

## **Gyógyszerkészítmények stabilitás- vizsgálatának statisztikai értékelése**

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products (Q1A(R2)), 2003

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Evaluation for Stability Data (Q1E), 2003

A stabilitásvizsgálat célja annak megállapítása, hogy az idő múlásával a különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, nedvességtartalom, fény stb.) hatására hogyan változik az adott gyógyszer minősége. Ennek alapján az ajánlott tárolási körülmények és az eltarthatósági idő meghatározása.

Stabil az a gyógyszerkészítmény, amelynek jellemző és lényeges tulajdonságai az előírt tárolás esetén felhasználhatóságának egész időtartama alatt csak a készítményre vonatkozó minőségi előírásokban rögzített határértéken belül változnak meg.

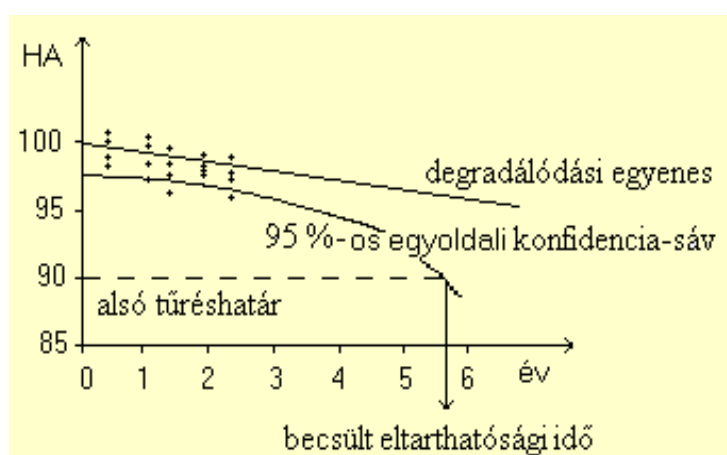
A stabilitásvizsgálat típusai

- Hosszúlejáratú (Long-term)
- Közbenső (Intermediate)
- Gyorsított (Accelerated)

A stabilitásvizsgálat típusa	Tárolási körülmények	A vizsgálat minimális ideje
Hosszúlejáratú	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5\% \text{ RH}$ vagy $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\% \text{ RH}$	12 hónap
Közbenső	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65 \pm 5\% \text{ RH}$	6 hónap
Gyorsított	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\% \text{ RH}$	6 hónap

Itt a hosszúlejáratú vizsgálat adatainak elemzéséről lesz szó.

Az alapvető módszer:



Szakmai szempontból:

egyetlen sarzs

több sarzs

több dózis-egység (hatáserősség)

több kiszereelés

redukált tervek (matrixing, bracketing)

Statisztikai szempontból:

regresszió-analízis (konfidencia-sáv)

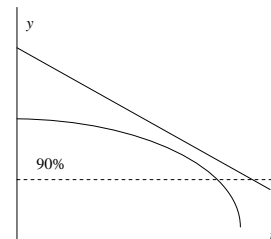
varianciaanalízis, hipotézisvizsgálat

General Linear Model (a kettő

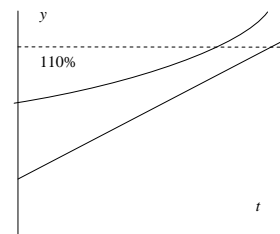
kombinációja)

Eltarthatósági idő:

- ha a kvantitatív tulajdonság csökkenésére kell számítani (pl. hatóanyag-tartalom), alsó 95%-os sáv



- ha a kvantitatív tulajdonság növekedésére kell számítani (pl. bomlástermék koncentrációja) felső 95%-os sáv



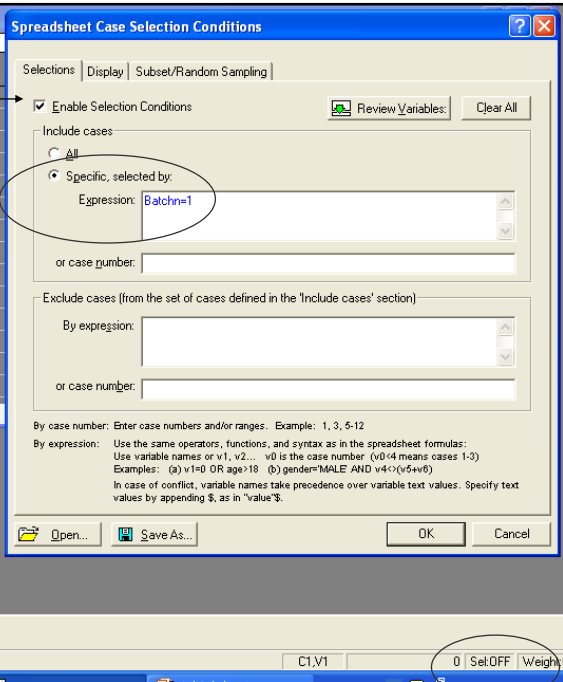
- ha előre nem tudjuk, hogy csökkenni vagy növekedni fog, kétoldali 95% sáv

