

附件 1

兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验 技术指导原则

本指导原则的适用范围仅限于兽用化学药品注册，兽用中药根据产品的具体情况可酌情参考本指导原则。本指导原则不包含难以取血的物种（如蜂、蚕），血药浓度无法代表作用部位药物浓度的情形（如局部给药发挥局部作用的制剂、乳房注入剂、子宫注入剂、静脉特殊给药系统靶位点释放药物），微生物发酵产品，治疗用蛋白或多肽，预混剂，药效学终点的生物等效性试验，临床终点的生物等效性试验。

下列产品可豁免血药浓度法生物等效性试验：静脉、皮下或肌肉注射给药的水性溶液；内服溶液或其他溶解的剂型；内服不吸收的产品（如抗酸剂，透视介质）；挥发性吸入麻醉溶液。

一、概述

生物等效性（Bioequivalence, BE）指含有相同活性物质的两种产品药学等效或药剂学可替代，在相同条件下以相同摩尔剂量给药，活性成分的吸收程度和速度无显著差异。

生物等效性研究在兽药研发的不同阶段具有不同作用，在新兽药研究阶段，为了确定新兽药处方、工艺合理性，通常需要比较改变上述因素后制剂是否能达到预期的生物利用度；开发新剂型，可通过 BE 研究来证实新剂型与原剂型是否等效；在临床试验过程中，可通过 BE 研究来验证同一药物的不同时期产品的前后一致性。在仿制原研制剂时，可通过 BE 研究来证明仿制制剂与原研制剂是否具有生物等效性，是否可与原研制剂替换使用。兽药批准上市后，如处方组成成分、比例以及工艺等出现一定程度的变更时，研究者需要根据产品变化的程度来确定是否进行 BE 研究，以考察变更后和变更前产品是否具有生物等效性。

两制剂只有当他们的生物利用度相等（即活性成分吸收的速度与程度相等）时，才被认为是生物等效的。如果受试制剂活性成分以等同于参比制剂活性成分的速度和程度进入体循环，那么受试制剂和参比制剂活性成分的局部利用度（组

织浓度)相似。作用部位生物利用度相似是药品治疗等效的基础。兽药吸收的速度和程度受诸多因素影响,如制剂工艺、药物粒径、晶型、赋形剂、填充剂、黏合剂、崩解剂、润滑剂、包衣材料、溶剂、助悬剂等。生物等效性研究也是验证制剂质量的手段之一,要提高仿制制剂的质量,尚需认真研究原研制剂的文献资料,从处方筛选、生产工艺条件改进和质量研究入手,避免最后出现不等效。

生物等效性研究的临床意义在于确定兽药的可处方性和兽药之间的可互换性。可处方性是指兽医首次开写该新兽药处方时,对其一般性能、特征如有效性和安全性(含生物等效性)的明了程度。可互换性是指治疗过程中换用兽药时,兽医能肯定仿制兽药的有效性与被替换兽药等同。

两种制剂具有生物等效性,不代表兽药残留安全可替代,一般不可以直接引用参比制剂的休药期标准。生物等效性不能合理地反映兽药的组织残留消除规律。在生物等效性评价的浓度范围内,受试制剂按参比制剂的给药方案使用,可能产生相同的血药-时间曲线,但也可能出现不同的组织处置动力学。为表明受试制剂残留消除阶段残留量与参比制剂残留量的差异,受试制剂需进行组织残留消除研究。比较受试制剂和参比制剂的休药期,取较长者作为受试制剂的休药期。

在某种靶动物进行的生物等效性或组织残留消除研究,一般不得外推到另一种动物。因为药物在分布或组织结合上存在种属差异,即使其吸收速度或程度上的微小差异也可能导致靶组织中残留标示物浓度的巨大差异。值得注意的是,局部有药物残留的制剂(如肌内注射、皮下注射制剂等)不能直接引用参比制剂的休药期,如果引用,需要对给药部位的药物残留行为信息进行充分评估。

二、试验设计

血药浓度法生物等效性研究是指用生物利用度研究方法,以药代动力学参数为终点指标,根据预先确定的等效标准和限度进行的比较研究。适用于药物活性成分吸收进入体循环具有全身作用的剂型(特殊注射剂和大多数内服剂型)。研究一般应包含药物浓度-时间曲线的吸收、分布和消除相。

1. 分析方法

合适、可靠的分析方法是血药浓度法生物等效性研究的关键。全血、血浆、血清等样品的取样量少,药物浓度低,内源性物质(如无机盐、脂质、蛋白质、代谢物以及其他药物)干扰多,个体差异大,影响样品中活性成分含量的测定。

因此，需要根据被测物的结构、性质、浓度范围和样品介质等具体情况，建立相应的分析方法。为保证方法的可靠性，必须对方法的性能进行全面验证。具体见《生物样品定量分析方法验证指导原则》。

