

PHỤ LỤC 14. HƯỚNG DẪN ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌC *IN VIVO* THUỐC GENERIC

Thuốc phát minh (thuốc biệt dược gốc) là thuốc được cấp phép lưu hành đầu tiên trên thế giới, trên cơ sở đã có đầy đủ các dữ liệu về chất lượng, an toàn và hiệu quả, bao gồm thuốc đã được cấp phép hoặc chưa được cấp phép lưu hành tại Việt Nam. Thuốc đối chứng là thuốc phát minh hoặc thuốc đã được cấp giấy đăng ký lưu hành với đầy đủ dữ liệu về hiệu quả, an toàn và chất lượng. Thuốc thử là thuốc generic được sử dụng để chứng minh có cùng hiệu quả điều trị (xét cả về hiệu lực và tính an toàn của thuốc) ở cùng một mức liều theo cùng một đường dùng so với thuốc đối chứng thông qua các dữ liệu thử tương đương sinh học (*in vivo*) hoặc thử tương đương độ hòa tan (*in vitro*) so với thuốc đối chứng. Hiện nay, Bộ Y tế đã ban hành thông tư (được cập nhật định kỳ) quy định các thuốc generic phải thử tương đương sinh học khi nộp hồ sơ đăng ký sản xuất, lưu hành.

Trong nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học (TĐSH) *in vivo*, khái niệm sinh khả dụng được định nghĩa là tốc độ và mức độ hấp thu được chất từ chế phẩm thuốc vào hệ tuần hoàn chung. Các đại lượng được sử dụng để biểu thị tốc độ và mức độ hấp thu được chất vào hệ tuần hoàn chung trong nghiên cứu TĐSH bao gồm: C_{max} (nồng độ đỉnh); t_{max} (thời gian đạt đến nồng độ đỉnh) và AUC (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian). Hai thuốc được coi là TĐSH nếu sinh khả dụng của chúng nằm trong giới hạn cho phép khi dùng cùng mức liều trong cùng điều kiện thử nghiệm.

Hướng dẫn này đưa ra một số nguyên tắc cơ bản trong đánh giá TĐSH để thu được kết quả tin cậy.

I. Quy định chung về phương pháp phân tích xác định nồng độ thuốc trong dịch sinh học

Các phương pháp sắc ký sử dụng các detector khác nhau như quang phổ tử ngoại - khả kiến, huỳnh quang, khối phổ, ... thường được sử dụng trong nghiên cứu đánh giá TĐSH để xác định nồng độ thuốc (dược chất hoặc chất chuyển hóa - chất cần phân tích) trong dịch sinh học (thường là mẫu huyết tương, máu, huyết thanh hay nước tiểu) của người tình nguyện (NTN) tham gia nghiên cứu. Những phương pháp này có tính đặc hiệu cao; có khả năng tách và định lượng trên cùng một hệ thống và cùng thời điểm. Trong một số trường hợp, có thể sử dụng phương pháp phân tích sinh hóa và sinh học nếu phương pháp có đủ độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu để xác định được nồng độ thuốc trong các mẫu sinh học.

Xác định nồng độ thuốc trong dịch sinh học cần thực hiện theo nguyên tắc thực hành tốt phòng thí nghiệm và theo quy định của các hướng dẫn hiện hành về phân tích thuốc trong dịch sinh học. Do quá trình phân tích mẫu sinh học bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như lượng mẫu ít, nồng độ thấp, lẫn nhiều tạp chất (lipid, protein, chất nội sinh, chất chuyển hóa...) và sự khác nhau giữa các cá thể, nên phương pháp phân tích phải được xây dựng và thẩm định để đảm bảo độ tin cậy trước khi tiến hành phân tích mẫu người tình nguyện.

1. Thẩm định phương pháp phân tích

1.1. Thẩm định đầy đủ

1.1.1. Độ đặc hiệu chọn lọc

Độ đặc hiệu là khả năng của phương pháp phân tích trong việc phát hiện và phân biệt chất phân tích với các chất khác, bao gồm cả các chất liên quan như các chất có cấu trúc tương tự chất phân tích, chất chuyển hóa, chất đồng phân, tạp chất, sản phẩm phân hủy hình thành trong quá trình xử lý mẫu hoặc các thuốc dự kiến sẽ được sử dụng đồng thời để điều trị cho bệnh nhân.

Độ chọn lọc là khả năng của phương pháp phân tích có thể xác định (định tính - định lượng) chất cần phân tích, không bị nhầm lẫn với các thành phần khác có trong mẫu. Độ chọn lọc phải được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu blank (là mẫu dịch sinh học trắng không chứa chất phân tích và chuẩn nội) thu được từ ít nhất 6 nguồn/lô riêng lẻ (không tan huyết và không có mỡ máu). Việc sử dụng ít nguồn hơn có thể được chấp nhận trong trường hợp nền mẫu hiếm. Tính chọn lọc đối với chuẩn nội cũng cần được đánh giá. Đối với nền mẫu có mỡ máu và nền mẫu tan huyết, nên sử dụng ít nhất một

nguồn nền mẫu và nền mẫu sử dụng phải mang tính đại diện nhiều nhất có thể cho các mẫu nghiên cứu dự kiến.

Đối với chỉ tiêu này, đáp ứng pic của mẫu trắng và mẫu zero không lớn hơn 20% (tại vị trí của chất phân tích) và không lớn hơn 5 % (tại vị trí của chuẩn nội) so với đáp ứng của mẫu giới hạn định lượng dưới (LLOQ).

1.1.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa đáp ứng/ tỷ lệ đáp ứng của pic (diện tích hay chiều cao) với nồng độ của chất phân tích phải được đánh giá bằng phương trình toán học phù hợp. Phương trình này phải được xác định bằng phương pháp phân tích hồi quy phù hợp (như phương pháp bình phương nhỏ nhất). Khoảng tuyến tính là khoảng từ nồng độ thấp nhất của đường chuẩn (LLOQ) đến nồng độ cao nhất của đường chuẩn (ULOQ) có mối quan hệ tuyến tính. Trong khoảng này, phép phân tích phải thỏa mãn các yêu cầu về độ đúng và độ chính xác theo quy định.

Đường chuẩn phải bao gồm mẫu blank và zero (là mẫu dịch sinh học trắng không có chất phân tích nhưng có chuẩn nội) và có ít nhất 6 nồng độ của chất phân tích pha trong cùng một mẫu dịch sinh học. Đường chuẩn hay khoảng tuyến tính phải bao gồm toàn bộ khoảng nồng độ của các mẫu cần phân tích. Không xác định nồng độ chất cần phân tích có trong mẫu thử bằng phương pháp ngoại suy.

Đường chuẩn hay khoảng tuyến tính thực hiện trên ít nhất 3 lô, trong nhiều ngày, độ đúng tại các nồng độ phải từ 85% - 115%, trừ tại điểm LLOQ được chấp nhận 80% - 120%. Có ít nhất 75% và tối thiểu 6 điểm chuẩn trong dãy chuẩn đạt được tiêu chuẩn trên.

1.1.3. Độ đúng và độ chính xác

Độ đúng là giá trị phản ánh độ sát gần của kết quả phân tích với giá trị thực của mẫu đã biết. Độ đúng của mỗi mức nồng độ phải nằm trong khoảng 85 % - 115 % nồng độ thực đã pha, riêng tại nồng độ LLOQ chấp nhận khoảng 80 % - 120 %.

Độ chính xác có thể được biểu thị bằng hệ số biến thiên (% CV) trong ngày và giữa các ngày, được xác định trên mẫu chuẩn kiểm tra. Nói chung, % CV không nên vượt quá 15 %, riêng tại nồng độ giới hạn định lượng dưới cho phép không vượt quá 20 %.

Độ đúng và độ chính xác được đánh giá ở ít nhất 4 mức nồng độ trong khoảng đường chuẩn: nồng độ giới hạn định lượng dưới (LLOQ), 1 nồng độ gấp khoảng 3 lần nồng độ thấp nhất của đường chuẩn (LQC); 1 nồng độ khoảng 30 % - 50 % nồng độ cao nhất của đường chuẩn (MQC) và 1 nồng độ khoảng ít nhất 75 % nồng độ cao nhất của đường chuẩn (HQC). Mỗi mức nồng độ phải được xác định trên ít nhất 5 mẫu. Độ đúng và độ chính xác phải được thực hiện trên ít nhất 3 lô phân tích trong ít nhất 2 ngày.

