

Фундаментальные вопросы валидации биоаналитической методики в свете требований GLP OECD



Шнаукшта В.С.

**РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных
средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК к.б.н., доцент**

С-Петербург июнь 2023

Содержание

1. Применение правил GLP в процессах валидации биоаналитических методик
2. Акцентные моменты при выборе методики и подготовке к процессу ее валидации
3. Основы пробоподготовки биоматрицы
4. Валидация метода количественного определения:
 - цель и задачи
 - виды валидации
 - валидационные параметры
5. Прослеживаемость и целостность данных при валидации
6. Документация: биоаналитический отчет



Нормативные руководства и правила

FDA Guidance for Industry “Bioanalytical Method validation” (May 2018)

EMA/CHMP/ICH/172948/2019 Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis 25 July 2022

Приложение 6 Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (Решение Совета ЕАЭК от 3 ноября 2016 г. № 85)



Правила надлежащей лабораторной практики ЕАЭС в сфере обращения ЛС (Решение Совета ЕАЭК от 3 ноября 2016 г. N 81)



Валидация биоаналитической методики

Согласно Рекомендациям ЕАЭС, ICH, FDA биоаналитическая методика, как и любая аналитическая методика, должна быть подвергнута валидации

Требования к валидации биоаналитических методик

Требования к валидации фармакопейных аналитических методик

- Большая вариабельность результатов биоаналитических определений (методики включают в себя процессы экстракции, осаждения белков и др.),
- сложный состав биологической матрицы, содержащей определяемое вещество

Биоаналитическая методика (ВАМ)

методика количественного определения ЛВ и их метаболитов в биологических объектах (цельной крови, плазме, сыворотке, моче и др.) человека и животных

Использование

- в основном при проведении фармакокинетических исследований (в т.ч. исследований биоэквивалентности), токсикокинетических исследований, изучении метаболизма

Основные методы анализа

- хроматографические (ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС-МС, ГХ-МС, ГХ-МС-МС),
- иммунологические (твердофазный
- иммуноферментный анализ)

GLP
BMV

Валидация биоаналитической методики (BMV)

Разработка и валидация
надежного биоаналитического
метода - **ключ к точным
измерениям лекарственных
средств и метаболитов в
биологической матрице**





Валидация биоаналитической методики (BMV)

- это не просто проведение стандартных анализов биологического образца
- это получение достоверных количественных результатов в соответствии с рекомендациями ЕАЭС, ЕМЕА, FDA поскольку **эти результаты анализа составляют основополагающий блок на пути к утверждению при регистрации препарата.**
- Из-за важности этих анализов регулирующие органы о тщательно проверяют эти результаты на предмет точности перед одобрением препарата.



Виды BMV

Полная

- при разработке новой биоаналитической методики

Частичная

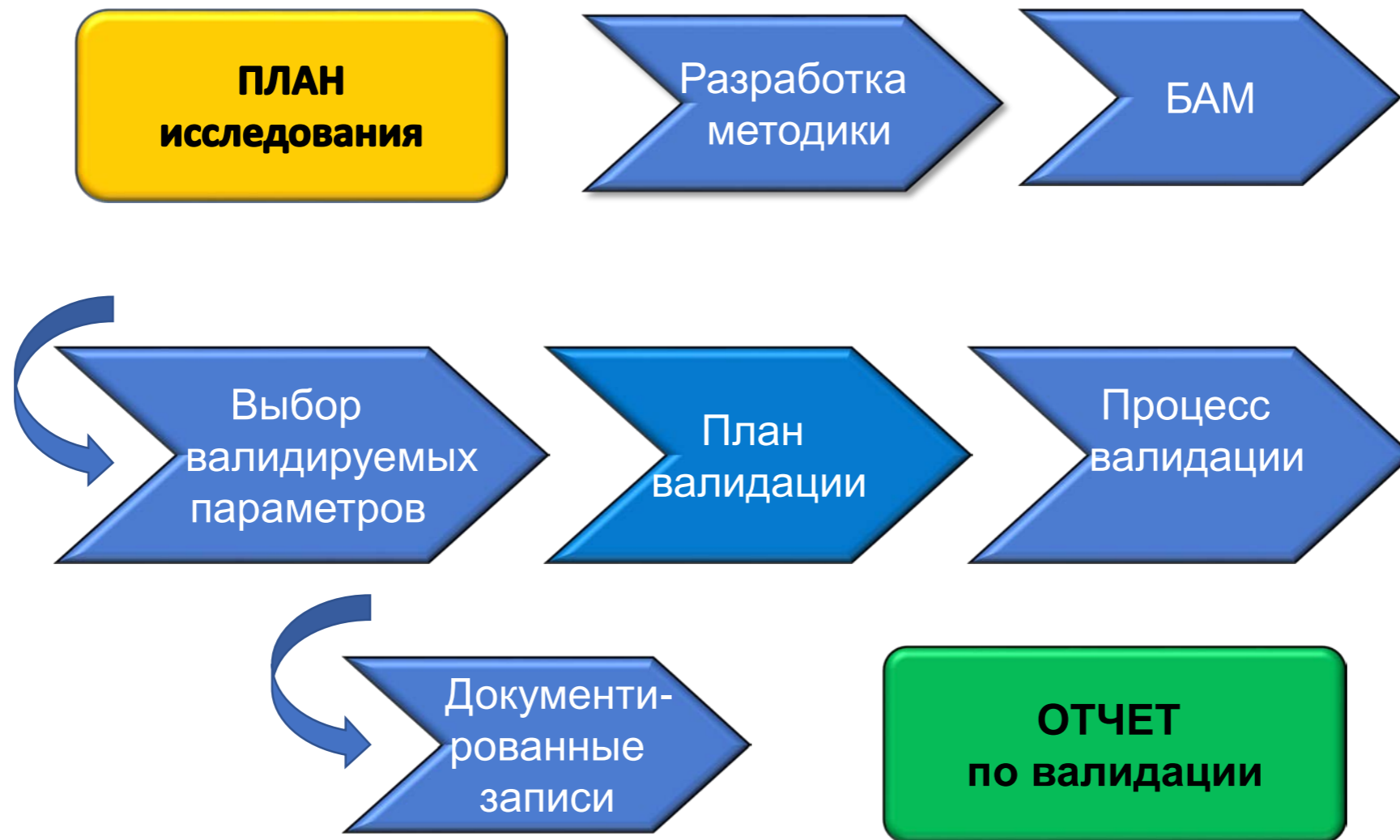
- смена лаборатории, оборудования, условий хранения проб и т.д.
- определение правильности и прецизионности на уровнях intra-day и between-run и определение стабильности

