

В. С. Арнаутов<sup>1</sup>, Д. В. Рейхарт<sup>2</sup>, А. С. Борисов<sup>1</sup>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕМА ВЫБОРКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

<sup>1</sup> ПАО «Валента Фарм», Россия, Москва.

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Россия, Москва.

Стандартным дизайном для исследований биоэквивалентности, который позволяет снизить внутрииндивидуальную вариабельность, является рандомизированное, перекрестное исследование (Crossover 2 × 2). Расчет объема выборки для исследования биоэквивалентности является важной частью планирования исследования и должен быть обоснован. Целью данной работы является реализация и валидация алгоритма определения необходимого объема выборки для исследований биоэквивалентности с помощью компьютерной симуляции. Предлагаемый алгоритм основан на процедуре определения мощности статистического теста при известных значениях количества наблюдений, вариации и заданного значения допустимого уровня ошибки первого рода.

**Ключевые слова:** биоэквивалентность; фармакокинетика; объем выборки; симуляции.

Исследование биоэквивалентности лекарственного препарата — вид клинического исследования, которое осуществляется для определения скорости всасывания и выведения одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ, количества лекарственного препарата, достигающего системного кровотока, и результаты которого позволяют сделать вывод о биоэквивалентности тестируемого лекарственного препарата в определенной лекарственной форме и дозировке, соответствующих форме и дозировке референтного лекарственного препарата [1].

Для определения скорости и степени абсорбции в исследованиях биоэквивалентности используется кривая «концентрация — время». Следующие фармакокинетические параметры и заранее установленные границы допустимых отклонений позволяют судить о биоэквивалентности сравниваемых лекарственных препаратов.

Кривая отражает концентрацию вещества в плазме крови.

*AUC* (Area Under the Curve — площадь под кривой «концентрация — время») отражает степень воздействия (экспозиции).  $C_{\max}$  (максимальная концентрация в плазме) и  $T_{\max}$  (время достижения максимальной концентрации в плазме крови) являются параметрами, на которые влияет степень абсорбции (рис. 1). Как правило, для подтверждения биоэквивалентности выполняется расчет двухстороннего 90 % доверительного интервала для отношения средних геометрических параметров *AUC* и  $C_{\max}$ , границы которого должны находиться в пределах 80,00 – 125,00 % [2 – 5].

Обычно для изучения параметров фармакокинетики определяется концентрация активного вещества исследуемого лекарственного препарата в плазме крови, однако в отдельных случаях определение может выполняться в цельной крови, либо в качестве анализата могут выступать метаболиты активного вещества.

Признание биоэквивалентности лекарственных средств позволяет экстраполировать данные доклинических и клинических исследований референтного препарата по безопасности и эффективности на тестируемый.

Наиболее часто исследования биоэквивалентности используются для регистрации воспроизводимых лекарственных средств (дженериков). Однако не редкими являются случаи использования исследований биоэквивалентности для регистрации новых форм лекарственных препаратов и нового состава (при его изменении) лекарственного средства.

Исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов выделяются среди других клинических исследований особенностями проведения (необходимость одновременной работы нескольких врачей, медсестер и ассистентов с рассчитанным по секундам графиком) и тщательностью планирования, от которого напрямую зависит успех или неудача исследования.

Определение объема выборки для проведения исследования биоэквивалентности является результатобразующей частью планирования исследования, наряду с выбором дизайнера и определения временных точек фармакокинетического профилирования. Учитывая возможности вычислительной техники на текущий момент, вне всякого сомнения является целесообразным использование компьютерного моделирования для определения объема выборки.

В соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» и правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза количество субъектов, включенных в исследование, должно определяться соответствующими расчетами объема выборки. Количество включенных в анализ субъектов исследования биоэквивалентности при этом должно быть не менее 12 [2, 3]. Основанием для определения параметров расчета объема выборки могут быть рекомен-

дации управления по контролю пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) [4], а расчет выборки должен быть выполнен с использованием опубликованных формул расчета или с использованием симуляционных данных. При этом в качестве параметров расчета необходимо учесть ошибку первого рода  $\alpha \leq 0,05$ , мощность  $(1 - \beta)$  80 или 90 %, допущение о том, что оцененное значение отношения изучаемых фармакокинетических параметров может отклоняться на величину до 5 %, а также вариацию оцениваемых параметров.

