийнятних циклів повинна бути розрахована на кожному рівні концентрації і вказана в аналітичному звіті. У випадку, якщо загальна середня правильність

та/або прецизійність перевищує 20%, мають бути проведені додаткові дослідження для визначення причини (причин) такого відхилення. У випадку порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності це може призвести до відхилення даних.

4.3.3. Калібрувальний діапазон

Щонайменше 2 рівні QCs повинні знаходитися в межах діапазону концентрацій, виміряних у досліджуваних зразках. Якщо після початку аналізу зразків, відібраних при призначеній терапевтичній дозі, спостерігається непередбачуване скупчення досліджуваних зразків на одному кінці калібрувальної кривої, аналіз слід зупинити і або звузити стандартний діапазон калібрування (тобто провести часткову валідацію), або переглянути існуючі концентрації QCs, або додати QCs з додатковими концентраціями до початкової кривої в межах спостережуваного діапазону, перш ніж продовжувати аналіз досліджуваних зразків. Немає необхідності повторно аналізувати зразки, проаналізовані до оптимізації діапазону калібрувальної кривої або концентрацій QCs.

4.3.4. Повторний аналіз досліджуваних зразків

Можливі причини для повторного аналізу досліджуваних зразків, кількість повторних аналізів та критерії прийняття рішення щодо вибору значення, яке буде вказано у звіті, повинні бути заздалегідь визначені в протоколі, плані дослідження або СОП до фактичного початку аналізу досліджуваних зразків.

Кількість зразків (і відсоток від загальної кількості зразків), які були повторно проаналізовані, повинні бути вказані і обговорені в біоаналітичному звіті. Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності в окремій таблиці мають надаватися значення відхилених циклів.

Деякі приклади причин для повторного аналізу досліджуваного зразка:

- Відхилення аналітичного циклу через невідповідність критеріям прийнятності щодо правильності калібрувальних стандартів та/або правильності і прецизійності QCs
- Отримана концентрація перевищує ULOQ
- Отримана концентрація є нижчою за LLOQ у циклах, де найнижчий калібрувальний стандарт було виключено з калібрувальної кривої, що призвело до вищого значення LLOQ порівняно з іншими циклами
- Несправність обладнання
- Розведений зразок знаходиться нижче LLOQ

- Ідентифікація кількісно вимірюваних рівнів аналіту в зразках перед дозуванням, контрольних зразках або зразках плацебо
- Коли зразки аналізуються в більш ніж одній лунці і отримуються значення, що не включаються у звіт, через те, що один з повторів не відповідає попередньо визначеним критеріям прийнятності (наприклад, надмірна варіабельність між лунками, один з повторів вище ULOQ або нижче LLOQ).

Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності повторний аналіз досліджуваних зразків з фармакокінетичних причин (наприклад, концентрація зразка не відповідає очікуваному профілю) є неприйнятним, оскільки це може вплинути на результат дослідження.

Повторно проаналізовані зразки повинні бути ідентифіковані в біоаналітичному звіті, а також повинні бути вказані початкове значення, причина повторного аналізу, значення, отримані в результаті повторних аналізів, остаточне прийняте значення і обґрунтування для його прийняття. Крім того, повинна бути надана зведена таблиця загальної кількості зразків, які були повторно проаналізовані з кожної причини. У випадках, коли перший аналіз дає результат, що не можна включити до звіту, вважається достатнім проведення одного повторного аналізу (наприклад, концентрація вище ULOQ або надмірна варіабельність між лунками). Аналіз зразків повинен базуватися на тій самій кількості лунок на досліджуваній зразок, що і в початковому аналізі. У випадках, коли значення потребує підтвердження (наприклад, вимірювана концентрація в зразку перед), потрібно провести кілька визначень, якщо це дозволяє об'єм зразка.

Безпека суб'єктів дослідження повинна мати пріоритет над будь-якими іншими аспектами дослідження. Отже, можуть виникнути інші обставини, за яких необхідно провести повторний аналіз конкретних зразків для цілей дослідження.

5. ОBOB'ЯЗКОВИЙ ПОВТОРНИЙ АНАЛІЗ ДОСЛІДЖУВАНИХ ЗРАЗКІВ

Характеристики досліджуваних зразків можуть відрізнятися від характеристик калібрувальних стандартів і QCs, що використовуються під час валідації методики, які готуються додаванням до зразка «бланк матриці». Відмінності у зв'язуванні білків, зворотне перетворення відомих і невідомих метаболітів, неоднорідність зразків, супутні ліки або біологічні компоненти, характерні для досліджуваних зразків, можуть впливати на виміряні концентрації аналіту в досліджуваних зразках. Метою обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків є перевірка достовірності отриманих концентрацій аналіту в зразках.

Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків повинен проводитися принаймні в наступних ситуаціях:

- Для доклінічних досліджень в рамках цієї настанови обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків, як правило, повинен проводитися принаймні один раз для кожного виду.

- Всі основні порівняльні дослідження біодоступності/біоеквівалентності
- Перше клінічне випробування на суб'єктах
- Основне(і) раннє(і) дослідження на ранній стадії, один раз на популяцію пацієнтів
- Перше або основне дослідження у пацієнтів з порушеннями функції печінки та/або нирок

Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків проводиться шляхом повторного аналізу підмножини зразків з даного дослідження в окремих (тобто відмінних від початкових) циклах в різні дні з використанням тієї ж біоаналітичної методики.

Розмір обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків залежить від аналізу та зразків дослідження і повинен ґрунтуватися на глибокому розумінні аналітичної методики та аналізу. Однак, як мінімум, якщо загальна кількість досліджуваних зразків менша або дорівнює 1000, то 10 % зразків повинні бути проаналізовані повторно; якщо загальна кількість зразків більша за 1000, то 10 % перших 1000 зразків (100) плюс 5 % від кількості зразків, що перевищують 1000 зразків, повинні бути проаналізовані. Об'єктивні критерії вибору підгрупи зразків для проведення обов'язкового повторного аналізу повинні бути заздалегідь визначені в протоколі, плані дослідження або СОП. Хоча суб'єкти/тварини повинні бути відібрані якомога більш випадковим чином з досліджуваної популяції, важливим є адекватне охоплення профілю концентрації. Тому рекомендується, щоб зразки для обов'язкового повторного аналізу відбиралися в районі максимальної концентрації (C_{max}), а деякі - у фазі елімінації. Крім того, відібрані зразки повинні бути репрезентативними для всього дослідження.