2. 普通制剂的生物等效性评价

2.1 试验设计 多数药物的吸收和消除存在着明显的个体差异，个体间差异远大于个体内变异。因此，生物等效性研究一般按自身交叉对照的方法设计。交叉设计要求把受试动物随机分成几组，按一定顺序处理。例如，两种制剂（或产品）的比较，采用双处理双周期交叉设计（ 2×2 交叉设计），即将动物分成两组，一组动物先给受试制剂后给参比制剂，另一组动物先给参比制剂后给受试制剂。受试动物接受不同处理的顺序应是随机的。

两顺序间应有足够长的间隔时间，称为清洗期。设定清洗期是为避免前一周期的处理对后一周期产生影响。每个受试动物都连续接受两次处理，相当于自身对照，使制剂因素对药物吸收的影响与其他因素区分开来，也减少了不同试验周期和个体差异的影响。清洗期一般不应短于活性成分或代谢物的 7 个消除半衰期，以便 99.3% 的药物已排出体外。对于动力学模型比较复杂（如组织结合时间长导致休药期也长）或具有生理学后效应潜能（如微粒体酶诱导作用）的药物，尚需延长清洗期。

首选 2×2 交叉设计，根据受试制剂的个数还可分别采用 3×3 交叉、 4×4 交叉或部分交叉等设计。例如，三个制剂（二个受试制剂、一个参比制剂）试验时，宜采用三制剂三周期的二重 3×3 拉丁方设计。

下列情形更适合采用平行设计：药物引起的生理学改变（如肝微粒体酶的诱导作用）在药物从体内完全消除后还存在，并改变第二周期所给产品的生物利用度；药物的尾段半衰期很长，在第二周期给药时可能还残留着第一周期的药物；双周期交叉研究的清洗期过长以致受试动物发生明显的生理发育方面的变化；药物的吸收推迟或延长，如“翻跟头”（Flip-Flop）动力学；动物的循环血量较少，第二周期很难采血等。对于平行试验设计，试验动物和潜在影响活性成分药动学特征的因素尽可能均衡，如体重、性别、食物、生理状态、繁殖水平（如果相关）等。

其他设计，如序贯设计、四处理双周期设计（受试制剂/受试制剂、参比制剂/参比制剂、受试制剂/参比制剂和参比制剂/受试制剂）或多周期设计在某些情

形下也是合适的，如长半衰期、高变异、窄治疗窗药物等，应根据药物特点进行试验设计，可根据预试验或文献，选择试验设计的种类，相应的统计学方法也应提前确定。

2.2 试验制剂 除非另外说明理由，参比制剂和受试制剂含量的差别不能超过 5%。应按产品标示的而不是检验的浓度或含量给药，给药量不得按检验的结果做校正。生物等效性数据及其衍生参数也不应按参比制剂和受试制剂含量的差别做校正。受试制剂和参比制剂在试验结束后应保留足够长时间，以备受试制剂注册时查考。

受试制剂 应为中试产品。应报告药名、剂型、规格、生产厂、批号、体外溶出度、稳定性、含量或效价、有效期、检验报告等数据。特殊药品尚需提供多晶型及光学异构体等关键属性资料。

对于多种含量（或浓度）规格的内服固体制剂，要考虑不同规格产品的活性/非活性成分的比例和体外溶出曲线、药物的水溶性以及含量范围。如果多规格产品的活性/非活性成分的比例相同并且配方一样，用高含量规格产品试验即可。但还要用合适的方法进行体外溶出试验，将受试制剂的每种规格与参比制剂的相应规格进行比较。

多规格豁免：如果一项申请涉及活性成分的几种不同规格，只对一种规格进行生物等效性研究是可接受的，但应提供其他规格的体外等效性数据。前提是满足以下所有条件：①兽药通过相同的生产工艺生产；②不同规格的兽药中所含成分相同；③不同规格的兽药中各成分含量成比例，即所有规格中各辅料与活性成分的含量比相同，但包衣液、胶囊壳、着色剂和矫味剂除外。如果各辅料与活性成分含量在比例上有一定差异，但生物等效性研究中所用规格和生物等效性豁免研究中所用规格满足 a 和 b 或 a 和 c 条件，则认为仍满足③：a. 活性成分的含量低于片芯重量的 5%，或低于胶囊内容物重量的 5%（如产品为胶囊剂）；b. 涉及的规格中，不同片芯的辅料或胶囊内容物的含量相同，仅活性成分含量有变化；c. 仅填充剂的含量有变化以补偿活性成分含量的变化，但其他片芯辅料或胶囊内容物的含量在所涉及的规格中均相同。④提供适当的体外溶出数据，使豁免体内生物等效性试验有充分的依据。不是所有规格均能达到漏槽条件的 pH 值条件下，不同规格制剂的体外溶出曲线可能不同。但是，通过与相应规格的原研制剂