### Стандартные методы расчета

Стандартным дизайном для исследований биоэквивалентности, который позволяет снизить внутрииндивидуальную вариабельность, является рандомизированное, двухпериодное, перекрестное в 2 последовательностях исследование (Crossover 2 × 2). При таком дизайне каждый пациент является контролем самому себе, так как индивидуальные особенности метаболизма одинаково влияют на биодоступность тестируемого и референтного препарата.

Для клинического исследования биоэквивалентности, проводящегося по стандартному дизайну, расчет объема выборки может быть выполнен с помощью выражения:

$$n \geq \frac{2\sigma^2(t(\alpha, df) + t(\beta, df))^2}{(\Delta - |\theta|)^2}, \quad (1)$$

где  $\sigma^2$  — остаточная внутрииндивидуальная вариация;  $\Delta$  — максимальные допустимые различия ( $\Delta = \ln(1,25)$  для стандартного интервала 80 – 125 %);  $t(\alpha, 2n - 2)$  и

$t(\beta, 2n - 2)$  — значения коэффициента Стьюдента при значении ошибки I рода  $\alpha$ , ошибки II рода  $\beta$  и количестве степеней свободы  $df = 2n - 2$ ,  $\theta = \ln(\mu_T/\mu_R) = \ln(\mu_T) - \ln(\mu_R)$  — предполагаемое различие средних значений логарифмически преобразованных параметров ( $AUC, C_{max}$ ) [6]. В соответствии с рекомендациями FDA  $\theta$  может быть принято как  $\theta = \ln(0,95) = -0,0513$ .

При этом значение  $\sigma^2$  может быть определено выражением:

$$\sigma^2 = \ln(1 + CV^2), \quad (2)$$

где  $CV$  — коэффициент внутрииндивидуальной вариации [5].

При расчете с помощью выражения (1) следует учесть, что значение коэффициента Стьюдента  $t(\alpha, df)$  и  $t(\beta, df)$  зависит от количества субъектов  $n$ , следовательно, расчеты необходимо проводить итеративно до момента, когда левая и правая часть выражения будут соответствовать друг другу. Для оптимизации процесса определения объема выборки может быть использовано специализированное программное обеспечение. Так, необходимые вычисления можно выполнить, используя программную среду вычислений R project с установленным пакетом “PowerTOST: Power and Sample Size Based on Two One-Sided t-Tests (TOST) for (Bio) Equivalence Studies” при помощи функции sampleN.TOST. Данная функция поддерживает алгоритмы расчета выборки на основе Owen’s Q функции, нецентрального распределения Стьюдента (noncentral t-distribution) и распределения Стьюдента (central t-distribution) [7, 8]. По умолчанию расчет размера выборки выполняется на основе Owen’s Q функции.