Зразки не повинні об'єднуватися, об'єднання може обмежити виявлення нетипових результатів. Зразки для обов'язкового повторного аналізу і QCs повинні оброблятися і аналізуватися так само, як і в початковому аналізі. Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків повинен бути проведений в межах періоду стабільності аналізу, але не в той самий день, що й початковий аналіз.

Різницю у відсотках між початковою концентрацією та концентрацією, виміряною під час повторного аналізу, повинна бути розрахована відносно їх середнього значення за допомогою наступного рівняння:

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

Для хроматографічних методик різниця у відсотках повинна бути в межах $\pm 20\%$ принаймні для 2/3 повторень. Для методик, що базуються на зв'язуванні лігандів різниця у відсотках повинна бути в межах $\pm 30\%$ для щонайменше 2/3 повторень.

Якщо загальні результати обов'язкового повторного аналізу зразків не відповідають критеріям прийнятності, повинно бути проведено розслідування та усунуто причини. Повинна бути розроблена стандартна операційна процедура, яка визначає, як ініціювати та проводити розслідування. Якщо розслідування не дозволяє встановити причину невідповідності, потенційний вплив невідповідності обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків на валідність дослідження також повинен бути зазначений у біоаналітичному звіті. Якщо обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків відповідає критеріям прийнятності, але виявляє значні або системні розбіжності між результатами для декількох зразків, це може вказувати на аналітичні проблеми, і доцільно провести додаткове розслідування.

Прикладами тенденцій, що викликають занепокоєння, можуть бути:

- Всі зразки обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків від одного суб'єкта не відповідають вимогам
- Всі зразки обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків з одного циклу не відповідають вимогам

Усі аспекти оцінок обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків повинні бути задокументовані, щоб можна було відтворити дослідження та будь-які розслідування. Окремі зразки, які значно відрізняються від початкового значення (наприклад, $> 50\%$, «flyers»), не повинні призводити до повторного аналізу початкового зразка і не потребують розслідування. Дані зразків обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків не повинні замінювати дані початкових зразків дослідження.

6. ЧАСТКОВА ТА ПЕРЕХРЕСНА ВАЛІДАЦІЯ

6.1. Часткова валідація

Часткова валідація оцінює модифікації вже повністю валідованих біоаналітичних методик. Часткова валідація може включати як визначення правильності та прецизійності в межах одного циклу, так і

майже повну валідацію. Якщо стабільність встановлена на одному етапі, її не обов'язково повторювати на іншому етапі.

Для хроматографічних методик типові модифікації або зміни біоаналітичних методик, що належать до цієї категорії, включають, але не обмежуються, наступними ситуаціями:

- Зміна аналітичної ділянки з використанням тієї самої методики (наприклад, передача біоаналітичної методики між лабораторіями)
- Зміна аналітичної методики (наприклад, зміна системи детектування, платформи)
- Зміна процедур обробки зразків
- Зміна об'єму зразка (наприклад, менший об'єм педіатричних зразків)
- Зміна діапазону калібрувальних концентрацій
- Зміна антикоагулянту (але не зміна протийону) в біологічних рідинах (наприклад, гепарин на етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА))
- Зміна однієї матриці в межах виду на іншу (наприклад, перехід від плазми людини до сироватки або спинномозкової рідини) або зміна виду в межах матриці (наприклад, перехід від плазми щурів до плазми мишей)
- Зміна умов зберігання

Для методик, що базуються на зв'язуванні лігандів типові модифікації або зміни біоаналітичних методик, що підпадають під цю категорію, включають, але не обмежуються наступними ситуаціями:

- Зміни в критичних реагентах методик, що базуються на зв'язуванні лігандів (наприклад, зміни від серії до серії)
- Зміни в мінімальному необхідному розведенні
- Зміна умов зберігання
- Зміна концентрацій калібрувального діапазону
- Зміна аналітичної методики (наприклад, зміна системи детектування, платформи)
- Зміна аналітичної ділянки з використанням тієї ж методики (наприклад, перенесення біоаналітичної методики між лабораторіями)
- Зміна пробопідготовки зразків
- Зміна антикоагулянту (але не зміна протийону) в біологічних рідинах (наприклад, гепарин на етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА))

Параметри часткової валідації повинні відповідати критеріям повної валідації. Якщо ці критерії не виконуються, необхідно провести додаткове дослідження та валідацію.

6.2. Перехресна валідація

Перехресна валідація необхідна для доказу взаємозв'язку між поданими даними, коли використовуються декілька біоаналітичних методик та/або декілька біоаналітичних лабораторій.

Перехресна валідація вимагається в наступних ситуаціях:

- Дані отримані з різних повністю валідованих методик в рамках дослідження.
- Дані отримані в рамках дослідження з різних лабораторій із застосуванням тієї ж біоаналітичної методики.
- Дані отримані різними повністю валідованими методиками в дослідженнях, які збираються об'єднати або порівняти для обґрунтування спеціальних режимів дозування або регуляторних рішень щодо безпеки, ефективності та маркування.

Якщо дані отримані різними повністю валідованими методиками, і ці дані не будуть об'єднані в дослідженнях, перехресна валідація, як правило, не потрібна.

Перехресна валідація повинна бути проведена до аналізу досліджуваних зразків, якщо це можливо.

Перехресна валідація повинна бути оцінена шляхом вимірювання одного і того ж набору зразків контролю якості (низьких, середніх і високих) щонайменше в трьох екземплярах і досліджуваних зразків (за наявності), які охоплюють діапазон концентрацій досліджуваного зразка ($n \geq 30$) за допомогою обох методик або в обох лабораторіях.

Відхилення можна оцінити за допомогою графіків Бланда-Альтмана або регресії Демінга. Також можна використовувати інші методи, які підходять для оцінки узгодженості між двома методиками (наприклад, коефіцієнт кореляції узгодженості). Крім того, можна побудувати криві залежності концентрації від часу для досліджуваних зразків, проаналізованих кожною методикою, щоб оцінити похибку.

Категорично не рекомендується використовувати декілька біоаналітичних методик для вимірювання одного і того ж аналіту при проведенні одного порівняльного дослідження біодоступності/біоеквівалентності.