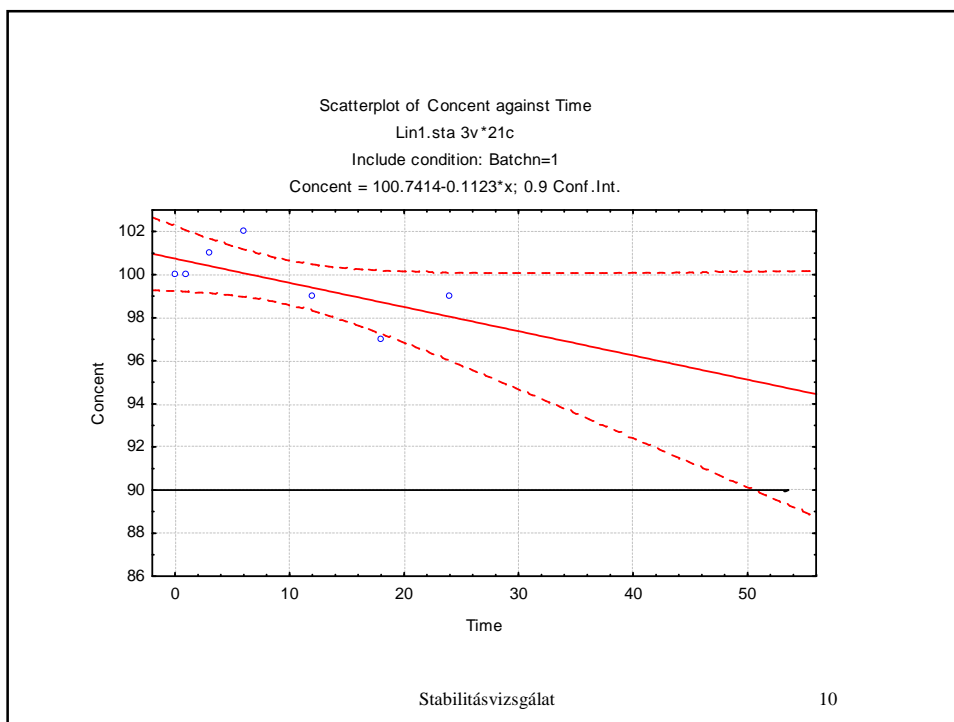
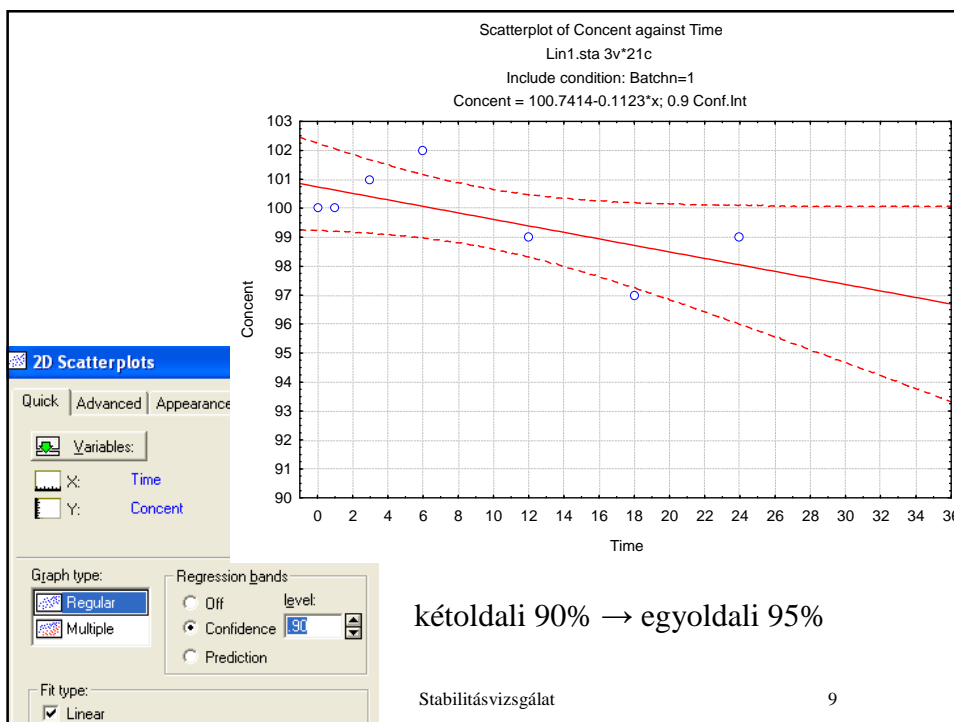
1. példa