Кросс

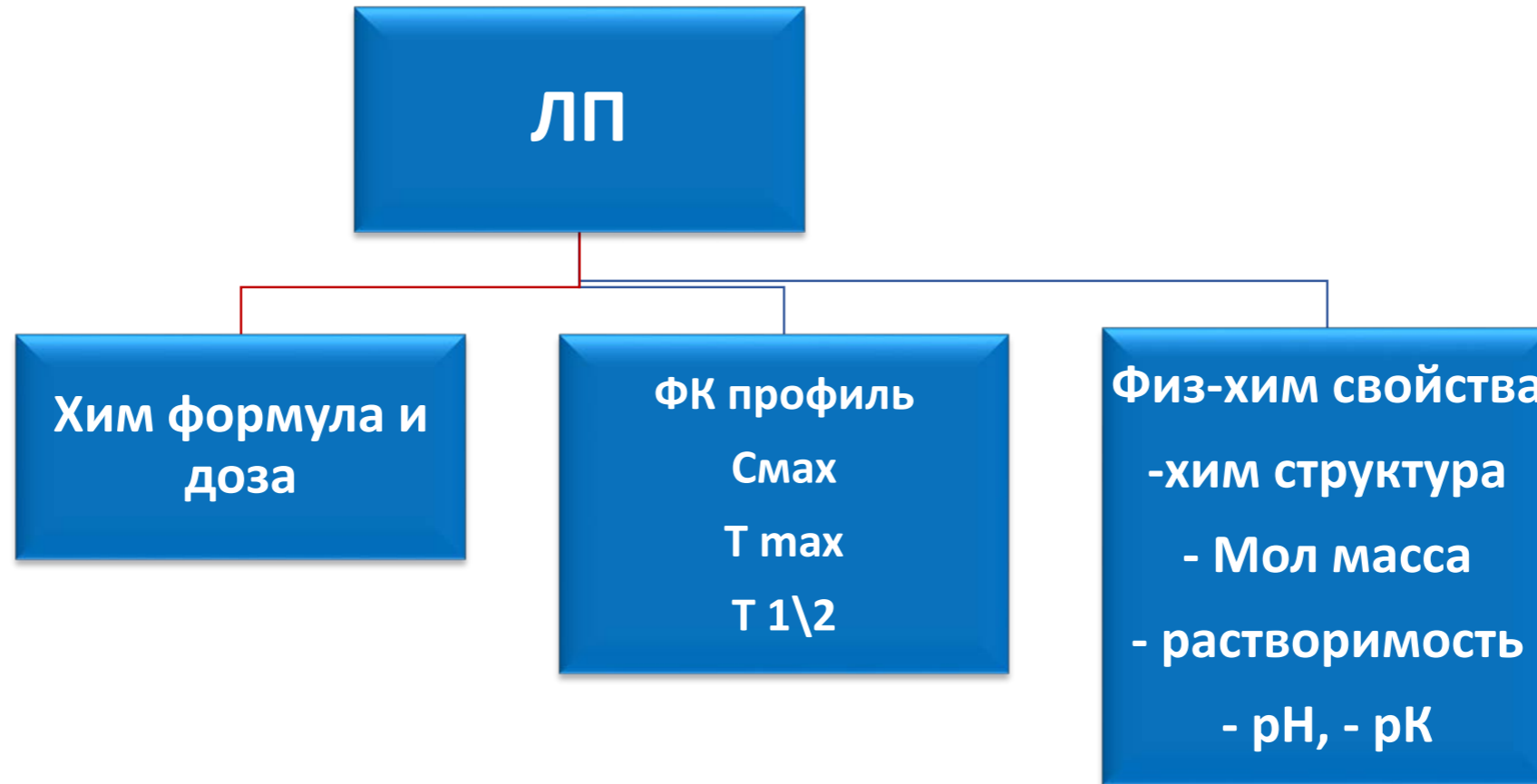
- при сравнении результатов определений, полученных из разных лабораторий
- результаты анализа определяемого вещества с помощью обеих методик не должны различаться более чем на 15%



Схема процесса разработки ВАР и ВМВ в GLP исследованиях

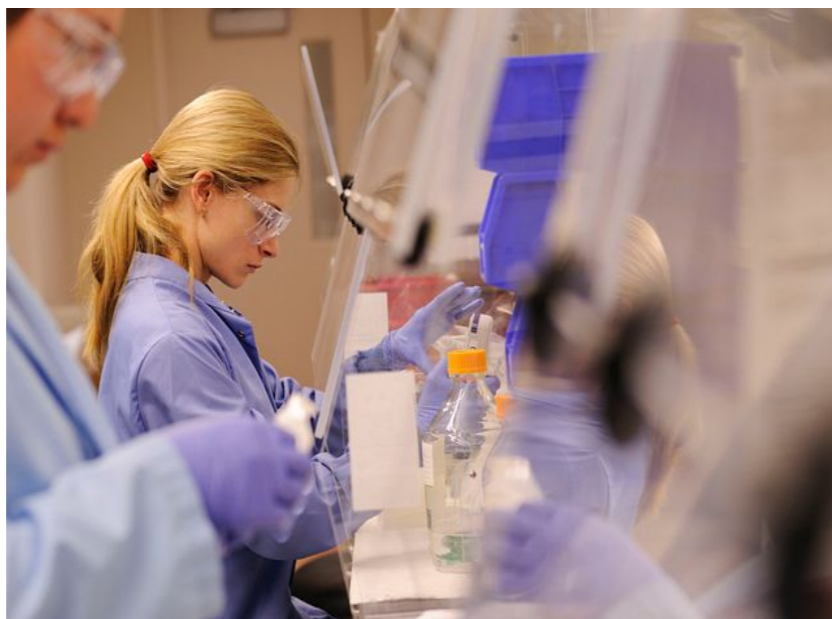


Литературный поиск





Разработка методики



Цель

определение условий анализа
исследуемых образцов и
пригодности методики для
выполнения поставленных
задач

Разработка методики

Исследование аналита

физико-химические
свойства

метаболизм in vitro и
in vivo

Степень связывания с
белками



Самая важная задача при разработке метода - **выделение аналита из биологической матрицы и его детектирование**



Фундамент для разработки ВАМ



Стандартные образцы

ТРЕБОВАНИЯ к СО

- аутентификация с известной идентичностью и чистотой для приготовления точных концентраций.
- сертификат анализа в соответствии требованиями стандартов EMEA и USP.
- для внутренних стандартов нет необходимости в сертификате анализа, если он не мешает анализу





Выделение исследуемого анализа из биологической матрицы



Белки и фосфолипиды – самые распространенные интерференты, обнаруживаемые в биологических образцах при количественном определении ЛС и метаболитов.