7. ДОДАТКОВЕ ОБГОВОРЕННЯ

7.1. Методики для аналітів, що є ендогенними молекулами

Для аналітів, що є ендogenousними молекулами (наприклад, замісна терапія), точність вимірювання аналітів є складним завданням, коли методика не може відрізнити терапевтичний агент від ендogenousної молекули. Крім того, ендogenousні рівні аналіту можуть змінюватися залежно від віку, статі, раси, добових коливань, хвороби або як побічний ефект лікування. У цьому розділі описано деякі підходи, які можуть бути використані для оцінки концентрації аналітів, що є ендogenousними молекулами. Нагадуємо, що біомаркери не входять до сфери застосування цієї настанови.

Біологічна матриця для приготування калібрувальних стандартів і QCs повинна бути такою самою, як і досліджувані зразки (тобто автентична біологічна матриця), і вона повинна бути вільною від матричного ефекту та інтерференції, як описано в розділах 3 і 4. Концентрація ендogenousного компонента в обраній біологічній матриці повинна бути достатньо низькою, щоб отримати адекватне співвідношення сигнал/шум (наприклад, $< 20\%$ від LLOQ).

У тих випадках, коли матриці без інтерференції недоступні, для розрахунку концентрації аналіту в досліджуваних зразках можна використовувати наступні підходи: 1) підхід із використанням сурогатної матриці, 2) підхід із використанням сурогатного аналіту, 3) підхід із відніманням фону і 4) підхід із додаванням стандарту.

1. Підхід із використанням сурогатної матриці,:

Матриця для калібрувальних стандартів замінюється сурогатною матрицею. Сурогатні матриці можуть сильно відрізнятися за складністю: від простих буферів або штучних матриць, які намагаються імітувати автентичні матриці, до розщеплених матриць або матриць інших видів.

2. Підхід із використанням сурогатного аналіту:

Аналіти, мічені стабільними ізотопами, використовують як сурогатні стандарти в мас-спектрометричних методиках для побудови калібрувальної кривої для кількісного визначення ендogenousних аналітів. У цьому підході припускають, що фізико-хімічні властивості автентичного і сурогатного аналітів однакові, за винятком молекулярної маси. Однак ізотопні стандарти можуть відрізнятися за часом утримування і мас-селективною чутливістю, тому перед застосуванням цього підходу співвідношення мас-селективних відгуків (тобто коефіцієнт відгуку) міченого і неміченого аналіту має бути близьким до одиниці і залишатися постійним у всьому калібрувальному діапазоні. Якщо коефіцієнт відгуку не відповідає цим вимогам, його слід включити в рівняння регресії калібрувальної кривої.

3. Підхід із відніманням фону:

Концентрацію ендogenous аналіту, що визначена в об'єднаній/репрезентативній матриці, віднімають від концентрації, що визначена в доданих стандартах, а потім чисту різницю використовують для побудови калібрувальної кривої.

Коли фонові концентрації знижують шляхом розведення зразків бланку матриці перед додаванням стандартів (наприклад, якщо необхідне значення нижче LLOQ), склад матриць у досліджуваних зразках і калібрувальних стандартах відрізняється, що може спричинити різні коефіцієнти відновлення та ефекти матриці. Ці відмінності повинні бути враховані під час валідації методики.

4. Підхід із додаванням стандарту:

Метод стандартного додавання застосовується тільки для аналітичних платформ з лінійними відгуками. Зазвичай метод додавання стандарту використовують для визначення концентрації ендogenous аналіту в автентичній матриці, яку використовують для приготування стандартів і QCs. Однак цей підхід можна застосовувати і для визначення досліджуваних зразків. У цьому підході кожен досліджуваний зразок розділяють на аліквоти однакового об'єму. До всіх аліквот, крім однієї, окремо додають відомі та різні кількості стандартів аналіту для побудови калібрувальної кривої або для автентичного бланку матриці, або для кожного досліджуваного зразка (наприклад, з 3 до 5 точок). Ендogenous концентрація бланку матриці або концентрація досліджуваного зразка визначається як від'ємна точка перетину з віссю x стандартної калібрувальної кривої, побудованої для цього конкретного досліджуваного зразка.

Валідація аналітичної методики для аналіту, що є ендogenous молекулою, вимагатиме наступних міркувань, крім валідації, наведеної в розділах 3 і 4.

7.1.1. Зразки контролю якості в методиках для аналітів, що є ендogenous молекулами

Ендogenous концентрації аналіту в біологічній матриці повинні бути оцінені перед підготовкою QCs. Повинні використовуватися матриці з найнижчим можливим рівнем заважаючого ендogenous аналіту. Концентрації QCs повинні відповідати ендogenous концентраціям в автентичній матриці і бути репрезентативними до очікуваних концентрацій досліджуваного зразка.

QCs повинні бути подібними до досліджуваних зразків і готуватися в тій самій матриці. В принципі, всі концентрації QCs, що використовуються для валідації, повинні бути аліквотами автентичної біологічної матриці без доданих (ендogenous QC з концентрацією між LLOQ і QC з низькою

концентрацією, якщо можливо) і з доданими відомими кількостями автентичного аналіту (QC з низькою, середньою та високою концентрацією). У доданих зразках (наприклад, LLOQ, QC з низькою концентрацією) додана кількість аналіту повинна бути достатньою, щоб забезпечити концентрацію, яка втричі вища або статистично відрізняється від ендогенної концентрації. Якщо такі варіанти, як використання декількох серій, альтернативних постачальників і матриць спеціальних популяцій, які можуть містити нижчу концентрацію аналіту, продовжують давати матриці, в яких ендогенні рівні настільки високі, що неможливо підготувати зразок QC з низькою концентрацією в автентичній матриці, можна використовувати розведену (сурогатну) матрицю.

7.1.2. Селективність, відновлення та ефект матриці в методиках для аналітів, що є ендогенними молекулами

Оцінка селективності ускладнюється відсутністю матриці, вільної від інтерференції. Для хроматографії чистоту піків слід досліджувати в рамках валідації методики, аналізуючи матриці, отримані від декількох донорів (щонайменше шість нормальних зразків, один гемолізований зразок і один ліпемічний зразок) з використанням дискримінаційної системи виявлення (наприклад, тандемної мас-спектрометрії (МС/МС)). Інші підходи, якщо вони обґрунтовані науковими принципами, також можуть бути розглянуті.