的比较，可确认其结果与活性成分而非制剂有关。此外，也可证明在相同的剂量下具有相似的溶出曲线（如可比较 2 片 5mg 和 1 片 10mg 的片剂）。

参比制剂 应选择原研制剂，并提供证明，具有全面的资料并说明选择理由。

2.3 动物 要求采用参比制剂标签规定的靶动物。每种靶动物均需单独进行生物等效性试验。

受试动物的个体间差异应减到最小。若兽药作用与动物性别无关，一般选用一个均质群体内同一性别的健康成年动物，使在品种、品系、年龄、激素水平、营养状态、生产性能等方面保持一致。动物的体重要限制在一定范围，以便每个个体的总剂量基本相同。如果难以保证动物的均质性（如马），也可用非均质群体的动物，但要采用限制性随机法使每组动物在年龄、体重、性别（如果相关）等方面一致。试验方案中应明确动物入选和剔除条件。

受试动物应经过全面的体检，证明为临床健康。根据药物的类别和安全性等，还应在试验前、试验期间和试验后进行生理生化项目检查。为避免其他药物干扰，试验前至少两周内和试验期间都应禁用任何其它药物。如果药物存在遗传多态性，会导致代谢差异，则应注意慢代谢引起的毒性问题。

入选动物的数量（或样本大小，N）应符合统计学要求。N 由三个基本因素决定：（1）显著性水平，即 α 值的大小，通常取 5%；（2）把握度，即 $1-\beta$ 值的大小（ β 是犯第 II 类错误的概率，也就是把实际等效误判为不等效的概率），一般定为 80%；（3）变异性（CV%）和误差（ σ^2 ），变异性和误差越大，N 越大。应避免动物数过少得出假阴性（即为两制剂等效却误判为不等效）错误的情况。N 过大可能带入其他差异。最理想的设计是采用最少的动物达到有 80% 把握度证明两种制剂是否等效。由于试前并不知道 σ^2 和 CV%，只能根据预试或参比制剂已有的参数估算 N，或在生物等效性试验完成后由本试验的 σ^2 、CV% 和把握度计算 N，以检验受试动物数是否合适。按照目前的统计方法，18~24 例可满足大多数药物的要求，所计算的样本数量是满足正式试验分析的最少动物数量。某些变异性大的药物，要增加动物数。除此之外，还应考虑动物的剔除因素（如呕吐、给药错误、死亡/受伤），以获得足够的实验数据。

受试期间，受试动物的饲养和活动、检查等要标准化，确保除受试制剂外涉及的其他因素的变异最小。受试动物在受试期间发生的任何不良反应，均应及时

处理和记录，必要时终止试验。

2.4 给药方案

单次/多次给药：大多数情况，采用单次给药。因为单次给药对于评价受试制剂和参比制剂有效成分从制剂中释放进入到循环系统的差异更灵敏。在下列情况下，可进行多次给药的生物等效性研究：药物作用取决于血中被测物的稳态浓度，活性成分是非线性和/或时间依赖性动力学，生物利用度个体差异大，吸收程度相差不大但吸收速度相差大，单次给药后被测物浓度过低、分析方法不能准确测得，治疗指数小，吸收延长或推迟，吸收速度小于消除速度，控、缓释制剂，分析方法的灵敏度不够、不能定量测得峰浓度后 3 个消除半衰期以后的浓度等。单次和多次给药方案均可采用平行或交叉试验设计。由于较长的试验周期会增加试验的复杂性，因此，一般多次给药不建议采用序贯试验设计和重复试验设计。对于标签规定的在较大的剂量范围内具有不同药理作用（如治疗和改善生产性能）的兽药，用批准的最高剂量进行单次给药生物等效性研究通常是合适的。但若药物遵循非线性动力学，则应使用不同的剂量做多个单次给药的生物等效性研究。

给药剂量：给药剂量取决于标签的规定、分析方法的灵敏度和参比制剂的实际应用条件。一般，没有证明线性动力学的受试制剂应采用参比制剂批准的剂量，剂量是标签的标示量，而不是实测值，受试制剂和参比制剂的剂量应相同。若参比制剂同一靶动物中批准了多个给药剂量，则应选用批准的最高剂量。如果能够证明参比制剂在标签标示范围内药动学特征（PK）呈线性，也可采用标签低剂量。为达到有效的可测药物浓度，安全指数大且 PK 呈线性的药物，也可选用比批准剂量高 2~3 倍的剂量，此时要提供剂量选择支持数据和靶动物的耐受性数据。