- ★ Белки могут выпадать в осадок и засорять хроматографическую колонку, если их не удалять из этих образцов.
- ★ Белки могут связываться с молекулами анализируемого вещества, препятствуя точному измерению концентрации анализируемого вещества.

Удаление белка

осаждение белка (protein precipitation PTT)

жидкость-жидкостная экстракция
(liquid-liquid extraction LLE)

твёрдофазная экстракция
(solid phase extraction SPE)

В зависимости от целевого диапазона концентраций и физико-химических свойств аналитов

Осаждение белка

РТТ

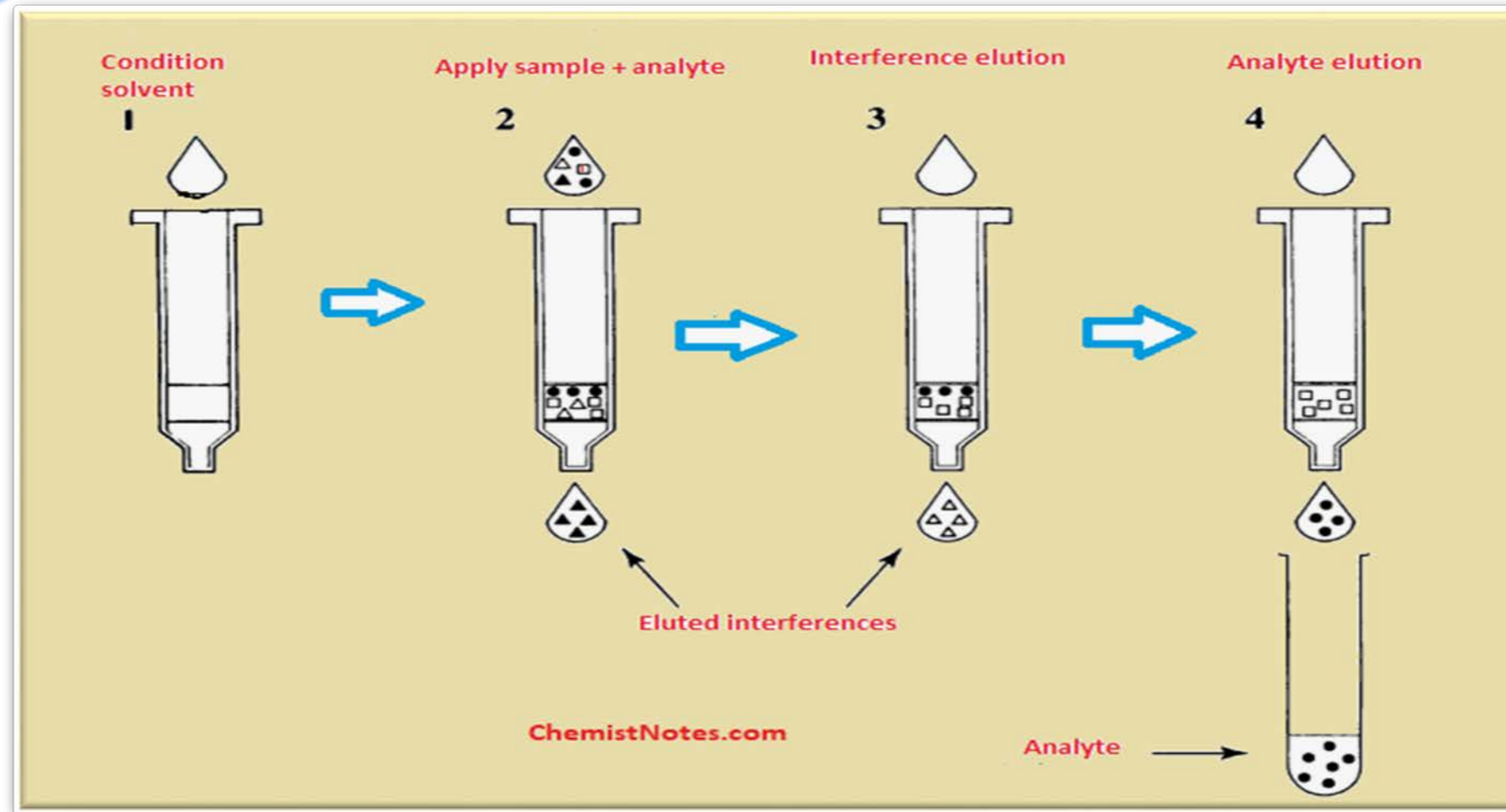
Денатурация белка путем добавления к образцу органического растворителя, кислоты, основания или нагревания

Ацетонитрил и метанол - наиболее часто используемые органические растворителями для РТТ. Как только белок выпадет в осадок, его гранулируют центрифугированием, а надосадочную жидкость используют для анализа

Недостаток – **разбавление образцов и снижение чувствительности** (чтобы осадить белок, добавляют минимум два или три эквивалента органического растворителя на каждый эквивалент образца)