Для підходів із додаванням стандарту та відніманням фону, оскільки для досліджуваних зразків і калібрувальних стандартів використовують однакову біологічну матрицю і аналіт, у досліджуваних зразках і калібрувальних стандартах відбувається однаковий ефект відновлення і ефект матриці. Однак, якщо ендогенний компонент неповністю ідентичний (наприклад, рекомбінантні білки), потенційна різниця у відновленні повинна бути оцінена в тесті на паралельність. Для підходів сурогатної матриці та сурогатного аналіту ефект матриці та відновлення можуть відрізнитися між калібрувальними стандартами та досліджуваними зразками. Ефект матриці повинен бути оцінений, щоб переконатися, що він не впливає на правильність і прецизійність, в основному на рівні LLOQ.

- Якщо використовується підхід із використанням сурогатної матриці, потрібно оцінити вплив різного ефекту матриці та відновлення як у сурогатній, так і в автентичній матриці. Це повинно бути досліджено експериментально використовуючи QCs з доданим аналітом у матриці, лише ендогенну матрицю та сурогатну матрицю з доданим аналітом, порівняно з калібрувальною кривою в сурогатній матриці.

- Якщо підхід з додаванням сурогатного аналіту застосовують у хромато-мас-спектрометричних методиках, потрібно оцінити вплив різного ефекту матриці та відновлення між сурогатним та автентичним ендегенним аналітами. Це повинно бути досліджено в експерименті, використовуючи QCs з доданим аналітом в матриці, лише ендегенну матрицю та матрицю з доданим сурогатним аналітом порівняно з калібрувальною кривою в сурогатній матриці.
- У деяких випадках може бути необхідним розведення QCs сурогатною матрицею (наприклад, для підходу із відніманням фону), коли рівень ендегенних речовин є високим і необхідно знизити значення LLOQ. У таких випадках дослідження ефекту матриці та відновлення повинні бути повторені з використанням автентичних біологічних матриць з ендегенними концентраціями між LLOQ та QC з низькою концентрацією, якщо такі є в наявності.

Критерії прийнятності для хроматографічних методик та методик, що базуються на зв'язуванні лігандів див. відповідно в розділах 3 і 4.

Оскільки склад біологічної матриці може впливати на ефективність методики, необхідно досліджувати матриці щонайменше від шести (хроматографічні методики)/десяти (методики, що базуються на зв'язуванні лігандів) різних донорів, за винятком підходу із додаванням стандарту, де кожен зразок аналізується за допомогою власної калібрувальної кривої.

7.1.3. Паралелізм в методиках для аналітів, що є ендегенними молекулами

Паралелізм гарантує, що спостережувані зміни у відгуку на задані зміни концентрації аналіту є еквівалентними для сурогатної та автентичної біологічної матриці в усьому діапазоні методики. Паралелізм повинен бути оцінений в підходах із використанням сурогатної матриці та сурогатного аналіту, беручи до уваги, що паралелізм оцінюється порівнювано в методиках, що базуються на зв'язуванні лігандів та хроматографічних методиках.

7.1.4. Правильність і прецизійність в методиках для аналітів, що є ендегенними молекулами

Правильність і прецизійність повинні відповідати критеріям, зазначеним у розділах 3 і 4 для хроматографічних методик та методик, що базуються на зв'язуванні лігандів відповідно.

У разі використання підходів сурогатної матриці або аналіту, оцінка правильності та прецизійності повинна бути проведена шляхом аналізу QCs порівняно з сурогатною калібрувальною кривою.

Концентрація ендogenous молекул в бланку матриці може бути визначена і віднята від загальної концентрації зразка з доданим аналітом. Правильність рекомендується розраховувати за такою формулою, коли QCs з автентичним аналітом додають у матрицю, що містить ендogenous рівні аналіту:

$$\text{Правильність(\%)} = \frac{(\text{Виміряна додана концентрація} - \text{ендogenous концентрація})}{\text{Додана концентрація}}$$

Тільки прецизійність може бути визначена на основі аналізу кожного QC без доданого/ендogenous аналіту.

7.1.5. Стабільність в методиках для аналітів, що є ендogenous молекулами

Щоб максимально відтворити досліджувані зразки, експерименти зі стабільності слід проводити з автентичним аналітом в автентичній біологічній матриці та з недодаваними/ендogenous QCs (зразок «бланк матриці» з ендogenous молекулою), а також з доданими QCs низької та високої концентрацій, як визначено в розділі 7.1.1. Однак, якщо для калібрування стандартів використовується сурогатна матриця, стабільність також повинна бути продемонстрована для аналіту в сурогатній матриці, оскільки вона може відрізнятися від стабільності в автентичній біологічній матриці.

7.2. Паралелізм

Паралелізм визначається як паралельний зв'язок між калібрувальною кривою і послідовно розведеними досліджуваними зразками для виявлення будь-якого впливу розведення на вимірювання аналіту. Хоча відсутність паралелізму є рідкісним явищем для біоаналітичних методик оцінки фармакокінетики, паралельність методик, що базуються на зв'язуванні лігандів повинен бути оцінений в кожному конкретному випадку, наприклад, коли під час аналізу досліджуваного зразка є підозра на втручання компонентів матриці (наприклад, наявність ендogenous зв'язуючого білка). Дослідження паралелізму або обґрунтування його відсутності повинні бути включені до біоаналітичного звіту. Деякі методики можуть демонструвати паралелізм для однієї популяції пацієнтів, але не демонструвати його для іншої популяції. Як правило, ці експерименти повинні проводитися під час аналізу досліджуваних зразків через недоступність досліджуваних зразків під час розробки або валідації методики. Досліджуваний зразок з високою концентрацією (бажано близькою до S_{max}) повинен бути розведений принаймні втричі зразком «бланк матриці». Розбіжність між зворотно розрахованими концентраціями зразків у серії розведень не повинна перевищувати 30% CV. Однак при застосуванні критерію 30 % дані повинні ретельно контролюватися, оскільки результати, що відповідають цьому критерію,

все одно можуть виявляти тенденції до непаралельності. У випадку, якщо зразок розбавляється нелінійно (тобто непаралельно), процедура представлення результатів повинна бути визначена заздалегідь.