在生物等效性研究中，一般不得对药代动力学参数进行剂量归一化。

片剂分割检查方法证明过刻痕片的含量均匀度，则可接受沿刻痕线分割片剂，但不得将片剂分割成更小的碎片。

标签给药范围内 PK 不呈线性的参比制剂，应考虑：①如果有证据表明药物存在饱和吸收过程，限制了药物吸收，则可能会出现标签高剂量等效而标签低剂量不等效，此时要优先选择标签低剂量进行 BE 试验，并提供低剂量选择依据和 PK 的线性范围。②如果药物溶解性较低，超过标签剂量范围后存在非线性 PK，

则标签高剂量和标签低剂量的 BE 试验均应实施。在交叉试验中，每个受试动物接受的受试制剂和参比制剂的总剂量是相同的，极少数情况下，由于动物生长过快，个体间药物体内过程差异导致偏差，调整给药剂量也可接受，但要具体药物具体分析。

给药途径：受试制剂和参比制剂应采用相同的给药途径和给药部位。

饲喂和禁食：所有种属动物，饲喂应符合动物福利，如反刍动物不能禁食。犬猫及非反刍动物用的内服普通制剂，应进行禁食的生物等效性试验，除非参比制剂标签中明确标示仅用于饲喂后动物。给药前至少禁食 8 小时，给药后禁食 4 小时。对要求与饲料一起给药的兽药，动物应先行饲喂。对饲喂可能影响吸收的兽药，受试动物应禁食。对于某些药物如肠溶制剂或内服缓释制剂，由文献或预试得知饲喂条件下药物的生物利用度有较大变化时，必须同时在饲喂和禁食条件下证明生物等效性。受试动物给药后应避免剧烈运动，亦不得长时间静卧，避免影响局部血流量。试验方案和报告应阐明在饲喂或禁食状态下开展生物等效性试验的合理性，并且要描述饲喂方案及饲料配方。

2.5 采样 采样点数取决于血药浓度曲线的特点以及与生物利用度相关数据的变异幅度（包括药动学变异性、分析误差和吸收动力学在产品之间的差别），要依据预试验或参考文献进行设计。一般应兼顾吸收相、分布相和消除相，在各时相及达峰时间前后应有足够的采样点。采样方案应该在预计的 T_{max} 附近设立密集的采样点，以便对 C_{max} 进行可靠估计，避免 C_{max} 成为浓度-时间曲线上的第一个点。给药前应先采集空白血样。采样应持续到活性成分的 3~5 个半衰期之后或 C_{max} 的 $\frac{1}{20} \sim \frac{1}{10}$ 之后，以满足 $\frac{AUC_{0-t}}{AUC_{0-\infty}}$ 大于 80% 的要求（式中： AUC_{0-t} 为从给药到最后采样时间点血药浓度算得的药-时曲线下面积， $AUC_{0-\infty}$ 为从 0 时到无穷大时间的药-时曲线下面积）。对数线性回归分析消除相时，至少要选择 3 个采样点，以准确估计 Ke 和 $AUC_{0-\infty}$ 。

对于多次给药的生物等效性试验，清洗期必须包含活性成分被完全清除之后的药理作用消失期。具有线性动力学产品，应选择合适的给药方案（剂量、给药间隔时间、给药次数）以获得稳态浓度。要测定连续的 3 个峰浓度（ C_{max} ）或谷浓度（ C_{min} ），或者通过在一个给药间隔内收集大约 10 份样品（包括刚好在下次给药之前采集的样品）以证明达稳态。达稳态后，应由末次给药的药-时曲线计

算 AUC 和需关注的药动学参数。对于受昼夜节律影响的药物，应连续 24 小时取样。

对于内源性物质，采样方案应该能够对每个受试动物在每个周期表征内源性基线。通常从 2~3 个给药前样品中测得基线。在其他情况下，可能需要给药前 1~2 天周期性采样，以获得时辰节律造成的内源性基线波动。

采集的样品应采用合适的方法处理和保存。

2.6 检测物质

一般原则：母体化合物的 C_{max} 通常对检测产品间吸收速率的差异比代谢物的 C_{max} 更敏感，因此，评价生物等效性应该基于母体化合物的浓度。

非活性前药：即使是非活性前药，也推荐证明母体化合物的生物等效性，不必测量活性代谢物。但是某些前药可能血浆浓度很低，并且快速清除，导致难于证明母体化合物的生物等效性。在此情形下，可以接受用主要活性代谢物来证明生物等效性。

使用代谢物替代活性母体化合物：只有在例外情况下，才会考虑以一个代谢物代替活性母体化合物。当使用代谢物替代活性母体化合物时，申请人应提交任何可得到的数据，以支持代谢物的暴露能反映母体化合物吸收，且证明该代谢物的生成在治疗剂量下不饱和。