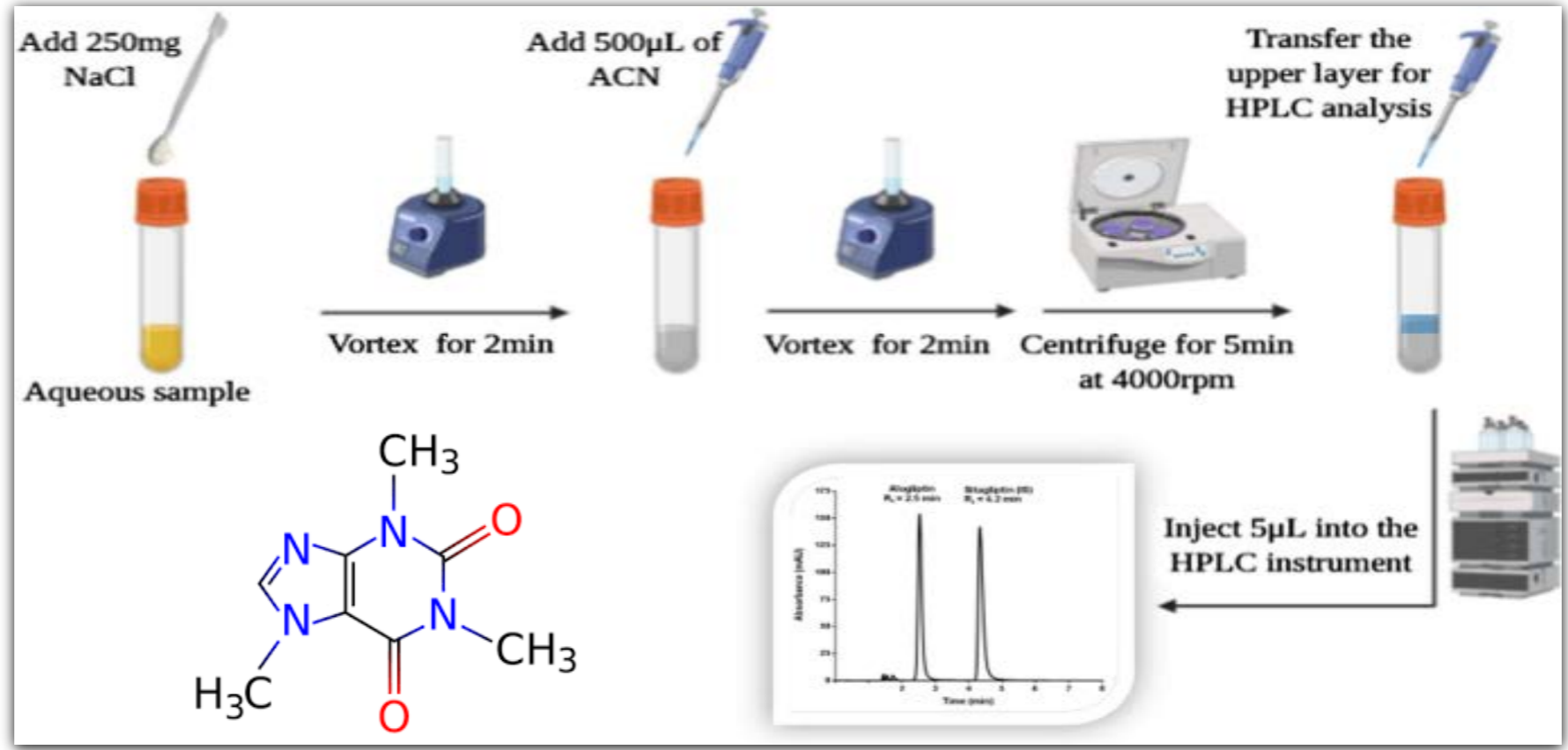
За РТТ также может последовать **выпаривание растворителя** и восстановление анализируемого вещества в растворе или буфере и компенсированное разбавление образца

Твердофазная Экстракция (SPE)



В SPE используется твердый сорбент, упакованный в колонку, для удаления загрязняющих веществ из биологических образцов. Когда образец наносится на упакованный сорбирующий материал, в материале адсорбируются как анализируемые вещества, так и интерференты. Интерференты смываются с сорбирующего материала с помощью растворителей (ацетонитрил или метанол)

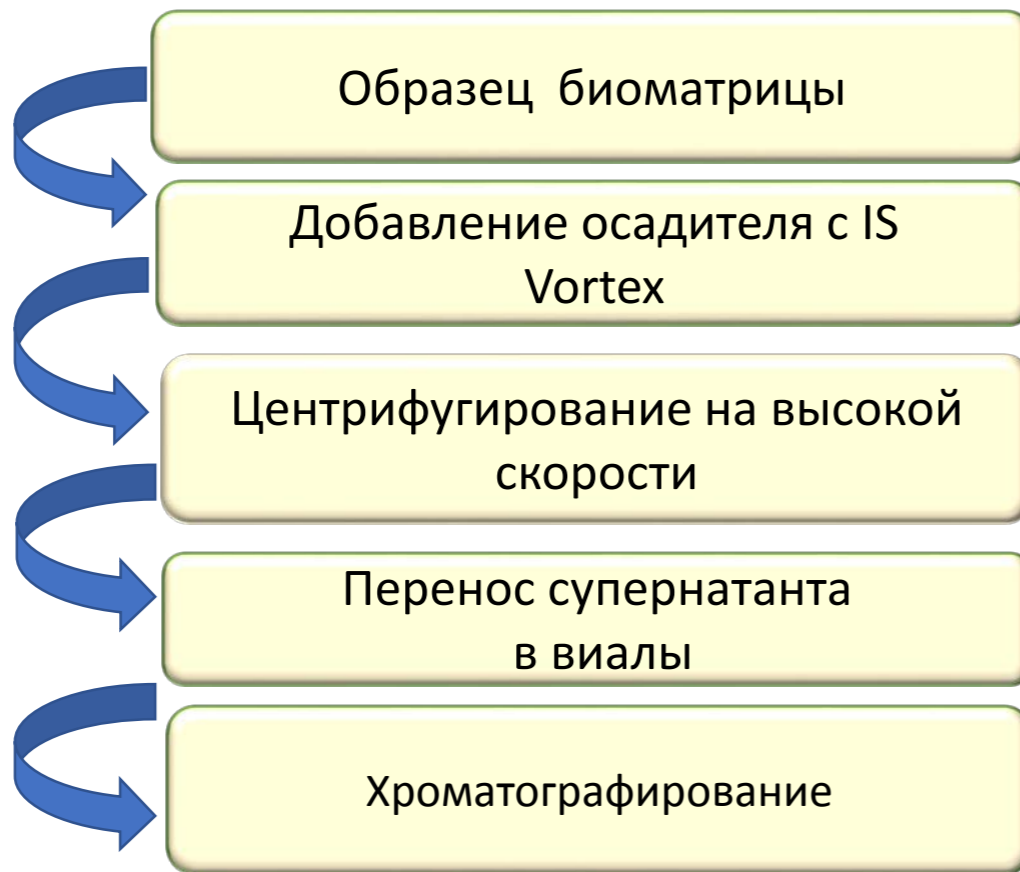
Жидкостно-Жидкостная экстракция (LLE)