Eltarthatósági idő becslése egyetlen sarzs adataiból

Lin1.sta      1. sarzs

Sel  
Graphs> Scatterplots





### A reziduumok grafikus vizsgálata (lineáris időfüggés?)

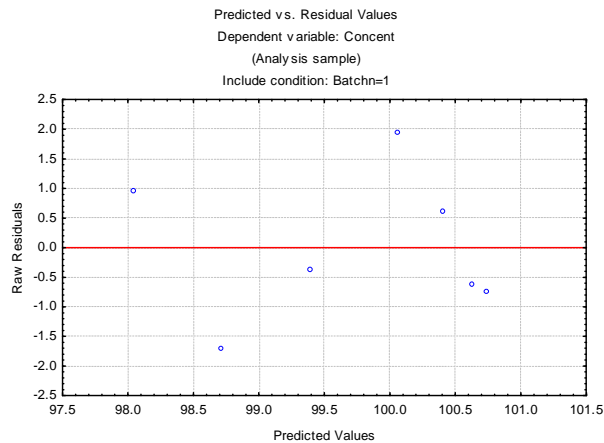
Statistics>Advanced Linear/Nonlinear Models>General Linear Models>Simple regression

Dependent variables: Concent

Predictor variable: Time

Resids fülön:

Pred. & Resids



Stabilitásvizsgálat

11

### A degradálódási függvény jellegének meghatározása (egyenes?)

A kinetika ismert lehet, például a hatóanyag-tartalom csökkenése általában nullad- vagy elsőrendű reakció szerint zajlik 15%-os bomlásig csekély a különbség: célszerű a statisztikai értékeléshez a nulladrendű reakciót (a lineáris modellt) választani.

$$y = y_0 - k_0 t$$

$$y = y_0 e^{-k_1 t}$$

Taylor-sorral közelítve  $t=0$  környékén:  $y \approx y_0 - y_0 k_1 t$

Stabilitásvizsgálat

12

A választott degradálódási függvény jóságát megfelelő statisztikai módszerekkel mindig igazolni kell.

Ha a kinetika nem ismert (pl. kioldódási adatok), célszerű mindig a lineáris modellel kezdeni. Csak akkor lépünk tovább a bonyolultabb négyzetes, exponenciális vagy logaritmusos függvények felé, ha a lineáris függvény jósága statisztikai módszerekkel nem igazolható.

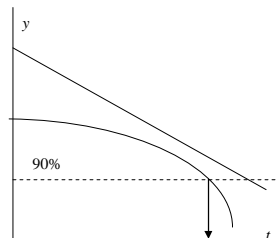
A mért stabilitási adatok alapján interpolációval vagy extrapolációval adhatunk becslést a várható eltarthatósági időre.

A vizsgálati időintervallumon túli extrapoláció csak abban az esetben engedélyezett, ha a gyorsított stabilitásvizsgálat ill. az esetlegesen helyette indított közbenső stabilitásvizsgálat során nem tapasztalható szignifikáns változás.

Az extrapoláció során feltételezzük, hogy a degradáció jellege a vizsgálati időszakon túl is az előzőekhez hasonlóan alakul. Mivel azonban ebben sohasem lehetünk teljesen biztosak, az ICH Guideline csak limitált extrapolációt engedélyez.

Példaként a hatóanyag-tartalom csökkenésének esete

$$\hat{Y} - t_{\alpha} s_y \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_j (x_j - \bar{x})^2}} < Y$$



Az eltarthatósági idő nagyobb, ha soványabb a konfidencia-sáv:  
mérés bizonytalansága  $\rightarrow s_y$  minél kisebb legyen  
mérési pontok száma  $\rightarrow n$  minél nagyobb legyen  
mérési pontok elhelyezkedése  $\rightarrow$

A mérési pontok száma növelhető:

- mérések több időpontban: nem szokás
- mérések több ismétléssel: tipikusan több tabletta 1-1 analízise
- több sarzs

A becsült eltarthatósági időnek az összes jövőbeli, hasonló körülmények között gyártandó sarzsra érvényesnek kell lennie  $\rightarrow$  több sarzsot kell vizsgálni.

ICH Guideline: minimálisan három sarzs vizsgálandó.



## A sarzsok egyesítése

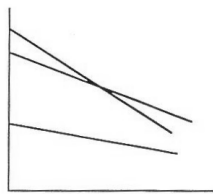
A sarzsok egyesítésére akkor van lehetőség, ha a sarzsok közti ingadozás kismértékű.

A sarzsok egyesítésének feltétele, hogy a vizsgált sarzsok degradálódási profilja hasonló legyen, azaz az egyes sarzsokra illesztett degradálódási görbe (egyenes) azonos legyen.

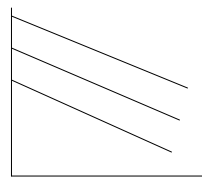
A vizsgált sarzsokra illesztett egyenesek akkor tekinthetők azonosaknak, ha paramétereik - meredekségük és tengelymetszetük - azonosak.

