

03 de mayo de 2017

GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA PARA MEDICAMENTOS VETERINARIOS

Tabla de contenidos

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. DEFINICIONES	2
3. ALCANCES Y OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA	4
4. CASOS EN LOS QUE NO ES NECESARIO REALIZAR ENSAYOS DE BIOEQUIVALENCIA <i>IN VIVO</i>	5
5. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD PARA LA ALIMENTACIÓN HUMANA.....	5
6. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE PRODUCTOS QUE CONTIENEN FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDAD O FÁRMACOS DE ESTRECHO MARGEN TERAPÉUTICO	6
7. DISEÑO DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE DOSIS UNICA	6
8. DISEÑO DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE DOSIS MÚLTIPLES	11
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ENSAYOS DE BIOEQUIVALENCIA.....	13
10. BIBLIOGRAFÍA	16

REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA PARA MEDICAMENTOS VETERINARIOS

1. INTRODUCCIÓN

Para ejercer una acción terapéutica óptima, un ingrediente activo debería ser liberado en el sitio de acción en una concentración efectiva durante el período deseado. Para poder realizar una predicción confiable del efecto terapéutico, el desempeño de la forma de dosificación que contiene el ingrediente activo debe estar bien caracterizado.

Varios fallos terapéuticos asociados a diferencias en biodisponibilidad ocurridas en el pasado, atestiguan la necesidad de evaluar el desempeño de las formas de dosificación en el transporte del ingrediente activo a la circulación sistémica y de allí al sitio de acción. Así, la biodisponibilidad de un ingrediente activo de un producto farmacéutico debería ser conocida y reproducible. Si se asume que en el mismo sujeto un perfil de concentración plasmática en función del tiempo resultará en concentraciones esencialmente similares en el sitio de acción y, por ende, tendrá un efecto esencialmente similar, se puede utilizar la información farmacocinética, en vez de los resultados terapéuticos, para establecer equivalencias: bioequivalencias.

En la práctica, la evidencia de bioequivalencia es generalmente la prueba más apropiada para sustanciar la equivalencia terapéutica entre productos medicinales. Por lo tanto, se debe entregar evidencia razonable que permita establecer que el producto en estudio, es terapéuticamente equivalente con el producto de referencia.

Es importante mencionar que existen antecedentes que concluyen que generalmente los estudios de bioequivalencia no son adecuados para sustentar un período de restricción de uso previo a la faena o a la recolección de leche, huevos o miel. Solo en ciertas circunstancias muy limitadas, los estudios de depleción de residuos son adecuadamente abarcados por un estudio de bioequivalencia, relacionadas con el límite de cuantificación del método, la duración del estudio y el análisis estadístico de los resultados. Si estas condiciones no se cumplen, además de estudios de bioequivalencia, serían necesarios estudios confirmatorios de depleción de residuos en los medicamentos farmacológicos destinados a especies productoras de alimento.

El objetivo de esta guía técnica es formular requerimientos para el diseño, realización y evaluación de estudios de bioequivalencia. También se considera en el Apéndice I la posibilidad de emplear estudios *in vitro* complementarios para demostrar equivalencia terapéutica.

Esta guía, como toda guía, no está pensada para establecer un requisito regulatorio específico u obligatorio. Se trata de ofrecer una herramienta que permita, a decisión del solicitante de un registro y con el acuerdo de la autoridad regulatoria, usar este tipo de experiencias incruentas para avalar equivalencia terapéutica.

2. DEFINICIONES

2.1 Equivalente farmacéutico:

Dos medicamentos son equivalentes farmacéuticos si contienen la misma cantidad del mismo principio activo con la misma sal o éster en la misma forma farmacéutica, están destinados a ser administrados por la misma vía y cumplen con estándares de calidad idénticos o comparables. Sin embargo, la equivalencia farmacéutica no necesariamente implica equivalencia terapéutica, ya que diferencias en los excipientes y/o en el proceso de elaboración, pueden generar una disolución o absorción más rápida o más lenta, lo que puede determinar disparidades en el comportamiento de los productos (OMS).

2.2 Alternativa farmacéutica:

Dos productos son alternativas farmacéuticas si contienen la misma cantidad molar del mismo principio activo pero difieren en su forma farmacéutica (ej cápsula vs comprimido) y/o en su forma química (Ej diferentes sales diferentes esteres). Las alternativas farmacéuticas entregan el mismo principio activo por la misma vía de administración pero no son equivalentes farmacéuticos. Pueden o no ser bioequivalentes o equivalentes terapéuticos con el producto de referencia.

2.3 Biodisponibilidad:

La biodisponibilidad se entiende como la tasa y el grado con los que una sustancia activa o su ingrediente activo es liberado desde una forma farmacéutica y se hace disponible a la circulación general para ejercer un efecto.

La biodisponibilidad de un medicamento veterinario se define por la velocidad y magnitud con que la sustancia activa alcanza la circulación sistémica y está disponible en el/los sitio(s) de acción. La velocidad de absorción se mide considerando la concentración plasmática máxima obtenida (C_{max}), el tiempo al cual se alcanza la máxima concentración (T_{max}) y el área bajo la curva (AUC).

En la mayoría de los casos, las sustancias han sido desarrolladas para exhibir un efecto terapéutico sistémico, y se puede dar entonces una definición más práctica, tomando en consideración que la sustancia en la circulación general se halla en intercambio dinámico con la sustancia en el sitio de acción.

Puede ser útil diferenciar entre "biodisponibilidad absoluta" de una forma de dosificación dada: la comparada con el 100% obtenible de la administración de una solución intravenosa del mismo fármaco (por ej. solución oral versus intravenosa) y la "biodisponibilidad relativa": la comparada con otra forma administrada por vía extravascular (por ej. comprimidos versus solución oral).

2.4 Bioequivalencia:

Dos productos medicinales son bioequivalentes si estos son equivalentes farmacéuticos o alternativa farmacéutica y sus biodisponibilidades (velocidad y cantidad absorbida del principio activo) luego de su administración a la misma dosis molar son similares en tal grado, que sus efectos en lo que respecta a eficacia y seguridad en la especie de destino son esencialmente los mismos (y no necesariamente iguales en la seguridad en el ser humano o en el medio ambiente). Tales productos deben estar adecuadamente rotulados y ser manufacturados cumpliendo con las normas vigentes de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP CAMEVET o GMP OMS).

Existe bioequivalencia entre medicamentos veterinarios si: al ser administrado a la misma dosis molar y la misma vía de administración, bajo condiciones experimentales estandarizadas, la velocidad de absorción y la cantidad de sustancia activa absorbida, sólo difieren dentro de límites preestablecidos.

Las sustancias activas a comparar deben tener propiedades fisicoquímicas similares, por ejemplo, perfil de disolución, forma cristalina y tamaño de la partícula. En caso de tratarse de principios activos que se presentan en una mezcla racémica, éstos deberán presentar la misma proporción de isómeros.

2.5 Equivalencia terapéutica:

Un producto medicinal es equivalente terapéutico de otro sólo si son **equivalentes o alternativas farmacéuticos**, si tiene la misma calidad y demuestra, mediante estudios *in vivo* o *in vitro*, la misma eficacia y seguridad que el producto de referencia, cuya eficacia y seguridad ya han sido establecidas.

2.6 Producto de referencia

Producto para el cual la calidad, eficacia y seguridad han sido establecidas evaluadas y aprobadas por la autoridad sanitaria competente del país donde se solicite la admisión de la prueba de bioequivalencia para avalar un registro nuevo, una nueva vía de administración o bien un cambio de formulación.

3. ALCANCES Y OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

Los estudios de bioequivalencia son métodos científicos válidos para comparar:

3.1 Un cambio significativo en la formulación, que pueda afectar la biodisponibilidad del principio activo. *Cuando se cambia la composición de una forma farmacéutica, se podría utilizar estos estudios para demostrar que el nuevo producto es bioequivalente con el producto con el que fueron realizados los ensayos clínicos.*

3.2 Diferentes rutas de administración para el mismo producto. *Un producto con una única fórmula cualicuantitativa puede aplicarse por diferentes vías de administración. En este sentido, dos vías de administración son bioequivalentes cuando sus perfiles de concentración plasmática son similares dentro de límites preestablecidos,*

3.3 Diferentes productos medicinales veterinarios que son equivalentes farmacéuticos. Evitar la realización de estudios de seguridad y/o eficacia cruentos, estudio que resultan innecesarios si se puede demostrar la bioequivalencia del producto con otro aprobado que cuenta con estos estudios. *Ej: nuevo producto vs producto de referencia. Si se hace referencia comparativa a un producto aprobado en términos de eficacia y/o seguridad, se debe demostrar la bioequivalencia con ese producto. (Dependiendo si la autoridad regulatoria admite la bioequivalencia como una herramienta para el registro de productos).*

Si bien hay estudios de equivalencia *in vitro* que en algunos casos son suficientes para lograr el objetivo, estos estudios se aplican más a formas farmacéuticas sólidas (ej: comprimidos). Este tipo de estudios son tratados en el Apéndice I.

4. CASOS EN LOS QUE NO ES NECESARIO DEMOSTRAR BIOEQUIVALENCIA *IN VIVO*

Generalmente no hacen falta estudios de bioequivalencia *in vivo* si el producto cumple con una o más de las siguientes condiciones:

a) El producto es una solución elaborada para ser administrada sólo por vía **intravenosa** y contiene la misma sustancia activa que un producto previamente aprobado para ser usado por la misma vía para el uso en la especie de destino que es sujeto de la nueva solicitud.

b) El producto es una forma de dosificación oral diseñada para no ser absorbida (p. ej., antiácido, medio radiopaco).

c) El producto reúne todas estas condiciones:

- Es una **solución oral**, jarabe u otra forma solubilizada similar de rápida liberación y alta absorción o es una forma farmacéutica sólida cuya rápida disolución haya sido previamente demostrada y contenga uno o más principios activos altamente solubles y absorbibles (Clasificación BCS, Biopharmaceutics Classification System). .-
- Contiene una sustancia activa en la misma dosis molar que el producto de referencia.
- Demuestra no contener sustancias inactivas que puedan afectar significativamente la absorción de la sustancia activa.

d) El producto es un producto reformulado por el fabricante original y es idéntico al de referencia, excepto por los agentes colorantes, saborizantes o conservantes, que se ha demostrado que no tienen influencia en la biodisponibilidad.

e) Soluciones anestésicas volátiles inhalatorias que contienen el mismo principio activo en la misma dosis.

f) Soluciones de aplicación tópica indicadas para obtener efectos terapéuticos locales. Otras formas farmacéuticas tópicas para uso local sólo en animales que no sean para consumo humano.

El hecho que no se realicen ensayos de bioequivalencia *in vivo* no implica la no realización de ensayos *in vitro*.

5. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD PARA LA ALIMENTACIÓN HUMANA

Demostrar que dos formulaciones son bioequivalentes generalmente no permite asegurar que ambas tendrán el mismo período de resguardo. Esto se debe a que pequeñas variaciones en la absorción cuando las concentraciones son muy pequeñas pueden producir diferencias significativas en la pendiente de eliminación que es la que se utiliza para determinar el período de resguardo.

Por ello, sólo es posible eximir de la presentación de un estudio de determinación de período de resguardo cuando:

- a. el método utilizado para la cuantificación del activo en plasma posea un límite de cuantificación igual o menor a la mitad del LMR,

- b. se hayan realizado al menos dos determinaciones en tiempos posteriores al período de restricción (periodo de resguardo) del producto original en ensayo
- c. se demuestre que no hay diferencias significativas entre los resultados de ambos productos en estas determinaciones.

En todo otro caso, la presentación de un estudio de bioequivalencia no eximirá de la realización de un estudio de determinación de período de resguardo.

6. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE PRODUCTOS QUE CONTIENEN FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDAD O FÁRMACOS DE ESTRECHO MARGEN TERAPÉUTICO

En casos específicos en los cuales el principio activo del producto en investigación presenta una ventana terapéutica estrecha (NTI), es decir, que producto de pequeñas variaciones de los niveles plasmáticos pueden provocar serias fallas terapéuticas (concentraciones sub-terapéuticas) o bien reacciones adversas serias (concentraciones supra-terapéuticas), se deberá evaluar si es que existe la necesidad de estrechar los rangos de aceptación de bioequivalencia, por ejemplo que el rango de aceptación del área bajo la curva (AUC del inglés) sea más pequeño, usualmente 90-110%, lo cual deberá ser justificado clínicamente. Lo anterior, se debe a que la curva dosis respuesta presenta una pendiente pronunciada, lo que se traduce en que pequeños cambios en las concentraciones plasmáticas generan variaciones importantes en los resultados clínicos (ej.:Ciclosporina), entonces los límites de aceptación deberían ser más estrechos, con el objetivo de garantizar la seguridad en el uso de estos medicamentos.

En el caso de los fármacos de alta variabilidad intra-individual, es decir, que presentan una variabilidad significativa/importante ($CV \geq 30\%$) en la cantidad y/o velocidad con que éstos se absorben en un mismo individuo, podría aceptarse un rango más amplio, pero éste debe ser justificado científicamente, tomando en cuenta consideraciones de seguridad y eficacia. Se debe tener en cuenta que en aquellos fármacos que presentan una alta variabilidad en el parámetro $C_{m\acute{a}x}$, es recomendado planificar la toma de una mayor cantidad de muestra cercano a $T_{m\acute{a}x}$, de tal manera que tanto la velocidad como la cuantía de absorción puedan ser caracterizadas adecuadamente.

Para ambos casos, se debe demostrar su equivalencia terapéutica mediante estudios comparativos *in vivo*.

7. DISEÑO DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE DOSIS UNICA

Cuando fuera posible se deberá realizar una comparación de un estudio de bioequivalencia *in vivo* de dosis única respecto de los productos o las vías de administración a evaluar en la especie animal de destino. Para conocer ejemplos de cuándo puede ser necesario un estudio de bioequivalencia *in vivo* de dosis múltiples, consultar la sección 8.

7.1 Producto de referencia

Cuando se emplee bioequivalencia para sustentar el registro de un nuevo producto que se propone como equivalente terapéutico de otros, el producto de referencia más apropiado es el primer producto autorizado con un expediente completo. Cuando existen varios productos aprobados, pero con distintas etiquetas, aplicaciones o especies, se debe llevar a cabo una prueba de bioequivalencia con el producto de referencia aprobado para las mismas indicaciones para las que fue diseñado el producto problema (test).

