

# Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности

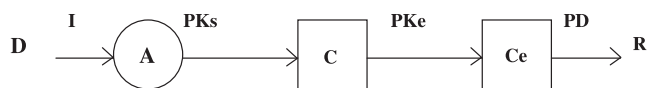
И.Б. Бондарева

НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, г. Москва

*Появление большого количества генерических лекарственных препаратов объясняет все возрастающий интерес к проблеме биоэквивалентности, планированию и статистическому анализу данных исследований, проводимых для установления биоэквивалентности. Установление биоэквивалентности (фармакокинетической эквивалентности) препаратов (обычно генерического и оригинального), предназначенных для внесосудистого введения и действие которых опосредовано появлением лекарственного средства в системном кровотоке, предполагает выполнение специального фармакокинетического исследования для сравнения относительной биодоступности лекарственного вещества при введении в одинаковых дозах при одинаковых условиях. Биодоступность характеризуется степенью всасывания (количеством препарата, достигающим системного кровотока) и скоростью процесса всасывания. Обычно такие исследования проводятся в соответствии с двойным слепым перекрестным дизайном. В качестве стандарта для сравнения обычно берется известный зарегистрированный препарат, а в качестве тестового — изучаемый препарат со сходными свойствами.*

Базовая методология при таких исследованиях основывается на предположении, что идентичность (или достаточная близость) в смысле создаваемого фармакологического эффекта фармакокинетических кривых изменения концентрации препарата в крови от времени для тестового препарата и стандарта означает их терапевтическую эквивалентность. То есть, основная идея, лежащая в основе исследований биоэквивалентности, может быть сформулирована следующим образом. Пусть  $I$  — процесс абсорбции дозы препарата ( $D$ ). Часть введенной дозы  $A$ , достигающая кровотока, распределяется в организме в соответствии с фармакокинетикой препарата ( $PK_s$ ). При этом в крови создается определенный профиль концентрации препарата ( $C$ ), который может быть непосредственно измерен. Препарат также достигает места действия, а создаваемая концентрация  $C_e$  приводит к определенному фармакологическому эффекту ( $R$ ) в соответствии с фармакодинамикой препарата ( $PD$ ). Схематично этот процесс может быть представлен в виде цепочки, отражающей не течение процесса во времени, а в основном причинно-следственные связи (рис.1). Эквивалентность рассматривается последовательно по всем этапам. Основной интерес, безусловно, представляет идентичность уровней создаваемого в результате эффекта  $R$ . Предполагается, что при определенных условиях «неэквивалентность» сравниваемых препаратов отражается на процессе их всасывания ( $I$ ) в большей степени, чем на всех остальных процессах. Однако переменная  $A$  не может быть непосредственно измерена, возможны измерения только переменной  $C$ , кроме того, кровь в данном

случае рассматривается, как «ворота», через которые должен пройти препарат, чтобы достичь места действия [34].



**Рисунок 1.** Схематичное представление соотношения между получаемой дозой препарата  $D$  и создаваемым фармакологическим эффектом  $R$ .

Для количественного сравнения процесса абсорбции препаратов ( $I$ ) необходимо выбрать показатели, характеризующие его в полной мере. Основным показателем для сравнения степени всасывания считается так называемое отношение биодоступности — отношение площадей под фармакокинетическими кривыми для тестового препарата и стандарта (в предположении равенства значений клиренса сравниваемых препаратов у индивидуального субъекта). Достаточно сложной задачей оказалось найти точный способ практической оценки и сравнения скоростей всасывания лекарственного препарата, этот вопрос обсуждается в [2,11,14,26,37,39,41].

Проведение исследований биоэквивалентности и статистический анализ результатов таких исследований регламентируется специально разработанными правилами [1,21]. Хотя в этой работе анализ основных показателей и статистических процедур, применяемых в исследованиях биоэквивалентности, проведен в основном на

основе методические рекомендации, разработанных в США [21], приведенные положения полностью соответствуют правилам, действующим в России [1].

### Стандартная процедура исследования биоэквивалентности

Обычно клинические исследования, целью которых является установление биоэквивалентности, проводятся в соответствии с двойным слепым АВ/ВА перекрестным дизайном.

Стандартная процедура представляет собой измерение уровней концентрации сравниваемых препаратов и метаболитов в крови (иногда еще и в моче) после получения однократной дозы или при повторяющемся дозировании для каждого субъекта, включенного в исследование. Периоды измерения концентрации для различных препаратов у одного и того же субъекта разделяются достаточно продолжительным временным интервалом (5-6 периодов полувыведения препарата), необходимым для исключения взаимовлияния препаратов. Измерения концентраций при однократном приеме препарата производятся в течение, по меньшей мере, трех – четырех периодов полувыведения препарата или прекращаются после снижения концентрации ниже пределов регистрации.

### Основные показатели биоэквивалентности

Согласно действующим правилам [21], биоэквивалентность проверяется с помощью некомпартментного подхода. Показатели биоэквивалентности оцениваются или рассчитываются непосредственно по зарегистрированным фармакокинетическим кривым. Правила регламентируют выбор основных показателей эквивалентности, которые оцениваются непосредственно по зарегистрированным кривым концентрация – время. Минимальный набор основных параметров сравнения при однократном приеме препаратов включает средние значения (или медианы) следующих фармакокинетических показателей [21]:

- $AUC_{0-T}$  – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до времени  $T$  последнего измерения, вычисленная методом трапеций;
- $AUC_{0-\infty}$  – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до бесконечности,  $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-T} + C_T/\lambda$ , где  $C_T$  – значение последней измеренной концентрации,  $\lambda$  – константа скорости элиминации препарата, вычисленная подходящим методом (например, методом наименьших квадратов по последним измерениям концентрации, соответствующих нисходящей фазе ФК профиля);
- Значение максимальной концентрации  $C_{max}$  и значение времени достижения максимальной

концентрации  $T_{max}$ , оцененные без интерполяции по зарегистрированным кривым.