## Több sarzs egyesíthetőségének vizsgálata

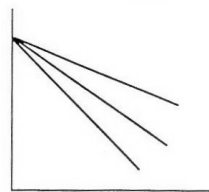
I. Mind a meredekség, mind a tengelymetszet különböző



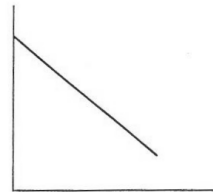
II. Azonos meredekség



III. Azonos tengelymetszet



IV. Azonos meredekség és tengelymetszet



A kiindulási ( $D$ ) modell: az adatokra sarzsonként különböző meredekségű és tengelymetszetű egyenest illesztünk

$$y_{ijk} = \alpha_i + \beta_i x_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$y_{ijk}$  az  $i$ -edik sarzs mért hatóanyag-tartalma a  $j$ -edik vizsgálati időpont  $k$ -adik ismételt mérésekor

$\alpha_i$  az  $i$ -edik sarzsra illesztett egyenes tengelymetszete (kiindulási hatóanyag-tartalom)

$\beta_i$  az  $i$ -edik sarzsra illesztett egyenes meredeksége (degradálódási ráta)

$x_{ij}$  az  $i$ -edik sarzs  $j$ -edik vizsgálati időpontja

$\varepsilon_{ijk}$  véletlen hiba

$C$  modell: ha csak a meredekségek azonosságára vonatkozó nullhipotézis teljesül

$$y_{ijk} = \alpha_i + \beta x_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$\alpha_i$  az  $i$ -edik sarzsra illesztett egyenes tengelymetszete

$\beta$  az összes adatra illesztett közös meredekség

**B** modell: az adatokra sarzsónként különböző meredekségű de azonos tengelymetszetű egyenest illesztünk

$$y_{ijk} = \alpha + \beta_i x_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$y_{ijk}$  az  $i$ -edik sarzs mért hatóanyag-tartalma a  $j$ -edik vizsgálati időpont  $k$ -adik ismételt mérésekor

$\alpha$  a közös tengelymetszet (kiindulási hatóanyag-tartalom)

$\beta_i$  az  $i$ -edik sarzsra illesztett egyenes meredeksége (degradálódási ráta)

$x_{ij}$  az  $i$ -edik sarzs  $j$ -edik vizsgálati időpontja

$\varepsilon_{ijk}$  véletlen hiba

A **D** modellel azonosnak szokták venni, nincs gyakorlati jelentősége.

**A** modell: ha mind a meredekségek, mind a tengelymetszetek azonosságát elfogadjuk

$$y_{ijk} = \alpha + \beta x_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$\alpha$  a közös egyenes tengelymetszete

$\beta$  a közös egyenes meredeksége

Lin, K.K.; Lin, T.Y.D.; Kelly, R.E.: Stability of Drugs, in Statistica in the Pharmaceutical Industry, ed. Buncher, C.B.; Tsay, J.Y., Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, 419-444

Reziduális négyzetösszegek

$$SS_{res} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2$$

$$SS_D = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}_i x_{ij})^2 \quad \hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}_i x_{ij}$$

az egyes sarzsokra külön-külön egyeneseket illesztve kapott reziduális négyzetösszeg

$$SS_C = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta} x_{ij})^2 \quad \hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta} x_{ij}$$

a sarzsok adataira azonos meredekségű, de különböző tengelymetszetű egyeneseket illesztve kapott reziduális négyzetösszeg

$$SS_A = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha} - \hat{\beta} x_{ij})^2 \quad \hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} x_{ij}$$

az összes adatra egy közös egyenest illesztve kapott reziduális négyzetösszeg

	négyzetösszeg	szabadsági fok
különböző meredekség, különböző tengelymetszet	$SS_D = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}_i x_{ij})^2$	$v_D = \sum_{i=1}^r (n_i - 2)$
azonos meredekség, különböző tengelymetszet	$SS_C = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta} x_{ij})^2$	$v_C = \sum_{i=1}^r (n_i - 1) - 1$
azonos meredekség, azonos tengelymetszet	$SS_A = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha} - \hat{\beta} x_{ij})^2$	$v_A = \sum_{i=1}^r n_i - 2$

Az egyesítés feltételeinek ellenőrzésére szekvenciális (lépcsőzetes) vizsgálat: először a meredekségek, majd a tengelymetszetek azonosságát teszteljük („proper order”).

Három eset:

Ha a meredekségek azonosságára vonatkozó nullhipotézist elutasítjuk, akkor a sarzsok adatait nem egyesíthetjük ( $D$  modell).

Ilyenkor minden egyes sarzsra külön-külön ki kell számítani az eltarthatósági időt, sarzsonként egyedi meredekséget és tengelymetszetet alkalmazva. Az így kapott eltarthatósági idők közül a legrövidebb lesz az összes sarzsra elfogadott becsült eltarthatósági idő („minimum approach”).