1.1.4. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Giới hạn định lượng dưới là nồng độ thấp nhất của đường chuẩn có thể xác định được với độ đúng và độ chính xác cho phép. Giới hạn định lượng dưới ít nhất phải thỏa mãn khả năng phân tích nồng độ của mẫu thử lấy ở thời điểm bằng 3 - 5 lần thời gian bán thải hoặc nhỏ hơn 1/20 giá trị C_{max} của chất phân tích.

1.1.5. Tỷ lệ thu hồi

Tỷ lệ thu hồi là tỷ lệ chất phân tích thu được sau khi mẫu được chiết tách theo quy trình đã chọn so với mẫu có cùng nồng độ không được xử lý qua chiết tách, được pha trong nền mẫu đã được chiết. Tỷ lệ thu hồi thường được đánh giá ở 3 mức nồng độ: LQC, MQC và HQC. Tỷ lệ thu hồi của chất phân tích không cần phải đạt 100 % nhưng tỷ lệ thu hồi của chất phân tích và chuẩn nội (nếu được sử dụng) giữa các mức nồng độ cần phải nhất quán.

1.1.6. Độ nhiễm chéo

Độ nhiễm chéo là sự thay đổi của nồng độ mẫu đo được vì lượng chất phân tích của mẫu trước còn bị giữ lại trong thiết bị phân tích. Nhiễm chéo cần phải được đánh giá và giảm thiểu trong quá trình xây dựng phương pháp. Trong quá trình thẩm định phương pháp, độ nhiễm chéo được đánh giá bằng việc mẫu blank được tiêm ngay sau mẫu ULOQ, đáp ứng pic của mẫu trắng không lớn hơn 20% (tại vị trí

của chất phân tích) và không lớn hơn 5% (tại vị trí của chuẩn nội) so với đáp ứng của mẫu LLOQ. Nếu xảy ra nhiễm chéo thì mẫu nghiên cứu không nên tiêm ngẫu nhiên. Phương pháp phân tích cần phải được xây dựng, thẩm định và áp dụng trong phân tích mẫu để nhiễm chéo không ảnh hưởng đến độ đúng và độ chính xác của kết quả.

1.1.7. Độ pha loãng

Độ pha loãng là việc đánh giá quy trình pha loãng mẫu để xác nhận rằng quy trình này không ảnh hưởng đến nồng độ đo được của chất phân tích. Thông số này được đánh giá bằng cách pha loãng mẫu có nồng độ chất phân tích lớn hơn ULOQ với nền mẫu (hoặc nền mẫu thay thế nếu nền mẫu hiếm). Hệ số pha loãng và nồng độ được áp dụng trong quá trình phân tích mẫu nghiên cứu phải nằm trong phạm vi được đánh giá trong quá trình thẩm định.

Với mỗi hệ số pha loãng thực hiện trên ít nhất 5 mẫu, độ đúng thu được nằm trong khoảng $\pm 15\%$ của nồng độ thực đã pha và độ chính xác không vượt quá 15%.

1.1.8. Ảnh hưởng nền mẫu

Ảnh hưởng nền mẫu là do ảnh hưởng của tất cả các thành phần khác ngoài chất phân tích có trong mẫu. Đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu nên thực hiện lặp lại trên ít nhất 3 mẫu tại các nồng độ LQC và HQC từ ít nhất 6 nguồn nền mẫu khác nhau. Việc sử dụng ít nguồn hơn có thể được chấp nhận trong trường hợp nền mẫu hiếm.

Đối với từng nền mẫu, độ đúng thu được nằm trong khoảng $\pm 15\%$ của nồng độ thực đã pha và độ chính xác không vượt quá 15%.

1.1.9. Độ ổn định

Độ ổn định được đánh giá để đảm bảo rằng các bước trong quá trình chuẩn bị mẫu, xử lý mẫu và phân tích mẫu và các điều kiện bảo quản được sử dụng không làm ảnh hưởng đến nồng độ của chất phân tích.

Việc đánh giá phải thực hiện ít nhất trên hai mức nồng độ là LQC và HQC. Độ đúng trung bình tại mỗi mức nồng độ nằm trong khoảng 15% của nồng độ thực đã pha.

Đối với thuốc phối hợp cố định liều và các thuốc cần được sử dụng phối hợp trong phác đồ điều trị: các chỉ tiêu độ ổn định đồng rã, độ ổn định của mẫu sinh học ngắn hạn và dài hạn nên được đánh giá với tất cả thành phần có trong thuốc.

Một số ví dụ về chỉ tiêu độ ổn định nên được nghiên cứu như sau:

- Độ ổn định dung dịch chuẩn gốc và chuẩn làm việc (bao gồm cả chất phân tích và chuẩn nội).
- Độ ổn định đông - rã đông của mẫu dịch sinh học.
- Độ ổn định của mẫu dịch sinh học (ngắn hạn và dài hạn).
- Độ ổn định mẫu trong autosampler.
- Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu.
- Độ ổn định sau quá trình xử lý mẫu.
- Độ ổn định chất phân tích trong máu toàn phần (nếu có thể).

1.1.10. Độ lặp lại khi tiêm mẫu

Độ lặp lại khi tiêm mẫu được đánh giá bằng cách tiêm lại lô phân tích bao gồm các mẫu đường chuẩn và ít nhất 5 mẫu tại các nồng độ QC (LQC, MQC, HQC) sau khi bảo quản. Độ chính xác và độ chính xác của các mẫu QC tiêm lại sẽ xác định liệu các mẫu có thể được tiêm lại hay không.

1.2. Thẩm định một phần

Thẩm định một phần được thực hiện khi có những thay đổi so với phương pháp đã được thẩm định đầy đủ trước đó. Thẩm định một phần có thể thực hiện một vài chỉ tiêu nhỏ hoặc có thể thực hiện nhiều chỉ tiêu gần như thẩm định đầy đủ. Nếu chỉ tiêu độ ổn định của mẫu đã được đánh giá rồi thì không cần thiết thực hiện lại chỉ tiêu này ở một địa điểm nghiên cứu khác.

Đối với phương pháp sắc ký, những thay đổi sau cần thực hiện thẩm định một phần, nhưng không giới hạn nội dung thay đổi:

- Thay đổi địa điểm phân tích khi sử dụng cùng một phương pháp phân tích (ví dụ như chuyển giao

phương pháp phân tích giữa các phòng thí nghiệm).

- Thay đổi phương pháp phân tích (ví dụ như thay đổi detector, nền mẫu, ...).
- Thay đổi quy trình xử lý mẫu.
- Thay đổi thể tích mẫu.
- Thay đổi khoảng tuyến tính.
- Thay đổi chất chống đông trong dịch sinh học (nhưng không thay đổi ion phản ứng) (ví dụ, heparin thành acid ethylenediaminetetraacetic (EDTA)).
- Thay đổi bản chất nền mẫu sinh học (ví dụ từ huyết tương sang huyết thanh hoặc dịch não tủy; hoặc thay đổi về loài trong nền mẫu: ví dụ chuyển từ huyết tương chuột cống sang huyết tương chuột nhắt).
- Thay đổi điều kiện bảo quản.

1.3. Thẩm định chéo

Thẩm định chéo được yêu cầu trong các trường hợp sau:

- Dữ liệu thu được từ những phương pháp phân tích khác nhau trong cùng một nghiên cứu.
- Dữ liệu thu được trong một nghiên cứu từ các phòng thí nghiệm khác nhau với cùng một phương pháp phân tích.
- Dữ liệu thu được từ các phương pháp phân tích khác nhau của các nghiên cứu mà dự kiến kết hợp dùng cho một chế độ liều đặc biệt hoặc quyết định của cơ quan quản lý liên quan đến an toàn, hiệu quả và nhãn thuốc.