Отношение биодоступности (отношение площадей под фармакокинетическими кривыми для тестового препарата и стандарта) является оценкой относительной степени всасывания. Параметры  $C_{max}$  и  $T_{max}$ , несмотря на многочисленные научные споры, используются для количественного сравнения скорости всасывания. Показатель  $C_{max}/AUC$  также часто включается для оценки скорости всасывания [8,30,31]. Для косвенной оценки скорости всасывания может использоваться и показатель  $MRT$  – среднее резидентное время (вместе с его дисперсией – показателем  $VRT$ ). Показатели  $MRT$  и  $VRT$  рассчитываются с помощью метода моментов по зарегистрированным кривым концентрация – время (соответствующие формулы приведены, например в [2,3]).

В случае многократного дозирования и исследования биоэквивалентности при стационарном распределении препарата в организме рекомендуемый минимальный набор показателей включает [21]:

- $AUC_{0-\tau}$  – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до конца интервала дозирования  $\tau$ , вычисленная после установления стационарного распределения;
- Значение максимальной концентрации  $C_{max}$  и значение времени достижения максимальной концентрации  $T_{max}$ , оцененные без интерполяции по зарегистрированным кривым после приема последней дозы препарата;
- $C_{min}$  – концентрация препарата в конце каждого интервала дозирования после установления стационарного распределения препарата;
- $C_{av}$  – средняя концентрация в интервале дозирования после установления стационарного распределения препарата,  $C_{av} = AUC_{0-\tau}/\tau$ ;
- $DF = 100\% \cdot (C_{max} - C_{min})/C_{av}$  – степень колебаний концентрации препарата в интервале дозирования после установления стационарного распределения.

Необходимость изучения биоэквивалентности в стационарном состоянии должна быть обоснована в протоколе исследования.

В исследованиях биоэквивалентности препаратов с контролируемым высвобождением в качестве показателей скорости всасывания могут использоваться также показатели  $T_{aboveC_{av}}$  (время превышения средней концентрации) и  $T_{75\%C_{max}}$  (время превышения 75% от максимальной концентрации), которые оцениваются по зарегистрированным ФК профилям. Показатель  $T_{aboveC_{av}}$  предпочтителен для исследований с многократным приемом препарата. В исследованиях с многократным приемом

препарата для оценки величины колебаний концентрации препарата в интервале дозирования также может быть полезен показатель  $\%swing=100\% \cdot (C_{\max} - C_{\min})/C_{\min}$  [31].

### Основные статистические процедуры и критерии эквивалентности

До начала 80-х годов наиболее распространенным статистическим тестом для проверки биоэквивалентности и сравнения средних значений выбранных показателей был дисперсионный анализ (ANOVA) [15,19,33]. В рамках этого метода выдвигалась стандартная нулевая гипотеза  $H_0$  об отсутствии различий между сравниваемыми препаратами (или, другими словами между выбранными показателями биоэквивалентности). Аддитивная модель, подразумевающая аддитивность вкладов различных составляющих, предполагает, что изучаемый показатель ( $X_{ijk}$  – индивидуальное наблюдение переменной у  $j$  – субъекта после получения  $i$ -препарата в  $k$  последовательности) может быть представлен в виде суммы общего среднего ( $\mu$ ); параметра ( $\sigma_{jk}$ ), отражающего специфическую для данного  $j$ -субъекта реакцию; параметра  $t_i$ , отражающего эффект от приема именно  $i$  – препарата; параметра  $\pi_l$ , характеризующего вклад, связанный с  $l$ -периодом измерений; и  $\epsilon_{ijk}$  – случайной ошибки модели ( $k=1,2$ ;  $j=1,\dots,n/2$ ;  $i=1$  и  $2$ ). Предполагается, что ошибка  $\epsilon_{ijk}$  имеет нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и дисперсией  $De$ .

В рамках такой модели среднее значение показателя для  $i$ -препарата может быть выражено как

$$\bar{X}_i = \mu + t_i + \bar{\epsilon}_i,$$

ошибка  $\bar{\epsilon}_i$  имеет нормальное распределение с нулевым средним и дисперсией, равной  $De/n$ .

Кроме того, основными предположениями, лежащими в основе математической модели данных для метода анализа вариаций в исследованиях биоэквивалентности, являются нормальное распределение данных, рандомизация пациентов, близость значений дисперсии показателей для сравниваемых препаратов.

С помощью F-теста на определенном уровне значимости с учетом числа степеней свободы может быть проверена гипотеза о несущественном вкладе различий между препаратами в общую вариацию данных. Однако такой подход имеет ряд недостатков. Один из них связан с ключевым предположением, на котором основан данный подход. Подход может применяться только в предположении о полном отсутствии взаимовлияния рассматриваемых препаратов в интервалах времени проведения соответствующих измерений. В случае, если период времени между приемом различных препаратов оказался недостаточным для полного исключения такого эффекта, данное предположение нарушается, и результаты оказываются неверными. Если отказаться от этого предположения, необходи-

мые математические модификации модели оказываются слишком сложными [27,39]. Другая проблема обусловлена связью числа испытуемых, устанавливаемой величиной различий и мощности теста. При достаточно большом объеме выборки можно статистически доказать наличие даже очень незначительных с клинической точки зрения различий. С другой стороны, наоборот, слишком маленький объем выборки может не позволить установить даже существенные различия. Попыткой регулировать последнее ограничение можно считать разработку так называемого «80/20» правила [16,27,37]. Оно означает, что исследование биоэквивалентности должно быть спланировано и проведено так, чтобы мощность статистического теста для выявления 20% статистически значимого различия между препаратами была не меньше 80%.