### Результаты сравнения мощности и объема выборки, полученной в ходе вычислений и симуляций

CV, %	Ratio = 1,0				Ratio = 1,0				Ratio = 0,95			
	N = 18		N = 24		Sim		R		Sim		R	
	Sim	R	Sim	R	N	Power	N	Power	N	Power	N	Power
15	0,991611	0,992040	0,999250	0,999249	12*	0,920995*	10	0,838554	12	0,830435	12	0,830516
16	0,982527	0,982639	0,997790	0,997794	12	0,878385	12	0,878346	14	0,848608	14	0,848665
17	0,968106	0,968127	0,994650	0,994700	12	0,827652	12	0,827341	14	0,805729	14	0,805683
18	0,947474	0,947502	0,989008	0,989100	14	0,856959	14	0,857588	16	0,819837	16	0,820357
19	0,920581	0,920559	0,980205	0,980154	14	0,807976	14	0,808599	18	0,828923	18	0,829371
20	0,887733	0,887592	0,967319	0,967190	16	0,832995	16	0,833200	20	0,835178	20	0,834680
21	0,849408	0,849268	0,949997	0,949800	18	0,848674	18	0,849268	22	0,837363	22	0,837437
22	0,806831	0,806478	0,927918	0,927864	18	0,805836	18	0,806478	22	0,804357	22	0,804007
23	0,760676	0,760209	0,901705	0,901528	20	0,820907	20	0,820764	24	0,806528	24	0,806653
24	0,711982	0,711454	0,871449	0,871149	22	0,831253	22	0,830579	26	0,808002	26	0,807666
25	0,661585	0,661146	0,837526	0,837226	24	0,837436	24	0,837226	28	0,807813	28	0,807439
26	0,610297	0,610138	0,800673	0,800342	24	0,800524	24	0,800342	30	0,806167	30	0,806253
27	0,559623	0,559195	0,761618	0,761106	26	0,806714	26	0,806729	32	0,803859	32	0,804311
28	0,509476	0,508998	0,720493	0,720116	28	0,811367	28	0,811031	34	0,802288	34	0,801769
29	0,460474	0,460154	0,678428	0,677934	30	0,813856	30	0,813724	38	0,819820	38	0,820187
30	0,413843	0,413193	0,635609	0,635066	32	0,814832	32	0,815152	40	0,815616	40	0,815845
Diff (M±SD)	0,000221 ± 0,000287		0,000208 ± 0,000208		– 0,000067 ± 0,000415				– 0,000020 ± 0,000345			

\* Отличающееся значение получено в ходе симуляции в связи с тем, что минимальное количество субъектов для симуляции принято как  $\geq 12$ , данное значение не учитывалось при расчете различий.

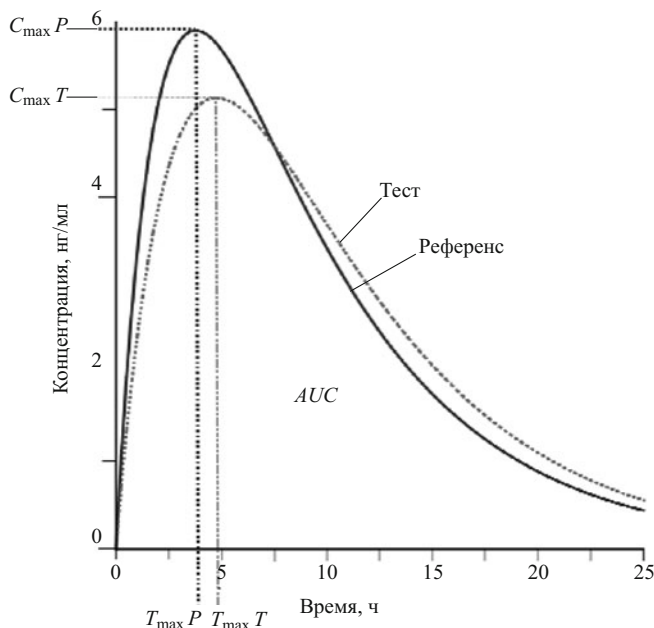


Рис. 1. Фармакокинетический профиль лекарственного вещества

### Механизм симуляции

Целью данной работы является разработка и валидация алгоритма определения необходимого объема выборки с помощью компьютерной симуляции. Определение объема выборки тесно связано с методами симуляционного определения мощности статистического теста. Предлагаемый алгоритм основан на процедуре определения мощности статистического теста при известных значениях количества наблюдений, вариации и заданного значения допустимого уровня ошибки первого рода и имеет аналогичное целевое назначение функции `power.TOST.sim` (D. Labes), входящей в состав пакета `PowerTOST` для среды вычислений R project [8].