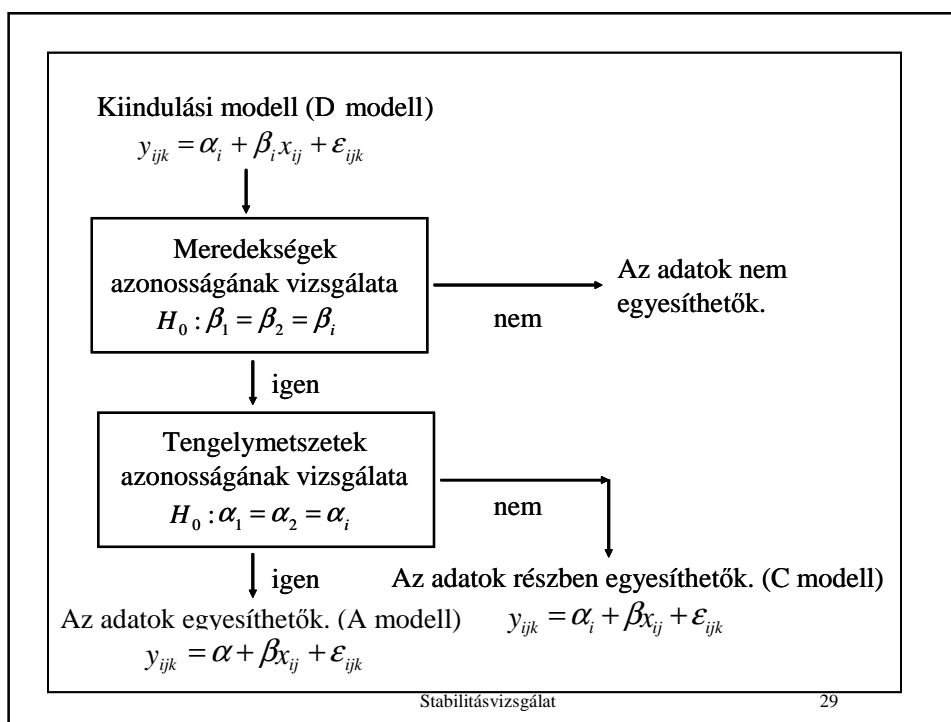
Ha a meredekségek azonosságát elfogadtuk, de a tengelymetszetek azonosságára vonatkozó nullhipotézist elutasítottuk, akkor az adatokat csak a közös meredekség becslésére egyesíthetjük (*C* modell).

A becsült közös meredekséget és az egyedi tengelymetszetet alkalmazva minden egyes sarzsra külön-külön ki kell számítani az eltarthatósági időt, a legrövidebb lesz az összes sarzsra elfogadott becsült eltarthatósági idő.

Ez az eset kedvezőbb az előzőnél, mivel a degradálódási egyenes meredekségét több adatból pontosabb becsléssel szűkebb konfidencia-sávot, s így hosszabb becsült eltarthatósági időt kapunk.

Ha mind a meredekségek, mind a tengelymetszetek azonosságát elfogadtuk, a sarzsok adatai egyesíthetők (*A* modell), azaz az összes adatra egyetlen egyenest illesztve becsülhetjük az eltarthatósági időt.

Ez az eset a legkedvezőbb, hiszen mind a meredekség, mind a tengelymetszet becsléséhez felhasználható lényegesen több mérési adat a konfidencia-sáv további szűkülését, így még hosszabb becsült eltarthatósági időt eredményez.



## Az általános regressziós próba

reziduális (maradék) négyzetösszeg

$$SS_{res} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2$$

$H_0$ : a redukált modell adekvát  $\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta} x_{ij}$

feltétel: a teljes modell adekvát  $\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}_i x_{ij}$

Stabilitásvizsgálat 30

reziduális (maradék) négyzetösszeg

ha a teljes modell, pl.  $\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}_i x_{ij}$  adekvát:

$$SS_r(\text{teljes modell}) = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}_i x_{ij})^2 = \chi^2 \sigma^2$$

$$\nu = \sum_{i=1}^r (n_i - 2) \quad \text{szabadsági fokkal}$$

ha a redukált modell, pl.  $\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta} x_{ij}$  is adekvát:

$$SS_r(\text{redukált modell}) = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta} x_{ij})^2 = \chi^2 \sigma^2 \quad \nu = \sum_{i=1}^r (n_i - 1) - 1$$

$$SS_r(\text{redukált modell}) - SS_r(\text{teljes modell}) = \chi^2 \sigma^2$$

$$\Delta \nu = \sum_{i=1}^r (n_i - 1) - 1 - \sum_{i=1}^r (n_i - 2) \quad \text{szabadsági fokkal}$$

$$F_0 = \frac{[S_r(H_0) - S_r(\text{teljes modell})] / (\Delta \nu)}{S_r(\text{teljes modell}) / \nu_{\text{teljes}}}$$

például

$\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}_i x_{ij}$  külön tengelymetszet, külön meredekség (teljes modell)

$\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta} x_{ij}$  külön tengelymetszet, közös meredekség ( $H_0$ , redukált modell)

$$F_0 = \frac{\frac{SS_C - SS_D}{\nu_C - \nu_D}}{\frac{SS_D}{\nu_D}} \quad \text{F-próba, } \alpha \text{ rögzített}$$