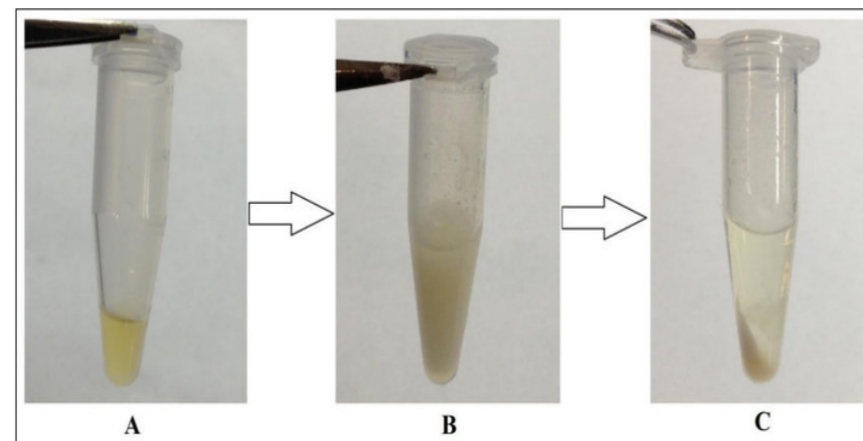
LLE - добавление несмешивающегося органического растворителя к биологическому образцу. Анализируемый материал экстрагируется из белков и липидов в слой органического растворителя, в то время как белки и липиды остаются в водной фазе.



Осаждение белка ультрацентрифугированием



- 25-1000 мкл
- 100-500 мкл
- 12000-16000 об/мин



Подбор условий анализа

выбор хроматографической
колонки

выбор компонентов
подвижной фазы

выбор внутреннего
стандарта

обеспечивают оптимальные
характеристики анализа
(чувствительность, селективность,
линейность и др., включая
стабильность методики в условиях
её продолжительного применения
при анализе большого количества
проб)

обеспечивает максимальную
точность количественной
оценки

Детальное описание БАМ

- Перечень оборудования, информация о его метрологической поверке
- Перечень и квалификация реагентов и расходных материалов
- СО действующей субстанции тестируемых препаратов (аналита) и внутреннего стандарта (с сертификатом качества)
- Биологическая матрица (с указанием антикоагулянта)
- Основные растворы аналита и внутреннего стандарта (концентрация, условия и сроки хранения)
- Рабочие растворы аналита (концентрация, условия и сроки хранения)
- Процедуры пробоподготовки
- Условия хроматографирования
- Порядок обработки хроматограмм (с указанием ПО)
- Порядок математической обработки данных (с указанием ПО)

Валидация биоаналитической методики (BMV)

Цель BMV

Демонстрация надежности метода для точного определения концентрации аналита в биологической матрице

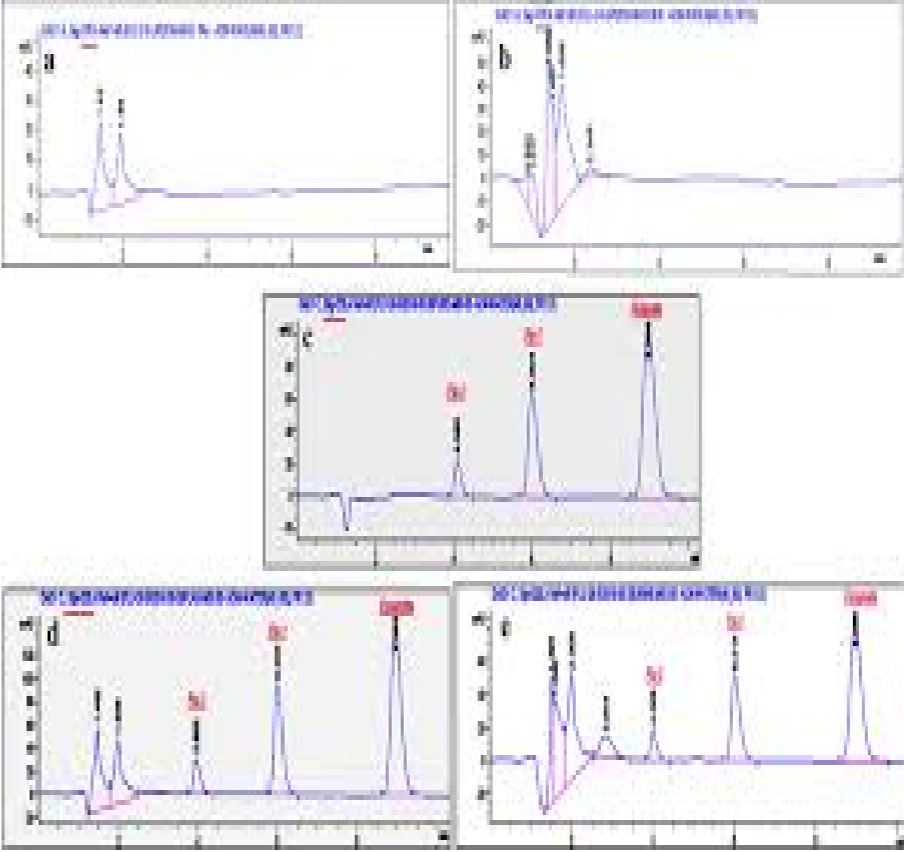




Тест-системы

Перед началом валидации проверяется аналитическое оборудование (тест-системы)

Квалификация и валидация компьютеризированных систем являются обязательными требованиями



Параметры валидации биометодики

- селективность (selectivity)
- оценка НПКО (lower limit of quantitation, LLOQ)
- линейность (linearity)
- правильность (accuracy)
- прецизионность (precision)
- эффект переноса (carry-over)
- эффект матрицы (matrix effect)
- стабильность (stability)
- степень извлечения (recovery)
- разведение (dilution integrity)

Образцы QC

Образцы контроля качества (QC)
– важный элемент процесса
BMV



- На этапе разработки метода рекомендуется **использовать свежеприготовленные QC**
- При определении правильности и прецизионности метода **включаются контрольные точки QC**
- **Калибровочные стандарты и QC готовятся отдельно**

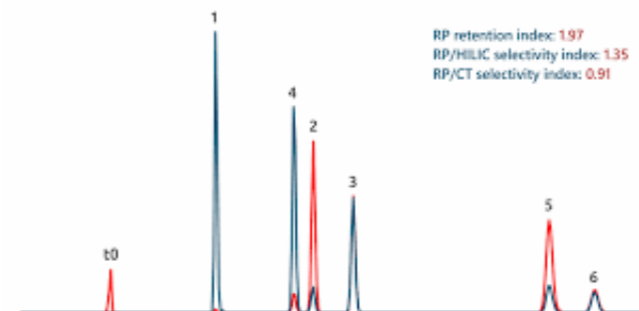
Селективность

способность проводить различие между АВ, IS и любым другим биологическим веществом, обнаруженным в образцах