Мощность статистического теста определяется как доля симуляций, завершившихся положительно, относительно общего количества симуляций. Под симуляцией понимается процедура генерации данных на основе заданных значений вариации и количества наблюдений с последующей статистической оценкой. Для определения объема выборки выполняются симуляции с использованием увеличивающихся значений числа наблюдений до момента, когда полученная мощность не будет удовлетворять заданным условиям. Количество симуляций должно быть достаточным для расчета мощности с приемлемой точностью и обычно составляет не менее  $10^5$  симуляций для каждой итерации.

### Генерация данных

В ходе каждой симуляции определяется стандартная ошибка ( $SE$ ) и  $Ln(Ratio)$ , на основании которых рассчитывается доверительный интервал. Определение  $SE$  осуществляется на основании известного коэффициента внутрииндивидуальной вариации ( $CV$ ) исследуемых параметров ( $AUC$ ,  $C_{max}$ ) и числа наблюдений ( $n$ ) в соответствии с выражением (3) с допущением, что число наблюдений в группах равно ( $n = n_1 + n_2$ ;  $n_1 = n_2$ ).

$$SE = \sqrt{\sigma^2 0,5 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} = \sqrt{\frac{2\sigma^2}{n}} = \sqrt{2 \ln \frac{(1+CV^2)}{n}}. \quad (3)$$

Генерация  $Ln(Ratio)$  осуществляется на основании  $SE$  и  $\theta$  — ожидаемой величины отношения ( $\ln(\mu_T/\mu_R)$ ).

$$Ln(Ratio) = \theta + X \cdot SE, \quad (4)$$

где  $\theta = \ln(\mu_T/\mu_R)$ ,  $X$  — нормально распределенная случайная величина с математическим ожиданием, равным 0, и стандартным отклонением, равным 1, генерируемая с помощью полярного метода [9, 10] для каждой симуляции.

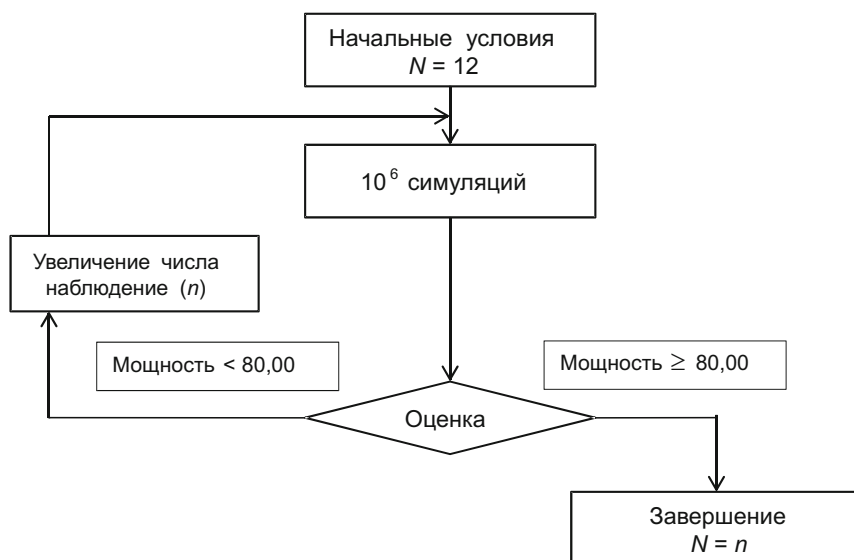


Рис. 2. Графическая схема алгоритма определения необходимого объема выборки на примере расчета с целевым значением мощности 80,00 %.

Для определения мощности необходимо проведение симуляции с учетом моделирования изменчивости самой вариации, которая обладает свойствами случайной величины, распределенной в соответствии с  $\chi^2$  (хи-квадрат) распределением, доверительный интервал которой можно определить с помощью выражения [11]:

$$\sigma_{\text{lower}}^2 = \frac{\sigma^2 df}{\chi_{\alpha/2, df}^2}; \sigma_{\text{upper}}^2 = \frac{\sigma^2 df}{\chi_{1-\alpha/2, df}^2}. \quad (5)$$

Генерация значения вариации при помощи выражения:

$$\sigma_{\text{sim}}^2 = \sigma^2 \frac{\chi_{df}^2}{df}, \quad (6)$$

где  $\chi_{df}^2$  — генерированная [12] случайная величина, распределенная в соответствии с  $\chi^2$ -квадрат распределением с  $df$  степенями свободы.  $SE_{\text{sim}}$  вычисляется как и  $SE$ , за исключением того, что вместо  $\sigma^2$  используется значение  $\sigma_{\text{sim}}^2$ , полученное с помощью генерации.