El producto de referencia deberá tomarse de un lote vigente de un producto aprobado en el país donde se solicite el registro del medicamento, que contenga la misma sustancia activa que la nueva formulación, nueva forma de dosificación o sal. Por ejemplo, se considera que diferentes ésteres de la misma entidad terapéutica son productos distintos.

Para un producto dado, una formulación puede servir de referencia para demostrar la bioequivalencia con otras formulaciones que eran parte del desarrollo.

Los Productos de Referencia o Comparadores, serán definidos por la autoridad sanitaria del país respectivo, a propuesta del patrocinador del estudio en el momento de la aprobación del protocolo.

7.2 Vía de administración de referencia

La vía de administración de referencia es la que se empleó al realizar los ensayos clínicos o toxicológicos y a la cual se hace referencia en cuanto a eficacia y seguridad.

7.3 Estándares para productos farmacológicos de prueba y de referencia

Se debe demostrar que tanto el producto de prueba como el de referencia cumplen con todos los estándares incluidos en compendios u otros estándares aplicables de identidad, concentración, calidad y pureza, además de cumplir con las exigencias de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP CAMEVET o GMP OMS).

7.4 Animales

Los animales utilizados en estudios de bioequivalencia deben estar clínicamente sanos y ser un grupo homogéneo (edad, raza, peso, estado hormonal y nutricional, nivel de producción, etc.). Cuando fuera posible, se recomienda restringir los estudios a un sexo si no hay evidencia de interacción entre sexo y productos. Cuando resulte difícil conservar la homogeneidad de todos los animales dentro del estudio (p. ej., en caballos), será aceptable utilizar ganado no homogéneo, siempre y cuando se haya equiparado a los animales en cada grupo de tratamiento por edad, peso, sexo (si fuera relevante), etc. Eso se deberá realizar mediante aleatorización restringida basada en el/los factor(es) de bloqueo relevante(s).

Los animales seleccionados deben provenir de la población de destino para la cual el producto es concebido.

Tamaño del grupo: la cantidad apropiada de animales debe estimarse cuidadosamente y depende de varios factores, incluida la varianza de la respuesta, diferencias en las dos formulaciones y nivel de rechazo de la hipótesis. El diseño cruzado tiene ventajas respecto de la potencia y la cantidad de animales necesarios. Se recomienda utilizar un mínimo de 6 animales por grupo para diseño cruzado y 12 animales por grupo para el diseño en paralelo.

7.5 Condiciones del ensayo

La bioequivalencia debe llevarse a cabo cumpliendo las exigencias de las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

En el caso de la vía oral, se debe prestar especial atención a los distintos factores que se sabe afectan la disposición de la sustancia activa. La administración de alimento puede mejorar o interferir con la absorción del fármaco, según las características del fármaco y la formulación. La alimentación también puede aumentar la variabilidad inter- o intra-sujeto de la velocidad y la magnitud de absorción del fármaco. El fundamento para realizar cada estudio de bioequivalencia bajo condiciones de ayuno o alimentación debe estar incluido en el protocolo. El protocolo debe describir la dieta y el régimen de alimentación que se seguirá en el estudio. Para todas las especies, el estado prandial y el tiempo exacto de alimentación deben ser consistentes con el bienestar animal (por ejemplo, los rumiantes no deben ser sometidos a ayuno) y con la farmacocinética del principio activo. Los estudios de medicamentos para caninos y felinos administrados vía oral se deberán realizar en animales en ayunas, a menos que la etiqueta del producto de referencia indique que el producto debe administrarse únicamente una vez recibidos los alimentos. El ayuno debe ser 8 horas antes y 4 horas después de la administración de la dosis. Para medicamentos orales de liberación prolongada indicados para animales no rumiantes, los estudios de bioequivalencia se deberán realizar en ambos estados, bajo condiciones de ayuno y una vez recibidos los alimentos, a menos que sea debidamente justificada otra condición. El protocolo debe contener el racional para desarrollar el estudio de bioequivalencia en estado de ayuno o alimentado y debe describir la dieta y el régimen de alimentación.

Si la etiqueta del producto de referencia indica que el producto debe administrarse únicamente en ayunas o habiendo recibido alimento, entonces el estudio de bioequivalencia deberá llevarse a cabo de ese modo.

7.6 Dosis que se probará

La dosis debe ser la aprobada y vigente.

Cuando el producto de referencia tiene varias dosis aprobadas, la prueba de bioequivalencia se debe realizar con la dosis más alta.

7.7 Recolección de muestras

Las concentraciones de principio activo y/o sus metabolitos activos se podrán determinar en muestras biológicas tales como sangre, suero, plasma y otros fluidos biológicos (ej: leche, orina).

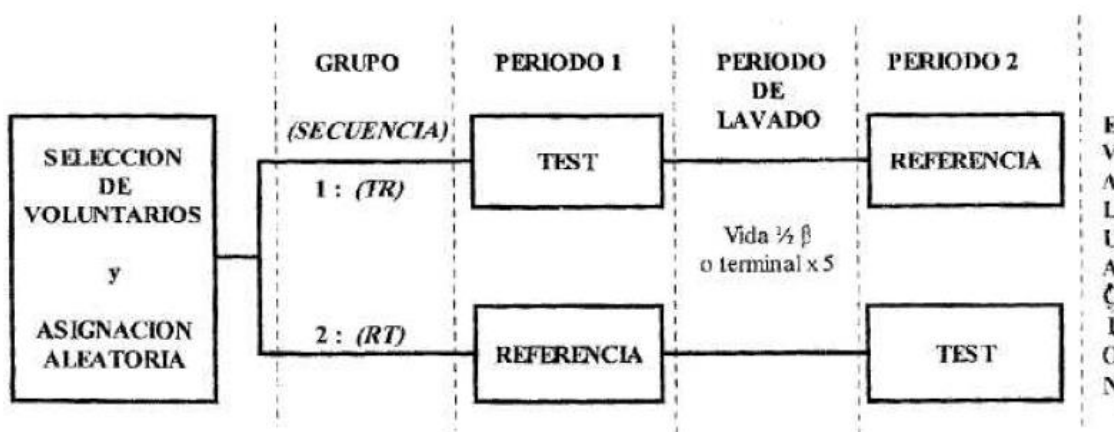
Las muestras deben ser tomadas de forma tal que se mida C_{max} y ABC adecuadamente. Se deberá medir al menos 2 puntos antes del C_{max}, entre 2 a 3 puntos alrededor del C_{max} y entre 3 a 4 puntos durante la fase de eliminación del principio activo.

7.8 Diseño experimental

El diseño de todo estudio de bioequivalencia tenderá a reducir al máximo la variabilidad no dependiente de las formulaciones estudiadas; test (T) y referencia (R). El diseño más habitual en un estudio de bioequivalencia es un estudio cruzado de dos secuencias (TR/RT), dos períodos (Período 1/Período 2),

dos tratamientos, aleatorizado, con una dosis única en cada período, no replicado y balanceado; todos los animales (en igual número en cada secuencia) deben recibir ambos tratamientos T y R. Este diseño permite evitar posibles confusiones entre los efectos del tratamiento y el período.

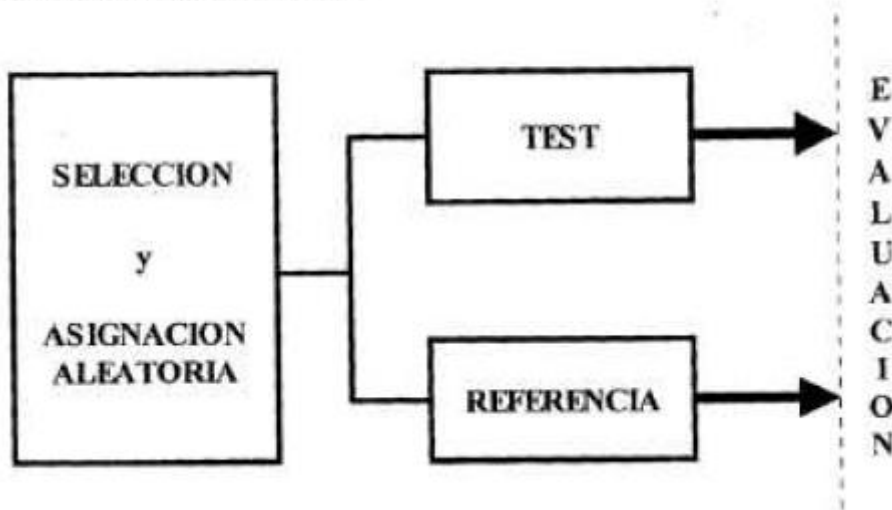
El tiempo transcurrido entre la administración de cada dosis de las formulaciones T o R, se denomina período de lavado y el mismo debe ser lo suficientemente prolongado como para que al momento de la segunda administración no se detecten concentraciones del principio activo administrado en el primer período, o éstas sean tan bajas que no tengan ninguna incidencia farmacocinética sobre la nueva administración. El esquema de diseño cruzado clásico se presenta en la figura siguiente.



El período de lavado deberá ser igual en todos los animales y su duración deberá ser de por lo menos diez veces la semivida de eliminación de la sustancia activa o sus metabolitos. Además, se podría requerir un período de tiempo adicional para alcanzar la desaparición de cualquier efecto farmacológico, como por ejemplo la inducción de las enzimas microsomales.

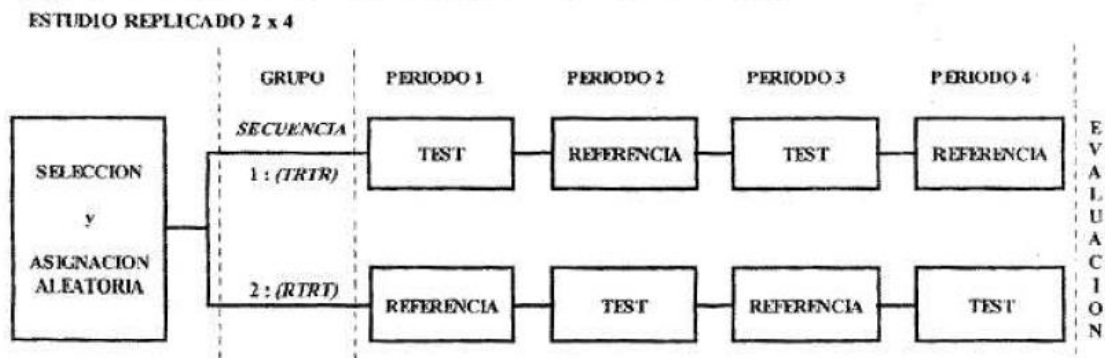
En el caso en que el período de lavado sea incompatible con un diseño cruzado clásico, como en el caso de fármacos con semivida prolongada o cuando los estudios deben realizarse en animales en crecimiento, se puede recurrir a un diseño paralelo en el que participan dos grupos con idéntico número de animales (grupo 1 y grupo 2), donde un grupo recibe solo una única dosis de un producto distinto del asignado al otro grupo. El esquema de diseño paralelo se presenta en la figura siguiente

ESTUDIO PARALELO



Para las formulaciones que posean un principio activo con alta variabilidad farmacocinética (CV igual o mayor al 30%), y que la formulación presente una semivida de eliminación corta, un modelo posible es el diseño replicado de dos secuencias y cuatro períodos, Secuencia 1: TRRT; Secuencia 2 TRRT. El esquema de diseño replicado de dos secuencias y cuatro períodos se presenta en la figura 4 del anexo.

DISEÑO REPLICADO 2 SECUENCIAS POR 4 PERÍODOS



7.9 Tamaño de la muestra

El número de animales necesarios para realizar un estudio de bioequivalencia está determinado por el nivel de significancia fijado, por la diferencia que se espera detectar, por la potencia esperada del ensayo y por el error de la varianza asociada a la característica primaria a ser estudiada expresado como CV intra-individual. El valor de este último puede obtenerse a partir de los resultados de un estudio piloto, de resultados de estudios realizados con anterioridad o a partir de datos procedentes de la literatura.

El número de animales debe ser calculado mediante métodos apropiados y no debe ser menor a 6 animales por grupo para diseño cruzado y 12 animales por grupo para el diseño en paralelo.

El método de cálculo del número de animales para un modelo multiplicativo (datos transformados a sus logaritmos naturales) se presenta en la ecuación 1 del anexo. Este método de cálculo permite estimar el número de individuos para un diseño cruzado clásico en función de varios valores de CV, de valores del cociente entre las medias geométricas (μ_T/μ_R) de los parámetros farmacocinéticos empleados y de la potencia esperada del método estadístico ($1-\beta$). Para un diseño paralelo este valor debe ser multiplicado por 2.

El test estadístico para demostrar bioequivalencia debe poseer una potencia no menor al 80%, con un riesgo para el consumidor del 5% (error α ; 0,05) y un riesgo para la industria farmacéutica del 20% (error β ; 0,20). Dado que la potencia se estima como $1-\beta$, el riesgo para la industria farmacéutica puede reducirse incrementando la potencia del test estadístico, lo que se logra incrementando el número de animales a incluir en el estudio. En la Tabla 1 del anexo, se presentan los números de individuos necesarios para realizar un estudio de bioequivalencia en función de diferentes valores de potencia del test estadístico, diferentes valores de CV y diferentes cocientes entre las medias geométricas de los parámetros farmacocinéticos fundamentales.

Los patrocinantes del estudio deben seleccionar un número suficiente de sujetos en consideración de las posibles pérdidas o retiros del estudio. Debido a que el reemplazo de animales durante el estudio puede complicar el modelo y análisis estadístico, generalmente no se recomienda reemplazar las pérdidas. Es por tanto, apropiado reclutar para el estudio un número de animales superior que el requerido según el cálculo del tamaño de la muestra.

7.10 Consideraciones del tiempo de muestreo

Los tiempos de muestreo deben ser elegidos de modo que permitan, en la medida de lo posible, describir el perfil de concentración plasmática del principio activo y permitir una determinación precisa de la T_{max} y la C_{max} .

Para maximizar la eficacia del tiempo de muestreo, puede ser necesario realizar un estudio piloto que ayude a identificar la forma de la curva de concentración/tiempo y la variabilidad probable en los valores de concentración.