### Vizsgálati lehetőségek kiegyensúlyozott tervre

Nullhipotézis	Alternatív hipotézis	SS	df	MS	$F_0$
<b>Közös meredekség és közös tengelymetszet (A)</b>	<b>Egyedi meredekség és egyedi tengelymetszet (D)</b>	$SS_{AD} = SS_A - SS_D$	$2(r-1)$	$\frac{SS_{AD}}{V_{AD}}$	$\frac{MS_{AD}}{MS_D}$
<b>Közös meredekség és közös tengelymetszet (A)</b>	<b>Közös meredekség és egyedi tengelymetszet (C)</b>	$SS_{AC} = SS_A - SS_C$	$r-1$	$\frac{SS_{BC}}{V_{BC}}$	$\frac{MS_{AC}}{MS_C}$
<b>Közös meredekség és egyedi tengelymetszet (C)</b>	<b>Egyedi meredekség és egyedi tengelymetszet (D)</b>	$SS_{CD} = SS_C - SS_D$	$r-1$	$\frac{SS_{CD}}{V_{CD}}$	$\frac{MS_{CD}}{MS_D}$
Egyedi meredekség és egyedi tengelymetszet (D)		$SS_D$	$N-2r$	$\frac{SS_D}{V_D}$	

Stabilitásvizsgálat

33

Nullhipotézis	Alternatív hipotézis	SS	df	MS	$F_0$
<b>Közös meredekség és egyedi tengelymetszet (C)</b>	<b>Egyedi meredekség és egyedi tengelymetszet (D)</b>	$SS_{CD} = SS_C - SS_D$	$r-1$	$\frac{SS_{CD}}{V_{CD}}$	$\frac{MS_{CD}}{MS_D}$

$\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}x_{ij}$        $\hat{Y}_{ij} = \hat{\alpha}_i + \hat{\beta}_i x_{ij}$

$SS_C = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}x_{ij})^2$        $SS_D = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}_i x_{ij})^2$

$v_C = \sum_{i=1}^r (n_i - 1) - 1$        $v_D = \sum_{i=1}^r (n_i - 2)$

$F_0 = \frac{SS_C - SS_D}{SS_D} = \frac{V_C - V_D}{V_D}$

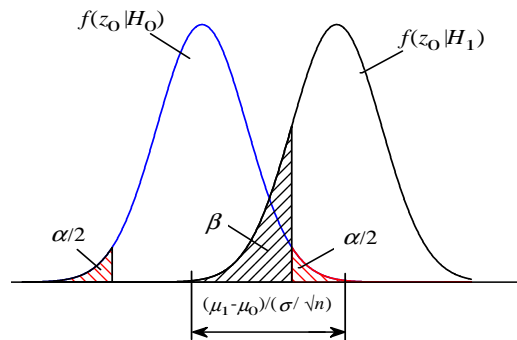
Stabilitásvizsgálat

34

A másodfajú hiba  $\beta$  valószínűségének csökkentésére az ICH Guideline által ajánlott megoldás:

Az elsőfajú hiba kockázatát a szokásos 0.05 helyett 0.25-ra választják

(az elsőfajú hiba valószínűségének növelésével a másodfajú hiba elkövetésének kockázata csökkenthető, azaz a próba ereje növelhető).



(emlékeztető)

Stabilitásvizsgálat

35

A 0.25-os határ kijelölése önkényes, sőt paradox helyzetet teremt:

Igényes stabilitásvizsgálatnál (sok sarzs, hosszú tárolási időtartam, több ismételt mérés, az analitikai mérés jól reprodukálható) már a sarzsok közötti kis különbség is könnyen szignifikánsnak minősíthető 0.25-os szinten (a több mérési pontnak köszönhetően nagyobb szabadsági fokszámú becslést kapunk ill. az  $F$ -próba nevezőjében szereplő viszonyítási szórásnégyzet kicsi).

Felületesen végzett stabilitásvizsgálatnál (kevés sarzs, az ismételt mérések hiánya, pontatlan analitikai mérés) a sarzsok egyesítésére vonatkozó nullhipotézis 0.25-os szinten sokkal könnyebben elfogadható.

Ruberg, S.J.; Stegeman, J.W.: Pooling data for stability studies: testing the equality of batch degradation slopes, *Biometrics*, 47, 1059-1069, (1991)

Stabilitásvizsgálat

36

2. példa: A sarzsok egyesíthetőségének vizsgálata

Lin1.sta

SEL=OFF!

Time (month)	Batch 1	Batch 2	Batch 3
0	100	100	100
1	100	99	99
3	101	100	101
6	102	102	101
12	99	101	100
18	97	100	96
24	99	98	99

Statistics>Advanced Linear/Nonlinear Models>General Linear Models>Homogeneity of slopes

Univariate Tests of Significance for Concent (Lin1.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	98276.37	1	98276.37	48659.94	0.000000
Batchn	0.26	2	0.13	0.06	0.938706
Time	11.70	1	11.70	5.80	0.029401
Batchn*Time	1.14	2	0.57	0.28	0.757252
Error	30.29	15	2.02		

Dependent: Concent  
Categorical pred.: Batchn  
Continuous pred.: Time  
Quick fülön: All effects

Döntés?