### Статистическая проверка

После определения значений  $\text{Ln}(\text{Ratio})$  и  $SE_{\text{sim}}$  происходит вычисление границ 90 % доверительного интервала с помощью выражений:

$$CI90 \%_{\text{lower}} = 100 \exp(\text{Ln}(\text{Ratio}) - t_{(1-\alpha/2, n-2)} SE_{\text{sim}}), \quad (7)$$

$$CI90 \%_{\text{upper}} = 100 \exp(\text{Ln}(\text{Ratio}) + t_{(1-\alpha/2, n-2)} SE_{\text{sim}}). \quad (8)$$

В случае, если  $CI90 \%_{\text{lower}} > 80,00 \%$  и  $CI90 \%_{\text{upper}} < 125,00 \%$ , симуляция считается положительно завершившейся. Для определения мощности проводится серия из  $10^6$  симуляций, после чего рассчитывается мощность как доля успешных симуляций относительно общего количества симуляций. Расчет симуляций начинается с использования минимальных значений  $n$  и выполняется до момента, когда рассчитанная в серии симуляций мощность удовлетворит заданным условиям (в большинстве случаев  $> 80,00 \%$ ).

### Валидация

Валидация представленного метода проведена с помощью сравнения значений, полученных с помощью симуляции, и значений, полученных с помощью вычисляемых формул. Для сравнения мощности использовалась функция `power.TOST` ( $\alpha = 0,05$ ,  $\text{theta} = 1,0$ ,  $CV = CV^*$ ,  $n = N^*$ ,  $\text{design} = "2 \times 2"$ ). Для определения объема выборки использована функция `sampleN.TOST` ( $\alpha = 0,05$ ,  $\text{targetpower} = 0,8$ ,  $\text{theta} = \text{Ratio}^*$ ,  $CV = CV^*$ ,  $\text{design} = "2 \times 2"$ ). Значения  $CV$ ,  $N$ ,  $\text{Ratio}$  и результаты расчета представлены в таблице. Для значения мощности (Power) было рассчитано среднее значение и стандартное отклонение различия (Diff) мощности, полученной как результат вычислений и симуляции.

Данные сравнения свидетельствуют о высокой сопоставимости результатов вычисления и симуляции.

Значения расчетов объема выборки полностью сопоставимы.

### Расширенные методы симуляции

Описанный подход обладает рядом ограничений. Так, предполагается что вариация данных не зависит от таких факторов как: препарат, период и последовательность. В случае, если возникает необходимость генерации данных с учетом гетерогенности вариации, может использоваться подход, основанный на генерации полного набора данных (т.е. данных субъектов), для последующего вычисления вариации и доверительного интервала. В этом случае для каждого субъекта генерируется пара случайных величин в соответствии с выражением:

$$\ln(Y_R) = SD \cdot X; \ln(Y_T) = SD \cdot X + \theta, \quad (9)$$

где  $Y_R$ ,  $Y_T$  — величина эффекта для тестируемого и референтного препарата,  $X$  — случайная нормально распределенная величина, генерируемая для каждого измерения каждого субъекта,  $\theta$  — ожидаемая величина отношения ( $\ln(\mu_T/\mu_R)$ ). После этого на основе сгенерированного массива данных проводится расчет вариации и вычисление доверительного интервала:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} \left( Y_{ijT} - Y_{ijR} - \frac{\sum_{i=j}^{n_i} (Y_{ijT} - Y_{ijR})}{n_i} \right)^2}{2 \left( \sum_{i=1}^m n_i - m \right)}, \quad (10)$$

где  $j$  — субъект,  $i$  — последовательность.