7.11 Análisis

Los métodos analíticos empleados en estudios de bioequivalencia deben estar completamente validados para cumplir con los criterios de validación estándar dados en la guía Guidance for industry Bioanalytical Method Validation FDA, Guidance for bioanalytical method of validation EMEA.o de la Guía CAMEVET para validación de estudios de residuos

8. DISEÑO DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA DE DOSIS MÚLTIPLES

8.1 Principios básicos

En algunos casos, es necesario comparar el producto Test con el de Referencia luego de administraciones repetidas, a fin de determinar las concentraciones plasmáticas durante el estado de equilibrio estacionario. Esto puede suceder en el caso de principios activos muy potentes que provocan efectos farmacéuticos a concentraciones plasmáticas muy bajas que se encuentran por debajo de la

resolución de la técnica analítica. Con el avance de las técnicas analíticas, estas situaciones se dan en casos excepcionales.

Se requiere un estudio de dosis múltiples cuando:

- a) La acción del producto es dependiente de las concentraciones plasmáticas del principio activo en estado estacionario.
- b) El principio activo presenta cinética no lineal y/o dependiente del tiempo.
- c) La concentración de la sustancia activa que resulta de una dosis única es demasiado baja para ser determinada con precisión a través del método analítico.
- d) Para formas farmacéuticas de liberación extendida con tendencia a acumulación.

8.2 Producto de referencia y condiciones experimentales

Como se estableció previamente.

8.3 Dosis

La selección de la dosis de los productos Test y Referencia se definirán según lo explicitado en el punto 5.6.

8.4 Frecuencia de administración

Se debe seleccionar la frecuencia de administración que dé como resultado las mayores concentraciones del fármaco en estado estacionario (Css). Esto se podrá determinar mediante un estudio piloto.

8.5 Recolección de muestras

Se deben tomar muestras para establecer que se alcanzaron condiciones de equilibrio estacionario (p. ej., midiendo dos o más concentraciones máximas (C_{max}) o mínimas (C_{min}) en sangre, plasma o suero o recolectando aproximadamente 10 muestras de sangre. (incluso inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis) durante el intervalo de dosis.

Las muestras de sangre debieran tomarse con una frecuencia suficiente que permitiera evaluar adecuadamente C_{máx}, ABC, C_{min} y otros parámetros. Los puntos experimentales de muestreo deben incluir una muestra pre-dosis, al menos 1 o 2 puntos antes de C_{max}, 2 puntos alrededor de C_{max}, 3 a 4 puntos durante la fase de eliminación.

8.6 Diseño experimental

La biodisponibilidad puede ser determinada en condiciones de estado de equilibrio estacionario sin necesidad de un período de lavado entre la administración de las formulaciones Test y Referencia.

En este tipo de ensayo, se cuenta con un solo grupo de animales y ambas formulaciones Test y Referencia serán administradas a cada uno de ellos guardando un intervalo entre dosis preestablecido, hasta alcanzar el estado de equilibrio estacionario (E_{ss}).

El número de dosis que deben ser administradas para alcanzar el E_{ss} está determinado por el tiempo fijado como intervalo entre dosis (τ) y por la semivida de eliminación de la formulación. Se acepta que el E_{ss} se alcanza cuando se han administrado las dosis preestablecidas durante un tiempo equivalente a 4-5 veces el valor de la semivida de eliminación de la formulación. En esas condiciones, el ABC estimada a partir de la administración realizada tras alcanzar el E_{ss} ($ABC_{R,SS 0-\tau}$) es igual a la que se estimaría luego de la administración de una única dosis de la formulación ($ABC_{R 0-\infty}$). Seguidamente a la administración de la última dosis de la formulación Referencia, se comienza a administrar las dosis de la formulación Test a los intervalos preestablecidos durante el tiempo necesario para que se alcance un nuevo E_{ss} . Al alcanzarse esa condición, se estima el ABC obtenida a partir de la última dosis administrada de la formulación Test ($ABC_{T,SS 0-\tau}$). La representación gráfica del diseño experimental para demostrar bioequivalencia mediante la administración de dosis múltiples se presenta en la figura 5 del anexo.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ENSAYOS DE BIOEQUIVALENCIA

9.1 Parámetros farmacocinéticos a analizar

Se deben analizar los parámetros farmacocinéticos derivados de las curvas de concentración del principio activo en la matriz biológica en que se haya determinado. A fin de evitar un posible sesgo, el cálculo de los parámetros fundamentales debe estar basado en los datos experimentales observados, evitando el uso de datos estimados por cualquier procedimiento matemático. Excepcionalmente, la utilización de datos estimados por modelización farmacocinética, interpolación u otros procedimientos deberá estar adecuadamente justificada para incluirlos en el estudio de bioequivalencia y los métodos de cálculo definidos a priori en el protocolo del estudio.

Existen numerosas situaciones en que puede ocurrir la eliminación total o parcial de los datos obtenidos para un animal durante el estudio de bioequivalencia de un medicamento. estas eliminaciones deberán ser justificadas técnicamente en el estudio.

Existen situaciones que pueden ocurrir con tal frecuencia que requieran ser estipuladas en el protocolo del estudio, por ejemplo, pérdida de una dosis administrada por regurgitación del animal. En estos casos los criterios para la eliminación de los datos deberán estar especificados previamente en el protocolo del estudio. Además, en estos casos se deberá evaluar la eliminación de los datos, considerando factores como:

- Lapso de tiempo aceptable entre la administración del fármaco y el evento de regurgitación.
- Cuando la cantidad de material perdido (alimento con medicamento) se considera relevante en el estudio.

Además, en caso de redosificar al animal después de un evento de pérdida, el criterio para la redosificación debe estar claramente establecido en el protocolo del estudio.

Por último es importante que todos los datos disponibles se encuentren incluidos en el análisis estadístico.

9.2 Estudios de dosis única

En los estudios de dosis única, los parámetros fundamentales para demostrar bioequivalencia son el área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo (ABC) y la concentración plasmática máxima observada (C_{max}).

El valor del ABC deberá ser calculado a partir de los datos de concentración plasmática observados mediante el método trapezoidal lineal.

El valor del ABC solo podrá ser utilizado en el estudio si el ABC estimada desde tiempo cero hasta el tiempo en el cual se observó la última concentración plasmática medida (ABC_{0-tz}) es igual o mayor al 80% del área bajo la curva extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$).

Los valores de C_{max} observados sólo serán útiles para estimar bioequivalencia si están claramente definidos y determinados con relativa exactitud. Esto se logra con tiempos de muestreo apropiados en la región de máxima probabilidad de aparición del pico de concentración plasmática, determinada a partir de un estudio piloto o de datos disponibles en la literatura.

Otros parámetros complementarios pueden ser calculados e incluidos en el estudio, a fin de proporcionar información adicional acerca del comportamiento farmacocinético de los productos a testear como, el tiempo al cual se observa la máxima concentración plasmática (T_{max}), el área bajo el momento de la curva (ABMC), el tiempo medio de residencia (TMR) y la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2el}$).

El T_{max} es una función de las constantes de velocidad de absorción como de eliminación. La utilidad de su valor está sujeta a las mismas consideraciones de C_{max} . Sin embargo la robustez del mismo es menor a ésta debido a que T_{max} es un parámetro que cuantifica una variable discreta (tiempos de muestreo) cuyos valores fueron preestablecidos en el diseño experimental, por lo tanto se lo incluye en el grupo de los parámetros complementarios.

El ABMC es un parámetro farmacocinético que no tiene interpretación directa, pero su cálculo es obligado para la estimación del TMR, por lo tanto sus valores pueden ser incluidos en el estudio.

El TMR puede ser utilizado como una variable complementaria cuando refleja el tiempo medio de absorción (TMA). El TMR sólo puede ser empleado cuando se ha determinado el TMR luego de la administración intravenosa en los mismos animales.

Si el diseño requiere otras matrices biológicas distintas del plasma, deberá seleccionarse y justificarse la utilización de los parámetros que se elijan.

9.3 Estudios de dosis múltiples

El parámetro farmacocinético fundamental para determinar bioequivalencia en los estudios de dosis múltiples es el área bajo la curva en estado de equilibrio entre administraciones ($ABC_{0-\tau}$).

Como parámetros complementarios se pueden considerar la concentración promedio en estado estable que se estima como $ABC_{0-\tau}$ sobre el intervalo entre administraciones (τ) ($ABC_{0-\tau}/\tau$), y el rango de fluctuación entre la concentración máxima y la concentración mínima observadas una vez alcanzado el estado de equilibrio estacionario ($C_{max} - C_{min}$).

9.4 Criterios para determinar la bioequivalencia (intervalo de bioequivalencia)

Los criterios deben ser seleccionados antes del comienzo del experimento y descriptos en el protocolo. El intervalo de bioequivalencia debe estar justificado con respecto a efectos clínicos esperados o efectos farmacológicos.

Para establecer que dos formulaciones son bioequivalentes se debe estimar el intervalo de confianza al 90% (IC90%) del cociente entre las medias geométricas (μ_T/μ_R) del ABC y la C_{max} , y demostrar que éste está comprendido dentro de un intervalo cuyos límites inferior y superior son 0.80 y 1.25.

En casos específicos en los cuales el principio activo del producto en investigación presente una ventana terapéutica estrecha, como en el caso de los compuestos con curvas de dosis-respuesta pronunciadas (con grandes variaciones en poco tiempo), entonces los límites deberían ser más estrechos.

En caso de tener que demostrar bioequivalencia entre productos en investigación que presentan principios activos con amplio margen terapéutico, puede considerarse la ampliación de los límites a 0,7 -1,43. Esto es muy frecuente en el caso de C_{max} siempre que se basen en evidencia clínica y cuando se especifique en el protocolo.

9.5 Análisis de los datos

El análisis de los datos debe presentarse en detalle. Es necesario realizar un análisis de varianza (que incluya formulación, período, secuencia, animales anidados en secuencia y, cuando correspondiera, efectos de sexo por formulación) para estimar la varianza de error que luego se utilizará para calcular el intervalo de confianza. Para ABC y C_{max} , antes de realizar el análisis de varianza, se recomienda la transformación logarítmica de datos. Para los parámetros dependientes del tiempo observados, la transformación no corresponde y podría ser mejor utilizar un enfoque no paramétrico. Para finalizar con el análisis de bioequivalencia, se deben comparar los límites superior e inferior del intervalo de confianza calculados con la varianza de error estimada, que se encuentran en las tablas de Análisis de la Varianza (ANOVA), con los límites predeterminados, es decir, 0,8 a 1,25 o 0,7 a 1,43 para datos de transformación logarítmica o bien 0,8 a 1,2 o 0,7 a 1,3 para datos no transformados.

Si se detectó un efecto en la secuencia, se debe analizar el primer período del diseño cruzado como diseño paralelo.

Cuando se utilizan varios criterios en la demostración de la bioequivalencia (caso general), la conclusión final a favor de la bioequivalencia se saca solamente si la hipótesis nula de no equivalencia es rechazada respecto de todos los parámetros relevantes.

También pueden emplearse otras técnicas de análisis estadístico validadas y adecuadamente fundamentadas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- “Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products”, EMEA/CVMP/016/00-FINAL, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology, 2001.
- “Guidance for Industry, Bioequivalence Guidance”, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2002.
- “Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence”, CPMP/EWP/QWP/1401/98, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, 2001.
- “Bioequivalence: Blood Level Bioequivalence Study”, VICH GL 52, 2013.

ANEXO DE LA GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE
BIOEQUIVALENCIA PARA MEDICAMENTOS VETERINARIOS: GRÁFICOS Y
TABLAS.

Figura 1. Representación esquemática del fundamento de un estudio para demostrar bioequivalencia entre una formulación de Referencia y una formulación Test. Si ambas formulaciones son equivalentes farmacéuticos y sus biodisponibilidades (velocidad y cantidad absorbida del principio activo) luego de su administración a la misma dosis molar son similares dentro de límites pre-establecidos, se asume que sus efectos en lo que respecta a eficacia y seguridad son los mismos.

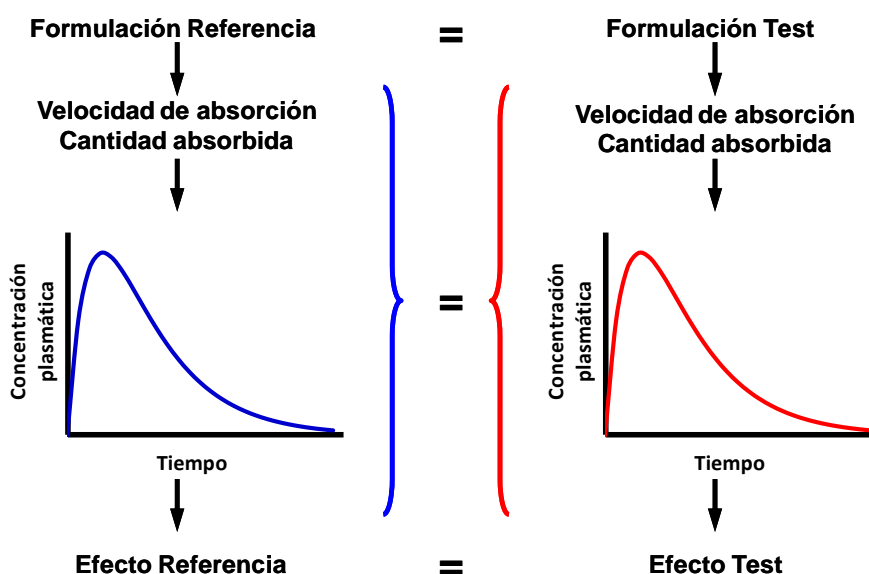


Figura 2. Representación esquemática diseño experimental cruzado de dos secuencias (TR/RT), dos períodos (Período 1/Período 2), dos tratamientos (Referencia y Test), aleatorizado, con una dosis única en cada período, no replicado y balanceado.

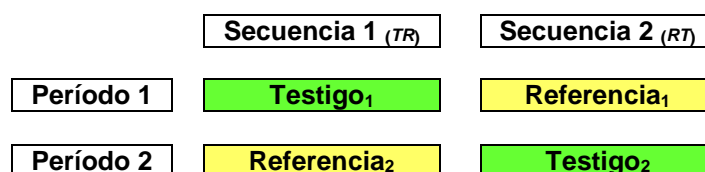


Figura 3. Representación esquemática de un diseño experimental paralelo. En este diseño participan dos grupos (grupo 1 y grupo 2), con idéntico número de animales cada uno donde un grupo recibe solo una única dosis de un producto distinto del asignado al otro grupo.