2. Phân tích mẫu người tình nguyện (NTN)

2.1. Lô phân tích

Một lô phân tích (analytical run) bao gồm mẫu blank; mẫu zero; các mẫu của đường chuẩn (ít nhất là 06 mẫu chuẩn) và các mẫu QC ở ít nhất 03 mức nồng độ (LQC, MQC, HQC), mỗi nồng độ 2 mẫu hoặc ít nhất bằng 5 % tổng số lượng mẫu nghiên cứu tùy theo số lượng nào lớn hơn và các mẫu NTN. Trong một lô phân tích, các mẫu QC phải được xen kẽ với các mẫu NTN để đảm bảo độ đúng, độ chính xác của toàn bộ quá trình phân tích và phải luôn được bắt đầu và kết thúc bằng mẫu QC.

Mẫu đường chuẩn và mẫu QC nên được chuẩn bị từ những dung dịch gốc độc lập. Tất cả các mẫu trong một lô phân tích (mẫu đường chuẩn, mẫu QC và mẫu NTN) phải được xử lý và chiết tách như là một batch theo trình tự dự định phân tích. Một batch phân tích bao gồm các mẫu QC và mẫu NTN và có thể có mẫu blank, zero và mẫu đường chuẩn, trong đó các mẫu được xử lý trong cùng một khoảng thời gian xác định và được thực hiện bởi cùng một nhóm cán bộ phân tích với cùng điều kiện phân tích và cùng dung môi, hóa chất.

Trong 1 lô phân tích không khuyến khích xử lý chia thành nhiều batch riêng lẻ, nếu vì lý do liên quan đến độ ổn định ngắn hạn cần chia thành nhiều batch, thì mỗi batch phải bao gồm các mẫu QC (LQC, MQC, HQC).

Đối với nghiên cứu so sánh sinh khả dụng/TĐSH, tất cả các mẫu của một NTN cần được phân tích trong 1 lô để giảm thiểu sự dao động.

2.2. Tiêu chuẩn chấp nhận lô phân tích

Tiêu chuẩn chấp nhận lô phân tích nên được quy định sẵn trong các quy trình thao tác chuẩn (SOP) và được tham khảo trong các hướng dẫn hiện hành của các cơ quan quản lý. Trường hợp lô phân tích có chứa nhiều batch, tiêu chuẩn chấp nhận áp dụng cho cả lô phân tích và cho từng batch riêng lẻ. Có thể chấp nhận lô phân tích nếu có batch trong lô không đạt yêu cầu.

Độ đúng của các mẫu chuẩn của đường chuẩn phải nằm trong khoảng 85 % - 115 %, riêng tại điểm LLOQ phải đạt từ 80 % - 120 % so với nồng độ lý thuyết. Có ít nhất 75 % số điểm của đường chuẩn và ít nhất 6 điểm phải đạt yêu cầu trên. Trường hợp có 1 điểm chuẩn nào đó trong đường chuẩn không đạt yêu cầu trên, điểm chuẩn này sẽ được loại bỏ khỏi đường chuẩn và đường chuẩn sau khi bỏ điểm sẽ được đánh giá lại bao gồm cả phân tích hồi quy.

Nếu loại bỏ điểm chuẩn là LLOQ của đường chuẩn, khi đó điểm chuẩn gần nhất đạt yêu cầu được xác định là giá trị LLOQ của lô phân tích, điểm thấp nhất này vẫn phải đáp ứng yêu cầu có độ đúng nằm trong khoảng $\pm 15\%$. Trường hợp loại bỏ điểm chuẩn là ULOQ của đường chuẩn, khi đó điểm chuẩn gần nhất đạt yêu cầu được xác định là giá trị ULOQ của lô phân tích. Đường chuẩn sau khi loại bỏ điểm chuẩn phải có khoảng nồng độ bao trùm tất cả các nồng độ mẫu QC (LQC, MQC, HQC).

Độ đúng của các mẫu QC phải đạt từ $85\% - 115\%$ so với nồng độ lý thuyết. Có ít nhất 67% tổng số mẫu QC phải đạt yêu cầu và ở mỗi mức nồng độ phải có ít nhất 50% số mẫu QC đạt yêu cầu.

2.3. Khoảng tuyến tính

Trước khi phân tích mẫu NTN, nếu biết hoặc dự đoán được phạm vi hẹp về nồng độ của các mẫu NTN, thì nên thu hẹp phạm vi đường chuẩn, điều chỉnh nồng độ mẫu QC hoặc thêm mẫu QC ở nồng độ phù hợp. Nếu không dự đoán trước được phạm vi hẹp về nồng độ của các mẫu NTN nhưng quan sát thấy sau khi bắt đầu phân tích mẫu thì nên dừng phân tích, thu hẹp khoảng đường chuẩn hoặc điều chỉnh nồng độ QC hoặc thêm mẫu QC ở nồng độ phù hợp. Không cần thiết phải phân tích lại các mẫu đã được phân tích trước khi tối ưu hóa khoảng đường chuẩn hoặc nồng độ QC. Nếu nồng độ một số mẫu NTN cao hơn ULOQ, khoảng đường chuẩn nên được mở rộng và thêm mẫu QC hoặc điều chỉnh nồng độ mẫu NTN (có thể pha loãng mẫu đến nồng độ phù hợp nằm trong khoảng đường chuẩn). Đảm bảo có ít nhất 2 nồng độ mẫu QC phải nằm trong khoảng nồng độ của NTN. Nếu khoảng đường chuẩn bị thay đổi, phương pháp phân tích phải được thẩm định lại (thẩm định một phần) để đảm bảo độ đúng và chính xác của phương pháp phân tích.

2.4. Phân tích lại mẫu người tình nguyện

Trình bày lý do phân tích lại, số lượng mẫu phân tích lại và tiêu chuẩn chấp nhận kết quả phân tích lại trong đề cương nghiên cứu hoặc các SOP trước khi bắt đầu phân tích mẫu NTN. Số lượng mẫu phân tích lại và kết quả phân tích lại được cung cấp trong báo cáo phân tích. Đối với các mẫu có nhiều chất phân tích được phân tích đồng thời, kết quả chấp nhận được áp dụng cho từng chất phân tích riêng biệt.

Một vài ví dụ về lý do phân tích lại mẫu NTN như sau:

- Lô phân tích không đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn chấp nhận lô phân tích.
- Dao động đáp ứng của chuẩn nội.
- Nồng độ mẫu lớn hơn ULOQ.
- Mẫu có nồng độ dưới LLOQ trong một lô phân tích có điểm thấp nhất của đường chuẩn được loại bỏ.
- Lỗi do thiết bị.
- Sai sót trong quá trình xử lý và tiêm mẫu.
- Nồng độ mẫu sau pha loãng nhỏ hơn giới hạn định lượng dưới.
- Phát hiện đáp ứng tại vị trí thời gian lưu của chất phân tích trong các mẫu 0 giờ, mẫu blank, mẫu zero.
- Sắc ký đồ xấu.

Đối với nghiên cứu TĐSH hoặc nghiên cứu sinh khả dụng, phân tích lại vì lý do được động học không được chấp nhận.

2.5. Tiêm lại mẫu người tình nguyện

Có thể tiêm lại các mẫu đã xử lý trong trường hợp gặp sự cố nếu mẫu đã được nghiên cứu độ ổn định sau xử lý. Việc tiêm lại toàn bộ lô phân tích hoặc tiêm lại riêng lẻ đường chuẩn hoặc QC vì đường chuẩn hoặc QC không đạt, mà không xác định được nguyên nhân phân tích, là không được chấp nhận.

2.6. Phân tích lại mẫu để kiểm tra phương pháp (ISR)

Phân tích mẫu ISR: thực hiện sau khi kết thúc toàn bộ quá trình phân tích trên mẫu NTN để kiểm tra độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp phân tích. Tiến hành lựa chọn một số mẫu của NTN để thực hiện phân tích lại theo quy trình phân tích đã ban hành.