В случае сравнения двух препаратов F-тест для анализа вариаций эквивалентен проверке традиционной нулевой гипотезы об отсутствии различий между средними значениями параметров биоэквивалентности  $\mu_T$  и  $\mu_R$  ( $\bar{X}_T$  и  $\bar{X}_R$  – их выборочные оценки, полученные на основе имеющихся данных) с помощью двустороннего критерия Стьюдента (обычно на уровне значимости 5%). Значение тестовой статистики в этом случае равно

$$t = \frac{\bar{X}_T - \bar{X}_R}{\sigma\sqrt{2/n}},$$

где  $n$  – число субъектов, включенных в исследование,  $\sigma$  – среднее квадратичное отклонение, оцененное с помощью анализа вариации для перекрестного дизайна (обычно оценка значения  $\sigma$  – квадратный корень из среднего квадрата «ошибки», или остаточной внутрииндивидуальной вариацией MSE). Вычисленное значение статистики сравнивается с табличным для двустороннего критерия на выбранном уровне значимости. Однако данный тест, как и дисперсионный анализ, устанавливает лишь наличие или отсутствие различий. Таким образом, независимо от мощности теста этот тест по своей сути является средством для проверки гипотезы о точном совпадении средних значений (и соответствующих препаратов), он не позволяет адекватно проверять гипотезу о «приблизительной эквивалентности». Поэтому в настоящее время такой подход применяется не для принятия окончательного решения о биоэквивалентности, а для проверки гипотез о статистической значимости влияния различных факторов: различий между препаратами (терапия), индивидуальных различий (субъекты), последовательности приема препаратов и периодов исследования на наблюдаемую вариацию данных. Кроме того, полученная с помощью метода ANOVA оценка остаточной вариации (MSE) используется при планировании необходимого числа включаемых в исследование пациентов и расчета соответствующего доверительного интервала.

Для обычного рандомизированного перекрестного дизайна АВ/ВА статистическая модель дисперсионно-

го анализа должна включать следующие факторы, вносящие вклад в общую наблюдаемую вариацию данных:

- различия между препаратами,
- межиндивидуальные различия,
- последовательность приема препаратов,
- периоды исследования.

Анализ вариаций и критерий Стьюдента являются параметрическими методами и предполагают нормальное распределение данных. Если распределение данных отличается от нормального, или нарушаются любые другие приведенные выше предположения, лежащие в основе метода ANOVA, можно попробовать применить преобразование, приводящее к нормальному распределению, или использовать подходящие непараметрические процедуры сравнения. В случае исследований биоэквивалентности обычно применяют преобразование типа «взятие логарифма» (натурального  $\ln$  или десятичного  $\lg$ ). Многие биологические признаки не могут принимать отрицательные значения и имеют несимметричное распределение, что свидетельствует в пользу их лог-нормального распределения. Но, что самое главное, результаты, полученные после такого преобразования, могут быть интерпретированы как геометрические средние. В исследованиях биоэквивалентности отношения средних показателей часто представляют больший интерес, чем различия между ними. Использование логарифмического преобразования позволяет перейти от различий между средними значениями преобразованных данных в соответствии с аддитивной моделью (для которой применимы хорошо разработанные статистические процедуры) к отношению соответствующих средних значений (или медиан) исходных данных.

Если предполагается лог-нормальное распределение соответствующего параметра, сравнение его средних значений с помощью дисперсионного анализа проводится на основе мультипликативной модели данных. В этом случае  $X_{ijk}$  – индивидуальное наблюдение показателя сравнения у  $j$  – субъекта после получения  $i$ -препарата в  $k$  последовательности ( $k=1,2$ ;  $j=1,\dots,n/2$ ;  $i=1$  и  $2$ ,  $l=1,2$ ) представляет собой произведение общего среднего ( $\mu$ ); параметра  $s_{jk}$ , отражающего случайный эффект, специфический для данного  $j$ -субъекта при получении терапии в  $k$ -последовательности; параметра  $t_i$ , отражающего прямой эффект от приема именно  $i$  – препарата; параметра  $\pi l$ , характеризующего влияние  $l$ -периода измерений; и случайной ошибки модели ( $\epsilon_{ijk}$ ). Обычно  $\ln s_{jk}$  имеет нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и  $D_s$ , а  $\ln \epsilon_{ijk}$  – нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и  $D_\epsilon$ .

Взятие логарифма от обеих частей модели приводит к соотношению:

$$Y_{ijk} = \ln X_{ijk} = \ln \mu + \ln t_i + \ln S_{jk} + \ln \pi l + \ln \epsilon_{ijk}$$

Приведем конечный результат, имеющий приклад-

ное значение: разность средних значений  $\bar{Y}_2$  и  $\bar{Y}_1$  трансформированных переменных (при логарифмическом преобразовании данных) для сравниваемых препаратов, является несмещенной оценкой логарифма отношений средних значений исходных переменных  $X_2$  и  $X_1$ , который в свою очередь оценивает логарифм отношения соответствующих прямых эффектов от сравниваемых препаратов  $\tau_2$  и  $\tau_1$ :

$$\bar{Y}_2 - \bar{Y}_1 = \ln \frac{\bar{X}_2}{\bar{X}_1} = \ln \frac{\tau_2}{\tau_1}$$

Тогда легко выводится соотношение, связывающее коэффициент вариации для значений  $X_{ijk}$  ( $CV_x$ ) с остаточной вариацией для  $Y_{ijk}$ , предоставляемой, например дисперсионным анализом после логарифмического преобразования данных:

$$D_s + D_\epsilon = D(Y_{ijk}) = \ln\{1 + (CV_x)^2\}$$

Если значение  $(CV_x)^2$  мало,  $\ln\{1 + (CV_x)^2\} \approx (CV_x)^2$ .

А значит, стандартное отклонение трансформированных данных приблизительно равно коэффициенту вариации исходных данных. Последнее соотношение часто применяется для расчета таблиц необходимого числа испытуемых для исследований биоэквивалентности [6,7,18,26]. Надо иметь в виду, что коэффициент вариации исходных данных также относится в данном случае не к полной, а скорее к остаточной вариации данных.