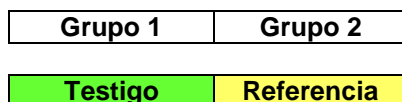


Figura 4. Representación esquemática de un diseño experimental replicado de dos secuencias y cuatro períodos.



Ecuación 1. Algoritmo propuesto por D. Hauschke & col. (1992) para estimar el número de individuos necesarios para realizar un estudio de bioequivalencia promedio.

$$Si 1 < \mu_T/\mu_R < \theta_S, entonces N \geq \left[t_{2N-2}^{1-\alpha} + t_{2N-2}^{1-\beta} \right]^2 \left[\frac{CV}{\ln\theta_S - \ln(\mu_T/\mu_R)} \right]^2$$

$$Si \theta_I < \mu_T/\mu_R < 1, entonces N \geq \left[t_{2N-2}^{1-\alpha} + t_{2N-2}^{1-\beta} \right]^2 \left[\frac{CV}{\ln\theta_I - \ln(\mu_T/\mu_R)} \right]^2$$

donde, μ_R y μ_T son las medias geométricas de los parámetros farmacocinéticos de las formulaciones Referencia y Test respectivamente, $\ln\theta_S$ y $\ln\theta_I$ son los logaritmos naturales de los límites superior e inferior para demostrar bioequivalencia, CV es el coeficiente de variación interindividual, t es el estadístico del test unilateral de t , α (0,05) y β (0.20) son los errores de consumidor (5%) y de la industria farmacéutica (20%), $2N-2$ es grado de libertad para un diseño experimental cruzado clásico, este valor en un diseño paralelo debe ser reemplazado por $N-1$.

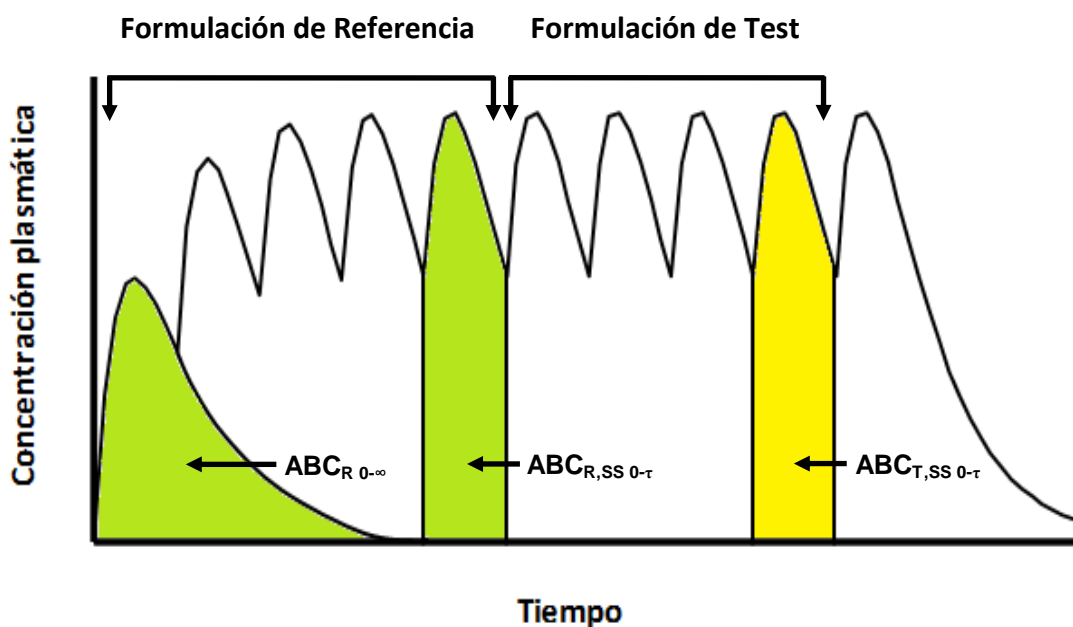
Tabla 1. Tamaños de muestra (número de individuos) para obtener una potencia estadística del 70%, 80% y 90% y varios valores de coeficientes de variación interindividual (CV%) cuando se aplica un modelo multiplicativo para demostrar bioequivalencia donde; $\alpha = 0,05$ (5%), $\Theta_1 = 0,8$ y $\Theta_5 = 1,25$. Los valores no enteros fueron redondeados a su valor inmediato superior y se presentan en *itálica*.

CV (%)	Potencia (%)	μ_T/μ_R							
		0.85	0.90	0.95	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20
5.0	70	<i>10</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>16</i>
7.5		<i>16</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>10</i>	<i>34</i>
10.0		<i>28</i>	<i>10</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>16</i>	<i>58</i>
12.5		<i>42</i>	<i>14</i>	<i>8</i>	<i>8</i>	<i>8</i>	<i>12</i>	<i>24</i>	<i>90</i>
15.0		<i>60</i>	<i>18</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>16</i>	<i>32</i>	<i>128</i>
17.5		<i>80</i>	<i>22</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>44</i>	<i>172</i>
20.0		<i>102</i>	<i>30</i>	<i>16</i>	<i>14</i>	<i>16</i>	<i>26</i>	<i>56</i>	<i>224</i>
22.5		<i>128</i>	<i>36</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>70</i>	<i>282</i>
25.0		<i>158</i>	<i>44</i>	<i>24</i>	<i>20</i>	<i>22</i>	<i>38</i>	<i>84</i>	<i>344</i>
27.5		<i>190</i>	<i>52</i>	<i>28</i>	<i>24</i>	<i>26</i>	<i>44</i>	<i>102</i>	<i>414</i>
30.0	<i>224</i>	<i>60</i>	<i>32</i>	<i>28</i>	<i>32</i>	<i>52</i>	<i>120</i>	<i>490</i>	
5.0	80	<i>12</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>22</i>
7.5		<i>22</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>12</i>	<i>44</i>
10.0		<i>36</i>	<i>12</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>20</i>	<i>76</i>
12.5		<i>54</i>	<i>16</i>	<i>10</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>14</i>	<i>30</i>	<i>118</i>
15.0		<i>78</i>	<i>22</i>	<i>12</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>42</i>	<i>168</i>
17.5		<i>104</i>	<i>30</i>	<i>16</i>	<i>14</i>	<i>16</i>	<i>26</i>	<i>56</i>	<i>226</i>
20.0		<i>134</i>	<i>38</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>18</i>	<i>32</i>	<i>72</i>	<i>294</i>
22.5		<i>168</i>	<i>46</i>	<i>24</i>	<i>20</i>	<i>24</i>	<i>40</i>	<i>90</i>	<i>368</i>
25.0		<i>206</i>	<i>56</i>	<i>28</i>	<i>24</i>	<i>28</i>	<i>48</i>	<i>110</i>	<i>452</i>
27.5		<i>248</i>	<i>68</i>	<i>34</i>	<i>28</i>	<i>34</i>	<i>58</i>	<i>132</i>	<i>544</i>
30.0	<i>292</i>	<i>80</i>	<i>40</i>	<i>32</i>	<i>38</i>	<i>68</i>	<i>156</i>	<i>642</i>	
5.0	90	<i>14</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>28</i>
7.5		<i>28</i>	<i>10</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>16</i>	<i>60</i>
10.0		<i>48</i>	<i>14</i>	<i>8</i>	<i>8</i>	<i>8</i>	<i>14</i>	<i>26</i>	<i>104</i>
12.5		<i>74</i>	<i>22</i>	<i>12</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>40</i>	<i>162</i>
15.0		<i>106</i>	<i>30</i>	<i>16</i>	<i>12</i>	<i>16</i>	<i>26</i>	<i>58</i>	<i>232</i>
17.5		<i>142</i>	<i>40</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>20</i>	<i>34</i>	<i>76</i>	<i>312</i>
20.0		<i>186</i>	<i>50</i>	<i>26</i>	<i>20</i>	<i>24</i>	<i>44</i>	<i>100</i>	<i>406</i>
22.5		<i>232</i>	<i>64</i>	<i>32</i>	<i>24</i>	<i>30</i>	<i>54</i>	<i>124</i>	<i>510</i>
25.0		<i>284</i>	<i>78</i>	<i>38</i>	<i>28</i>	<i>36</i>	<i>66</i>	<i>152</i>	<i>626</i>
27.5		<i>342</i>	<i>92</i>	<i>44</i>	<i>34</i>	<i>44</i>	<i>78</i>	<i>182</i>	<i>752</i>
30.0	<i>404</i>	<i>108</i>	<i>52</i>	<i>40</i>	<i>52</i>	<i>92</i>	<i>214</i>	<i>888</i>	

Tabla 2. Tamaños de muestra (número de individuos) para obtener una potencia estadística del 70%, 80% y 90% y varios valores de coeficientes de variación interindividual (CV%) cuando se aplica un modelo multiplicativo para demostrar bioequivalencia donde; $\alpha = 0,05$ (5%), $\Theta_1 = 0,7$ y $\Theta_S = 1,43$. Los valores no enteros fueron redondeados a su valor inmediato superior y se presentan en *itálica*.

CV (%)	Potencia (%)	μ_T/μ_R												
		0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20	1.25	1.30	1.35
15.0	70	46	14	8	6	6	6	6	6	8	10	14	26	68
20.0		80	24	12	8	8	8	8	8	10	14	24	44	118
25.0		122	34	18	12	10	10	10	12	14	22	34	66	180
30.0		172	48	24	16	12	12	12	14	20	30	48	94	256
35.0		230	64	32	20	16	16	16	20	26	38	64	124	342
40.0		296	80	40	26	20	20	20	24	32	48	80	160	438
45.0		366	100	48	30	24	24	24	28	40	60	100	198	544
50.0		444	120	58	36	30	28	30	34	48	72	120	238	658
55.0		524	142	68	42	34	32	34	40	56	84	142	282	780
60.0		610	164	80	50	40	38	40	46	64	98	164	328	906
15.0	80	60	18	10	8	6	6	6	8	8	12	18	34	88
20.0		104	30	16	10	8	8	8	10	12	18	30	56	154
25.0		160	44	22	14	12	10	12	14	18	28	44	86	236
30.0		226	62	30	20	16	14	16	18	26	38	62	122	336
35.0		302	82	40	26	20	18	20	24	32	50	82	162	448
40.0		388	106	52	32	24	22	24	30	42	62	106	208	576
45.0		482	130	62	38	30	28	30	36	50	78	130	258	714
50.0		582	158	76	46	36	32	34	44	62	94	158	312	864
55.0		688	186	90	54	42	38	40	50	72	110	186	370	1022
60.0		802	216	104	62	48	44	46	58	84	128	216	430	1190
15.0	90	82	24	12	8	8	6	8	8	10	16	24	46	122
20.0		144	40	20	14	10	10	10	12	16	24	40	78	212
25.0		220	60	30	18	14	12	14	18	24	36	60	120	326
30.0		312	86	42	26	18	18	18	24	34	50	86	168	464
35.0		418	114	54	34	24	22	24	32	44	68	114	224	620
40.0		536	144	70	42	30	28	30	40	56	86	144	288	796
45.0		666	180	86	52	38	34	38	48	70	106	180	358	988
50.0		806	216	104	62	46	40	44	58	84	128	216	432	1196
55.0		954	256	122	74	52	48	52	68	98	152	256	512	1416
60.0		1108	298	142	86	62	54	60	80	114	176	298	594	1646

Figura 5. Diseño experimental para demostrar bioequivalencia mediante condiciones de estado de equilibrio estacionario.



donde $ABC_{R,0-\infty}$ es el área bajo la curva del producto referencia si este hubiese sido administrado en una única dosis, $ABC_{R,SS,0-\tau}$ y $ABC_{T,SS,0-\tau}$ son las áreas bajo la curva de los productos Referencia y Test estimadas durante los intervalos entre administraciones ($0-\tau$), luego de alcanzarse para uno y otro el estado de equilibrio estacionario.

Bibliografía:

D. Hauschke & coll. (1992). Sample size determination for bioequivalence assessment using a multiplicative model. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 20:557-561.

Diletti E, Hauschke D, Steinijans VW. (1992) Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; (30), Supplement N°1. pp S51-58.

APÉNDICE de guía de Bioequivalencia

Contenido

1. ESTUDIOS ALTERNATIVOS.....	23
2. DISEÑO DE ESTUDIOS DE EQUIVALENCIA <i>IN VITRO</i> DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN ORAL.....	23
3. DISEÑO DE ESTUDIOS DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN ORAL.....	25

1. ESTUDIOS ALTERNATIVOS

Los estudios de equivalencia *in vitro* podrían respaldar la bioequivalencia en los siguientes casos:

1. Cuando se demostró bioequivalencia, la información de disolución *in vitro* se puede emplear para respaldar la equivalencia de concentraciones menores para esa formulación genérica. En esos casos, para el método *in vitro* se requiere que se reúnan todas las condiciones detalladas a continuación:
 - Las concentraciones de la dosis difieren sólo respecto de la concentración de la sustancia activa.
 - Se sabe que el fármaco se asocia con farmacocinética lineal.
 - La composición de las formulaciones es cualitativamente idéntica.
 - La proporción entre principio activo y excipiente para las diferentes dosificaciones es esencialmente la misma o, en el caso de contenidos muy bajos de principio activo, la proporción entre los excipientes es la misma.
 - Las nuevas formulaciones son fabricadas por el mismo laboratorio productor, en el mismo sitio de manufactura y con los mismos procedimientos.
2. Cuando hay un cambio poco significativo en la formulación de un producto aprobado (o previo a la aprobación de un producto que ha sido sometido a ensayos clínicos extensivos) y se ha determinado que el cambio sólo precisa confirmación de la equivalencia *in vitro* con la formulación que fue sometida a los ensayos clínicos originales.
3. Asegurar la consistencia entre lotes de un producto.

2. DISEÑO DE ESTUDIOS DE EQUIVALENCIA *IN VITRO* DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN ORAL

Un producto medicinal de administración oral está compuesto de una o más sustancias farmacológicas, excipientes y la proporción entre ellos. El tipo de excipientes y el método de elaboración del producto final se eligen en base al contenido, las propiedades fisicoquímicas y las propiedades intrínsecas (*bulk properties*) del fármaco y sus propiedades de absorción. Tomadas en su conjunto, esto le confiere a cada producto ciertas características de disolución.