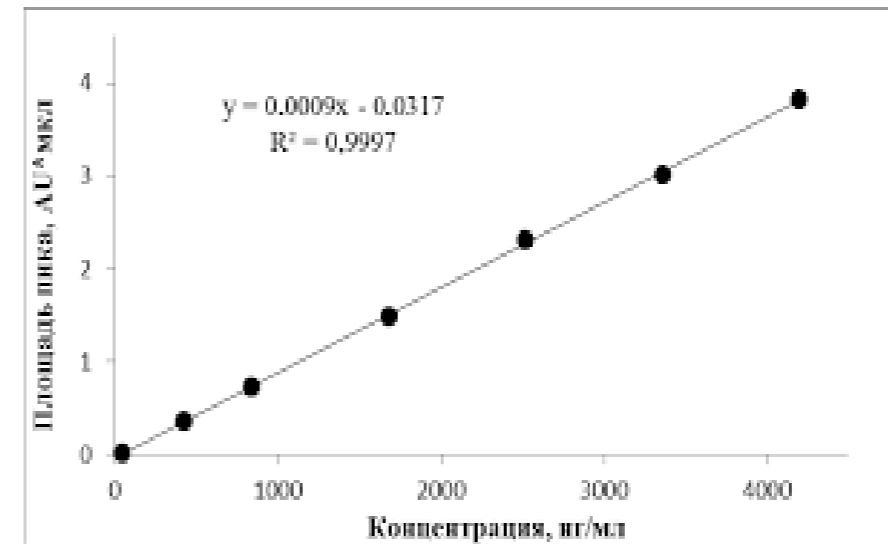
На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не должно наблюдаться пиков с временами удерживания, соответствующих анализируемому веществу и ВС

- анализ минимум шести чистых образцов («бланк-матрица») из разных источников
- в пустой матрице время удерживания анализируемого вещества должно составлять не более 20% от пика образца с НПКО (LLOQ) и 5% для IS
- в липидизированной матрице
- в гемолизированной матрице



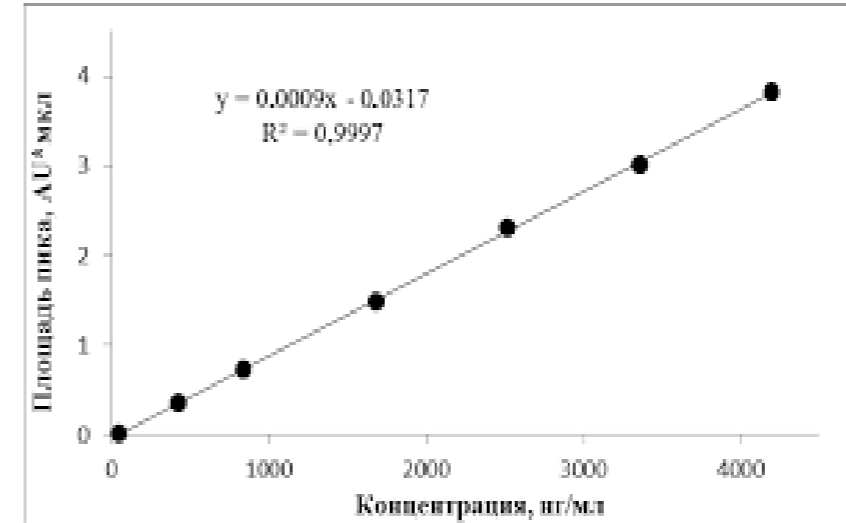
Калибровочная кривая

- Выбор надлежащего диапазона для стандартных растворов и калибровки проводят **на основе ожидаемого диапазона концентраций**
- Получение воспроизводимой калибровочной кривой
- Биологическая матрица - одинаковая на протяжении всего исследования
- КК строить для каждого аналитического цикла



Калибровочная кривая

- ✓ В образец «бланк матрицы» (обработанный образец матрицы без аналита и внутреннего стандарта) добавляются аликвоты известных концентраций аналита
- ✓ Диапазон ожидаемых (рабочих) концентраций аналита - от LLOQ до ULOQ
- ✓ нулевой образец (обработанный образец матрицы с внутренним стандартом)
- ✓ минимум шесть калибровочных стандартов разного концентрационного уровня



Каждый калибровочный стандарт анализируют не менее чем в двух повторностях

Нижний предел количественной оценки (LLOQ)

НПКО (LLOQ)

Наименьшая концентрация аналита в образце, которую можно надежно количественно определить с приемлемой правильностью и прецизионностью

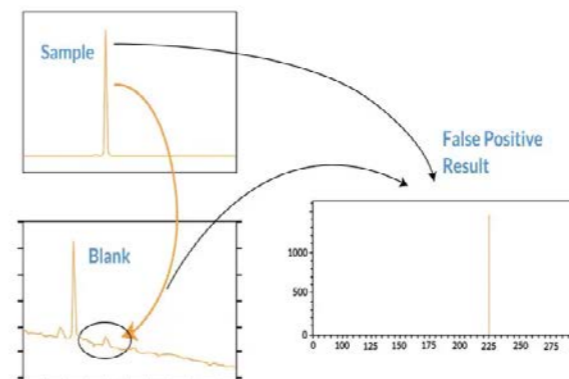
Сигнал аналита должен быть минимум в 5 раз больше сигнала в образце «бланк-матрицы»

Должен быть не выше, чем 5% от S_{max}

Эффект переноса (carry-over)

При последовательном анализе калибровочных образцов с ULOQ и образцов интактной плазмы крови:

- на хроматограммах образцов интактной плазмы крови должны отсутствовать пики со временам удерживания пиков исследуемых веществ и ВС.