Важность проведения расчетов необходимого числа включенных пациентов подчеркивается в правилах проведения исследований. Обычно эти оценки проводятся отдельно для выбранных показателей эквивалентности.

Объяснение применению логарифмического преобразования данных можно найти и с фармакокинетической точки зрения. Известное общее соотношение, связывающее основные фармакокинетические параметры в рамках линейной кинетики и при условии, что выведение препарата происходит только из центральной камеры, записывается как:

$$AUC_{0-\infty} = \frac{F \cdot D}{CL} = \frac{F \cdot D}{V \cdot k_{el}}$$

$F \cdot D$  – фракция дозы, достигшая кровотока,  $CL$  – клиренс препарата у данного субъекта,  $V$  – кажущийся объем распределения,  $k_{el}$  – константа скорости элиминации.

Таким образом, использование показателя AUC в качестве меры количества препарата, достигшего кровотока, (степень всасывания) предполагает включение в модель мультипликативного члена  $CL$  (произведение  $V$  и  $k_{el}$ ), который может рассматриваться как функция от конкретного субъекта. А значит, межиндивидуальные различия не могут адекватно рассматриваться в рамках аддитивной модели исходных данных. Прове-



дение логарифмического преобразования приводит к аддитивной модели:

$$\ln AUC_{0-\infty} = \ln F + \ln D - \ln V - \ln k_{el}$$

Похожие аргументы справедливы и для показателя  $C_{max}$ . В рамках однокамерной модели можно записать следующее уравнение для этого показателя биоэквивалентности:

$$C_{max} = \frac{F \cdot D}{V} \exp\{-k_{el} \cdot T_{max}\},$$

где опять параметры  $F$ ,  $D$  и  $V$  представлены в виде мультипликативного члена. После логарифмического преобразования последнее уравнение будет иметь вид, соответствующий аддитивной модели:

$$\ln C_{max} = \ln F + \ln D - \ln V - \ln k_{el} \cdot T_{max}$$

Надо иметь в виду, что для проведения формальной проверки соответствия распределения определенного показателя нормальному или лог-нормальному закону в случае исследования биоэквивалентности обычно не хватает данных (при  $n=20, 30$ ). Поэтому, если не возникает явного противоречия с данными, анализ проводят в предположении о лог-нормальном распределении параметра  $AUC$  и  $C_{max}$ . Отказ от проведения логарифмического преобразования для этих показателей должен быть обоснован в протоколе исследования. Вообще, в соответствии с правилами, протокол исследования должен отражать предположения о форме распределения выбранных показателей эквивалентности, а также включать их индивидуальные значения, попарные индивидуальные различия (или отношения), средние значения (арифметические и геометрические), средние значения различий (или отношений), соответствующие стандартные отклонения и коэффициенты вариации. Желательно также представлять гистограммы распределения различий и логарифмических отношений основных показателей биоэквивалентности ( $AUC, C_{max}$ ) [21].

Согласно правилам, статистическая проверка биоэквивалентности состоит в статистическом сравнении средних значений параметров, выбранных в качестве показателей биоэквивалентности (например,  $AUC$  и  $C_{max}$ ), с помощью интервального критерия. Если два таких средних значения оказываются «достаточно близкими» (не обязательно равными), препараты считаются биоэквивалентными.

Авторы [16] пришли к выводу, что для целей исследований биоэквивалентности более корректной формальной формулировкой эквивалентности, с точки зрения статистики, является не традиционная нулевая гипотеза об отсутствии различий, а соответствующая ей альтернативная гипотеза. Таким образом, в случае исследований биоэквивалентности нулевая гипотеза состоит в том, что сравниваемые препараты не эквивалентны, тогда соответствующая ей альтернативная ги-

потеза состоит в том, что препараты эквивалентны. Это позволило связать известные в статистике ошибки первого и второго рода при тестировании статистических гипотез с существующими ошибками или, другими словами, рисками, возникающими в области анализа биоэквивалентности. При проведении подобного анализа существует два типа ошибок или рисков, которые нужно принимать во внимание и, по мере возможностей, стараться снизить. Первая ошибка (соответствует  $\alpha$  – вероятности ошибки первого рода) – так называемый «риск потребителя», который заключается в том, что в результате тестирования существует вероятность признания неэквивалентных препаратов биоэквивалентными. Второй тип ошибки риска – так называемый «риск производителя», который заключается в наличии ненулевой вероятности не признать в результате тестирования биоэквивалентные препараты таковыми. Обычно организации, регламентирующие исследования биоэквивалентности, стараются снизить риск потребителя и предоставляют возможность фармацевтической компании решать, какая величина риска производителя является для нее приемлемой. Влиять на величину риска производителя можно с помощью выбора подходящего числа испытуемых (объема выборки). Вопросы определения необходимого числа испытуемых для проведения исследований биоэквивалентности помощью различных статистических тестов рассмотрены в работах [3,6,7,10,18].

Пусть  $\mu_T$  и  $\mu_R$  – генеральные средние показателя биоэквивалентности для тестового и стандартного препаратов. Гипотеза о биоэквивалентности может быть сформулирована в терминах отношения сравниваемых параметров или в терминах их абсолютных различий. Для параметров  $AUC$  и  $C_{max}$  обычно принято сравнение отношений. Если  $Q_1$  и  $Q_2$  – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, нулевая гипотеза об отсутствии эквивалентности может быть записана как:

$$H_0: \mu_T/\mu_R < Q_1 \text{ или } \mu_T/\mu_R > Q_2,$$

а соответствующая альтернативная гипотеза о наличии биоэквивалентности формулируется как:

$$H_A: Q_1 \leq \mu_T/\mu_R \leq Q_2$$

В случае проведения логарифмического преобразования формулировка гипотез также трансформируется:

$$H_A: \delta_1 \leq \mu_T - \mu_R \leq \delta_2,$$

где  $\delta_i = \ln(Q_i)$ , при  $i=1,2$ ; в этом случае  $\mu_T - \mu_R$  – разность средних значений показателя биоэквивалентности, соответствующая логарифмической трансформации. Такой же вид гипотезы соответствует тестированию абсолютных различий.