Durante el desarrollo de este tipo de producto medicinal, se emplea una prueba de disolución como herramienta para identificar factores de formulación que influyen y pueden tener efectos cruciales en la biodisponibilidad. Ni bien se definen la composición y el proceso de elaboración del fármaco, se utiliza una prueba de disolución en el control de calidad de los lotes de escalado y de los lotes de producción para asegurar la congruencia de lote a lote y controlar que los perfiles de disolución sean similares a los lotes de laboratorio. Además, la prueba de disolución también puede emplearse para respaldar la biodisponibilidad de un nuevo producto farmacológico, la bioequivalencia de un producto esencialmente similar o sus variaciones.

Por eso, los estudios de disolución pueden servir para varios propósitos:

- Aseguramiento de la calidad
 - Obtener información sobre lotes de prueba utilizados en estudios de biodisponibilidad/ bioequivalencia y en ensayos clínicos para respaldar las especificaciones del producto.
 - Ser una herramienta para demostrar congruencia en la elaboración.
 - Obtener información sobre los productos de referencia utilizados en estudios de biodisponibilidad/ bioequivalencia y en ensayos clínicos.
- Inferencia indirecta de bioequivalencia
 - Para demostrar la similitud entre las distintas formulaciones de una sustancia activa y el producto medicinal de referencia. Entendiéndose por distintas formulaciones a variaciones de una formulación o nuevas formulaciones, incluso productos esencialmente similares.
 - Para recopilar información sobre la congruencia entre lotes de los productos (de prueba y de referencia) que se utilizarán como base para la selección de lotes apropiados para el estudio *in vivo*.

La metodología de la prueba debe estar de acuerdo con los requerimientos farmacopeicos, a menos que esos requerimientos demuestren ser insatisfactorios. Se puede considerar el uso de métodos alternativos cuando se justifique que éstos son discriminatorios y capaces de diferenciar entre lotes con desempeño aceptable y no aceptable del producto *in vivo*.

Si un ingrediente activo se considera altamente soluble, es razonable esperar que no cause problemas de biodisponibilidad si, además, el sistema de dosificación se disuelve rápidamente en el rango de pH fisiológico esperado después de la administración del producto. En esas situaciones, puede no ser necesario realizar un estudio de bioequivalencia en función de los antecedentes del caso y en la similitud de los perfiles de disolución, que se basan en pruebas de discriminación, que cumplan con 85% de disolución en 15 - 30 minutos ¹. La similitud debe justificarse por los perfiles de disolución, cubriendo al menos tres puntos temporales diferentes, que se logran con tres tampones (*buffers*) diferentes (normalmente rango de pH 1-6,8; en los casos en que se considera necesario el rango pH 1-8).

3. DISEÑO DE ESTUDIOS DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN ORAL

3.1 Principios básicos

La prueba *in vitro* debe ser un factor de predicción validado de la disolución *in vivo* del producto, es decir, las condiciones de prueba *in vitro* deben haber estado relacionadas previamente a condiciones *in vivo*. No se puede emplear una prueba *in vitro* cuando el tiempo medio de disolución es mayor al tiempo medio de absorción. Además, cuanto más largo sea el tiempo de disolución, más difícil será la extrapolación entre condiciones *in vitro* e *in vivo*. Por eso, no se recomienda realizar pruebas *in vitro* cuando el tiempo de disolución es muy largo.

3.2 Condiciones experimentales

Las condiciones para realizar estudios de equivalencia *in vitro* deben estar definidas claramente, (por ej., pH, temperatura, medio de disolución, agitación, etc.) Se indica el uso de por lo menos tres condiciones de pH a fin de brindar cierta confianza a la extrapolación de las condiciones *in vitro* a las condiciones *in vivo*. Si se considera que no hacen falta estudios a diferentes pH, deberá justificarse. Las especificaciones del equipamiento empleado para un estudio de equivalencia *in vitro* deberán estar definidas por organismos de referencia internacional. Se deberá utilizar un método analítico validado para analizar el nivel de sustancia activa liberada.

3.3 Toma de muestras

Las muestras tomadas para ensayos *in vitro* son comprimidos, cantidades definidas de una pasta o polvo en un envase especificado. Esas muestras se toman siguiendo un plan previamente establecido en el protocolo y basado en un procedimiento de aleatorización. El plan debe tener en cuenta los factores incluidos en el diseño experimental (p. ej., lotes del producto). El procedimiento de muestreo debe ser el mismo tanto para la formulación de referencia como para la de prueba. Cuando fuera posible, el conjunto final de muestras de cada formulación debe ser representativo de toda la población: p. ej., la cantidad de lotes de los que se obtienen las muestras para la prueba *in vitro* debe estar relacionada con la variabilidad esperada entre los lotes.

3.4 Diseño experimental

El diseño experimental debe tener en cuenta las principales fuentes de variación, que probablemente influyan el resultado final: lote del producto, tiempo de conservación, equipamiento utilizado en la prueba (p. ej., un recipiente en una prueba de disolución). Se deben tomar precauciones para evitar el sesgo, como una distribución equitativa de unidades de cada formulación en cada prueba analítica. Cuando sea pertinente, se deben realizar réplicas de las determinaciones, a fin de tomar en consideración la variación inherente al método analítico.

3.4.1 Tamaño de la muestra

En el caso de que sea relevante utilizar un diseño similar al estudio de bioequivalencia *in vivo*, se debe determinar el tamaño de la muestra para suministrar suficiente potencia en la demostración de la equivalencia. El coeficiente de variación empleado en el cálculo del tamaño de la muestra debe

obtenerse de estudios piloto o estimarse a partir de la variabilidad del método analítico. Estos puntos deben estar documentados en el protocolo.

3.4.2 Análisis estadístico para estudios de disolución *in vitro*

Los parámetros deben seleccionarse *a priori* y deben estar justificados con respecto a la correlación con la farmacocinética. Puede bastar con discutir la relación entre el tiempo de disolución y la tasa de absorción para los productos comparados (eso es, cuando el proceso de disolución no es el paso limitante de la velocidad y la magnitud de absorción). La equivalencia *in vitro* puede ser demostrada mediante la comparación de los perfiles de disolución luego del ajuste a un modelo matemático o mediante la comparación de parámetros como tiempo de disolución del 50%, tiempo de disolución del 90% y área bajo la curva (ABC). El análisis estadístico puede ser similar al utilizado en un estudio de bioequivalencia. Sin embargo, el intervalo de equivalencia predeterminado debe estar justificado cuidadosamente. Hay que recordar que la exención de estudios *in vivo* sólo es posible cuando los resultados de los estudios *in vitro* llevan a deducir un comportamiento farmacocinético similar entre los dos productos comparados.

¹ Pharmaceutical Research. Vol 15, No. 1, 1998 – Review “Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms” Jennifer Dressman, Gordon Amidon, Christos Reppas and Vinod Shah.

03 de maio de 2017

GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA PARA MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

27

Tabela de conteúdos

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	2
2. DEFINIÇÕES	2
3. ALCANCES E OBJETIVOS DOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA.....	4
4. CASOS EM QUE NÃO É NECESSÁRIO REALIZAR ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA <i>IN VIVO</i>	5
5. CONSIDERAÇÕES DE SEGURANÇA PARA A ALIMENTAÇÃO HUMANA	5
6. CRITÉRIOS PARA A AVALIAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE PRODUTOS QUE CONTÊM FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDADE OU FÁRMACOS DE ESTREITA MARGEM TERAPÊUTICA	6
7. DESENHO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DOSE ÚNICA	6
8. DESENHO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DOSES MÚLTIPLAS	11
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA	13
10. BIBLIOGRAFIA	16

REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA PARA MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

1. INTRODUÇÃO

Para exercer uma ação terapêutica ótima, um ingrediente ativo deveria ser liberado no local de ação numa concentração efetiva durante o período desejado. Para poder realizar uma predição confiável do efeito terapêutico, o desempenho da forma de dosagem que contém o ingrediente ativo deve estar bem caracterizado.

Várias falhas terapêuticas associadas a diferenças em biodisponibilidade acontecidas no passado testemunham a necessidade de avaliar o desempenho das formas de dosagem no transporte do ingrediente ativo à circulação sistêmica e daí ao local de ação. Assim, a biodisponibilidade de um ingrediente ativo de um produto farmacêutico deveria ser conhecida e reproduzível. Assumindo que no mesmo sujeito um perfil de concentração plasmática em função do tempo resultará em concentrações essencialmente similares no local de ação e, portanto, terá um efeito essencialmente similar, pode ser utilizada a informação farmacocinética, em vez dos resultados terapêuticos, para estabelecer equivalências: bioequivalências.

Na prática, a evidência de bioequivalência é geralmente a prova mais apropriada para substanciar a equivalência terapêutica entre produtos medicinais. Portanto, deve-se entregar evidência razoável que permita estabelecer que o produto em estudo é terapêuticamente equivalente ao produto de referência.

É importante mencionar que existem antecedentes que concluem que geralmente os estudos de bioequivalência não são adequados para sustentar um período de restrição de uso prévio ao abate ou à coleta de leite, ovos ou mel. Só em certas circunstâncias muito limitadas os estudos de depleção de resíduos são adequadamente abrangidos por um estudo de bioequivalência, relacionadas com o limite de quantificação do método, a duração do estudo e a análise estatística dos resultados. Se estas condições não se cumprirem, além de estudos de bioequivalência, serão necessários estudos confirmatórios de depleção de resíduos nos medicamentos farmacológicos destinados a espécies produtoras de alimento.

O objetivo deste guia técnico é formular requerimentos para o desenho, realização e avaliação de estudos de bioequivalência. Também se considera no Apêndice I a possibilidade de utilizar estudos *in vitro* complementários para demonstrar equivalência terapêutica.

Este guia, como todo guia, não é pensado para estabelecer um requisito regulatório específico u obrigatório. Trata-se de oferecer uma ferramenta que possibilite, sob a decisão de quem solicita um registro, com o consenso das autoridades do registro, usar este tipo de testes incruentos para avaliar equivalência terapêutica

2. DEFINIÇÕES

2.1 Equivalente farmacêutico:

Dois medicamentos são equivalentes farmacêuticos se contêm a mesma quantidade do mesmo princípio ativo com o mesmo sal ou éster na mesma forma farmacêutica, estão destinados a serem administrados pela mesma via e cumprem com padrões de qualidade idênticos ou comparáveis. No entanto, a equivalência farmacêutica não implica necessariamente equivalência terapêutica, pois diferenças nos excipientes e/ou no processo de elaboração podem gerar uma dissolução ou absorção mais rápida ou mais lenta e assim determinar disparidades no comportamento dos produtos (OMS).

2.2 Alternativa farmacêutica:

Dois produtos são alternativas farmacêuticas se contêm a mesma quantidade molar do mesmo princípio ativo, mas a sua forma farmacêutica é diferente (p. ex. cápsula vs. comprimido) e/ou em sua forma química (p. ex. diferentes sais diferentes ésteres). As alternativas farmacêuticas entregam o mesmo princípio ativo pela mesma via de administração, mas não são equivalentes farmacêuticos. Podem ou não ser bioequivalentes ou equivalentes terapêuticos com o produto de referência.

2.3 Biodisponibilidade:

A biodisponibilidade se entende como a taxa e o grau com os que uma substância ativa ou seu ingrediente ativo é liberado desde uma forma farmacêutica e se fica disponível à circulação geral para exercer um efeito.

A biodisponibilidade de um medicamento veterinário se define pela velocidade e magnitude com a qual a substância ativa alcança a circulação sistêmica e está disponível no(s) local (ou locais) de ação. A velocidade de absorção se mede considerando a concentração plasmática máxima obtida (C_{max}), o tempo ao qual se alcança a máxima concentração (T_{max}) e a área sob a curva (AUC).

Na maioria dos casos, as substâncias foram desenvolvidas para exibir um efeito terapêutico sistêmico, e se pode dar então uma definição mais prática, tomando em consideração que a substância na circulação geral se encontra em intercâmbio dinâmico com a substância no local de ação.

Pode ser útil diferenciar entre “biodisponibilidade absoluta” de uma forma de dosagem dada: a comparada com 100% alcançável da administração de uma solução intravenosa do mesmo fármaco (p. ex. solução oral vs. intravenosa) e a “biodisponibilidade relativa”: a comparada com outra forma administrada por via extravascular (p. ex. comprimidos vs. solução oral).

2.4 Bioequivalência:

Dois produtos medicinais são bioequivalentes se estes equivalentes farmacêuticos ou alternativa farmacêutica e suas biodisponibilidades (velocidade e quantidade absorvida do princípio ativo) depois de sua administração à mesma dose molar são semelhantes em tal grau que seus efeitos no que refere a eficácia e segurança na espécie de destino são essencialmente os mesmos (e não necessariamente iguais na segurança no ser humano ou no meio ambiente). Tais produtos devem estar adequadamente rotulados e ser manufaturados cumprindo com as normas vigentes de Boas Práticas de Manufatura (GMP CAMEVET ou GMP OMS).

Existe bioequivalência entre medicamentos veterinários se: sendo administrado à mesma dose molar e à mesma via de administração, sob condições experimentais estandardizadas, a velocidade de absorção e a quantidade de substância ativa absorvida só diferem dentro de limites preestabelecidos.

As substâncias ativas a comparar devem ter propriedades físico-químicas similares, por exemplo, perfil de dissolução, forma cristalina e tamanho da partícula. Em se tratando de princípios ativos que se apresentam numa mistura racêmica, estes deverão apresentar a mesma proporção de isômeros.

2.5 Equivalência terapêutica:

Um produto medicinal é equivalente a outro só se são **equivalentes ou alternativas farmacêuticos**, se tem a mesma qualidade e demonstra, através de estudos *in vivo* o *in vitro*, a mesma eficácia e segurança que o produto de referência, cuja eficácia e segurança já foram estabelecidas.

2.6 Produto de referência

Produto para o qual a qualidade, eficácia e segurança foram estabelecidas, avaliadas e aprovadas pela autoridade sanitária competente do país onde for solicitado que se admita um teste de bioequivalência para avaliar um registro novo, uma nova via de administração, o uma mudança da formulação. .