7.3. Відновлення (Recovery)

Для методик, які використовують екстракцію зразків, повинен бути оцінений показник відновлення (ефективність екстракції). Відновлення виражається у відсотках від відомої кількості аналіту, що пройшов етапи екстракції та обробки зразка за даною методикою. Відновлення визначається шляхом порівняння відгуку аналіту в обробленому біологічному зразку з доданим аналітом, з відгуком в обробленому біологічному зразку з потім доданим аналітом. Відновлення аналіту не повинно бути 100%, але ступінь відновлення аналіту та внутрішнього стандарту (якщо використовується) повинен бути однаковим. Експерименти з відновленням рекомендується проводити шляхом порівняння результатів аналізу екстрагованих зразків при різних концентраціях, зазвичай трьох концентраціях (низькій, середній та високій).

7.4. Мінімально необхідне розведення

Мінімально необхідне розведення – це коефіцієнт розведення, який використовується в зразках, що розводяться буферним розчином для зменшення фонового сигналу або інтерференції матриці при аналізі з використанням методик, що базуються на зв'язуванні лігандів. Мінімально необхідне розведення повинно бути однаковим для всіх зразків, включаючи калібрувальні стандарти та QCs, і повинно бути визначатися під час розробки методики. Якщо мінімально необхідне розведення змінюється після розробки методики, необхідна часткова валідація. Мінімально необхідне розведення повинно бути представлено у звіті про валідацію аналітичної методики.

7.5. Комерційні і діагностичні набори

Комерційні або діагностичні набори (далі - набори) іноді розробляються разом з новими хімічними або біологічними препаратами для діагностики пацієнтів у місцях надання медичної допомоги. Рекомендації цього розділу настанови не стосуються розробки наборів, призначених для діагностики пацієнтів у місцях надання медичної допомоги (наприклад, супровідних або додаткових діагностичних наборів). Дивіться відповідні настанови щодо регуляторних вимог до розробки таких наборів.

Якщо заявник змінює призначення набору (замість розробки нової методики) або використовує набори «виключно для дослідницьких цілей» для вимірювання концентрацій хімічних або біологічних препаратів під час розробки нового лікарського засобу, заявник повинен оцінити

валідацію набору, щоб переконатися, що він відповідає стандартам розробки лікарських засобів, описаних у цій настанові.

Питання щодо валідації наборів для кількісного визначення, включають, але не обмежуються наступним:

- Якщо референтний стандарт у наборі відрізняється від стандарту досліджуваних зразків, тестування повинно оцінити відмінності ефективності кількісного визначення реагентів набору. Специфічність, правильність, прецизійність і стабільність аналізу набору повинні бути доведені в реальних умовах використання в установі, що проводить аналіз зразків. Відхилення від інструкцій з використання набору, повинні бути повністю валідовані.
- Набори, що використовують незначну кількість калібрувальних стандартів (наприклад, одно- або двоточкову калібрувальну криву), повинні включати внутрішні валідаційні експерименти для встановлення калібрувальної кривої з достатньою кількістю стандартів у всьому калібрувальному діапазоні.
- Фактичні концентрації QCs повинні бути відомі. Концентрації QCs, виражені у вигляді діапазонів, не є достатніми для кількісного застосування. У таких випадках повинні готуватися і використовуватися QCs з відомими концентраціями, незалежно від QCs з набору.
- Калібрувальні стандарти та QCs повинні готуватися в тій самій матриці, що й досліджувані зразки. Набори з калібрувальними стандартами та QCs, приготовлені в матриці, відмінній від досліджуваних зразків, повинні бути обґрунтовані, і повинні бути проведені відповідні експерименти.
- Якщо в дослідженні використовують кілька серій наборів, повинні бути враховані варіабельність і порівнянність між серіями для будь-яких критично важливих реагентів, що входять до складу набору.
- Якщо використовується набір з декількома планшетами, для контролю правильності аналізу на кожному планшеті повинна використовуватися достатня кількість повторних QCs. Критерії прийнятності повинні бути встановлені як для окремих планшетів, так і для всього аналітичного циклу.

7.6. Нові або альтернативні технології

Якщо нова або альтернативна технологія використовується як єдина біоаналітична технологія з самого початку розробки лікарського засобу, перехресна валідація з існуючою технологією не потрібна.

Використання двох різних біоаналітичних технологій для розробки лікарського засобу може призвести до отримання даних про один і той самий продукт, які можуть бути складними для інтерпретації. Такий результат може мати місце, коли одна платформа генерує концентрації лікарського засобу, які відрізняються від тих, що отримані за допомогою іншої платформи. Тому, коли нова або альтернативна аналітична платформа замінює попередню платформу, яка використовувалася при розробці лікарського засобу, важливо добре розуміти потенційні відмінності. Дані, отримані за допомогою попередньої платформи/технології, повинні бути перехресно валідовані за допомогою нової або альтернативної платформи/технології. Рекомендується на ранній стадії розробки лікарського засобу звернутися за консультацією до регуляторних органів. Використання двох методик або технологій в рамках порівняльного дослідження біодоступності/біоеквівалентності категорично не рекомендується.

Використання нової технології в регульованому біоаналізі повинно бути підкріплено критеріями прийнятності, встановленими апріорі на основі розробки методики і підтвердженими в ході валідації.

7.6.1. Методики сухих матриць

Методики сухої матриці – це методологія відбору зразків, що має такі переваги, як відбір зменшених об'ємів зразків крові для мікропробопідготовки для аналізу лікарських засобів, а також простота збору, зберігання і транспортування зразків. На додаток до типової методології валідації для рідинної хроматографії з мас-селективним детектором або методик, що базуються на зв'язуванні лігандів, використання методики сухої матриці вимагає подальшої валідації цього підходу до відбору зразків, перш ніж використовувати методику сухої матриці в дослідженнях, що підтримують заявку на реєстрацію, таких як:

- Гематокрит (особливо для нанесення цільної крові на картки)
- Однорідність зразка (особливо для суб-проб, відібраних з картки/пристрою)
- Екстракція зразка з висушеної матриці
- Збір зразків методикою сухої матриці для обов'язкового повторного аналізу зразків
- Необхідно забезпечити достатній об'єм зразка або достатню кількість повторів для проведення обов'язкового повторного аналізу зразків
- Повинен оцінюватися шляхом багаторазового проколювання зразка або зразки повинні відбиратися в двох екземплярах

Якщо методики сухої матриці використовуються для клінічних випробувань або доклінічних досліджень на додаток до типових підходів до рідин (наприклад, зразків рідини плазми) в тих самих дослідженнях, ці дві методики повинні бути перехресно валідовані, як описано (див. Розділ 6.2). Щодо доклінічних досліджень, див. розділ 4.1 ICH S3A Q&A. На ранніх стадіях розробки лікарських засобів заохочується зворотний зв'язок з відповідними регуляторними органами.