Для отношений биоэквивалентности были выбра-

ны допустимые пределы. Если рассматривается абсолютная арифметическая разница между средними, соответствующими допустимыми пределами различий считаются 20% от значения параметра  $\mu_R$  (0,8 – 1,2). Эти пределы, однако, не являются инвариантными к обратному преобразованию, поскольку величина, обратная 0,8, равна 1,25. А это значит, что, несмотря на кажущуюся симметрию этих пределов, вывод об эквивалентности двух препаратов зависит от того, какой препарат считается тестовым, а какой стандартным. Кроме того, часто анализируются не сами AUC, а их натуральные логарифмы lnAUC. Тогда значениям пределов 0,8 – 1,2 будут соответствовать также несимметричные пределы –0,223 и 0,183. Поэтому в настоящее время приняты значения пределов 0,8 – 1,25 для отношений показателей [21].

Процедура тестирования интервальных гипотез типа  $H_A$  или  $H'_A$  производится с помощью их декомпозиции и проверки двух соответствующих односторонних тестов для выбранных пределов эквивалентности  $\delta_1$  и  $\delta_2$ :

$$H'_{01} : \mu_T - \mu_R < \delta_1 \quad H'_{A1} : \mu_T - \mu_R \geq \delta_1$$

и

$$H'_{02} : \mu_T - \mu_R > \delta_2 \quad H'_{A2} : \mu_T - \mu_R \leq \delta_2.$$

Вывод об эквивалентности в результате тестирования гипотез может быть сделан, если на одном и том же уровне значимости удастся отвергнуть обе нулевые гипотезы  $H'_{01}$  и  $H'_{02}$ , а значит, и общую интервальную гипотезу  $H_0$ . Каждая составляющая данной гипотезы проверяется по стандартной процедуре тестирования простой односторонней гипотезы на одном и том же выбранном уровне значимости  $\alpha$ . Например, в случае нормального распределения, по критерию Стьюдента рассчитываются тестовые статистики вида [32]:

$$t_1 = \frac{(\bar{X}_T - \bar{X}_R) - \delta_1}{\sigma\sqrt{2/n}} \quad \text{и} \quad t_2 = \frac{\delta_2 - (\bar{X}_T - \bar{X}_R)}{\sigma\sqrt{2/n}}$$

где  $\sigma^2$  – средний квадрат «ошибки» MSE, предоставляемый анализом вариации. Рассчитанные значения статистик сравниваются с табличным для одностороннего теста и уровня значимости обычно равного 5%.

В исследованиях биоэквивалентности процедура проверки двух таких односторонних гипотез приводит к установлению биоэквивалентности в том случае, если  $100 \cdot (1 - 2 \cdot \alpha) \%$  доверительный интервал для различий (или отношений) полностью располагается внутри выбранного интервала эквивалентности. Поэтому в настоящее время для проверки биоэквивалентности обычно вычисляются 90% доверительные интервалы и проверяется, находятся ли они внутри выбранных пределов эквивалентности. Это соответствует проверке двух односторонних тестов на уровне значимости 5%. В настоящее время принято к индивидуальным вычис-

ленным показателям AUC<sub>ij</sub> применять логарифмическое преобразование и весь последующий анализ проводить для этих трансформированных величин. Вычисленные границы 90% доверительного интервала для выборочной средней разности lnAUC подвергаются преобразованию, обратному взятию натурального логарифма ( $\exp\{\ln AUC\}$ ), полученные значения сравниваются с пределами эквивалентности (0,8; 1,25). Избежать обратного преобразования можно, сравнив полученные значения для границ доверительного интервала с пределами эквивалентности по логарифмической шкале (–0,223; 0,223). Логарифмическое преобразование применяется и для переменной  $C_{max}$ . В общем случае для отношений  $C_{max}$  устанавливаются те же допустимые пределы эквивалентности, что и для переменной AUC.

Значения пределов биоэквивалентности обсуждаются и в настоящее время. Так, для отношений  $C_{max}$  были предложены границы (0,7; 1,43) [7,27]. Аргументом в пользу такого расширения допустимых пределов для отношений  $C_{max}$  было замечание, что такой экстремальный параметр, как  $C_{max}$ , основанный на единственном измерении, имеет большую вариацию, чем интегральный показатель AUC. Есть предложение также установить для препаратов с узким терапевтическим коридором более жесткие допустимые границы, скажем (0,9; 1,11) для AUC и (0,8; 1,25) для  $C_{max}$  [7]. В любом случае выбор допустимых пределов биоэквивалентности должен быть основан не только на статистических, но и на клинических данных и соображениях, аналогично выбору «клинически значимого различия». При этом авторы [27] не исключают, что для некоторых антибиотиков такие границы могут быть даже односторонние, например (0,8; ∞).

Известно несколько способов построения доверительных интервалов для разности или отношения показателей биоэквивалентности: на основе парного критерия Стьюдента; на основе остаточной вариации, предоставляемой дисперсионным анализом ANOVA для перекрестного дизайна АВ/ВА; симметричные интервалы, предложенные Westlake; специальные непараметрические процедуры [27, 32, 38, 39, 41, 42].

В случае построения 90%-ного доверительного интервала для разности средних значений ( $\bar{d} = \mu_T - \mu_R$ ) с помощью дисперсионного анализа ANOVA для сбалансированного (число пациентов в обеих подгруппах А и В одинаково и равно  $n/2$ ) перекрестного дизайна АВ/ВА границы могут быть вычислены по формуле:

$$\bar{d} \pm t(n-2; 0,9) \cdot \sqrt{2 \cdot MSE / n},$$

где  $n$  – общее число включенных в исследование субъектов, MSE – средний квадрат ошибки, оцененный с помощью метода ANOVA,  $t(n-2; 0,9)$  – коэффициент Стьюдента (определяется по соответствующим таблицам) для числа степеней свободы  $n-2$  и двустороннего 10% уровня.