3. ALCANCES E OBJETIVOS DOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Os estudos de bioequivalência são métodos científicos válidos para comparar:

3.1 Uma mudança significativa na formulação que possa afetar a biodisponibilidade do princípio ativo. *Quando a composição de uma forma farmacêutica é modificada, seria possível utilizar estes estudos para demonstrar que o novo produto é bioequivalente com o produto com o qual foram realizados os ensaios clínicos.*

3.2 Diferentes vias de administração para o mesmo produto. *Um produto com uma única fórmula quali-quantitativa pode ser aplicado por diferentes vias de administração. Nesse sentido, duas vias de administração são bioequivalentes quando seus perfis de concentração plasmática são similares dentro de limites pré-estabelecidos.*

3.3 Diferentes produtos medicinais veterinários que são equivalentes farmacêuticos. Evitar a realização de estudos de segurança e/ou eficácia cruents, estudos que resultam inessários caso possa ser demonstrada a bioequivalência do produto com outro aprovado que conta com estes estudos. *P. ex. novo produto vs. produto de referência. Caso se faça referência comparativa a um produto aprovado em termos de eficácia e/ou segurança, deve-se demonstrar a bioequivalência com esse produto. (Dependendo de que a autoridade regulatória admita a bioequivalência como uma ferramenta para o registro de produtos).*

Embora haja estudos de equivalência *in vitro* que em alguns casos são suficientes para conseguir o objetivo, estes estudos se aplicam mais a formas farmacêuticas sólidas (p. ex. comprimidos). Este tipo de estudos é tratado no Apêndice I.

4. CASOS EM QUE NÃO É NECESSÁRIO DEMOSTRAR BIOEQUIVALÊNCIA *IN VIVO*

Geralmente não são necessários estudos de bioequivalência *in vivo* se o produto cumpre com uma ou mais das seguintes condições:

a) O produto é uma solução elaborada para ser administrada só por via **intravenosa** e contém a mesma substância ativa que um produto previamente aprovado para ser utilizado pela mesma via para o uso na espécie de destino que é sujeito da nova solicitude.

b) O produto é uma forma de dosagem oral desenhada para não ser absorvida (p. ex. antiácido, meio radiopaco).

c) O produto reúne todas estas condições:

- É uma **solução oral**, xarope ou outra forma solubilizada similar de rápida liberação e alta absorção ou é uma forma farmacêutica sólida cuja rápida dissolução tenha sido previamente demonstrada e contenha um ou mais princípios ativos altamente solúveis e absorvíveis (Classificação BCS, Biopharmaceutics Classification System).
- Contém uma substância ativa na mesma dose molar que o produto de referência.
- Demonstra não conter substâncias inativas que possam afetar significativamente a absorção da substância ativa.

d) O produto é um produto reformulado pelo fabricante original e é idêntico ao de referência, exceto pelos agentes corantes, saborizantes ou conservantes, que foi demonstrado que não têm influência na biodisponibilidade.

e) Soluções anestésicas voláteis inalatórias que contêm o mesmo princípio ativo na mesma dose.

f) Soluções de aplicação tópica indicadas para obter efeitos terapêuticos locais. Outras formas farmacêuticas tópicas para uso local só em animais que não sejam para consumo humano.

O fato de que não sejam realizados ensaios de bioequivalência *in vivo* não implica a não realização de ensaios *in vitro*.

5. CONSIDERAÇÕES DE SEGURANÇA PARA A ALIMENTAÇÃO HUMANA

Demonstrar que duas formulações são bioequivalentes geralmente não permite assegurar que as duas terão o mesmo período de resguardo. Isto se deve a que pequenas variações na absorção quando as concentrações são muito pequenas podem produzir diferenças significativas na pendente de eliminação que é a utilizada para determinar o período de resguardo.

Por isso, só é possível eximir da apresentação de um estudo de determinação de período de resguardo quando:

- d. o método utilizado para a quantificação do ativo em plasma possuir um limite de qualificação igual ou menor à metade do LMR,

- e. tenham sido realizadas pelo menos duas determinações em tempos posteriores ao período de restrição (período de resguardo) do produto original sob ensaio.
- f. se demonstre que não há diferenças significativas entre os resultados dos dois produtos nestas determinações.

Em qualquer outro caso, a apresentação de um estudo de bioequivalência não eximirá da realização de um estudo de determinação de período de resguardo.

6. CRITÉRIOS PARA A AVALIAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE PRODUTOS QUE CONTÊM FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDADE OU FÁRMACOS DE ESTREITA MARGEM TERAPÊUTICA

Em casos específicos nos quais o princípio ativo do produto em investigação apresenta uma janela terapêutica estreita (NTI), isto é, que devido a pequenas variações dos níveis plasmáticos podem provocar sérias falhas terapêuticas (concentrações subterapêuticas) ou mesmo reações adversas sérias (concentrações supra terapêuticas), deverá ser avaliado se existe a necessidade de estreitar as faixas de aceitação de bioequivalência, por exemplo que a faixa de aceitação da área sob curva (AUC do inglês) seja menos, usualmente 90-100%, o qual deverá ser justificado clinicamente. Isto se deve a que a curva dose-resposta apresenta uma pendente pronunciada, o que se traduz em que pequenas mudanças nas concentrações plasmáticas geram variações importantes nos resultados clínicos (p. ex. Ciclosporina), então os limites de aceitação deveriam ser mais estreitos, com o objetivo de garantir a segurança no uso destes medicamentos.

No caso dos fármacos de alta variabilidade intraindividual, isto é, que apresentam uma variabilidade significativa/importante ($CV \geq 30\%$) na quantidade e/ou velocidade com que estes são absorvidos num mesmo indivíduo, poderia ser aceita uma faixa mais ampla, mas esta deve ser justificada cientificamente, levando em conta considerações de segurança e eficácia. Deve-se levar em conta que naqueles fármacos que apresentam uma alta variabilidade no parâmetro $C_{máx}$, é recomendado planificar a toma de uma maior quantidade de amostra próximo a $T_{máx}$, de modo que tanto a velocidade quanto o grau de absorção possam ser caracterizados adequadamente.

Nos dois casos, deve-se demonstrar sua equivalência terapêutica através de estudos comparativos *in vivo*.

7. DESENHO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DOSE ÚNICA

Quando for possível deverá ser realizada uma comparação de um estudo de bioequivalência *in vivo* de dose única em relação aos produtos ou as vias de administração a serem avaliadas na espécie animal de destino. Para conhecer exemplos de quando pode ser necessário um estudo de bioequivalência *in vivo* de doses múltiplas, consultar a seção 7.

7.1 Produto de referência

Quando se use bioequivalência para avaliar o registro de um novo produto que se considera equivalente terapêutico de outro, o produto de referência mais apropriado é o primeiro produto autorizado com um dossiê completo. Quando existem vários produtos aprovados, mas com diferentes rótulos, aplicações ou espécies, deve-se levar a cabo uma prova de bioequivalência com o produto de referência aprovado para as mesmas indicações para as que foi desenhado o produto problema (teste).

O produto de referência deverá ser tomado de um lote vigente de um produto aprovado no país onde for solicitado o registro do medicamento, que contenha a mesma substância ativa que a nova formulação, nova forma de dosagem ou sal. Por exemplo, considera-se que diferentes ésteres da mesma entidade terapêutica são diferentes produtos.

Para um produto dado, uma formulação pode servir de referência para demonstrar a bioequivalência com outras formulações que eram parte do desenvolvimento.

Os Produtos de Referência ou Comparadores serão definidos pela autoridade sanitária do país respectivo, a proposta do patrocinador do estudo no momento da aprovação do protocolo.

7.2 Via de administração de referência

A via de administração de referência é a que foi utilizada ao realizar os ensaios clínicos ou toxicológicos e à qual se faz referência quanto a eficácia e segurança.

7.3 Padrões para produtos farmacológicos de prova e de referência

Deve-se demonstrar que tanto o produto de prova quanto o de referência cumprem com todos os padrões incluídos em compêndios ou outros padrões aplicáveis de identidade, concentração, qualidade e pureza, além de cumprir com as exigências das Boas Práticas de Manufatura (GMP CAMEVET o GMP OMS).

7.4 Animais

Os animais utilizados em estudos de bioequivalência devem estar clinicamente saudáveis e ser um grupo homogêneo (idade, raça, peso, estado hormonal e nutricional, nível de produção, etc.). Quando for possível, recomenda-se restringir os estudos a um sexo caso não haja evidência de interação entre sexo e produtos. Quando for difícil conservar a homogeneidade de todos os animais dentro do estudo (p. ex. em cavalos), será aceitável utilizar gado não homogêneo, desde que os animais tenham sido equiparados em cada grupo de tratamento por idade, peso, sexo (se for relevante), etc. Isso deverá ser realizado mediante aleatorização restrita baseada no/s fator(ES) de bloqueio relevante(s).

Os animais selecionados devem provir da população de destino para a qual o produto é concebido.

Tamanho do grupo: a quantidade apropriada de animais deve ser estimada cuidadosamente e depende de vários fatores, incluída a variância da resposta, diferenças nas duas formulações e nível de rejeição da hipótese. O desenho cruzado tem vantagens em relação à potência e a quantidade de animais necessários. Recomenda-se utilizar um mínimo de 6 animais por grupo para desenho cruzado e 12 animais por grupo para o desenho em paralelo.

7.5 Condições do ensaio

A bioequivalência deve se levar a cabo cumprindo as exigências das Boas Práticas Clínicas (BPC) e Boas Práticas de Laboratório (BPL).

No caso da via oral, deve-se prestar especial atenção aos diferentes fatores que se sabe afetam a disposição da substância ativa. A administração de alimento pode melhorar ou interferir com a absorção do fármaco, segundo as características do fármaco e a formulação. A alimentação também pode aumentar a variabilidade inter ou intra sujeito da velocidade e a magnitude de absorção do fármaco. O fundamento para realizar cada estudo de bioequivalência sob condições de jejum ou alimentação deve estar incluído no protocolo. O protocolo deve descrever a dieta e o regime de alimentação que se seguirá no estudo. Para todas as espécies, o estado prandial e o tempo exato de alimentação devem ser consistentes com o bem-estar animal (por exemplo, os ruminantes não devem ser submetidos a jejum) e com a farmacocinética do princípio ativo. Os estudos de medicamentos para caninos e felinos administrados via oral deverão ser realizados em animais em jejum, a menos que o rótulo do produto de referência indique que o produto deve ser administrado unicamente uma vez recebidos os alimentos. O jejum deve ser de 8 horas e 4 horas depois da administração da dose. Para medicamentos orais de liberação prolongada indicados para animais não ruminantes os estudos de bioequivalência deverão ser realizados em ambos os estados, sob condições de jejum e uma vez recebidos os alimentos, a menos que seja devidamente justificada outra condição. O protocolo deve conter o racional para desenvolver o estudo de bioequivalência em estado de jejum ou alimentado e deve descrever a dieta e regime de alimentação.

Caso o rótulo do produto indique que o produto deve ser administrado unicamente em jejum ou tendo recebido o alimento, então o estudo de bioequivalência deverá ser levado a cabo desse modo.

7.6 Dose que será provada

A dose deve ser a aprovada e vigente.

Quando o produto de referência tem várias doses aprovadas, a prova de bioequivalência deve ser realizada com a dose mais alta.

7.7 Coleta de amostras

As concentrações de princípio ativo e/ou seus metabolitos ativos poderão ser determinados em amostras biológicas tais como sangue, soro, plasma e outros fluidos biológicos (p. ex. leite, urina).

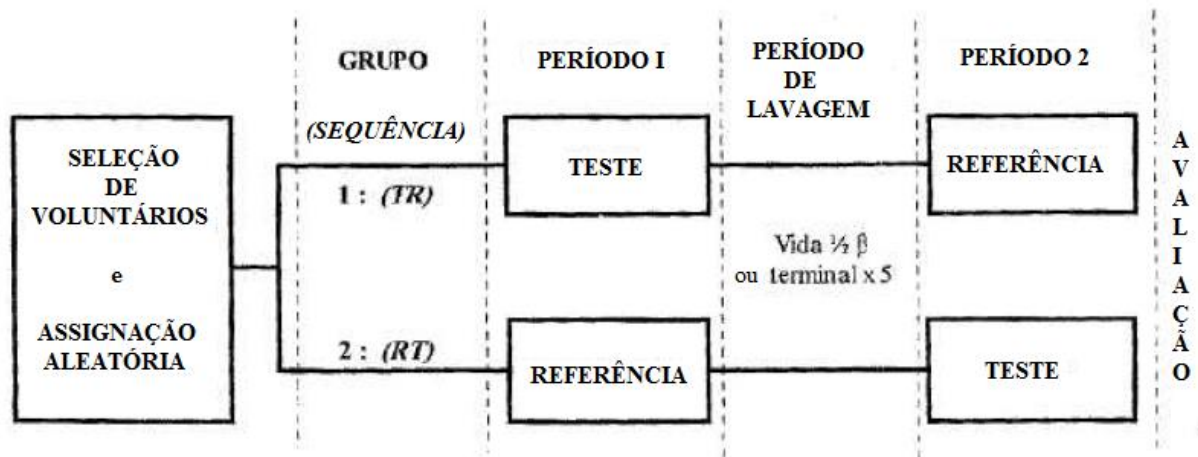
As amostras devem ser tomadas de forma que se meça C_{max} e ABC adequadamente. Deverá ser medido pelo menos 2 pontos antes do C_{max}, entre 2 a 3 pontos em torno do C_{max} e entre 3 e 4 pontos durante a fase de eliminação do princípio ativo.

7.8 Desenho experimental

O desenho de todo estudo de bioequivalência terá a tendência de reduzir ao máximo a variabilidade no que depende das formulações estudadas; teste (T) e referência (R). O desenho mais habitual em um estudo de bioequivalência é um estudo cruzado de duas sequências (TR/RT), dois períodos (Período 1/Período 2), dois tratamentos, aleatorizado, com uma dose única em cada período, não replicado e

balanceado; todos os animais (em igual número em cada sequência) devem receber ambos os tratamentos T e R. Este desenho permite evitar possíveis confusões entre os efeitos do tratamento e o período.