Критерии приемлемости

- не более 20% от НПКО аналита (LLOQ)
- не более 5% для IS

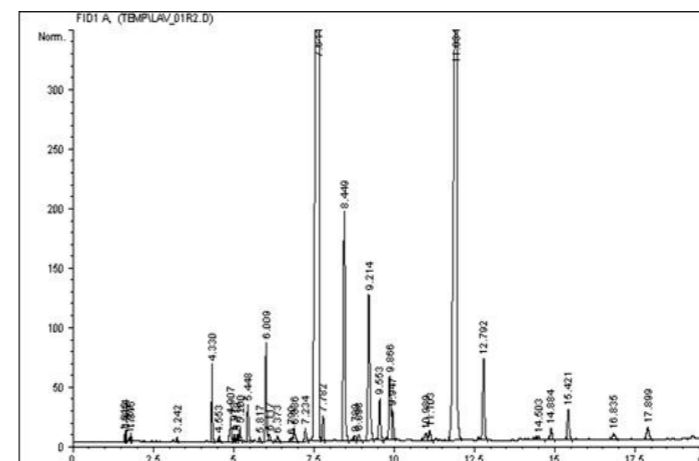


Эффект матрицы (matrix effect)

При использовании методов LC-MS

- минимум 6 серий матрицы, полученной от разных доноров
- объединенная матрица неприменима
- матричный фактор (MF) для каждого аналита и IS
- низкий и высокий уровень концентрации (максимум в 3 раза превышающем LLOQ и близком к ULOQ)

MF для 6 серий матрицы $\leq 15\%$



Правильность (Ассигасу)

Правильность - близость
установленного значения к
номинальной концентрации аналита
(в %)

Оценивается на образцах контроля
качества (QC).

Образцы QC готовят отдельно от
калибровочных стандартов



Критерии приемлемости:

минимум пять повторов стандарта
контроля качества (QC) при четырех
уровнях концентрации находятся в
пределах 15% от номинальных
концентраций для хроматогра-
фических анализов во время
валидации БАМ

- В пределах одного цикла
(внутрисерийная)
- Между циклами (межсерийная)

Правильность (Accuracy)

Внутрисерийная правильность (within-run accuracy)

Минимум по 5 образцов
концентрационного уровня

4 уровня концентраций:

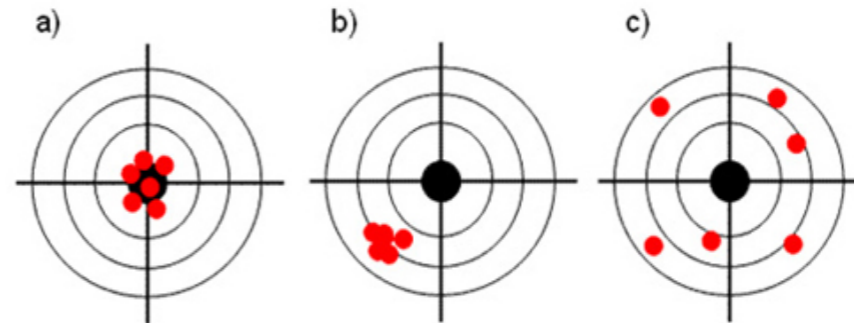
- LLOQ
- 3 LLOQ (низкий QC)
- 50% диапазона КК (средний QC)
- 75% ULOQ (высокий QC)

Требования: 15% для всех QC
20% для LLOQ

Межсерийная правильность (between-run accuracy)

3 серии циклов (3 повтора) в
течение двух разных дней

Требования: 15% для всех QC
20% для LLOQ



Прецизионность (Precision)

Показывает близость значений повторных измерений аналита

Выражается как коэффициент вариации (CV)

4 уровня концентраций:

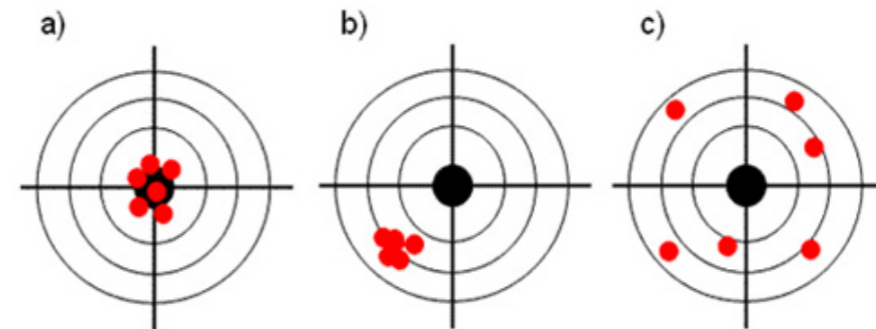
- LLOQ
- LOQ (низкие значения QC)
- MQC (средние значения QC)
- ULOQ (высокие значения QC)

Внутрисерийная
Межсерийная

Требования:

$CV \leq 15\%$ для всех QC

$CV \leq 20\%$ для LLOQ





Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	CV, % (n=5)	δ , %
1	0,896	0,051	5,646	- 10,4
2,5	2,620	0,096	3,676	4,76
10	11,262	0,319	2,830	12,62
20	19,880	0,937	4,715	- 0,61
50	49,75	0,864	3,243	3,41