对映异构体：一般可以接受使用非手性生物分析方法评价生物等效性。但是当满足以下全部条件或未知时，则应该测定单一对映体：对映异构体的药动学有差异；对映异构体的药效学差异显著；对映异构体的暴露（AUC）比值在不同吸收速率下发生变化。

如果一个对映体是药理活性的，另一个是非活性的，或对活性的贡献很小，则用活性对映体就足以证明生物等效性。

内源性物质：对于内源性药物的生物等效性试验，可以考虑超治疗剂量给药，只要该剂量能被很好耐受，使给药后增加的超过基线的浓度能被可靠测定，药动学参数计算反映给药后增加的浓度。应该在试验计划中预先规定用于基线校正的确切方法并说明理由。一般采用标准缩减基线校正法，即减去个体的内源性物质给药前浓度的均值，或者减去个体给药前内源性物质 AUC。如果浓度水平远远高于内源性基线浓度，可以不需要基线校正。

2.7 药动力学参数计算

一般用非房室数学模型分析方法来估算药代动力学参数。在生物等效性研究中，其主要测量参数 C_{\max} 和 t_{\max} 均以实测值表示。 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 以梯形法计算，故受数据处理程序影响不大。

在测定单剂量给药后的生物等效性试验中，应当测定受试制剂和参比制剂的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 C_{\max} 和 t_{\max} 等参数。

在稳态下测定普通制剂生物等效性的试验中，提供受试制剂和参比制剂的3次谷浓度数据 (C_{trough})，达稳态后的 AUC_{τ} 、 $C_{\max,ss}$ 、 C_{trough} 、 $t_{\max,ss}$ 、DF 等参数。

2.8 等效判断标准

在单剂量给药测定生物等效性的试验中，参比制剂和受试制剂 C_{\max} 和 AUC 几何均值比的 90% 置信区间应该落在可接受范围 80.00%~120.00% (AUC 未做对数转换) 或 80.00%~125.00% (AUC 做过对数转换) 范围内。为了落在接受范围内，下限舍入后保留两位小数应 $\geq 80.00\%$ ，上限舍入后保留两位小数应 $\leq 125.00\%$ 。

t_{\max} 是时间依赖性参数，它的应用有限。只有当药物的释放速度与临床疗效 (或安全性) 密切相关时， t_{\max} 才需做统计，用于评价。由于 t_{\max} 为 10min 的 20% 变异与其为 120min 的 20% 变异的 意义不同，所以该参数的等效性范围应根据临床要求事先做认真的定义和证明。

C_{\max} 和 t_{\max} 只有当峰浓度能准确获得时才有意义。

$AUC_{0 \rightarrow t}$ 至少应覆盖 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 的 80%，如果覆盖小于 80% 的受试动物超过总数的 20%，则需要讨论该试验的有效性。

2.9 数据处理与统计分析

2.9.1 数据表达

BE 研究必须提供所有个体浓度测定数据和药代动力学参数，并提供汇总数据。如所有受试动物各个时间点受试制剂和参比制剂的药物浓度测定数据、每一时间点的平均浓度 (Mean) 及其标准差 (SD)，提供每个受试动物的浓度-时间曲线 (C-T 曲线)、平均 C-T 曲线以及 C-T 曲线各个时间点的标准差。对于需进行统计分析的药代动力学参数，应提交对受试制剂和参比制剂比值的点估计及 90% 置信区间。对于单次给药研究，应报告每周期每只动物的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 占 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 的百分比。不能随意剔除任何数据。脱落动物的数据一般不可用其他数据替代。

2.9.2 分析中数据剔除

多种情况下,可能且有必要剔除一个试验动物的全部或部分数据。应该尽量避免剔除数据,否则,可评价的受试动物数量会减少,剔除数据后试验效力会下降。在一个特定周期中剔除一个受试动物数据可能会使血药浓度-时间曲线不可靠。例外情况下,使用了其他药物可能是一个受试动物的剔除理由。过失或操作错误造成的数据应排除。对不明原因造成的异常数字,应在统计学检验(如Dixon检验)后做取舍。

对随机试验结果的无偏评估需要根据相同规则处理所有受试动物。这些规则应该独立于给药或试验结果。所以,从统计分析中剔除一个受试动物数据必须在生物分析之前制定好数据剔除规则,要在试验方案中设定标准,剔除才是有效的。所有的有效数据均应包含在统计学分析中,不能以统计学理由和药动学理由剔除数据。例如,某头动物周期2的数据被剔除后,周期1的数据不能对应剔除,也应进行统计学分析。

试验方案中应有剔除标准,如内服制剂存在呕吐风险,因呕吐导致丢失的部分或全部给药剂量,因此,试验方案中预先设定与呕吐有关的数据剔除标准。如剔除标准应写明①从给药到发生呕吐的可接受时间(如胃排空时间,动物的饲喂状态等)。②可接受的因呕吐导致的药物损失量。此外,试验中可选择在动物呕吐后重复给药,其标准也应在试验方案中预先说明。