Тогда 90%-ный доверительного интервала для отно-

шений средних значений ( $\mu_T/\mu_R$ ) с помощью дисперсионного анализа ANOVA для сбалансированного перекрестного дизайна АВ/ВА строится по формуле:

$$(\bar{X}_T \pm t(n-2; 0,9) \sqrt{2 \cdot MSE / n}) / \bar{X}_R.$$

Если в выбранной математической модели данных постулируется отсутствие эффекта периода наблюдения, и исследование биоэквивалентности проводится в соответствии с обычным перекрестным дизайном, предыдущие формулы несколько изменяются:

$$\begin{aligned} & \bar{d} \pm t(n-1; 0,9) \cdot S_d / \sqrt{n}, \\ & (\bar{X}_T \pm t(n-1; 0,9) \cdot S_d / \sqrt{n}) / \bar{X}_R, \end{aligned}$$

где  $S_d$  – стандартное отклонение попарных различий. Таким образом, в данном случае доверительные интервалы базируются на парном критерии Стьюдента.

В случае незначительного влияния периода наблюдения первые два метода будут давать практически совпадающие интервалы. Метод, предложенный Westlake [41, 42], предоставляет доверительный интервал, симметричный относительно точки отсутствия различий. Далее нами будет приведена одна из непараметрических процедур.

Рассмотренные до сих пор статистические методы проверки биоэквивалентности были параметрическими, то есть предполагали нормальное или лог-нормальное распределение сравниваемых параметров. Для решения этой задачи применяются и непараметрические методы. Так, поскольку такая переменная, как  $T_{max}$ , по своей природе не может иметь нормальное или лог-нормальное распределение, рекомендуется применять непараметрические методы анализа. Однако для небольшого объема выборок, часто используемых в таких исследованиях (20, 30 испытуемых), традиционные непараметрические методы являются недостаточно эффективными. Обзор непараметрических методов, применяемых в таких исследованиях, приведен в работах [27, 37].

Остановимся подробнее на одном из таких свободных от предположений о распределении методов, используемых при проверке биоэквивалентности. Он представляет собой некоторое обобщение теста знаковых рангов Уилкоксона [38, 39]. Как было сказано выше, для проверки биоэквивалентности строятся доверительные интервалы для отношений биодоступности  $AUC(\text{test})/AUC(\text{standard})$  в предположении конкретной формы их распределения. Метод Уилкоксона позволяет построить такие интервалы без учета формы распределения и, кроме того, позволяет построить распределение вероятностей для таких значений отношений биодоступности. Для данной процедуры предполагается, что в результате исследования, выполненного в соответствии с перекрестным планом, было получено  $n$  индивидуальных значений отношений биодоступности  $g_i = AUC_i(\text{test})/AUC_i(\text{standard})$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ). Для всех по-

лученных значений  $g_i$  вычисляются значения геометрических средних  $g_{ij} = \sqrt[r_i]{g_j}$  (для всех значений  $i$  меньше или равных  $j$ ,  $j = 1, 2, \dots, n$ ), всего  $n(n+1)/2$  значений  $g_{ij}$ . Полученные значения геометрических средних ранжируются от меньшего к большему. Не вдаваясь в математические подробности (они подробно рассмотрены в [37]), можно сказать, что для наиболее распространенного случая  $n=18$  искомые границы 95%-ного доверительного интервала задаются 41-ым (нижняя граница) и 131-ым (верхняя граница) значениями ранжированных геометрических средних (для  $n=24$  между 82 и 219 средним). Поскольку при наличии биоэквивалентности индивидуальные отношения AUC должны распределяться вокруг 1, а доверительные интервалы для среднего отношения не должны выходить за пределы (0,8, 1,25), построенная гистограмма распределения индивидуальных геометрических средних дает наглядное представление о соответствии имеющихся данных гипотезе о биоэквивалентности. Строго гипотезу о равенстве единице медианного элемента распределения геометрических средних проверяют с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Для этого вычисляются отдельно суммы рангов геометрических средних в ранжированном ряду, больших и меньших единичного значения. Меньшую из двух таких сумм сравнивают с соответствующим табличным значением. Медианой распределения в случае  $n=18$  является 86 элемент в ранжированном ряду. Кроме того, визуальный анализ такого распределения может позволить выявить мультимодальность распределения для некоторых лекарственных препаратов. Такое возможно в случае, если среди испытуемых выделяются субъекты, например, с высокой и низкой скоростью метаболизма одного из препаратов.

### Резко отличающиеся наблюдения

Последнее обстоятельство, в соответствии с имеющимися правилами, требует специального рассмотрения и отражения в протоколе исследования. Резко отклоняющиеся наблюдения (outliers) в исследовании биоэквивалентности, обычно проводящегося по перекрестной схеме, означают, что у одного или нескольких субъектов значения различий или отношений индивидуальных показателей биодоступности существенно отличаются от значений у основной группы. Это может быть связано либо с недостатками сравниваемого препарата (например, с особенностями его растворимости), либо с наличием малочисленных подпопуляций, у которых относительная биодоступность сравниваемых препаратов значимо отличается от значений, характерных для остальной популяции. Для этой подпопуляции эти препараты являются небиоэквивалентными даже, если они будут признаны биоэквивалентными в среднем. Для проверки таких резко выделяющихся наблюдений разра-

ботаны специальные статистические тесты. В случае одного выделяющегося наблюдения наиболее часто применяется тест, основанный на проверке студентизированного остатка [25]. Тем не менее, резко выделяющиеся наблюдения не могут быть автоматически исключены из анализа только на основании проверки статистического теста. В случае если статистический анализ показал наличие таких наблюдений, необходимо привести в протоколе научное объяснение этого явления и доказательство справедливости исключения данных этих субъектов из последующего анализа.