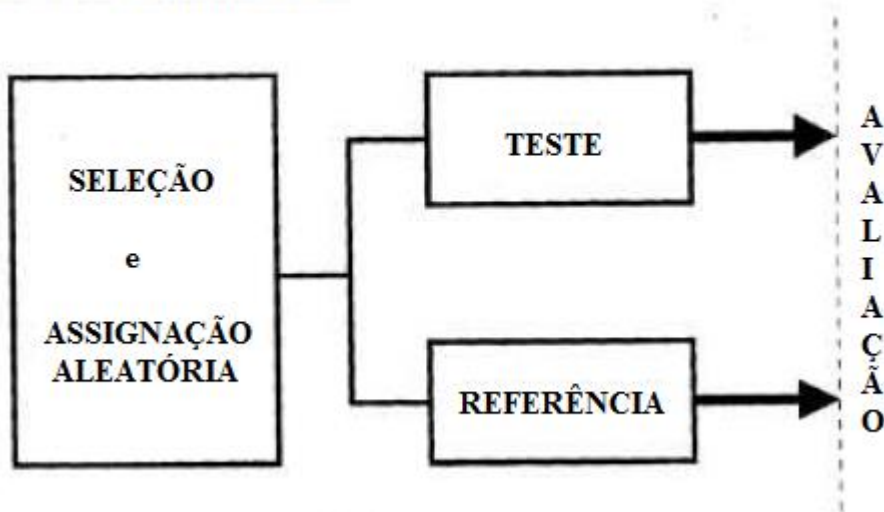
O tempo decorrido entre a administração de cada dose das formulações T ou R, denomina-se período de lavagem e deve ser suficientemente prolongado como para que no momento da segunda administração não sejam detectadas concentrações de princípio ativo administrado no primeiro período, ou estas sejam tão baixas que não tenham nenhuma incidência farmacocinética sobre a nova administração. O esquema de desenho cruzado clássico é apresentado na figura a seguir.



O período de lavagem deverá ser igual em todos os animais e sua duração deverá ser de, pelo menos, dez vezes a semivida de eliminação da substância ativa ou seus metabolitos. Além disso, poderia ser requerido um período de tempo adicional para alcançar a desaparecimento de qualquer efeito farmacológico, como, por exemplo, a indução das enzimas microssomais.

No caso em que o período de lavagem seja incompatível com um desenho cruzado clássico, como no caso de fármacos com semivida prolongada ou quando os estudos devem ser realizados em animais em crescimento, pode-se recorrer a um desenho paralelo no qual participam dois grupos com idêntico número de animais (grupo 1 e grupo 2), onde um grupo recebe só uma única dose de um produto diferente do atribuído ao outro grupo. O esquema de desenho paralelo é apresentado na figura a seguir.

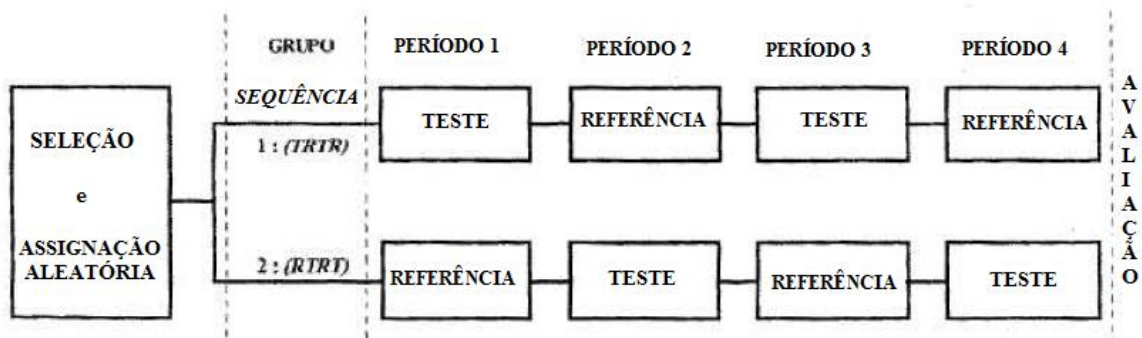
ESTUDO PARALELO



Para as formulações que possuem um princípio ativo com alta variabilidade farmacocinética (CV igual ou maior a 30%), e que a formulação apresentar uma semivida de eliminação curta, um modelo possível é o desenho replicado de duas sequências e quatro períodos, Sequência 1: TRRT; Sequência 2 TRRT. O esquema de desenho replicado de duas sequências e quatro períodos é apresentado na figura 4 do anexo.

DESENHO REPLICADO 2 SEQUÊNCIAS POR 4 PERÍODOS

ESTUDO REPLICADO 2 x 4



7.9 Tamanho da amostra

O número de animais necessários para realizar um estudo de bioequivalência está determinado pelo nível de significância fixado, pela diferença que se espera detectar, pela potência esperada do ensaio e pelo erro da variância associada à característica primária a ser estudada expresso como CV intraindividual. O valor deste último pode ser obtido a partir dos resultados de um estudo piloto, de resultados de estudos realizados com anterioridade ou a partir de dados procedentes da literatura.

O número de animais deve ser calculado mediante métodos apropriados e não deve ser menor a 6 animais por grupo para desenho cruzado e 12 animais por grupo para o desenho em paralelo.

O método de cálculo do número de animais para um modelo multiplicativo (dados transformados a seus logaritmos naturais) é apresentado na equação 1 do anexo. Este método de cálculo permite estimar o número de indivíduos para um desenho cruzado clássico em função de vários valores de CV, de valores do quociente entre as médias geométricas (μ_T/μ_R) dos parâmetros farmacocinéticos empregados e da potência esperada do método estatístico ($1-\beta$). Para um desenho paralelo este valor deve ser multiplicado por 2.

O teste estatístico para demonstrar bioequivalência deve possuir uma potência não menor a 80% com um risco para o consumidor de 5% (erro α ; 0,05) e um risco para a indústria farmacêutica de 20% (erro β ; 0,20). Dado que a potência se estima como $1-\beta$, o risco para a indústria farmacêutica pode ser reduzido incrementando a potência do teste estatístico. Isto se consegue incrementando o número de animais a incluir no estudo. Na Tabela 1 do anexo, são apresentados os números de indivíduos necessários para realizar um estudo de bioequivalência em função de diferentes valores de potência do teste estatístico, diferentes valores de CV e diferentes quocientes entre as médias geométricas dos parâmetros farmacocinéticos fundamentais.

Os patrocinadores do estudo devem selecionar um número suficiente de sujeitos em consideração das possíveis perdas ou retirados do estudo. Devido a que a substituição de animais durante o estudo pode complicar o modelo e análise estatística, geralmente não se recomenda substituir as perdas. Portanto, é apropriado recrutar para o estudo um número de animais superior que o requerido segundo o cálculo do tamanho da amostra.

7.10 Considerações do tempo de amostragem

Os tempos de amostragem devem ser escolhidos de modo que permitam, na medida do possível, descrever o perfil de concentração plasmática do princípio ativo e permitir uma determinação precisa da T_{max} e a C_{max}.

Para maximizar a eficácia do tempo de amostragem pode ser necessário realizar um estudo piloto que ajude a identificar a forma da curva de concentração de contração/tempo e a variabilidade provável os valores de concentração.

7.11 Análise

Os métodos analíticos empregados em estudos de bioequivalência devem estar completamente validados para cumprir com os critérios de validação padrão dados no guia Guidance for industry Bioanalytical Method Validation FDA , Guidance for bioanalytical method of validation EMEA ou do Guia CAMEVET para validação de estudos de resíduos.

8. DESENHO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DOSES MÚLTIPLAS

8.1 Princípios básicos

Em alguns casos, é necessário comparar o produto Teste com o de Referência depois de administrações repetidas, a fim de determinar as concentrações plasmáticas durante o estado de equilíbrio estacionário. Isto pode acontecer no caso de princípios ativos muito potentes que provocam efeitos farmacêuticos a concentrações plasmáticas muito baixas que se encontram por baixo da resolução da técnica analítica. Com o avanço das técnicas analíticas, estas situações acontecem em casos excepcionais.

Requer-se um estudo de doses múltiplas quando:

- a) A ação do produto é dependente das concentrações plasmáticas do princípio ativo em estado estacionário.
- b) O princípio ativo apresenta cinética não lineal e/ou dependente do tempo.
- c) A concentração da substância ativa que resulta de uma dose única é demasiado baixa para ser determinada com precisão através do método analítico.
- d) Para formas farmacêuticas de liberação estendida com tendência a acumulação.

8.2 Produto de referência e condições experimentais

Como foi estabelecido previamente.

8.3 Dose

A seleção da dose dos produtos Teste e Referência serão definidos segundo o explicitado no ponto 5.6.

8.4 Frequência de administração

Deve-se selecionar a frequência de administração que dê como resultado as maiores concentrações do fármaco em estado estacionário (C_{ss}). Isto poderá ser determinado mediante um estudo piloto.

8.5 Coleta de amostras

Devem ser tomadas amostras para estabelecer que foram atingidas condições de equilíbrio estacionário (p. ex. medindo duas ou mais concentrações máximas (C_{max}) ou mínimas (C_{min}) em sangue, plasma ou soro ou recolhendo aproximadamente 10 amostras de sangue. (ainda imediatamente antes da administração da seguinte dose) durante o intervalo de doses.

As amostras de sangue deveriam ser tomadas com uma frequência suficiente que permitisse avaliar adequadamente C_{max} , ABA, C_{min} e outros parâmetros. Os pontos experimentais de amostragem devem incluir uma amostra pré-dose, pelo menos 1 ou 2 pontos antes de C_{max} , 2 pontos em torno de C_{max} , 3 a 4 pontos durante a fase de eliminação.

8.6 Desenho experimental

A biodisponibilidade pode ser determinada em condições de estado de equilíbrio estacionário sem necessidade de um período de lavagem entre a administração das formulações Teste e Referência.

Neste tipo de ensaio, conta-se com um só grupo de animais e ambas as formulações Teste e Referência serão administradas a cada um deles guardando um intervalo entre doses preestabelecido, até atingir o estado de equilíbrio estacionário (E_{ss}).

O número de doses que devem ser administradas para atingir o E_{ss} está determinado pelo tempo fixado como intervalo entre doses (τ) e pela semivida de eliminação da formulação. Se aceita que o E_{ss} é atingido quando foram administradas as doses pré-estabelecidas durante um tempo equivalente a 4-5 vezes o valor da semivida de eliminação da formulação. Nessas condições, a ABC estimada a partir da administração realizada trás atingir o E_{ss} ($ABC_{R,ss 0-\tau}$) é igual à que seria estimada depois da administração de uma única dose da formulação ($ABC_{R 0-\infty}$). Seguidamente à administração da última dose da formulação Referência, começa a ser administrada a dose da formulação Teste aos intervalos pré-estabelecidos durante o tempo necessário para que se alcance um novo E_{ss} . Ao atingir essa condição, estima-se a ABC obtida a partir da última dose administrada da formulação Teste ($ABC_{T,ss 0-\tau}$). A representação gráfica do desenho experimental para demonstrar bioequivalência mediante a administração de doses múltiplas é apresentada na figura 5 do anexo.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

9.1 Parâmetros farmacocinéticos a analisar

Devem ser analisados os parâmetros farmacocinéticos derivados das curvas de concentração do princípio ativo na matriz biológica na qual se tenha determinado. A fim de evitar um possível viés, o cálculo dos parâmetros fundamentais deve estar baseado nos dados experimentais observados, evitando o uso de dados estimados por qualquer procedimento matemático. Excepcionalmente, a utilização de dados estimados por modelação farmacocinética, interpolação ou outros procedimentos deverá estar

adequadamente justificada para incluí-los no estudo de bioequivalência e os métodos de cálculo definidos a priori no protocolo do estudo.

Existem numerosas situações em que pode acontecer a eliminação total ou parcial dos dados obtidos para um animal durante o estudo de bioequivalência de um medicamento. Estas eliminações deverão ser justificadas tecnicamente no estudo.

Existem situações que podem acontecer com tal frequência que requeiram ser estipuladas no protocolo do estudo, por exemplo, perda de uma dose administrada por regurgitação do animal. Nestes casos os critérios para a eliminação dos dados deverão estar especificados previamente no protocolo do estudo. Além disso, nestes casos deverá ser avaliada a eliminação dos dados, considerando fatores como:

- Lapso de tempo aceitável entre a administração do fármaco e o evento de regurgitação.
- Quando a quantidade de material perdido (alimento com medicamento) se considera relevante no estudo.

Além disso, caso o animal receba nova dosagem após um evento de perda, o critério para a nova dosagem deve estar claramente estabelecido no protocolo do estudo.

Por último, é importante que todos os dados disponíveis se encontrem incluídos na análise estatística.

9.2 Estudos de dose única

Nos estudos de dose única os parâmetros fundamentais para demonstrar bioequivalência são a área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ABC) e a concentração plasmática máxima observada (C_{max}).

O valor da ABC deverá ser calculado a partir dos dados de concentração plasmática observados mediante o método trapezoidal linear.

O valor da ABC só poderá ser utilizado no estudo caso a ABC estimada desde tempo zero até o tempo no qual foi observada a última concentração plasmática medida (ABC_{0-t_z}) seja igual ou maior a 80% da área sob a curva extrapolada ao infinito ($ABC_{0-\infty}$).

Os valores de C_{max} observados só serão úteis para estimar bioequivalência caso estejam claramente definidos e determinados com relativa exatidão. Isto se consegue com tempos de amostragem apropriados na região de máxima probabilidade de aparição do pico de concentração plasmática, determinada a partir de um estudo piloto ou de dados disponíveis na literatura.

Outros parâmetros complementários podem ser calculados e incluídos no estudo a fim de proporcionar informação adicional acerca do comportamento farmacocinético dos produtos a testar como o tempo ao qual se observa a máxima concentração plasmática (T_{max}), a área sob o momento da curva (ABMC), o tempo médio de residência (TMR) e a semivida aparente de eliminação ($t_{1/2el}$).

O T_{max} é uma função das constantes de velocidade de absorção como de eliminação. A utilidade de seu valor está sujeita às mesmas considerações de C_{max} . No entanto, a sua robustez é menor a esta devido a que T_{max} é um parâmetro que quantifica uma variável discreta (tempos de amostragem) cujos valores

foram pré-estabelecidos no desenho experimental, portanto é incluído no grupo dos parâmetros complementários.

O ABMC é um parâmetro farmacocinético que não tem interpretação direta, mas seu cálculo é obrigado para a estimação do TMR, portanto seus valores podem ser incluídos no estudo.

O TMR pode ser utilizado como uma variável complementar quando reflete o tempo médio de absorção (TMA). O TMR só pode ser empregado quando foi determinado o TMR após a administração intravenosa nos mesmos animais.

Caso o desenho requeira outras matrizes biológicas diferentes ao plasma deverá ser selecionada e justificada a utilização dos parâmetros que forem escolhidos.