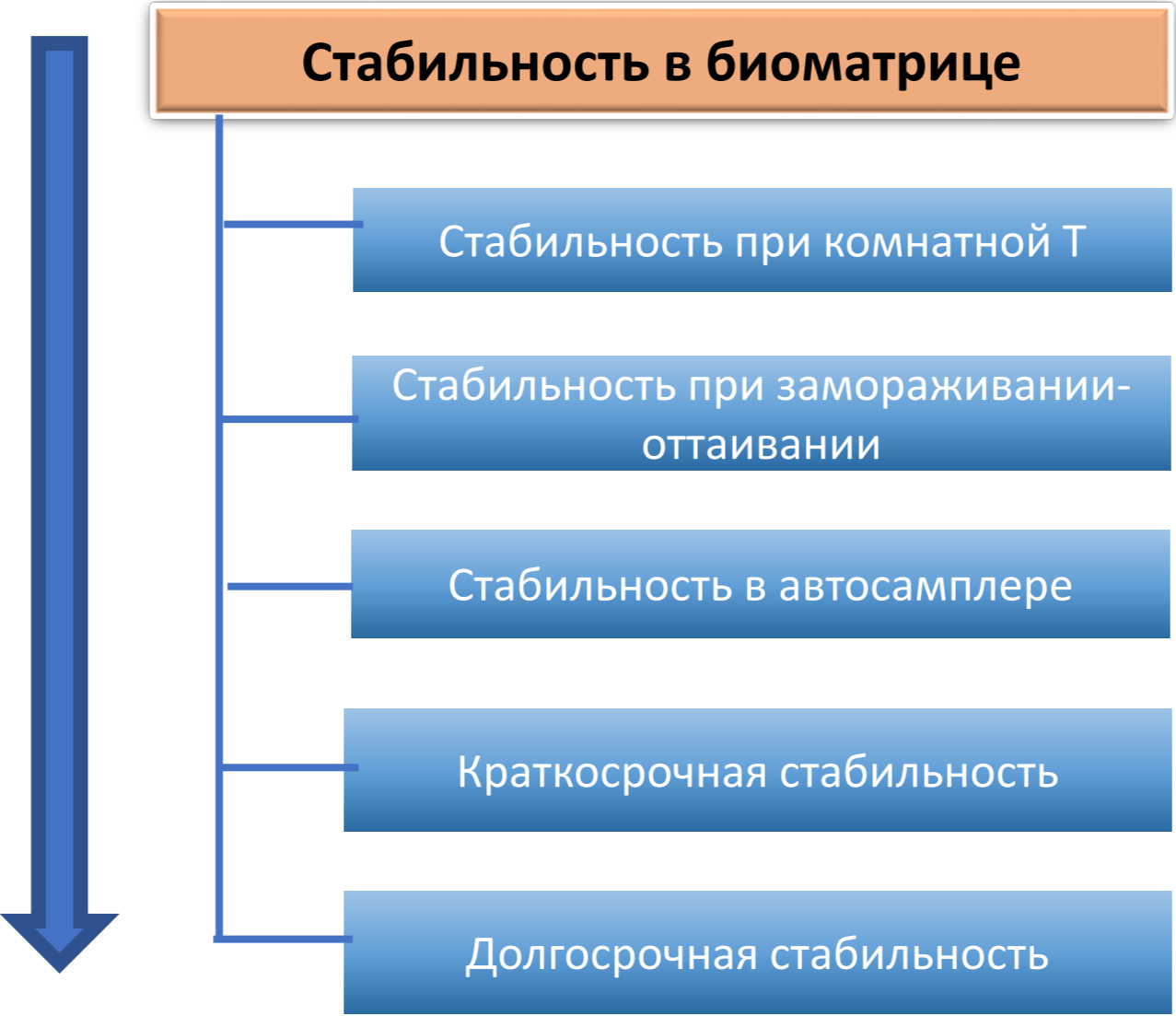
Стабильность

- Стабильность гарантирует, что обработка образца и хранение не влияют на концентрацию анализируемого вещества и, следовательно, результаты анализа в определенной матрице образца.
- Образцы QC анализируются при различных условиях обращения с образцами.
- Значения должны находиться в пределах 15% от номинальной концентрации, чтобы продемонстрировать достаточную стабильность в различных условиях.





Стабильность





Параметр «Разведение»

При превышении концентрации исследуемых образцов ULOQ



Проверка влияния разбавления на правильность и прецизионность (целостность разведения)

В образец пустой матрицы добавляют аналит в концентрации, превышающей ULOQ, а затем разбавляют матрицей до значений, указанных в исследовании, и затем тестируют на правильность и прецизионность

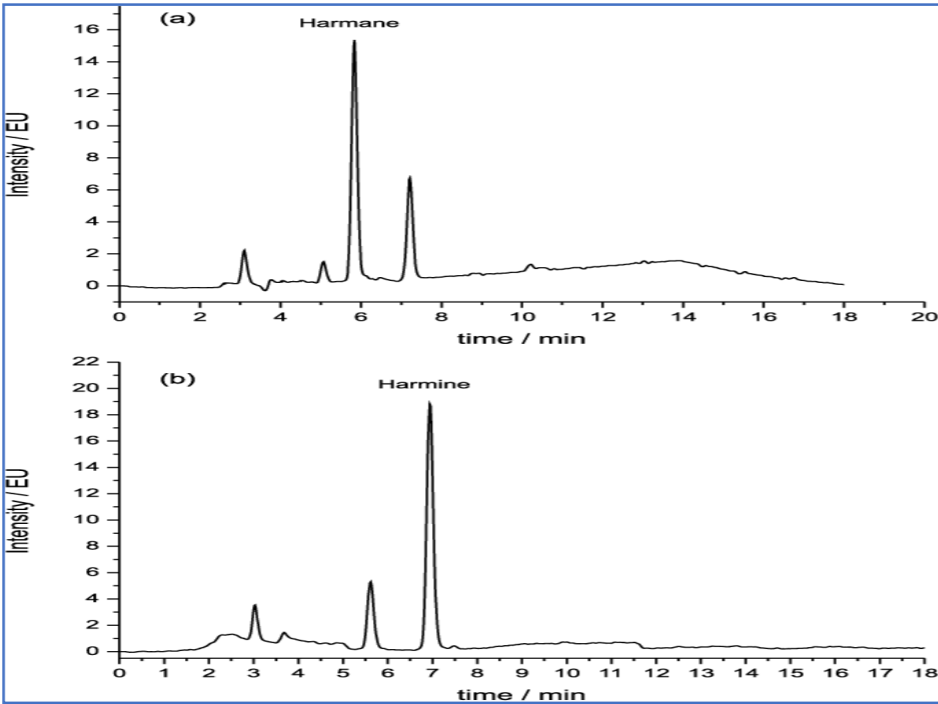


Результаты BMV

- Отчет BMV – содержит **информацию о выполнении исследований по требованиям GLP**
- Результаты представляются по каждому валидационному параметру в текстовом формате с приложениями :
 - таблицы, содержащие результаты анализа всех валидационных образцов с информацией о датах их приготовления и анализа
 - рисунки с калибровочными кривыми
 - Достаточное количество хроматограмм калибровочных стандартов и контрольных образцов, предназначенных для параметров BMV
- После результатов оценки каждого валидационного параметра должен быть представлен **вывод о его соответствии / несоответствии установленным критериям приемлемости**
- В заключении: **Вывод о надежности валидированной методики и возможности ее использования в дальнейших ФК исследованиях, что подтверждается итоговой таблицей.**

Целостность электронных данных

Электронное хранение всего первичного материала на сервере с ограниченным доступом



Документальный след

- Разработка методики
- Биоаналитическая методика
- План валидации
- Протоколы валидации
- Отчет по валидации
(ссылки на SOP)
- Хроматограммы
- Инспекционные проверки



Заключение

- Валидация биоаналитической методики в соответствии с требованиями GLP - обязательный этап в фармакокинетических исследованиях
- Валидация биоаналитической методики это сложный процесс, но который достоверным образом доказывает точность количественных определений ЛВ в биологической матрице, что даст правильную информацию о кинетике ЛП в организме и тем самым обеспечивает безопасность и эффективность ЛП.





Благодарю за внимание!

Алматы, Байтурсынова 40А
Интернет-сайт: www.NDDA.kz

E-mail: V.Shnaukshta@dari.kz

Tel: (+7 727) 233 03 48