#### **Программа BIOEQV для проведения статистического анализа данных исследования биоэквивалентности**

Разработанная Бондаревой И.Б. программа BIOEQV применялась в течение последних 6 лет для статистической обработки данных исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов. Эта программа позволяет оценивать немодельным способом основные фармакокинетические показатели, выбранные для демонстрации биоэквивалентности, по результатам проведенных измерений концентрации и проводить полный статистический анализ для оценки биоэквивалентности «в среднем». Моменты фармакокинетической кривой ( $AUC$ ,  $MRT$  – среднее резидентное время,  $VRT$  – дисперсия среднего резидентного времени) рассчитываются с помощью численного интегрирования методом трапеций, показатели  $C_{max}$  и  $T_{max}$  фиксируются непосредственно по измеренным значениям. Обо всех полученных таким образом показателях для тестового препарата и стандарта предоставляется полная параметрическая (средние значения, дисперсии, коэффициенты вариации) и непараметрическая (максимальные и минимальные значения, размах, медианы, квартили) статистика. Информация предоставляется также об индивидуальных и средних различиях (или отношениях) показателей. Набор процедур для статистического анализа данных включает: анализ вариаций, построение доверительных интервалов (95 и 90%) параметрическими и непараметрическими способами, построение гистограмм распределения попарных геометрических средних индивидуальных отношений  $AUC$  и  $C_{max}$  (в предположении их лог-нормального распределения) и критерий Уилкоксона, парный критерий Стьюдента и построение графиков индивидуальных различий.

Правильность работы программы BIOEQV была верифицирована по приведенным в статьях [31, 39] данным исследований и приведенным там же результатам, полученным с помощью другого программного обеспечения. Этот вопрос подробно обсуждался в [3].

#### **Представление результатов статистического анализа в отчете**

В соответствии с правилами [21], все измеренные значения концентрации у всех включенных субъектов должны быть представлены в отчете в нетрансформированном виде. Все рассчитанные индивидуальные значения фармакокинетических показателей для всех включенных субъектов должны быть также представлены в отчете нетрансформированными. Средние значения, стандартные отклонения и коэффициенты вариации (параметрическая статистика) для всех выбранных показателей сравнения должны быть продемонстрированы.

Отчет исследования биоэквивалентности должен отражать статистические предположения о форме распределения выбранных показателей эквивалентности, что определяют последующий выбор процедур для проведения статистических сравнений. Для показателей  $AUC$  и  $C_{max}$  (в случае предположения о лог-нормальном распределении), кроме значений арифметических средних для тестового препарата и стандарта, должны быть показаны геометрические средние значения (антилогарифм от соответствующего арифметического среднего логарифмированных значений) и средние значения после логарифмического преобразования, а также соответствующие стандартные отклонения. Кроме того, независимо от предположения о законах распределения, желательно демонстрировать в отчете также непараметрическую статистику для выбранных показателей биоэквивалентности (медиана, мода, минимальное и максимальное значение, квантили, размах и т.п.).

Для иллюстрации статистических сравнений индивидуальные значения показателей биоэквивалентности для тестового препарата ( $T$ ) и стандарта ( $R$ ) должны быть представлены параллельно в виде параллельных столбцов таблицы. Для показателей  $AUC$  и  $C_{max}$  должны быть показаны не только индивидуальные значения разностей ( $T-R$ ), но и индивидуальные значения отношений ( $T/R$ ) и логарифмов таких отношений ( $\log T/R$  или  $\ln T/R$ ) для каждого включенного субъекта. Для каждого субъекта исследования в результирующей таблице должна быть указана последовательность получения сравниваемых препаратов. Также желательно представить в отчете гистограммы распределения значений попарных разностей или логарифмов отношений для основных показателей ( $AUC$ ,  $C_{max}$ ).

В отчете должны быть продемонстрированы результаты оценок доверительных интервалов, а также предоставлена вся информация о статистических методах, применявшихся для проверки гипотезы о биоэквивалентности сравниваемых препаратов для всех выбранных показателей.