Под значением величины эффекта понимается логарифмически преобразованный показатель изучаемого фармакокинетического параметра ( $AUC$ ,  $C_{\text{max}}$ ).

Расчет мощности проводится аналогично описанному выше методу. В общем случае генерация данных проводится только для значения остаточной вариации, однако для расширенного анализа возможна генерация данных согласно полной модели вариации с включением влияния вариации, обусловленной периодом, препаратом, последовательностью.

Таким образом, предложенные методы позволяют провести расчет выборки для исследований биоэквивалентности на основании предположения об остаточной вариации данных, различия тестируемого и референтного препаратов, мощности и величины ошибки первого рода. Однако для прогнозирования и планирования исследований может применяться подход, использующий процедуру симуляции, основанную на генерации данных на уровне субъектов исследования. Данный подход позволяет включить в модель влияние других факторов, а также учитывать возможную гетерогенную вариацию для тестируемого и референтного препаратов, расширив инструментарий прогнозирования для исследователей. Исходные коды алгоритмов симуляции и данные валидации размещены на сайте [github.com](https://github.com) [13]. Для

генерации случайных величин была использована библиотека Colt 1.2.0 (cern.jet.random) [14].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 03.07.2016) “Об обращении лекарственных средств” (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017), Москва (2016).
2. *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, Том I, Гриф и К, Москва (2014). ISBN 978 – 5-8125 – 1858 – 5.
3. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза ([https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411955/cncd\\_21112016\\_89\\_2](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411955/cncd_21112016_89_2))
4. *Guidance for industry: Statistical Approaches Establishing Bioequivalence (2001)*; prepared by the Population and Individual Bioequivalence Working Group of the Biopharmaceutics Coordinating Committee in the Office of Pharmaceutical Science, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) at the Food and Drug Administration (FDA).
5. E. Diletti, D. Hauschke, and V. W. Steinijans, *Int. J. Clin. Pharm. Ther. Toxicol.*, **19**, 1 – 8 (1991).
6. Shein-Chung Chow and Hansheng Wang, *J. Pharmacokinet. Pharmacodynam.*, **28**(2), 155 – 169 (2001).
7. D. B. Owen, *Biometrika*, **52**, 437 – 446 (1965).
8. PowerTOST: Power and Sample Size Based on Two One-Sided t-Tests (TOST) for (Bio) Equivalence Studies reference manual v. 1.4 – 4 2017 – 03 – 15; <https://cran.r-project.org/web/packages/PowerTOST/index.html>.
9. G. Marsaglia and T. A. Bray, *SIAM Rev.*, **6**, 260 – 264 (1964).
10. D. E. Knuth; in: *The Art of Computer Programming*, Boston (1997), *Seminumerical Algorithms*, section 3.4.1, subsection C.
11. D. J. Sheskin, *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*, Fourth Edition, ISBN: 1584888148.
12. J. F. Monahan, *ACM Trans. Math. Software*, **13**, 168 – 172 (1987).
13. <https://github.com/PharmCat/Bioequivalence>
14. <http://dst.lbl.gov/ACSSoftware/colt/>

Поступила 28.04.17

## DETERMINING SAMPLE SET VOLUME FOR BIOEQUIVALENCE INVESTIGATIONS USING COMPUTER MODELING

V. S. Arnautov<sup>1</sup>, D. V. Reikhart<sup>2</sup>, and A. S. Borisov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valenta Pharm Company, Moscow, 119530 Russia

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

Standard design for drug bioequivalence study aimed at reducing the intra-individual variance is provided by randomized crossover  $2 \times 2$  investigation. Determination of the sample set volume for this bioequivalence investigation is an important part of experiment planning and must be reliably justified. The present work was aimed at implementation and validation of an algorithm for determining the necessary volume of sample set for bioequivalence investigation using numerical simulations. The proposed algorithm is based on the procedure of determination of the statistical test power for the known number of observations, variance, and preset value of the permissible first-order error level.

**Keywords:** bioequivalence; pharmacokinetics; sample volume; numerical simulations.