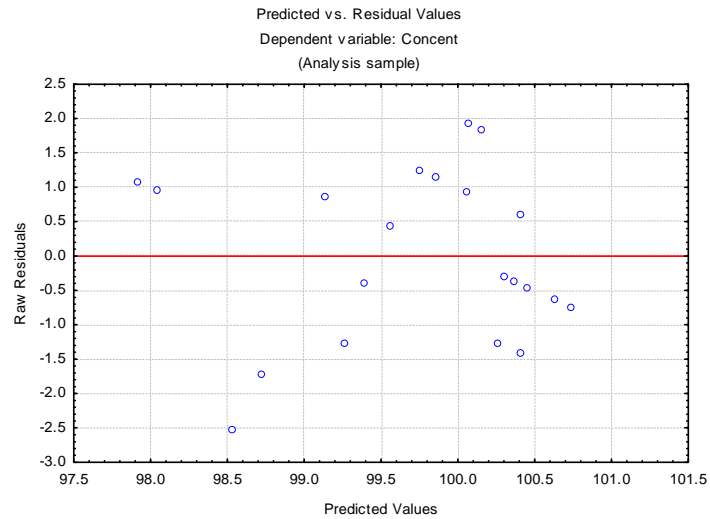
$$SS_D = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}_i x_{ij})^2 \quad SS_C = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta} x_{ij})^2$$

$$v_D = \sum_{i=1}^r (n_i - 2) \quad v_C = \sum_{i=1}^r (n_i - 1) - 1$$

$$F_0 = \frac{SS_C - SS_D}{SS_D} = \frac{v_C - v_D}{v_D}$$

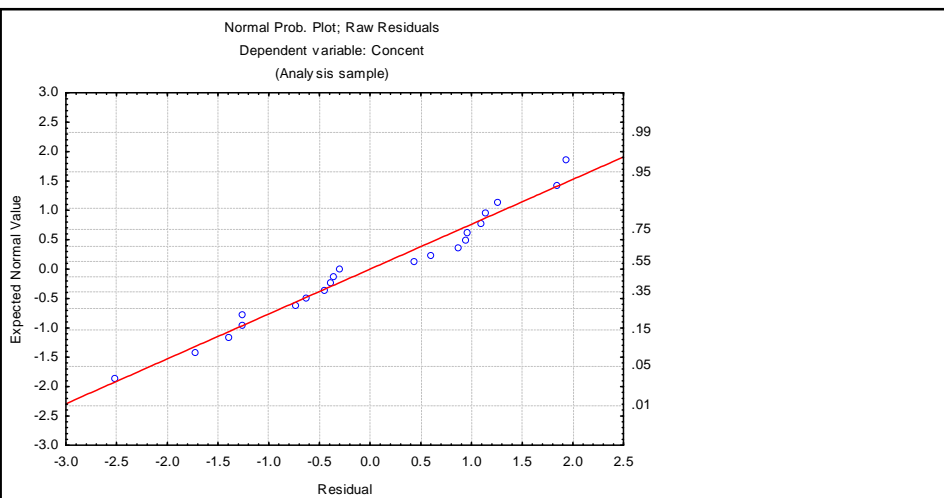
## Reziduumok elemzése: a teljes modell megfelelően illeszkedik-e

Resids fülön:  
Pred. & Resids  
P-plot of resids



Stabilitásvizsgálat

39



A képek megnyugtatók, a három sarzsra külön egyenesek modellje (a teljes modell) elfogadható, tehát joggal szolgál vonatkozásul az *F*-próba nevezőjében.

Stabilitásvizsgálat

40

Azonos-e a három sarzsra illeszthető egyenesek tengelymetszete (párhuzamos egyenesek: A modell)  
 Statistics>Advanced Linear/Nonlinear Models>General Linear Models>Analysis of Covariance

Univariate Tests of Significance for Concent (Lin1.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	98276.37	1	98276.37	53141.72	0.000000
Time	11.70	1	11.70	6.33	0.022220
Batchn	1.14	2	0.57	0.31	0.738223
Error	31.44	17	1.85		

Quick fülön: All effects

Döntés?

$$SS_A - SS_D$$

$$SS_C = SS_D + (SS_C - SS_D)$$

$$SS_C = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha}_i - \hat{\beta}x_{ij})^2 \quad SS_A = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{\alpha} - \hat{\beta}x_{ij})^2$$

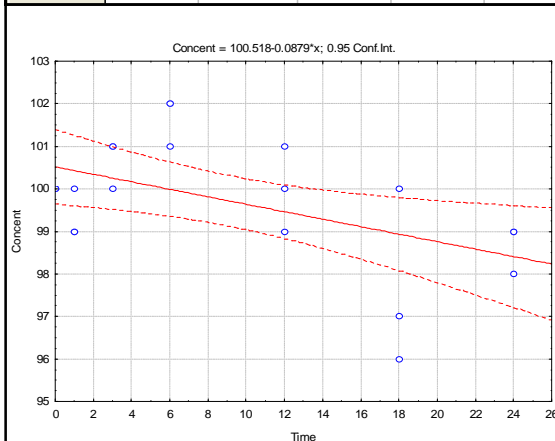
Statistics>Advanced Linear/Nonlinear Models>General Linear Models>Simple regression

Univariate Tests of Significance for Concent (Lin1)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	98276.37	1	98276.37	57310.34	0.000000
Time	11.70	1	11.70	6.83	0.017120
Error	32.58	19	1.71		