Программа BIOEQV позволяет провести все требуемые статистические расчеты и получить все индивидуальные значения показателей и их статистические параметры, которые необходимы для формирования отчета и заключения.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов // МЗ РФ, Москва, 2001.
2. Сергеев В.И., Бондарева И.Б. «Математическая статистика в клинических исследованиях» // «Экстрем Медицина», Москва, 2000.
3. Сергеев В.И., Дзельдифф Р., Бондарева И.Б. «Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение» // Москва, Издательство РАМН, 2003.
4. Benet LZ., Goyan JE. «Bioequivalence and Narrow Therapeutic Index Drugs» // Pharmacotherapy 15(4): 433-440, 1995.
5. Chen M-L., Patnaik R., Hauck WW, et al. «An Individual Bioequivalence Criterion: Regulatory Consideration» // Statistics in Medicine 19(20): 2821-2842, 2000.
6. Diletti E., Hauschke D., Steinijans V.W. «Sample Size Determination for Bioequivalence Assessment by Means of Confidence Intervals» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 29(1): 1-8, 1991.
7. Diletti E., Hauschke D., Steinijans V.W. «Sample Size Determination: Extended Tables for the Multiplicative Model and Bioequivalence Ranges of 0.9 to 1.11 and 0.7 to 1.43» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 30(8):287-290, 1992.
8. Endernyi L., Fritsch S., Yan W. «Cmax/AUC Is a Clearer Measure Than Cmax for Absorption Rates in Investigations of Bioequivalence» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 29(10): 394-399, 1991.
9. Endernyi L., Taback N., Tothfalusi L. «Properties of the Estimated Variance Component for Subject-by-formulation Interaction in Studies of Individual Bioequivalences» // Statistics in Medicine 19(20): 2867-2878, 2000.
10. Eshhart J.D., Chinchilli V.M. «Sample Size Considerations for Assessing Individual Bioequivalence Based on the Method of Tolerance Intervals» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 32(1): 26-32, 1994.
11. Fluehler H., Hirtz J., Moser H.A. «An Aid to Decision – Making in Bioequivalence Assessment» // J Pharmacokin Biopharm 9(2): 235-243, 1981.
12. Gould AL. «Discussion of Individual Bioequivalence by M.-L. Chen» // J Biopharm Stat 7(1): 23-29, 1997.
13. Gould AL. «A Practical Approach for Evaluating Population and Individual Bioequivalences» // Statistics in Medicine 19(20): 2721-2740, 2000.
14. Grieve A.P. «Evaluation of Bioequivalence Studies» // Eur J Clin Pharmacol 40: 201-203, 1991.
15. Grizzle J.E. «The Two-Period Change-Over Design and Its Use in Clinical Trials» // Biometrics, June 1965.
16. Hauck W.W., Anderson S. «Types of Bioequivalence and Related Statistical Considerations» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 30(5): 181-187, 1992.
17. Hauschke D., Steinijans V.W. «The U.S. Draft Guidance Regarding Population and Individual Bioequivalence Approaches: Comments by Research-based Pharmaceutical Company» // Statistics in Medicine 19(20): 2769-2774, 2000.
18. Hauschke D., Steinijans V.W., Diletti E., et al. «Presentation of the Intrasubject Coefficient of Variation for Sample Size Planning in Bioequivalence Studies» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 32(7): 376 – 378, 1994.
19. Hills M., Armitage P. «The Two-Period Cross-Over Clinical Trial» // Br J Clin Pharmacol 8: 7-20, 1979.
20. Hsuan FC. «Some Statistical Considerations on the FDA Draft Guidance for Individual Bioequivalences» // Statistics in Medicine 19(20): 2879-2884, 2000.
21. In vivo bioequivalence guidances // U.S. Pharmacopeia 24-NF 19, National Formulary, Supplement 1090, 2000.
22. Ju H.L. «On TIER Method for Assessment of Individual Bioequivalence» // J Biopharm Statist, 7(1): 63-85, 1997.
23. Liu J.P., Chow S.-C. «A Two One-Sided Tests Procedure for Assessment of Individual Bioequivalence» // J Biopharm Stat 7(1): 49-61, 1997. Liu J.P., Weng C.S. «Estimation of Direct formulation Effect under log Normal Distribution in Bioavailability/Bioequivalence Studies» // Statistics in Medicine 11: 881-896, 1992.
24. Lund RE. «Tables for an Approximate Test for Outliers in Linear Models» // Technometrics, Vol. 17(4): 473-476, 1975.
25. Mandallaz D., Mau J. «Comparison of Different Methods for Decision-Making in Bioequivalence Assessment» // Biometrics 37: 213-222, 1981.
26. Pabst G., Jaeger H. «Review of Methods and Criteria for the Evaluation of Bioequivalence Studies» // Eur J Clin Pharmacol 38: 5-10, 1990.
27. Phillips K.F. «Power of the Two One-Sided Tests Procedure in Bioequivalence» // J pharmacokin Biopharm 18(2): 137-144, 1990.
28. Rescigno A. «Rate of Absorption» // Pharmacological Research 35(1): 5-6, 1997. Rescigno A., Powers J.D. «AUC and Cmax Are Not Sufficient to Prove Bioequivalence» // Pharmacological Research 37(2):93-95, 1998.
29. Sauter R., Steinijans V.W., Diletti E., et al. «Presentation of Results from Bioequivalence Studies» // Internat J Clin Pharmacol, Ther and Toxicol 30(7): 233-256, 1992.
30. Schuurmann D.J. «A Comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and Power Approach for Assessing the Equivalence of Average Bioavailability» // J Pharmacokin Biopharm 15(6): 657-680, 1987.
31. Selwyn MR., Dempster AP., Hall NR. «A Bayesian Approach to Bioequivalence for 2X2 Changeover Design» // Biometrics 37: 11-21, 1981.
32. Senn S. «Statistical Issues in Drug Development» // John Wiley & Sons, 1997.
33. Steinijans V.W., Hauschke D. «International harmonization of Regulatory Requirements» // Clinical Research and Regulatory Affairs 10: 203-220, 1993.
34. Steinijans V.W., Hauschke D., Schall R. «International harmonization of Regulatory Requirements for Average Bioequivalence and Current Issue in Individual Bioequivalence» // Drug Information Journal 29: 1055-1062, 1995.
35. Steinijans V.W., Hauschke D. «Update on Statistical Analysis of Bioequivalence Studies» // Intern J Clin Pharmacol, Ther and Toxicology 28(3): 105-110, 1990.
36. Steinijans V.W., Diletti E. «Generalization of Distribution-Free Confidence Intervals for Bioavailability Ratios» // Eur J Clin Pharmacol 28: 85-88, 1985.
37. Steinijans V.W., Diletti E. «Statistical Analysis of Bioavailability Studies: Parametric and Nonparametric Confidence Intervals» // Eur J Clin Pharmacol 24: 127-136, 1983.
38. Weltek S. «A Comment on So-Called Individual Criteria of Bioequivalence» // J Biopharm Stat 7(1): 17-21, 1997.
39. Westlake W.J. «Response to Bioequivalence Testing: a Need to Rethink» // Biometrics 37: 591-993, 1981.
40. Westlake W.J. «Symmetrical Confidence Intervals for Bioequivalence Trials» // Biometrics, 32: 741-744, 1976.
41. Yafune A., Ishiguro M. «Bootstrap Approach for Constructing Confidence Intervals for Population Pharmacokinetic Parameters. I: a Use of Bootstrap Standard Error» // Statistics in Medicine 18(5): 581-599, 1999.