对此的例外是,由于受试动物未按规定给药,或者清洗期不够,此时可以质疑该试验的有效性。从统计分析中剔除的受试动物样本仍然需要测定,并列出结果。

2.9.3 统计分析

统计模型和随机化过程应在试验方案中预先定义,应根据不同的试验设计采用合适的统计学方法。评价生物等效性的最合适方法是双侧90%置信区间法(具体方法见附录)。该法可用于各参数如AUC、 C_{max} ,包括做自然对数转换或未做自然对数转换的数据。

AUC是 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 与 $AUC_{t \rightarrow \infty}$ 之和。 $AUC_{t \rightarrow \infty}$ 是最后一次采样到无穷时间药-时曲线下面积,按 $AUC_{t \rightarrow \infty} = C_t / \lambda_z$ 计算,式中 t 为最后一次采样的时间, C_t 为最后一次样品测得的浓度, λ_z 为消除速率常数,系对数血药浓度-时间曲线末端直线

部分的斜率。

$AUC_{0 \rightarrow t}$ 采用线性曲边梯形法计算。如采用其他方法，应附参考文献。如果采样时间落在消除相，则可考虑用对数曲边梯形法或其他方法。

AUC 、 C_{max} 和 t_{max} 一般用实测值而不用理论值。 AUC 和 C_{max} 应经对数转换后用多因素方差分析法 (ANOVA) 进行显著性检验，然后再用双单侧 t 检验法和 90% 可信区间法判断兽药的生物等效性。方差分析可提示误差来源，为双单侧 t 检验提供误差值 (MSE)。为能做出生物等效性的结论，由 ANOVA 表中发现的估计误差算得的置信区间的上限和下限应与事先确定的范围如 0.80~1.25 (对数转换后范围) 或 0.80~1.20 (未做对数转换的范围) 进行比较。时间依赖性参数不必进行自然对数转换，应采用非参数法进行分析。

当等效性参数不是正态分布或对数-常态分布时，应采用非参数法做等效性分析，如 Mann-Whitney-Wilcoxon 方法 (用于平行设计) 或 Wilcoxon signed rank test 方法 (用于交叉设计)。

兽药、周期、试验顺序的影响要做方差分析，性别及其与产品的相互作用在必要时也要做方差分析。

用几个参数证明生物等效性时，只有当非等效的无效假设在所有参数被拒绝后才能最后得出生物等效的结论。

应采用非房室分析法估算的药动力学参数，采用房室模型方法估计参数不可接受。研究者可根据具体情况选择符合统计学要求的相应软件，并在报告中加以说明。

多次给药以恒定间隔 τ 多次给药达稳态后，一个剂量间隔内的药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow \tau}$) 是药物吸收程度的特征，是评价多次给药生物等效性的主要参数。平均稳态浓度 (C_{ss}) 是另一评价吸收程度的重要指标，用下式计算：

$$C_{ss} = \frac{AUC_{0 \rightarrow \tau}}{\tau}$$

式中 $AUC_{0 \rightarrow \tau}$ 系稳态条件下用药间隔期 $0 \sim \tau$ 内的 AUC ， τ 是给药间隔时间。要测定 $C_{max,ss}$ 和 $t_{max,ss}$ ，还要测定药物浓度在 $C_{max,ss}$ 和 $C_{min,ss}$ 之间的波动范围 (DF)，也可用于评价多次给药的生物等效性，但要结合临床做具体分析。DF 计算如下：

$$DF = (C_{max,ss} - C_{min,ss}) / C_{ss} \times 100\%$$

3.内服缓、控释制剂

缓、控释制剂改变了药物释放和吸收的过程，这些制剂的生物等效性试验与普通制剂有所不同。一般要求同时进行单次给药和多次给药研究，必要时还应考虑饲喂的影响。

3.1 单次给药 旨在比较受试动物在空腹状态下服用受试制剂与参比制剂的吸收速度和程度，确认受试制剂缓、控释的药动力学特征。试验设计基本同普通制剂。

若国内已有相同产品上市，参比制剂应选国内外上市的相同缓、控释制剂的主导产品。

除提交各受试动物受试制剂与参比制剂在不同时间点的药物浓度、 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 C_{max} 、 t_{max} 的均值和标准差等数据外，应尽可能提供吸收速率常数(K_a)、平均滞留时间(MRT)等体现缓释特征的参数。

生物等效性评价标准同普通制剂。若以缓、控释制剂为参比制剂， AUC 、 C_{max} 、 t_{max} 均符合生物等效性统计学要求的，可认定两制剂于单次给药条件下是生物等效的。若以普通制剂为参比制剂， AUC 符合生物等效性的一般要求但 C_{max} 明显降低、 t_{max} 明显延迟，则说明该制剂具有缓释或控释动力学特征。