Số lượng mẫu lựa chọn phân tích ISR bằng 10 % nếu tổng số mẫu đã phân tích ít hơn 1000. Nếu tổng số mẫu đã phân tích lớn hơn 1000, số lượng mẫu phân tích ISR bằng 10 % của 1000 mẫu đầu tiên cộng thêm 5 % số lượng các mẫu còn lại. Nên chọn mẫu một cách độc lập, ngẫu nhiên, lựa chọn các mẫu xung quanh $C_{\max}$ và ở pha thải trừ, mẫu của các NTN khác nhau, của các ngày phân tích khác nhau.

Phương pháp có độ lặp lại tốt nếu ít nhất 2/3 tổng số mẫu được phân tích kiểm tra có % lệch nằm trong khoảng ± 20 %.

Công thức tính % lệch như sau:

$$\% \text{ lệch} = \frac{\text{Kết quả phân tích ISR} - \text{Kết quả ban đầu}}{\text{Kết quả trung bình}} \times 100$$

II. Quy định chung đối với một nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học

Theo quy định, tất cả các nghiên cứu TĐSH đều phải xây dựng đề cương nghiên cứu. Đề cương nghiên cứu trình bày rõ mô hình hoặc thiết kế nghiên cứu; phương pháp, nội dung nghiên cứu; phương pháp thống kê, đánh giá kết quả nghiên cứu... Đề cương nghiên cứu đều phải được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học phê duyệt chấp thuận trước khi tiến hành triển khai nghiên cứu.

Quy định chung đối với các nghiên cứu TĐSH như sau:

1. Lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu

1.1. Tiêu chuẩn

Trong nghiên cứu TĐSH, đa số trường hợp thường chọn đối tượng tham gia nghiên cứu là NTN khỏe mạnh, một số trường hợp đặc biệt thực hiện trên bệnh nhân vì lý do an toàn hoặc dung nạp. Với thuốc dùng cho trẻ em, vẫn nên chọn người lớn để thử nghiệm. Một số tiêu chuẩn cụ thể của đối tượng tham gia nghiên cứu như sau:

- Giới tính: Nếu thuốc dự kiến sử dụng cho cả hai giới thì đối tượng tham gia nghiên cứu là cả hai giới. Nếu thuốc dự kiến chỉ dùng cho một giới thì đối tượng tham gia nghiên cứu chỉ chọn giới tính đó; tuy nhiên, cần cân nhắc nguy cơ đối với phụ nữ có khả năng mang thai.
- Tuổi: Thông thường từ 18 tuổi - 55 tuổi.
- Chỉ số khối lượng cơ thể (*Body mass index - BMI*): Được tính bằng thương số giữa cân nặng cơ thể (đơn vị tính kg) và bình phương chiều cao cơ thể (đơn vị tính m^2) của đối tượng tham gia nghiên cứu và thông thường nằm trong giới hạn trung bình từ 18,0 - 30,0 kg/m^2 (giới hạn BMI có thể thay đổi tùy theo từng hướng dẫn và tùy theo từng nghiên cứu cụ thể).
- Không có tiền sử về dị ứng.
- Chấp thuận tự nguyện ký vào bản cam kết tự nguyện tham gia nghiên cứu.
- Đối tượng tham gia nghiên cứu được lựa chọn theo tiêu chuẩn chấp nhận/loại trừ đã được ghi rõ trong đề cương. Cần sàng lọc đối tượng tham gia bằng đánh giá các xét nghiệm cận lâm sàng, tiền sử bệnh và kiểm tra thể trạng. Tùy thuộc vào nhóm điều trị và dữ liệu an toàn của thuốc, cần kiểm tra sức khỏe riêng và thực hiện các lưu ý phòng ngừa trước, trong và sau khi hoàn thành nghiên cứu. Ưu tiên người không hút thuốc lá và không có tiền sử nghiện rượu hoặc ma túy. Kiểu hình và/hoặc kiểu gen của các đối tượng cũng có thể được cân nhắc vì các lý do liên quan đến độ an toàn hoặc dược động học. Nếu đối tượng là phụ nữ thì phải tiến hành làm các xét nghiệm và đảm bảo không mang thai trong quá trình tham gia nghiên cứu.

1.2. Số lượng người tình nguyện

Số lượng NTN phải đủ theo các yêu cầu, quy định liên quan của Cơ quan quản lý và được tính theo nguyên tắc dùng với số lượng nhỏ nhất có thể được để đảm bảo yếu tố đạo đức trong các nghiên cứu y sinh học nhưng vẫn đảm bảo yêu cầu, mức độ tin cậy thống kê của phép thử.

Xác định số lượng NTN tham gia nghiên cứu dựa trên tính toán cỡ mẫu thích hợp. Số lượng NTN không được ít hơn 12 người và phải đảm bảo phòng ngừa trường hợp NTN có thể rút lui khỏi nghiên cứu.

Đối với nghiên cứu chéo, số lượng NTN tham gia nghiên cứu được tính trên các dữ liệu:

- Hệ số biến thiên nội cá thể được ước tính từ một nghiên cứu thăm dò hoặc từ kết quả của các nghiên cứu trước đó hoặc từ các tài liệu đã được công bố;
- Mức ý nghĩa mong muốn (5 %);
- Giá trị power mong muốn (tối thiểu là 80 %);
- Sai lệch dự kiến của tỷ số giữa thuốc thử và thuốc đối chứng (delta trong khoảng từ 5 % - 10 %);
- Khoảng tin cậy 90 % tỷ lệ trung bình hình học phải nằm trong giới hạn TĐSH yêu cầu, thông thường là 80,00 % - 125,00 %, đối với dữ liệu được chuyển đổi logarit.

Trong một số trường hợp, thông tin tham khảo của hệ số biến thiên không có sẵn, chưa đủ độ đáng tin cậy nên có thể sử dụng thiết kế nghiên cứu two-stage thay thế cho việc tiến hành nghiên cứu pilot.

2. Thuốc nghiên cứu

2.1. Thuốc đối chứng

Thuốc đối chứng dùng trong nghiên cứu TĐSH phải là sản phẩm đã được cấp phép sản xuất, lưu hành dựa trên các số liệu đã có về an toàn, hiệu quả điều trị của sản phẩm. Thuốc đối chứng được lựa chọn phải đạt tiêu chuẩn chất lượng và phải có nguồn gốc, xuất xứ rõ ràng. Nên lựa chọn thuốc đối chứng có dạng bào chế phù hợp với dạng bào chế của thuốc thử và ưu tiên lựa chọn thuốc có giấy đăng ký lưu hành còn hiệu lực do Bộ Y tế Việt Nam cấp. Nếu không có khuyến cáo cụ thể, hàm lượng được chất so với hàm lượng ghi trên nhãn của lô thuốc thử được lựa chọn thử tương đương sinh học phải sai khác không quá 5 % so với lô thuốc đối chứng trong nghiên cứu TĐSH. Quy định cụ thể lựa chọn thuốc đối chứng dùng trong nghiên cứu TĐSH áp dụng theo hướng dẫn của cơ quan quản lý.

2.2. Thuốc thử

Thuốc thử trong nghiên cứu TĐSH phải được nghiên cứu, sản xuất theo tiêu chuẩn thực hành tốt sản xuất thuốc và các quy định liên quan của Cơ quan quản lý. Thuốc thử dùng trong nghiên cứu cần đại diện cho sản phẩm dự kiến lưu hành trên thị trường và cơ sở đăng ký cần giải thích và bàn luận về vấn đề này. Chỉ sử dụng lô thuốc thử được sản xuất với cỡ lô đủ lớn, có đầy đủ hồ sơ sản phẩm và đạt các yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn đồng thời có. Quy định về cỡ lô sản xuất của thuốc thử ở quy mô thử nghiệm được quy định bởi các hướng dẫn cụ thể của Cơ quan quản lý.

Ví dụ, đối với dạng thuốc rắn dùng đường uống có tác dụng toàn thân:

- Thuốc thử được chọn từ một lô có cỡ lô tối thiểu bằng 1/10 cỡ lô sản xuất hoặc 100 000 đơn vị (tùy thuộc số lượng nào lớn hơn), trừ trường hợp có lý do hợp lý. Trường hợp cỡ lô sản xuất theo quy trình nhỏ hơn 100 000 đơn vị, mẫu thuốc dùng cho nghiên cứu cần được sản xuất theo đúng cỡ lô đăng ký.
- Khi sản xuất các lô thuốc sử dụng trong nghiên cứu, cần đảm bảo chắc chắn rằng sản phẩm và quy trình sẽ có khả năng áp dụng trên quy mô công nghiệp.