Dependent variables: Concent

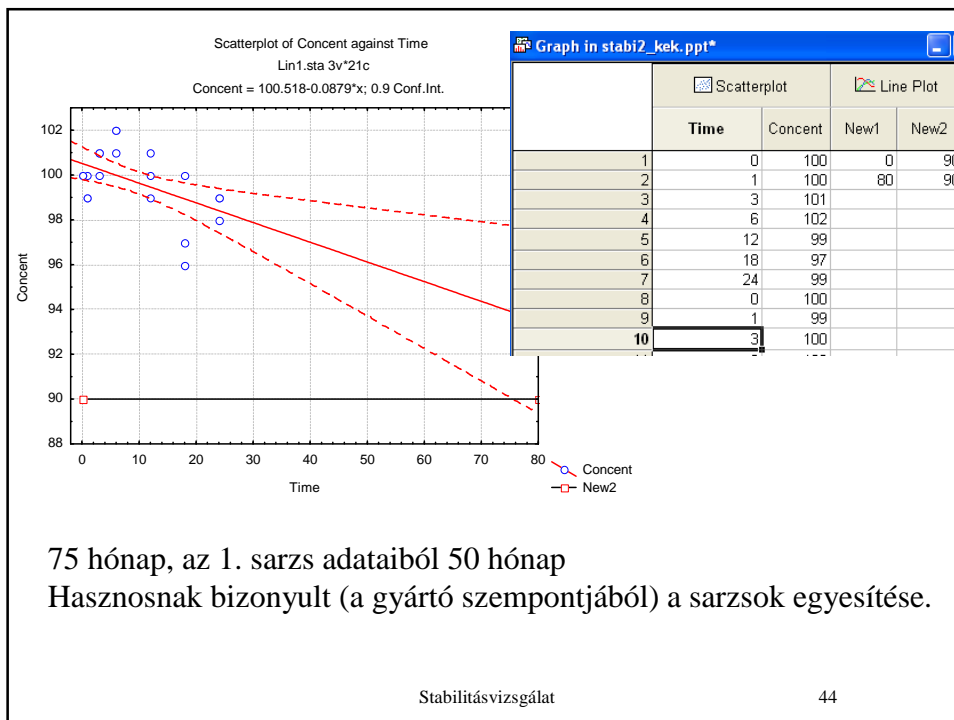
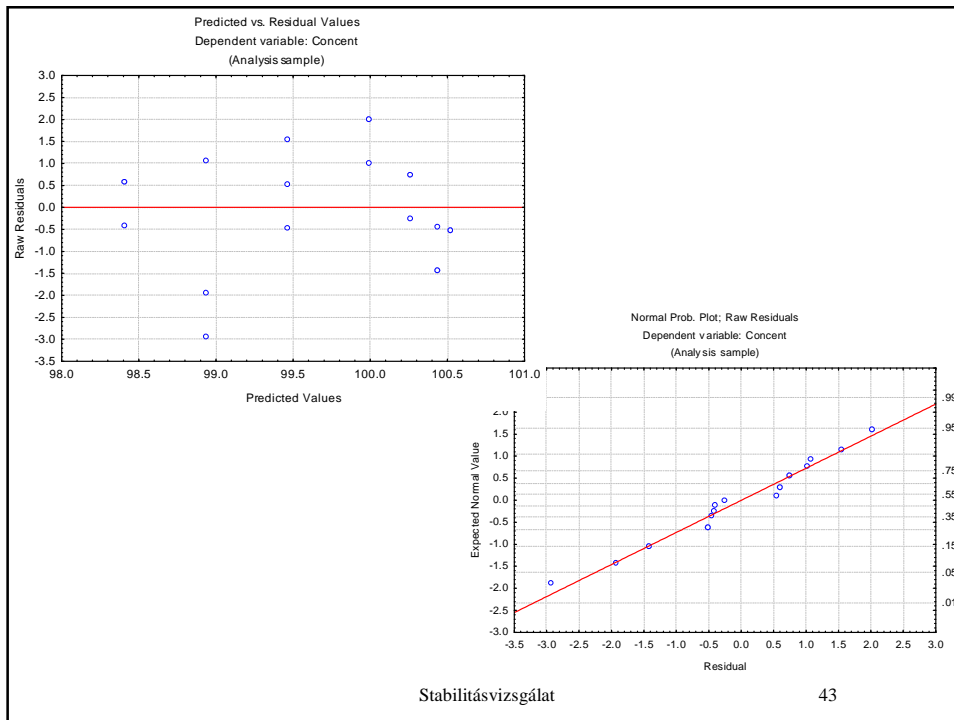
Predictor variable: Time

Quick fülön: All effects



Van-e degradálódás egyáltalán? döntés?

scale!



A lépések:

Jó-e a lineáris modell

Homogeneity of slopes, reziduumok

Párhuzamosak-e az egyenesek

Homogeneity of slopes, C-D/D összehasonlítás

Ha igen, azonos-e a tengelymetszetük is

Analysis of covariance, A-C/C összehasonlítás

Ha igen, egyetlen egyenest illeszthetünk

Simple regression, konf. sáv