8. ДОКУМЕНТАЦІЯ

Загальні та специфічні СОП, а також належне ведення документації є необхідними для правильної валідації аналітичної методики. Дані, отримані для валідації біоаналітичної методики, повинні бути задокументовані і доступні для аудиту та інспекції даних. У таблиці 1 наведено рекомендовану документацію для подання до регуляторних органів, а також документацію, яка повинна бути доступною на аналітичній дільниці під час інспектування. Ця документація може зберігатися на аналітичній дільниці або в іншому безпечному місці. У цьому випадку документація повинна бути легкодоступною за вимогою.

Уся відповідна документація, необхідна для відтворення дослідження в тому вигляді, в якому воно проводилося і в якому представлено, повинна зберігатися в безпечному місці. Відповідна документація включає, але не обмежується вихідними даними, протоколами і звітами, записами, що підтверджують процедурні, операційні та екологічні питання, а також записи листування між усіма залученими сторонами.

Незалежно від формату документації (паперовий чи електронний), записи повинні бути внесені одночасно з подією, а подальші зміни не повинні приховувати початкові дані. Підстави для зміни або обробки даних повинні бути задокументовані з достатньою деталізацією, а початковий запис повинен бути збережений.

8.1. Загальна інформація

Коротка інформація повинна включати наступні пункти з Розділу 2.6.4/2.7.1 Загального технічного документа (CTD; або електронного CTD, eCTD) або звітів:

- Повинен бути включений короткий опис методик, використаних для кожного дослідження. Кожне резюме повинно містити назву методики, ідентифікаційний код методики, тип аналізу, код біоаналітичного звіту, дату введення методики в дію та відповідні коди звітів з валідації.
- Для кожного аналізу повинна бути надана зведена таблиця всіх відповідних звітів з валідації, включаючи звіти про часткову валідацію та перехресну валідацію. Таблиця повинна містити код

методики, тип методики, причину для нового методики або додаткової валідації (наприклад, зниження межі кількісного визначення). Зміни, внесені до методики, повинні бути чітко ідентифіковані.

- Якщо методика має різні коди для методики, звітів з валідації та біоаналітичних звітів повинна бути надана зведена таблиця з перехресними посиланнями на ці ідентифікаційні коди,.
- Обговорення змін у методиці (наприклад, еволюція методики, причина(и) перегляду, ключові аспекти)
- Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності – перелік інспекцій регуляторних органів із зазначенням дат і результатів для кожної аналітичної ділянки, якщо вони проводилися протягом останніх трьох років, а також через рік після завершення дослідження.

8.2. Документація для звітів з валідації та біоаналітичних звітів

Таблиця 1 описує рекомендовану документацію для звітів з валідації та біоаналітичних звітів.

Таблиця 1. Документація і звітування

Пункт	Документація в місці проведення аналізу	Звіт з валідації	Аналітичний звіт
Придатність хроматографічної системи	Дати, час проведення перевірки придатності і використанні для цього зразки	Не застосовується	Не застосовується
Короткий огляд розвитку методики	Історія /еволюція методики (наприклад, для пояснення змін, унікальних аспектів методу із супровідними даними, якщо наявні)	Не застосовується	Не застосовується
Стандартні зразки	Сертифікат аналізу або еквівалентний документ, що підтверджує якість (включаючи чистоту), стабільність/термін придатності/дату повторного аналізу, номер серії, а також виробника або джерело. Документація щодо отримання,	Копія сертифікату аналізу або еквівалентного документа має містити номер серії/партії, джерело, показники якості (включаючи чистоту), умови зберігання, а також дату закінчення терміну придатності або дату повторного аналізу. Замість копії документа може бути надана таблиця з цією інформацією. У разі закінчення терміну придатності – надати дані щодо якості та стабільності на момент	Копія сертифікату аналізу або еквівалентного документа має містити номер серії/партії, джерело, показники якості (включаючи чистоту), умови зберігання, а також дату закінчення терміну придатності або дату повторного тестування. Замість копії документа може бути надана таблиця з цією інформацією. У разі закінчення терміну придатності – надати дані щодо якості та стабільності на момент

	використання та умов зберігання. У разі закінчення терміну придатності – оновлений сертифікат аналізу або повторне тестування якості та ідентичності із зазначенням дат повторного тестування.	використання із зазначенням дат повторного тестування та результати повторного тестування.	використання із зазначенням дат повторного тестування та результати повторного тестування.
Внутрішній стандарт (IS)	Якість внутрішнього стандарту або демонстрація його придатності. Записи щодо отримання, використання та умов зберігання.	Назва реагенту або стандарту Походження	Назва реагенту або стандарту Походження
Критичні реагенти	Назва реагенту Номер серії/партії Джерело/Походження Концентрація, якщо застосовується	Назва реагенту Номер серії/партії Джерело/Походження Концентрація, якщо застосовується Дата повторного тестування (термін придатності)	Назва реагенту Номер серії/партії Джерело/Походження Концентрація, якщо застосовується Дата повторного тестування (термін придатності)

	Дата повторного тестування (термін придатності) Умови зберігання	Умови зберігання	Умови зберігання
Основні/Робочі розчини	Запис про приготування та використання основних/робочих розчинів Місце та умови зберігання	Підтвердження того, що розчини використовувалися в межах встановленого періоду стабільності Стабільність основних/робочих розчинів Умови зберігання	Підтвердження того, що розчини використовувалися в межах встановленого періоду стабільності Стабільність основних/робочих розчинів Умови зберігання
Бланк матриці	Записи про опис матриці, номери партій, дати отримання, умови зберігання та джерело/постачальника	Опис, номер партії, дати отримання	Опис, номер партії, дати отримання
Калібрувальні стандарти і зразки контролю якості	Записи про приготування і дата приготування Запис температур зберігання (наприклад, фіксація дат внесення/вилучення, відповідального аналітика,	Опис приготування, включаючи опис матриці Номер серії, дати приготування та період стабільності Умови зберігання (температура, дати, тривалість тощо)	Опис приготування Дати приготування та період стабільності Умови зберігання