3. Thiết kế nghiên cứu

Các nghiên cứu TĐSH nên được tiến hành trong các điều kiện tiêu chuẩn hóa nhằm hạn chế tối đa sự khác biệt về tất cả các yếu tố liên quan để phát hiện tốt hơn sự khác nhau về dược động học giữa thuốc thử và thuốc đối chứng.

Kiểu nghiên cứu phổ biến nhất trong nghiên cứu TĐSH, so sánh sinh khả dụng giữa một thuốc thử và một thuốc đối chứng là nghiên cứu đơn liều, chéo 2 x 2 x 2 (2 thuốc, 2 giai đoạn, 2 trình tự thử thuốc). Để hạn chế ảnh hưởng của sự khác biệt giữa các cá thể và giai đoạn thử nghiệm, các đối tượng nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm. Một nhóm sẽ được sử dụng thuốc thử trước và thuốc đối chứng sau; ngược lại, nhóm kia sử dụng thuốc đối chứng trước và thuốc thử sau. Giữa 2 giai đoạn thử, cần có một khoảng thời gian đủ dài để đảm bảo cho thuốc sử dụng ở giai đoạn trước loại hết ra

khởi cơ thể (ít nhất khoảng 5 lần thời gian bán thải của thuốc).

Đối với các thuốc có thời gian bán thải kéo dài (> 24 h), có thể áp dụng thiết kế nghiên cứu chéo đơn liều hoặc thiết kế nghiên cứu song song. Trong nghiên cứu song song, đối tượng tham gia thử nghiệm được chia thành 2 nhóm, một nhóm uống thuốc thử và nhóm còn lại uống thuốc đối chứng. Đối với nghiên cứu chéo hoặc song song, thời gian lấy mẫu phải đủ dài để đảm bảo hoàn thành quá trình vận chuyển thuốc qua đường tiêu hóa và hấp thu dược chất (thường xảy ra trong khoảng 2 - 3 ngày).

Ngoài các mô hình nghiên cứu kể trên, trong một số trường hợp có thể áp dụng các mô hình nghiên cứu khác như: nghiên cứu đa liều; nghiên cứu lặp lại.

Đối với các dạng thuốc đặc biệt khác, thiết kế và thực hiện theo hướng dẫn cụ thể của cơ quan quản lý hoặc các hướng dẫn tham chiếu của các tổ chức khác về thử TĐSH.

NTN phải kiêng thực phẩm và đồ uống có thể tương tác với chức năng tuần hoàn, tiêu hóa, gan hoặc thận (ví dụ: đồ uống có cồn hoặc một số loại nước ép trái cây) trong khoảng thời gian thích hợp trước (chẳng hạn 24 h) và trong thời gian nghiên cứu.

NTN không dùng đồng thời bất kỳ loại thuốc nào khác (bao gồm cả thuốc thảo dược) trong một khoảng thời gian thích hợp trước cũng như trong quá trình nghiên cứu. Trong trường hợp không thể tránh khỏi việc dùng thuốc đồng thời, ví dụ như để điều trị các tác dụng phụ như đau đầu, thì việc sử dụng phải được báo cáo (liều lượng và thời gian dùng thuốc) và phải đánh giá các ảnh hưởng có thể có đối với kết quả nghiên cứu.

3.1. Tình trạng đói hoặc no

Thông thường, nghiên cứu TĐSH cần được thực hiện trong tình trạng đói vì đây được xem là điều kiện tốt nhất để phát hiện sự khác biệt giữa các công thức bào chế. Do đó, đối với các thuốc mà tóm tắt đặc tính sản phẩm của thuốc đối chứng khuyến cáo sử dụng thuốc vào lúc đói hoặc không phụ thuộc bữa ăn, cần nghiên cứu TĐSH trong tình trạng đói. Đối với các thuốc mà tóm tắt đặc tính sản phẩm của thuốc đối chứng khuyến cáo chỉ sử dụng thuốc trong tình trạng no, nghiên cứu TĐSH thường được tiến hành trong tình trạng no.

Đối với thuốc dạng bào chế giải phóng dược chất biến đổi hoặc dạng bào chế đặc biệt (ví dụ: vi nhũ tương, hệ phân tán rắn) cần thực hiện nghiên cứu TĐSH ở cả tình trạng đói và tình trạng no, trừ khi có yêu cầu chỉ được dùng thuốc khi đói hoặc khi no.

Nghiên cứu đói: Người tình nguyện nhịn đói trước khi uống thuốc, thời gian tối thiểu yêu cầu NTN nhịn đói tùy theo từng hướng dẫn (thông thường từ 8 h - 10 h, được quy định cụ thể trong từng đề cương nghiên cứu). Do lượng chất lỏng sử dụng có thể ảnh hưởng đến tốc độ di chuyển từ dạ dày xuống ruột của các thuốc dạng uống, cần uống thuốc thử và thuốc đối chứng với cùng một thể tích nước xác định (trong khoảng từ 150 ml - 250 ml, thông thường lượng nước uống thuốc khoảng 240 ml). NTN được uống nước theo nhu cầu, trừ khoảng thời gian một giờ trước và một giờ sau khi dùng thuốc, và không được phép ăn trong vòng 4 h sau khi dùng thuốc. Chế độ ăn sau khi dùng thuốc cần được chuẩn hóa về thành phần và thời điểm dùng bữa trong một thời gian thích hợp.

Nghiên cứu no: Đối với các nghiên cứu no, các điều kiện thử nghiệm tương tự nghiên cứu đói, chỉ khác là được cung cấp bữa ăn thử nghiệm trước khi dùng thuốc. Nếu thông tin sản phẩm của thuốc đối chứng không có khuyến cáo cụ thể, NTN cần bắt đầu bữa ăn 30 min trước khi dùng thuốc và nên ăn hết suất ăn trong vòng 30 min. Nếu không có khuyến cáo cụ thể, nên sử dụng bữa ăn giàu chất béo (khoảng 50 % so với tổng lượng calo của bữa ăn) và giàu năng lượng (khoảng 800 - 1000 calo). Bữa ăn giàu chất béo có lượng protein, carbohydrat và chất béo theo thứ tự tương ứng khoảng 150, 250 và 500 - 600 calo. Mô tả thành phần của bữa ăn sử dụng trong nghiên cứu, chú ý tới lượng protein, carbohydrat và chất béo (số gam, lượng calo tổng cộng và tỷ lệ calo tương ứng của từng thành phần).

3.2. Liều thử hoặc hàm lượng thử

Trong nghiên cứu TĐSH, liều thử của thuốc thử phải giống với liều thử của thuốc đối chứng. Trong trường hợp phải sử dụng liều khác nhau, cần nêu rõ lý do và phải hiệu chỉnh các giá trị được động học thu được một cách phù hợp theo tỷ lệ mức liều dùng.

Khi đăng ký đồng thời một số hàm lượng khác nhau của thuốc thử, có thể chỉ cần thiết lập TĐSH với một hoặc hai hàm lượng, phụ thuộc vào tỷ lệ thành phần giữa các hàm lượng khác nhau và độ tan của chất phân tích. Hàm lượng sử dụng trong nghiên cứu phụ thuộc vào sự tuyến tính được động học của dược chất.

Đối với thuốc có dược động học tuyến tính: Thông thường, hàm lượng cao nhất được thực hiện thử TĐSH, có thể lựa chọn hàm lượng thấp hơn để thử nếu vì lý do an toàn hay dung nạp thuốc. Nếu phương pháp phân tích không đủ nhạy để định lượng chính xác nồng độ thuốc trong huyết tương sau khi dùng liều đơn của hàm lượng cao nhất, có thể lựa chọn một mức liều cao hơn (ưu tiên dùng nhiều viên có hàm lượng cao nhất).