3.2 多次给药 旨在比较缓、控释受试制剂与相应参比制剂多次连续用药达稳态后药物的吸收程度、稳态血药浓度及其波动情况。

按临床推荐的给药方案连续服药的时间达 7 个消除半衰期后，通过连续测定至少 3 次 C_{trough} （采样时间应安排在每天的同一时间），以证实受试动物血药浓度已达稳态。达稳态后，在最后一个给药期内，参照单次给药采样时间点设计，测定血药浓度。

以普通制剂为参比制剂时，普通制剂与缓、控释制剂分别按推荐临床用药方法给药（例如普通制剂每日 2 次，缓、控释制剂每日 1 次）。达稳态后，缓、控释制剂在末次给药后参照单次给药时间点采样，测定药物浓度。普通制剂仍按临床用法给药，按 2 次给药的药时曲线确定采样时间点，测得的 AUC 是实际 2 次给药后 AUC 的总和，不宜用剂量调整公式计算，如以 1 次给药 AUC 的 2 倍计。稳态峰浓度、达峰时间及谷浓度可用 2 次给药的平均值。

应提供各受试动物缓、控释受试制剂与参比制剂在各时间点的血药浓度实测

值及其均数和标准差、达稳态后末次给药的血药浓度-时间曲线、 AUC_{ss} 、 C_{ss} 和 DF。

等效性评价一般同缓、控释制剂的单次给药，但 C_{trough} 是需要考虑的重要参数。当以普通制剂为参比制剂时，对于波动系数的评价，应结合缓、控释制剂本身的特点做具体分析。

另外，对于不同的缓、控释剂型，还应根据剂型的特殊性进行试验设计，增加相应考察指标以体现剂型的特点。

4. 复方制剂

一个组分的体内行为不可能完全代表其它组分的体内行为，故原则上应证实每一个主要有效成分的生物等效性。试验设计时应尽量兼顾各个成分的特点。

三、 试验报告

用于替代仿制兽药临床试验研究的关键生物等效性试验报告按《兽用化学药品生物等效试验报告撰写指导原则》要求提交。

四、 附录

生物等效性数据统计分析法

评价生物等效性的最合适方法是 90% 置信区间法。该法可用于各参数如 AUC 、 C_{max} 、 C_{trough} （如适用），包括做自然对数转换或未做自然对数转换的数据。

1. 未转换数据

以下先介绍置信区间法如何用于双周期交叉设计(常态分布) 的未转换数据。

设 \bar{X}_{T1} 和 \bar{X}_{T2} 分别为受试制剂在第 1 期和第 2 期的均值， \bar{X}_{R1} 和 \bar{X}_{R2} 分别为参比制剂在第 1 期和第 2 期的均值，则受试制剂和参比制剂在两期的均值分别为 $\bar{X}_T = \frac{\bar{X}_{T1} + \bar{X}_{T2}}{2}$ 和 $\bar{X}_R = \frac{\bar{X}_{R1} + \bar{X}_{R2}}{2}$ 。虽然两顺序组开始时动物的数量是相等的，但试验结束时每顺序组的动物数 (n_A 和 n_B) 可能不相等。上述公式采用 μ_T 和 μ_R （为相应的群体的均值）的剩余的或最小的平方估计值。这些均值不是每顺序样本大小的函数。

由方差分析得误差 σ^2 , 从以下 ANOVA 表的“误差”均方得用以计算 90% 置信区间的 s^2 值。

数据来源	自由度
顺序	1
动物 (顺序)	$n_A + n_B - 2$
周期	1
制剂	1
误差	$n_A + n_B - 2$
总计	$2n_A + 2n_B - 1$

由 Student t-分布得 90% 置信区间的下限和上限。

$$L = (\bar{X}_T - \bar{X}_R) - t_{n_A+n_B-2; 0.05} s \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}$$

$$U = (\bar{X}_T - \bar{X}_R) + t_{n_A+n_B-2; 0.05} s \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}$$

如果 90% 置信区间被完全包含在某个固定区间内, 要说明两产品是等效的, 则须在该区间的端点上做双单侧统计检验 ($\alpha=0.05$)。

例 1, 设 $L=3$, $U=17$, $\bar{X}_T=110$, $\bar{X}_R=100$ 。按照传统的假设检验法, 认为结果在统计学上有显著意义, 因为置信区间不包含 0。运用置信区间法, 整个置信区间落在 \bar{X}_R 的 17% 以内 (置信区间的低端落在 $\frac{L}{\bar{X}_R} = \frac{3}{100} = \bar{X}_R$ 的 3% 之内, 而上端落在 $\frac{U}{\bar{X}_R} = \frac{17}{100} = \bar{X}_R$ 的 17% 之内)。如果差异高于 20% 在兽医学上才是重要的, 则认为此项研究的结果适于证明生物等效性。