	температурних показників та ідентифікатора морозильної(их) камери.		
Стандартні операційні процедури (СОП)	Процедури для всіх аспектів аналізу, такі як: Метод/процедура (валідація/аналітичний) Критерії прийнятності (наприклад, для аналітичного циклу, калібрувальної кривої, зразків контролю якості) Обладнання Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків Запис змін до стандартної операційної процедури (зміна, дата, причина тощо)	Детальний опис процедур методу	Перелік процедур/аналітичних протоколів, що використовуються для методу

Відстеження зразків	Отримання досліджуваних зразків і їх стан на момент отримання Записи, що підтверджують спосіб транспортування та отримання зразків Інвентаризація зразків і причини відсутності окремих зразків Місце зберігання (наприклад, морозильна камера) Журнали відстеження зразків контролю якості, калібрувальних стандартів і досліджуваних зразків Журнали зберігання в морозильній камері для зразків контролю якості, калібрувальних стандартів та досліджуваних зразків	Не застосовується	Дати отримання партій зразків, кількість зразків Стан зразків під час отримання Умови та місце зберігання в місці проведення аналізу Загальна тривалість зберігання: від моменту забору зразків до аналізу Перелік усіх відхилень від запланованих умов зберігання та їх потенційний вплив Додатково, для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності: Ідентифікатор суб'єкта дослідження
---------------------	--	-------------------	--

	із фіксацією внесення та вилучення		
Аналіз	Документація та дані для перевірки придатності системи для хроматографії Журнал використання приладів, включаючи дати аналізу для кожного аналітичного циклу Журнали екстракції зразків, включаючи документацію обробки калібрувальних стандартів, зразків контролю якості та досліджуваних зразків для кожного циклу, включаючи дати екстракції Ідентичність зразків контролю якості та серій калібрувальних стандартів, а також	Для всіх досліджень надаються: Таблиця всіх аналітичних циклів із зазначенням дат аналізу, прийнятих або відхилених Таблиця концентрацій калібрувальних стандартів та результатів функцій відгуку (параметри калібрувальної кривої) для всіх прийнятих аналітичних циклів із зазначенням точності та правильності. Таблиця результатів зразків контролю якості всередині аналітичного циклу та між циклами, а також калібрувальних стандартів (за циклами оцінки правильності та прецизійності). Значення, що виходять за межі прийнятих критеріїв, мають бути чітко позначені. Для методик, що базуються на зв'язуванні лігандів, слід додатково вказати загальну похибку.	Для всіх досліджень надаються: Таблиця всіх аналітичних циклів із зазначенням статусу (прийнятий або відхилений), причин відхилення та дат проведення аналізу. Таблиця концентрацій калібрувальних стандартів та результатів функцій відгуку (параметри калібрувальної кривої) для всіх прийнятих аналітичних циклів із зазначенням точності та правильності. Таблиця результатів зразків контролю якості для всіх прийнятих аналітичних циклів, включаючи загальну правильність та прецизійність між циклами для зразків контролю якості, а також результати правильності і прецизійності прийнятих циклів. Таблиця повторно проаналізованих циклів із результатами повторного

	досліджуваних зразків у кожному циклі Документація щодо налаштувань та обслуговування приладів Лабораторна інформаційна менеджмент-система (ЛІМС) Інформація про валідацію, включаючи документацію та дані щодо: селективності, специфічності, нижньої межі кількісного визначення, прецизійності та правильності, ефекту переносу, допустимості розведення, відновлення, матричного ефекту	Дані щодо селективності, специфічності, лінійності при розведенні, нижньої межі кількісного визначення (LLOQ), ефекту переносу, відновлення. Короткострокова стабільність аналіту в матриці при кімнатній температурі або при температурі обробки зразка, стабільність при заморожуванні/таненні, довготривала стабільність, стабільність екстракту та основного розчину Перехресна/часткова валідація, якщо застосовується. Окремий звіт про додаткову валідацію, якщо застосовується. Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності додатково надати: Ідентифікатор приладу для кожного аналітичного циклу Зведену таблицю 100% аналітичних циклів із зазначенням прийнятих та відхилених аналітичних циклів	аналізу та причинами повторної інжекції. Графіки зразків контролю якості для аналізу трендів – рекомендовано. Таблиця концентрацій, отриманих в результаті дослідження. Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності додатково надати: Ідентифікатор приладу для кожного аналітичного циклу. Графіки відгуку внутрішнього стандарту (IS) для кожного аналітичного циклу, включаючи відхилені. Зведену таблицю 100% аналітичних циклів із зазначенням прийнятих та відхилених аналітичних циклів
--	--	--	--

	Короткострокової стабільності аналіту в матриці при кімнатній температурі або при температурі обробки зразка, стабільності при заморожуванні/таненні, довготривалої стабільності, стабільності екстракту та основного розчину Перехресна/часткова валідація, якщо застосовується.		
Хроматограми та повторна інтеграція	100% електронних хроматограм (оригінальних та після реінтегрування) з прийнятих та відхилених аналітичних циклів. Причина реінтегрування. Спосіб реінтегрування: зведені таблиці 100% прийнятих і відхилених	Для всіх досліджень: Репрезентативні хроматограми (оригінальні та реінтегровані). Причина повторної інтеграції. Хроматограми можуть бути подані як додаток. Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності додатково надати:	Для всіх досліджень: Хроматограми можуть бути подані як додаток. Для досліджень, відмінних від порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності, Випадково відібрані хроматограми з 5% зразків, поданих у складі реєстраційного досьє. Причина повторної інтеграції.