Nếu đã chứng minh TĐSH với (các) hàm lượng được coi là nhạy cảm nhất để phát hiện được sự khác biệt tiềm tàng giữa các thuốc, nghiên cứu TĐSH *in vivo* cho (các) hàm lượng khác có thể được miễn.

Đối với thuốc có dược động học không tuyến tính:

- Khi mức độ hấp thu thuốc tăng nhiều hơn sự tăng liều dùng trong khoảng liều điều trị, thực hiện ở ít nhất một hàm lượng cao nhất.

- Khi mức độ hấp thu thuốc tăng ít hơn sự tăng liều dùng trong khoảng liều điều trị mà nguyên nhân đã biết không phải do khả năng hòa tan kém của dược chất mà do có hiện tượng bão hòa các chất vận chuyển thuốc vào tế bào và cả thuốc thử và thuốc đối chứng đều không có chứa bất cứ một tá dược nào có khả năng ảnh hưởng đến nhu động đường tiêu hóa hoặc protein vận chuyển, thực hiện ở hàm lượng thấp nhất hoặc một hàm lượng nằm trong khoảng liều có dược động học tuyến tính.

- Khi mức độ hấp thu thuốc tăng ít hơn sự tăng liều dùng mà nguyên nhân đã biết là do khả năng hòa tan kém của dược chất, thực hiện ở hai hàm lượng gồm hàm lượng cao nhất và hoặc hàm lượng thấp nhất hoặc một hàm lượng nằm trong khoảng liều có dược động học tuyến tính.

3.3. Thời điểm lấy mẫu

Số lượng mẫu lấy phải đủ để có thể mô tả đường biểu diễn nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian. Thời điểm lấy mẫu nên kéo dài gấp ít nhất 3 lần thời gian bán thải của thuốc. Cần lấy nhiều điểm quanh t_{max} dự kiến để ước lượng chính xác hơn nồng độ đỉnh, tránh điểm đạt C_{max} là điểm đầu tiên của đường cong nồng độ thuốc theo thời gian. Cần lấy tối thiểu ba đến bốn mẫu trong pha thải trừ để đảm bảo có thể ước lượng chính xác hằng số tốc độ thải trừ (thông số này được sử dụng để ước lượng $AUC_{(0-\infty)}$ một cách tin cậy). Thời điểm lấy mẫu cũng cần đảm bảo đường cong nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian đủ dài, giới hạn cho phép là $AUC_{(0-t)}$ phải đạt tối thiểu 80 % $AUC_{(0-\infty)}$. Đối với các dạng bào chế giải phóng ngay có thời gian bán thải quá dài, có thể kết thúc lấy mẫu ở thời điểm sau khi uống thuốc 72 h; khi đó, giá trị AUC_{0-72} được sử dụng thay thế cho $AUC_{(0-t)}$. Thời gian lấy mẫu dài hơn 72 h là không cần thiết đối với các dạng bào chế giải phóng ngay, bất kể thời gian bán thải của thuốc dài hay ngắn.

Trong các nghiên cứu đa liều, trong một khoảng liều, mẫu 0 giờ (mẫu trước khi uống thuốc) được lấy ngay trước khi dùng thuốc (trong vòng 5 min trước khi dùng thuốc) và mẫu cuối cùng được lấy trong vòng 10 min so với thời gian dự kiến của khoảng cách liều để đảm bảo có thể xác định chính xác giá trị $AUC_{(0-\tau)}$.

Trường hợp mẫu sinh học được chọn là nước tiểu, mẫu nước tiểu thường được lấy trong khoảng thời gian tối thiểu bằng ba lần thời gian bán thải.

Với các chất nội sinh, thời điểm lấy mẫu cần đảm bảo xác định được dữ liệu nồng độ chất nội sinh ban đầu (mức nền) trong mỗi giai đoạn. Thông thường, mức nền được xác định từ 2-3 mẫu lấy trước khi dùng thuốc. Một số trường hợp cần lấy mẫu đều đặn trong thời gian 1-2 ngày trước khi sử dụng thuốc để xác định sự dao động của mức nền liên quan đến nhịp sinh học.

4. Phân tích dược động học

Các thông số dược động học thường được tính toán dựa trên thời gian lấy mẫu thực tế.

Lập các bảng và hình để biểu thị các dữ liệu nồng độ thuốc trong huyết tương vào những thời điểm lấy

mẫu khác nhau của từng cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Sau đó tính các thông số dược động học tương đối của mỗi cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho mỗi thông số.

Đối với các nghiên cứu đơn liều

Cần xác định các thông số chính như AUC (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian), C_{max} (nồng độ đỉnh) và các thông số bổ sung như t_{max} (thời gian đạt tới nồng độ đỉnh), λ_z (hằng số tốc độ thải trừ pha cuối), $t_{1/2}$ (thời gian bán thải của thuốc), $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$.

Giá trị C_{max} và t_{max} thu được từ các số liệu thực và không phải tính toán.

Giá trị $AUC_{(0-t)}$ (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ tính từ thời điểm 0 đến thời điểm t) được tính theo phương pháp hình thang, với t là thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể định lượng được.

Giá trị $AUC_{(0-\infty)}$ (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm 0 đến vô cùng) được tính toán theo công thức: $AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + C_t/\lambda_z$.

Trong đó: C_t là nồng độ thuốc tại thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể xác định được.

Giá trị $t_{1/2}$ có thể được tính bằng công thức: $t_{1/2} = 0,693/\lambda_z$.

Đối với các nghiên cứu đa liều

Cần xác định các thông số chính sau khi uống đa liều (đạt trạng thái ổn định) như $AUC_{(0-\tau)}$, $C_{max,ss}$ và các thông số bổ sung như $C_{\tau,ss}$, $C_{min,ss}$, $C_{av,ss}$, mức độ biến động $[(C_{max,ss}-C_{min,ss})/C_{av,ss}]$, $t_{max,ss}$ và dao động $[(C_{max,ss}-C_{min,ss})/C_{min,ss}]$.

Trong đó:

$AUC_{(0-\tau)}$ là diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc - thời gian từ thời điểm 0 giờ đến thời điểm τ .

τ là khoảng thời gian giữa các lần dùng thuốc.

$C_{max,ss}$ là nồng độ đỉnh, thu được từ các số liệu thực, sau khi dùng liều cuối cùng ở trạng thái ổn định.

$C_{min,ss}$ là nồng độ cực tiểu ở thời điểm cuối trong khoảng thời gian dùng liều cuối cùng ở trạng thái ổn định.

$C_{av,ss}$ là nồng độ thuốc trung bình ở trạng thái ổn định, tính theo công thức $C_{av,ss} = AUC_{(0-\tau)}/\tau$.

$t_{max,ss}$ là thời gian đạt $C_{max,ss}$.

Khi không thể xác định được nồng độ thuốc trong huyết tương, có thể thực hiện trên một mẫu sinh học khác như nước tiểu, nhưng chất xác định được và phương pháp phân tích phải phù hợp đảm bảo kết quả xác định nồng độ thuốc trong các mẫu là đúng, chính xác và đáng tin cậy. Khi sử dụng dữ liệu nồng độ thuốc trong nước tiểu, cần xác định các giá trị $Ae_{(0-t)}$ và R_{max} . $Ae_{(0-t)}$ được phân tích với cùng mức chấp nhận tương tự $AUC_{(0-t)}$. R_{max} cũng được phân tích với cùng mức chấp nhận tương tự C_{max} .

Cần sử dụng phương pháp không ngăn để xác định các thông số dược động học trong các nghiên cứu TĐSH. Sử dụng phương pháp ngăn để xác định các thông số này không được chấp nhận.

Ngoài các thông số dược động học cơ bản trong nghiên cứu TĐSH kể trên, tùy theo mục đích cũng như các mô hình nghiên cứu cụ thể còn có thể xác định thêm các thông số dược động học khác như giá trị $t_{1/2}$ hấp thu; thời gian lưu trú trung bình (*mean retention/residence time – MRT*); diện tích dưới đường cong nồng độ tích lũy - thời gian (*area under the moment curve – AUMC*), ...