例 2, 设 $L=-4$, $U=24$, $\bar{X}_T=110$, $\bar{X}_R=100$ 。按照传统的假设检验方法, 认为结果在统计学上没有显著意义, 因为置信区间包含 0。然而置信区间从 \bar{X}_R 扩

大到 24% (置信区间的低端落在 $\frac{L}{\bar{X}_R} = \frac{-4}{100} = \bar{X}_R$ 的 -4% 之内, 而上端落在

$\frac{U}{\bar{X}_R} = \frac{24}{100} = \bar{X}_R$ 的 24% 之内)。如果差异高于 20% 在兽医学上才是重要的, 则认为

此项研究的结果不适于证明生物等效性, 因为整个置信区间不在 \bar{X}_R 的 20% 以内。

2. 对数转换数据

将每个动物的 AUC 和 C_{\max} 进行自然对数转换, 再对转换的数据进行分析。对于双周期交叉设计, 计算误差和最小平方均值的 ANOVA 模型在转换和未转换的数据是一样的。按 Student t-分布公式找出 90% 置信区间的上限和下限。随后将对数转换的数据的置信边界的上限和下限做反转换。值得注意的是, 原始数据的均值与对数转换后计算的均值不是严格相等的, 因为转换后计算所得的均值是几何均值。

对数转换后, AUC 表示为 LnAUC, 其均值为 $\overline{\text{LnAUC}}_t = \sum_{i=1}^n \frac{\text{LnAUC}_{it}}{n}$ 。式中 t 代表受试制剂 AUC 的测定值, i 是第 i 个动物的 AUC, n 是受试制剂试验动物的总数。做反转换, 对数均值就成为几何均值 $e^{(\overline{\text{LnAUC}}_t)}$ 。

置信边界的反转换以下列方式实现:

边界下限 (用百分数表示) = $(e^L - 1) \times 100$

边界上限 (用百分数表示) = $(e^U - 1) \times 100$

这里 L 和 U 分别为置信区间的下界和上界, 用对数转换的数据计算。

举例, 下表是交叉试验所得的 AUC 数据。

动物	交叉顺序	参比制剂		受试制剂	
		AUC	LnAUC	AUC	LnAUC
1	1	518.0	6.25	317.8	5.76
2	1	454.9	6.12	465.0	6.14
3	1	232.8	5.45	548.4	6.31
4	1	311.1	5.74	334.8	5.81
5	2	340.4	5.83	224.7	5.41
6	2	497.7	6.21	249.2	5.52

7	2	652.0	6.48	625.4	6.44
8	2	464.1	6.14	848.7	6.74
	均值	433.8	6.03	451.7	6.02
	标准差	133.3	0.33	214.3	0.47
	几何均值		414.7		410.5

在这个例子中，对数转换后计算的 90% 置信区间的低限和高限分别为 -0.395 和 0.372。反转换后，下界和上界分别为

$$(e^{-0.395}-1) \times 100 = (0.674-1) \times 100 = -32.6\%$$

$$(e^{0.372}-1) \times 100 = (1.451-1) \times 100 = 45.1\%$$

这样置信边界的下界和上界分别为参比制剂几何均值的 -32.6% 和 45.1%。如果生物等效性可接受的置信边界为参比制剂几何均值的 80.00% 到 125.00%，则本例子的数据不能证明受试制剂和参比制剂是生物等效的。

置信区间的宽度是由受试动物变异（存在于平行设计的受试动物之间）和受试动物的数量所决定的。一般，未转换数据的置信区间为 80.00%~120.00%，即置信区间落在参比制剂均值的 $\pm 20\%$ 以内。对于作过对数转换的数据，置信区间一般应为 80.00%~125.00%，即落在参比制剂均值的 -20% 和 +25% 以内。

参考文献

1. 兽用化学药品生物等效性试验指导原则，农业部公告第 1247 号
2. GL52-St7: BIOEQUIVALENCE: BLOOD LEVEL BIOEQUIVALENCE STUDY, VICH, 2015
3. Bioequivalence Guidance , FDA/CVM GFI #35, 2006
4. Guideline conduct bioequivalence studies veterinary medicinal products , EMA/CVMP 016/2000-Rev.4, 2022
5. 9011 药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则，《中华人民共和国药典》（2020 版）：460
6. 生物等效性研究的统计学指导原则，国家药品监督管理局药品审评中心，2018.10.29
7. 高变异药物生物等效性研究技术指导原则，国家药品监督管理局药品审评中心，2018.10.29
8. 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则，国家药品监督管理局药品审评中心，2007.08.23
9. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则，国家药品监督管理局药品审评中心，2017.11.27
10. 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则，《中华人民共和国药典》（2020 版）：466