	аналітичних циклів, включаючи калібрувальну криву, регресію, функцію ваги, відгук та час утримання аналіту та внутрішнього стандарту, співвідношення відгуку між ними, тип інтеграції	100% хроматограм (оригінальних та реінтегрованих) з прийнятих та відхилених аналітичних циклів. Зведену таблицю щодо 100% прийнятих і відхилених аналітичних циклів.	Ідентифікація та обговорення хроматограм із ручною інтеграцією Стандартна операційна процедура щодо інтеграції, якщо застосовується Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності додатково надати: 100% хроматограм. Оригінальні та повторно інтегровані хроматограми, а також результати первинної та повторної інтеграції. Зведену таблицю щодо 100% прийнятих і відхилених аналітичних циклів.
Відхилення від процедури	Одночасне (своєчасне) фіксування відхилень або непередбачених подій. Дослідження непередбачених подій. Оцінка впливу.	Опис відхилень. Вплив на результати дослідження. Опис та підтверджуючі дані щодо суттєвих розслідувань.	Опис відхилень. Вплив на результати дослідження. Опис та підтверджуючі дані щодо суттєвих розслідувань.
Повторний аналіз	Процедури повторного аналізу (визначення	Не застосовується	Для всіх досліджень:

	причин повторного аналізу тощо) Збереження 100% даних повторного аналізу Одночасні записи причин повторів		Таблиця ідентифікаторів зразків, причина повторного аналізу, значення початкового та повторного аналізу, обґрунтування наведених значень, ідентифікатори аналітичних циклів Для порівняльних досліджень біодоступності/біоеквівалентності додатково: значення з відхилених аналітичних циклів слід включити в окрему таблицю.
Обов'язковий повторний аналіз досліджуваних зразків	Процедура для обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків Дані обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків: ідентифікатори аналітичних циклів, зведені таблиці аналітичних циклів, хроматограми або інші електронні файли	Не застосовується	Таблиця даних обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків (первинні та повторно отримані значення, ідентифікатори аналітичних циклів, відсоткова різниця, відсоток успішних результатів) Розслідування причин відхилення результатів обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків, якщо були

	інструментальних даних Задokumentовані розслідування причин відхилення результатів обов'язкового повторного аналізу досліджуваних зразків, якщо були		
Комунікація	Між залученими сторонами (заявником, контрактними дослідницькими організаціями та консультантами) щодо дослідження/методу.	Не застосовується	Не застосовується
Аудити та інспектування	Докази щодо проведених аудитів та інспекцій	Не застосовується / див. розділ 8.1 для зведеної інформації, що має бути включена до eЗТД	Не застосовується / див. розділ 8.1 для зведеної інформації, що має бути включена до eЗТД

НАЦІОНАЛЬНИЙ ДОДАТОК (довідковий)

Перелік редакційних змін та доповнень

Ця настанова розроблена на підставі керівництва ICH M10 з валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків (EMA/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis») Європейського агентства з лікарських засобів (ЕМА) розробленої Комітетом з лікарських засобів для медичного призначення (CHMP) [11].

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

Настанова містить положення, що відповідають чинному законодавству.

До настанови внесено такі редакційні зміни та додаткову інформацію:

- назву цієї настанови наведено відповідно до вимог ДСТУ 1.5:2015 «Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів» [5], а позначення – відповідно до вимог стандарту СТ МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення» [3];
- додатково введено такі структурні елементи настанови, як «Передмова», «Національний вступ», «Сфера застосування», «Нормативні посилання», «Терміни та визначення понять», «Позначки та скорочення» та національний додаток «Бібліографія», оформлені відповідно до вимог ДСТУ 1.5:2015 «Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів» [5] та ДСТУ 1.7:2015 «Національна стандартизація. Правила та методи прийняття та застосування міжнародних і регіональних нормативних документів» [6]. Розділ «Зміст» цієї настанови подано з урахуванням додаткових структурних елементів;
- кожний структурний елемент та його номер у даній настанові відповідають таким у керівництві ICH M10 з валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків (EMA/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis») [11];
- розділ «Терміни та визначення понять» викладено на підставі розділу «Glossary» керівництва ICH M10 з валідації

біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків (EMA/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis») [11]. Цей розділ не позначено номером та викладено після розділу «Нормативні посилання». Усі терміни у розділі «Терміни та визначення понять» наведено в алфавітному порядку;

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

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

- у розділі «Національний вступ» додатково описано коли відповідно до документа EMA/449486/2023 «Implementation Strategy of ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation» [12], допускається застосування попереднього керівництва CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2 та гармонізованої з ним Настанови СТ-Н МОЗУ 42-7.8:2021 «Лікарські засоби. Біоаналітична частина дослідження» [4] ;

- додатково до посилань на керівництва ЄС зроблено посилання на відповідні гармонізовані документи, затверджені в Україні.

НАЦІОНАЛЬНИЙ ДОДАТОК (довідковий)

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 26 серпня 2005 року № 426 «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення», зареєстрований у Міністерстві юстиції України 19 вересня 2005 року за № 1069/11349.
2. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 16 лютого 2009 року № 95.
3. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 14 вересня 2005 року № 471 «Про затвердження документів з питань стандартизації фармацевтичної продукції».
4. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-7.8:2021 «Лікарські засоби. Біоаналітична частина дослідження», затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 22 березня 2021 року № 522
5. ДСТУ 1.5-2015 Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів.
6. ДСТУ 1.7-2015. – Національна стандартизація. Правила та методи прийняття та застосування міжнародних і регіональних нормативних документів.
7. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council, of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (Директива 2001/83/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 6 листопада 2001 року про кодекс Співтовариства відносно лікарських засобів для медичного призначення).
8. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (codified version) (Директива 2004/10/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про гармонізацію законів; постанов і адміністративних положень, що стосуються застосування принципів належної лабораторної практики і перевірки їх застосування при дослідженні хімічних речовин).

9. Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council, of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) (Директива 2004/9/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 11 лютого 2004 року про інспекцію та перевірку належної лабораторної практики).
10. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Notice to Applicants V. 2A - Procedures for marketing authorisation CHAPTER 1 MARKETING AUTHORISATION (Правила, що регулюють лікарські засоби в Європейському Союзі. – Том 2А. – Процедури реєстрації РОЗДІЛ 1 РЕЄСТРАЦІЯ).
10. CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** «Guideline on bioanalytical method validation» (Керівництво з валідації біоаналітичної методики).
11. EMA/CHMP/ICH/172948/2019 «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis» (Керівництво ICH M10 з валідації біоаналітичної методики та аналізу досліджуваних зразків)
12. EMA/449486/2023 «Implementation strategy of ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation» (Стратегія впровадження керівництва ICH M10 з валідації біоаналітичної методи).
13. EMEA/P/24143/2004 Rev.1 corr «Procedure for European Union guidelines and related documents within the pharmaceutical legislative framework, 2005» (Процедура відносно керівництв та супровідних документів Європейського Союзу в рамках фармацевтичного законодавства, 2005).