Chất mẹ và các chất chuyển hóa

Đánh giá TĐSH cần dựa trên nồng độ chất mẹ đo được do C_{max} của chất mẹ thường là dữ liệu nhạy hơn để phát hiện sự khác biệt về tốc độ hấp thu giữa các thuốc nghiên cứu so với C_{max} của chất chuyển hóa.

Đối với các tiền thuốc không có hoạt tính, cũng khuyến cáo chứng minh TĐSH dựa trên chất mẹ. Khi đó không cần thiết định lượng chất chuyển hóa có hoạt tính. Tuy nhiên, một số tiền thuốc có nồng độ thấp trong huyết tương và bị thải trừ nhanh dẫn đến khó chứng minh TĐSH dựa trên chất mẹ. Trong trường hợp này, chấp nhận chứng minh TĐSH dựa trên chất chuyển hóa chính mà không cần định lượng chất mẹ. Trong phạm vi hướng dẫn này, một chất mẹ được coi là một tiền thuốc không có hoạt tính nếu chất này không có hoặc có đóng góp rất nhỏ vào hiệu quả lâm sàng của thuốc.

Không khuyến cáo sử dụng một chất chuyển hóa để thay thế cho chất mẹ có hoạt tính. Điều này chỉ xem xét nếu chứng minh được không thể cải thiện độ nhạy của phương pháp phân tích trên chất mẹ,

vì vậy phương pháp phân tích là không đủ tin cậy để định lượng chất mẹ sau khi dùng liều đơn, ngay cả khi có thể lựa chọn nghiên cứu ở mức liều cao hơn. Tuy nhiên, sử dụng một chất chuyển hóa thay thế cho chất mẹ có hoạt tính chỉ được chấp nhận trong những trường hợp cá biệt. Khi sử dụng dữ liệu nồng độ chất chuyển hóa thay thế cho nồng độ chất mẹ có hoạt tính, cơ sở đăng ký cần trình bày tất cả dữ liệu để chứng minh mức độ phơi nhiễm (AUC) với chất chuyển hóa sẽ phản ánh mức độ phơi nhiễm (AUC) với chất mẹ và sự hình thành chất chuyển hóa chưa đạt trạng thái bão hòa ở các mức liều điều trị.

Đồng phân đối quang

Có thể sử dụng các phương pháp phân tích sinh học đối xứng (không phân biệt đồng phân đối quang). Tuy nhiên, cần định lượng riêng từng loại đồng phân trong trường hợp có đồng thời tất cả các điều kiện sau:

- (1) Các đồng phân đối quang có đặc điểm dược động học khác nhau.
- (2) Các đồng phân đối quang khác nhau rõ rệt về mặt dược lực học.
- (3) Tỷ lệ phơi nhiễm (AUC) của các đồng phân thay đổi khi tốc độ hấp thu thay đổi.

Nếu một đồng phân đối quang có tác dụng dược lý trong khi đồng phân còn lại không có hoạt tính hoặc chỉ có rất ít hoạt tính, chỉ cần chứng minh TĐSH dựa trên đồng phân đối quang có hoạt tính.

Các chất nội sinh

Trong nghiên cứu TĐSH các thuốc là chất nội sinh, có thể cần nhắc sử dụng liều thử cao hơn mức liều điều trị để xác định chính xác nồng độ tăng thêm sau thử nghiệm so với mức nền, với điều kiện đã biết mức liều thử được dung nạp tốt.

Phương pháp chính xác để hiệu chỉnh so với mức nền cần được xác định trước và phải được làm rõ trong đề cương nghiên cứu. Phương pháp hiệu chỉnh theo mức nền là trừ đi giá trị nền, tức là trừ đi giá trị trung bình nồng độ chất nội sinh trước khi dùng thuốc hoặc trừ đi AUC của chất nội sinh trước dùng thuốc của mỗi người tình nguyện. Nếu nồng độ chất nội sinh sau thử nghiệm tăng hơn hẳn so với nồng độ chất nội sinh ở mức nền thì khi đó việc hiệu chỉnh theo mức nền là không cần thiết.

Trong các nghiên cứu TĐSH với chất nội sinh, cần chú ý đảm bảo thời gian nghỉ giữa hai giai đoạn phải đủ dài do không thể trực tiếp xác định có xảy ra hiện tượng nhiễm chéo hay không.

Sử dụng dữ liệu trong nước tiểu

Trường hợp không thể định lượng chính xác nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian của chất mẹ, có thể sử dụng dữ liệu thuốc bài tiết trong nước tiểu thay thế. Tuy nhiên, cần biện giải một cách chặt chẽ khi sử dụng dữ liệu thuốc trong nước tiểu để tính toán mức độ phơi nhiễm. Nếu có thể xác định được C_{max} trong huyết tương một cách đáng tin cậy, nên kết hợp cả dữ liệu này với dữ liệu trong nước tiểu (phản ánh mức độ phơi nhiễm) để đánh giá TĐSH. Khi sử dụng dữ liệu thuốc trong nước tiểu, cơ sở đăng ký cần trình bày tất cả các dữ liệu đã có để chứng minh rằng dữ liệu thuốc bài tiết trong nước tiểu sẽ phản ánh sự phơi nhiễm thuốc trong huyết tương.

5. Tính toán sinh khả dụng

Nghiên cứu đơn liều: Sinh khả dụng F được tính toán lần lượt bằng cách sử dụng AUC_{0-t} và $AUC_{0-\infty}$ của mỗi cá thể, đồng thời tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Khi liều của thuốc thử (T) giống với liều của thuốc đối chứng (R):

$$F = (AUC_{0-t})_T / (AUC_{0-t})_R \times 100 \%$$

$$F = (AUC_{0-\infty})_T / (AUC_{0-\infty})_R \times 100 \%$$

Khi liều thuốc thử khác với liều thuốc đối chứng và chất được phân tích đặc trưng cho dược động học tuyến tính, chỉ số F có thể thay đổi phụ thuộc vào liều và được thể hiện dưới đây:

$$F = [(AUC_{0-t})_T \times D_R / (AUC_{0-t})_R \times D_T] \times 100 \%$$

$$F = [(AUC_{0-\infty})_T \times D_R / (AUC_{0-\infty})_R \times D_T] \times 100 \%$$

Trong đó: D_R và D_T là liều uống của thuốc đối chứng và thuốc thử.

Phân tích các chất chuyển hóa: Một vài thuốc là dạng tiền chất của thuốc không thể định lượng được trong máu vì dạng tiền chất của thuốc chuyển hóa rất nhanh trong cơ thể. Sinh khả dụng của những loại thuốc này có thể được đánh giá qua đáp ứng thích hợp của chất chuyển hóa có hoạt tính.

$$F = (AUC_{0-t})^m_T / (AUC_{0-t})^m_R \times 100 \%$$

$$F = (AUC_{0-\infty})^m_T / (AUC_{0-\infty})^m_R \times 100 \%$$

Trong đó: m là ký hiệu của chất chuyển hóa.

Nghiên cứu đa liều: Sinh khả dụng F được tính toán dựa trên số liệu $AUC^{ss}_{0-\tau}$ của mỗi cá thể. Khi liều của thuốc thử (T) giống với liều của thuốc đối chứng (R), sinh khả dụng ở trạng thái ổn định được xác định bằng công thức:

$$F = (AUC^{ss}_{0-\tau})_T / (AUC^{ss}_{0-\tau})_R \times 100 \%$$

Trong đó: AUC^{ss}_{0-t} là diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc - thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm τ trong suốt khoảng liều ở trạng thái ổn định.

6. Đánh giá tương đương sinh học

Nên sử dụng dữ liệu của tất cả NTN tham gia nghiên cứu để tính thống kê. Tuy nhiên, với những NTN không có đủ dữ liệu của cả thuốc thử và thuốc đối chứng trong các nghiên cứu thiết kế chéo hoặc thiếu dữ liệu của một giai đoạn trong các nghiên cứu thiết kế song song không được sử dụng để tính thống kê. Không chấp nhận đề cương nghiên cứu trong đó đưa ra các NTN “dự phòng” sẽ được đưa vào phân tích khi cần để thay thế cho các NTN bị loại ra.

Các lý do cho phép được loại bỏ dữ liệu phải được quy định trước trong đề cương nghiên cứu.

Loại bỏ dữ liệu của một NTN trong một giai đoạn cụ thể khi gặp biến cố bất lợi như nôn và tiêu chảy dẫn đến làm giảm độ tin cậy của dữ liệu nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian. Ví dụ như đối với các thuốc giải phóng ngay nếu tình trạng nôn trong khoảng thời gian 2 lần T_{max} trung vị tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, đối với các thuốc dạng giải phóng biến đổi tình trạng nôn xảy ra trong khoảng thời gian nhỏ hơn hoặc bằng khoảng thời gian giữa 2 lần dùng thuốc thì cần loại bỏ dữ liệu ra khỏi phân tích thống kê. Dữ liệu nồng độ của đối tượng bị nôn phải được báo cáo.

Trường hợp NTN có nồng độ thuốc trong mẫu huyết tương ở thời điểm 0 giờ: Nếu nồng độ ở thời điểm 0 giờ (pre-dose) không quá 5 % C_{max} thì có thể đưa dữ liệu của NTN này vào thống kê mà không cần bất kỳ điều chỉnh nào trong tính toán dược động học. Nếu nồng độ ở thời điểm 0 giờ > 5 % C_{max} thì nghiên cứu sẽ loại bỏ NTN này khỏi tất cả các đánh giá nghiên cứu TĐSH. Nghiên cứu sẽ không được chấp nhận nếu việc loại trừ này dẫn đến dữ liệu thống kê ít hơn 12 NTN.

Trong một số trường hợp ngoại lệ, sử dụng đồng thời với một thuốc khác cũng có thể là lý do để loại bỏ dữ liệu của người tình nguyện đó. Không chấp nhận việc loại bỏ dữ liệu dựa trên phân tích thống kê hoặc chỉ do các nguyên nhân liên quan đến dược động học, bởi vì không thể phân biệt giữa yếu tố về mặt bào chế với những yếu tố khác có ảnh hưởng đến dược động học.

Đối với các nghiên cứu đơn liều, khi tính thống kê, không nên loại bỏ dữ liệu của NTN có giá trị $AUC_{(0-t)}$ thấp hơn 80 % $AUC_{(0-\infty)}$ (không áp dụng trong trường hợp sử dụng AUC_{0-72}). Tuy nhiên, nếu tỷ lệ phần trăm $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$ nhỏ hơn 80 % trong hơn 20 % số NTN tham gia nghiên cứu được thì cần có bàn luận phù hợp.

Với các biến số C_{max} và AUC: Các giá trị C_{max} và AUC phải được chuyển sang giá trị thang logarit. Đánh giá TĐSH dựa trên khoảng tin cậy 90 % của tỷ số trung bình hình học giữa thuốc thử và thuốc đối chứng. Phương pháp này tương ứng với phương pháp TOST (two one-sided test) với H_0 là không TĐSH ở mức ý nghĩa 5 %. C_{max} và AUC sẽ được phân tích bằng mô hình ANOVA dựa trên số liệu đã chuyển sang giá trị thang logarit với các yếu tố ảnh hưởng bao gồm: thuốc nghiên cứu, giai đoạn, trình tự, đối tượng trong trình tự (subject nested in sequence). Khoảng tin cậy 90 % của sự khác biệt giữa các thuốc theo dữ liệu đã chuyển sang giá trị thang logarit được xác định từ mô hình ANOVA. Khoảng tin cậy này sau đó được chuyển lại dạng ban đầu (khử logarit) để thu được khoảng tin cậy 90 % cho tỷ số trung bình hình học giữa thuốc thử và thuốc đối chứng tính theo thang đo ban đầu.

Nếu giới hạn khoảng tin cậy 90 % của các tỷ số C_{max} , AUC (nghiên cứu đơn liều) hoặc $C_{max,ss}$, $AUC_{(0-T)}$ (nghiên cứu đa liều) tương ứng giữa thuốc thử và thuốc đối chứng nằm trong khoảng 80,00 % - 125,00 % thì thuốc thử TĐSH *in vivo* so với thuốc đối chứng.

Không yêu cầu phân tích thống kê đối với t_{max} . Tuy nhiên, nếu tốc độ giải phóng nhanh được xác định là có ý nghĩa lâm sàng và quan trọng, liên quan đến khởi phát tác dụng hoặc các tác dụng bất lợi, không nên có sự khác biệt rõ ràng về giá trị trung vị của t_{max} và sự biến thiên của nó khác nhau giữa thuốc thử và thuốc đối chứng.

Đối với một số thuốc/dược chất có khoảng điều trị hẹp (NTID): giới hạn chấp nhận đối với AUC cần được quy định chặt chẽ hơn, trong khoảng từ 90,00 % - 111,11 %. Trong trường hợp C_{max} có vai trò đặc biệt quan trọng đối với tính an toàn, hiệu quả hoặc việc theo dõi nồng độ thuốc, cũng cần áp dụng giới hạn chấp nhận từ 90,00 % - 111,11 % cho thông số này. Không thể đưa ra một bộ tiêu chí để xác định các thuốc có khoảng điều trị hẹp và điều này phải được xem xét trong từng trường hợp cụ thể dựa trên những lưu ý về lâm sàng.

Đối với các thuốc/dược chất có tính biến thiên cao (HVDP): là các thuốc/dược chất có sự biến thiên của một thông số dược động học trong cá thể lớn hơn 30 %, có thể thực hiện một nghiên cứu thiết kế chéo lặp lại (replicate cross-over design) để xem xét mở rộng khoảng chấp nhận đối với khoảng tin cậy 90 % của tỷ số C_{max} , có thể mở rộng tới khoảng tối đa 69,84 % - 143,19 %. Cơ sở đăng ký cần chứng minh sự biến thiên trong cá thể tính được là tin cậy và không phải do các giá trị sai khác cá biệt gây ra. Yêu cầu về khoảng giới hạn chấp nhận mở rộng phải được xác định trước trong đề cương nghiên cứu. Tỷ số trung bình nhân (GMR) cần nằm trong giới hạn chấp nhận thông thường 80,00 % - 125,00 %.

Đối với thiết kế two-stage (hai đợt):

Kế hoạch sử dụng mô hình nghiên cứu hai đợt phải được làm rõ trong đề cương nghiên cứu cùng với mức ý nghĩa hiệu chỉnh được sử dụng cho mỗi đợt phân tích. Dữ liệu của đợt 1 được tiến hành phân tích thống kê tạm thời và cả hai đợt được phân tích thống kê với mức ý nghĩa hiệu chỉnh (với khoảng tin cậy thích hợp sử dụng xác suất bao phủ hiệu chỉnh lớn hơn 90 %). Khi phân tích dữ liệu kết hợp từ hai đợt, yếu tố đợt nghiên cứu cần đưa vào mô hình ANOVA.

Với phân tích đợt 1, mô hình phân tích bao gồm các yếu tố thuốc nghiên cứu, giai đoạn, trình tự và đối tượng (trình tự).

Với phân tích đợt 2, phân tích được thực hiện trên dữ liệu gộp của cả hai đợt. Mô hình phân tích đợt 2 bao gồm các yếu tố đợt, thuốc nghiên cứu, giai đoạn (đợt), trình tự và đối tượng (trình tự x đợt).

Đối với trường hợp thuốc thử là dạng bào chế giải phóng biến đổi còn thuốc đối chứng là dạng bào chế giải phóng ngay: Vì không thể thiết lập được TĐSH giữa thuốc thử và thuốc đối chứng do có sự khác nhau về tốc độ phóng thích dược chất, thay cho báo cáo số liệu nghiên cứu thử TĐSH, yêu cầu báo cáo số liệu nghiên cứu dược động học của thuốc thử kèm theo báo cáo số liệu nghiên cứu so sánh an toàn và hiệu quả trên lâm sàng giữa thuốc thử và thuốc đối chứng bào chế ở dạng giải phóng ngay. Trong trường hợp này phải tham khảo cụ thể các hướng dẫn hiện hành của các cơ quan quản lý.