9.3 Estudos de doses múltiplas

O parâmetro farmacocinético fundamental para determinar bioequivalência nos estudos de doses múltiplas é a área sob a curva em estado de equilíbrio entre administrações ($ABC_{0-\tau}$).

Como parâmetros complementares podem ser considerados a concentração média em estado estável que se estima como $ABC_{0-\tau}$ sobre o intervalo entre administrações (τ) ($ABC_{0-\tau}/\tau$) e a faixa de flutuação entre a concentração máxima e a concentração mínima observadas uma vez atingido o estado de equilíbrio estacionário ($C_{max} - C_{min}$).

9.4 Critérios para determinar a bioequivalência (intervalo de bioequivalência)

Os critérios devem ser selecionados antes do início do experimento e descritos no protocolo. O intervalo de bioequivalência deve estar justificado em relação a efeitos clínicos esperados ou efeitos farmacológicos.

Para estabelecer que duas formulações são bioequivalentes deve-se estimar o intervalo de confiança a 90% (IC90%) do quociente entre as médias geométricas (μ_T/μ_R) da ABC e a C_{max} e demonstrar que este está compreendido dentro de um intervalo cujos limites inferior e superior são 0.80 e 1.25.

Em casos específicos nos quais o princípio ativo do produto em investigação apresentar uma janela terapêutica estreita, como no caso dos compostos com curvas de dose-resposta pronunciadas (com grandes variações em pouco tempo) então os limites deveriam ser mais estreitos.

Caso tenha que se demonstrar bioequivalência entre produtos em investigação que apresentem princípios ativos com ampla margem terapêutica, pode se considerar a ampliação dos limites a 0,7 - 1,43. Isto é muito frequente no caso de C_{max} sempre que se basearem em evidência clínica e quando for especificado no protocolo.

9.5 Análise dos dados

A análise dos dados deve ser apresentada em detalhe. É necessário realizar uma análise de variância (que inclua formulação, período, sequência, animais aninhados em sequência e, quando corresponder, efeitos de sexo por formulação) para estimar a variância de erro que depois será utilizada para calcular o intervalo de confiança. Para ABC e C_{max} , antes de realizar a análise de variância, recomenda-se a

transformação logarítmica de dados. Para os parâmetros dependentes do tempo observados, a transformação não corresponde e poderia ser melhor utilizar um enfoque não paramétrico. Para finalizar com a análise de bioequivalência, devem ser comparados os limites superior e inferior do intervalo de confiança calculados com a variância de erro estimada que se encontram nas tabelas de Análise da Variância (ANOVA), com os limites pré-determinados, isto é, 0,8 a 1,25 ou 0,7 a 1,43 para dados de transformação logarítmica ou então 0,8 a 1,2 ou 0,7 a 1,3 para dados não transformados.

Caso seja detectado um efeito na sequência, deve ser analisado o primeiro período do desenho cruzado como desenho paralelo.

Quando são utilizados vários critérios na demonstração da bioequivalência (caso geral), a conclusão final a favor da bioequivalência se tira só se a hipótese nula de não equivalência for rejeitada em relação a todos os parâmetros relevantes.

Também podem ser empregadas outras técnicas de análise estatística validada e adequadamente fundamentadas.

10. BIBLIOGRAFIA

- “Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products”, EMEA/CVMP/016/00-FINAL, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology, 2001.
- “Guidance for Industry, Bioequivalence Guidance”, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2002.
- “Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence”, CPMP/EWP/QWP/1401/98, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, 2001.
- “Bioequivalence: Blood Level Bioequivalence Study”, VICH GL 52, 2013.

ANEXO DO GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA
PARA MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS: GRÁFICOS E TABELAS.

Figura 1. Representação esquemática do fundamento de um estudo para demonstrar bioequivalência entre uma formulação de Referência e uma formulação Teste. Caso ambas as formulações sejam equivalentes farmacêuticos e suas biodisponibilidades (velocidade e quantidade absorvida do princípio ativo) após a sua administração à mesma dose molar são semelhantes dentro de limites pré-estabelecidos, assume-se que seus efeitos a respeito da eficácia e segurança são os mesmos.

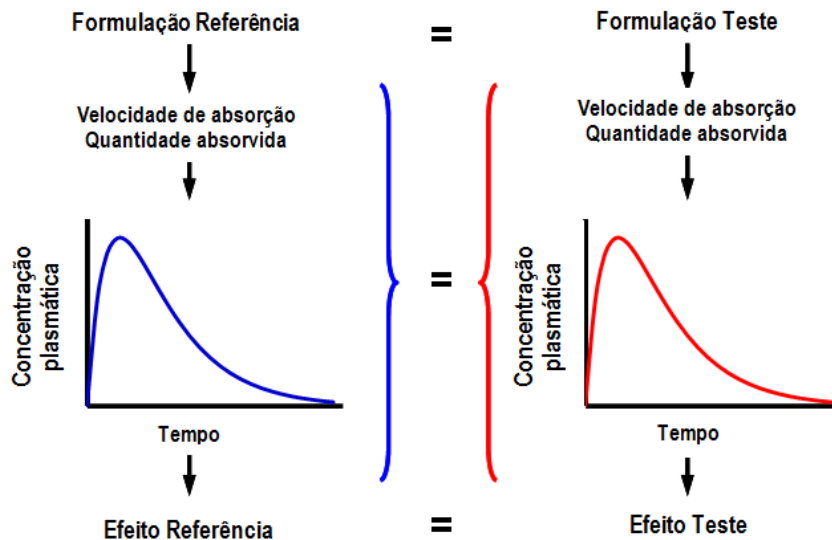


Figura 2. Representação esquemática desenho experimental cruzado de duas seqüências (TR/RT), dois períodos (Período 1/Período 2), dois tratamentos (Referência e Teste), aleatorizado, com uma dose única em cada período, não replicado e balanceado.

	Seqüência 1 (TR)	Seqüência 2 (RT)
Período 1	Testemunha ₁	Referência ₁
Período 2	Referência ₂	Testemunha ₂

Figura 3. Representação esquemática de um desenho experimental paralelo. Neste desenho participam dois grupos (grupo 1 e grupo 2), com idêntico número de animais cada um onde um grupo recebe só uma única dose de um produto diferente do designado ao outro grupo.

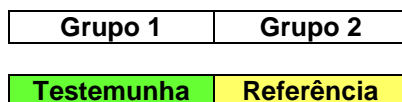
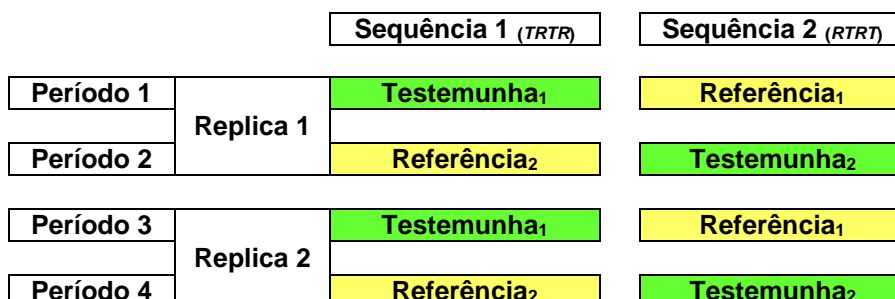


Figura 4. Representação esquemática de um desenho experimental replicado de duas seqüências e quatro períodos.



Ecuación 1. Algoritmo proposto por D. Hauschke & col. (1992) para estimar o número de indivíduos necessários para realizar um estudo de bioequivalência em média.

$$\text{Se } 1 < \mu_T/\mu_R < \Theta_S, \text{ então } N \geq \left[t_{2N-2}^{1-\alpha} + t_{2N-2}^{1-\beta} \right]^2 \left[\frac{CV}{\ln\Theta_S - \ln(\mu_T/\mu_R)} \right]^2$$

$$\text{Se } \Theta_I < \mu_T/\mu_R < 1, \text{ então } N \geq \left[t_{2N-2}^{1-\alpha} + t_{2N-2}^{1-\beta} \right]^2 \left[\frac{CV}{\ln\Theta_I - \ln(\mu_T/\mu_R)} \right]^2$$

onde, μ_R e μ_T são as médias geométricas dos parâmetros farmacocinéticos das formulações Referência e Teste respectivamente, $\ln\Theta_S$ e $\ln\Theta_I$ são logaritmos naturais dos limites superior e inferior para demonstrar bioequivalência, CV é o coeficiente de variação interindividual, t é o estatístico do teste unilateral de t , α (0,05) e β (0,20) são os erros de consumidor (5%) e da indústria farmacêutica (20%), $2N-2$ é o grau de liberdade para um desenho experimental cruzado clássico, este valor em um desenho paralelo deve ser substituído por $N-1$.

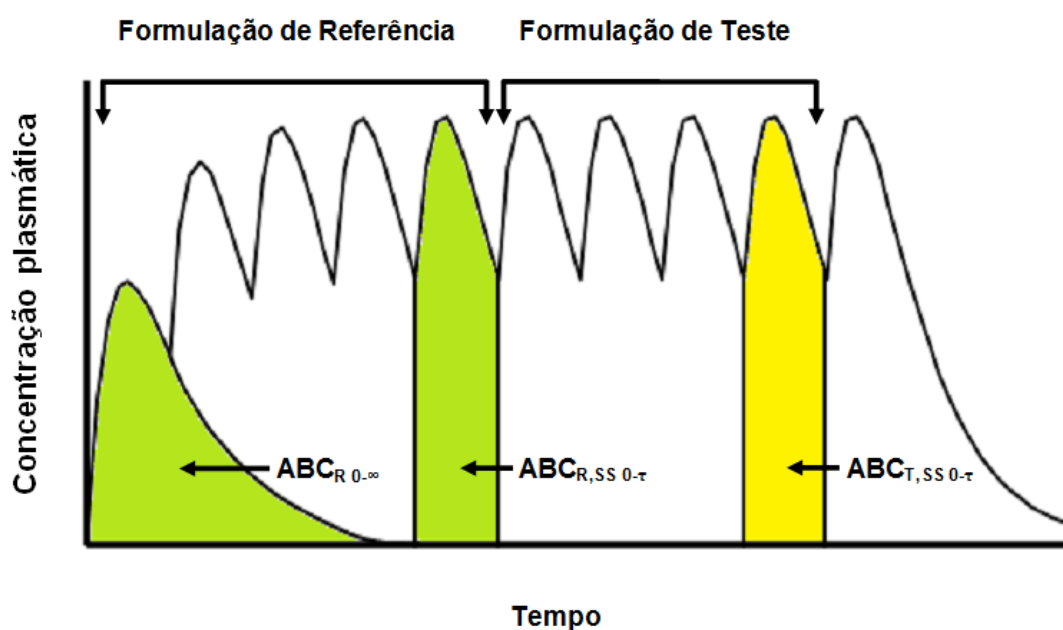
Tabela 1. Tamanhos de amostra (números de indivíduos) para obter uma potência estatística de 70%, 80% e 90% e vários valores de coeficientes de variação interindividual (CV%) quando se aplica um modelo multiplicativo para demonstrar bioequivalência onde; $\alpha = 0,05$ (5%), $\Theta_1 = 0,8$ e $\Theta_5 = 1,25$. Os valores não inteiros foram arredondados a seu valor imediato superior e se apresentam em itálico.

CV (%)	Potência (%)	μ_T/μ_R							
		0.85	0.90	0.95	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20
5.0	70	10	6	4	4	4	4	6	16
7.5		16	6	6	4	6	6	10	34
10.0		28	10	6	6	6	8	16	58
12.5		42	14	8	8	8	12	24	90
15.0		60	18	10	10	10	16	32	128
17.5		80	22	12	12	12	20	44	172
20.0		102	30	16	14	16	26	56	224
22.5		128	36	20	16	20	30	70	282
25.0		158	44	24	20	22	38	84	344
27.5		190	52	28	24	26	44	102	414
30.0	224	60	32	28	32	52	120	490	
5.0	80	12	6	4	4	4	6	8	22
7.5		22	8	6	6	6	8	12	44
10.0		36	12	8	6	8	10	20	76
12.5		54	16	10	8	10	14	30	118
15.0		78	22	12	10	12	20	42	168
17.5		104	30	16	14	16	26	56	226
20.0		134	38	20	16	18	32	72	294
22.5		168	46	24	20	24	40	90	368
25.0		206	56	28	24	28	48	110	452
27.5		248	68	34	28	34	58	132	544
30.0	292	80	40	32	38	68	156	642	
5.0	90	14	6	4	4	4	6	8	28
7.5		28	10	6	6	6	8	16	60
10.0		48	14	8	8	8	14	26	104
12.5		74	22	12	10	12	18	40	162
15.0		106	30	16	12	16	26	58	232
17.5		142	40	20	16	20	34	76	312
20.0		186	50	26	20	24	44	100	406
22.5		232	64	32	24	30	54	124	510
25.0		284	78	38	28	36	66	152	626
27.5		342	92	44	34	44	78	182	752
30.0	404	108	52	40	52	92	214	888	

Tabela 2. Tamanhos de amostra (números de indivíduos) para obter uma potência estatística de 70%, 80% e 90% e vários valores de coeficientes de variação interindividual (CV%) quando se aplica um modelo multiplicativo para demonstrar bioequivalência onde; $\alpha = 0,05$ (5%), $\Theta_1 = 0,7$ e $\Theta_5 = 1,43$. Os valores não inteiros foram arredondados a seu valor imediato superior e se apresentam em itálico.

CV (%)	Potência (%)	μ_T/μ_R												
		0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20	1.25	1.30	1.35
15.0	70	46	14	8	6	6	6	6	6	8	10	14	26	68
		80	24	12	8	8	8	8	8	10	14	24	44	118
		122	34	18	12	10	10	10	12	14	22	34	66	180
		172	48	24	16	12	12	12	14	20	30	48	94	256
		230	64	32	20	16	16	16	20	26	38	64	124	342
		296	80	40	26	20	20	20	24	32	48	80	160	438
		366	100	48	30	24	24	24	28	40	60	100	198	544
		444	120	58	36	30	28	30	34	48	72	120	238	658
		524	142	68	42	34	32	34	40	56	84	142	282	780
		60.0	610	164	80	50	40	38	40	46	64	98	164	328
15.0	80	60	18	10	8	6	6	6	8	8	12	18	34	88
		104	30	16	10	8	8	8	10	12	18	30	56	154
		160	44	22	14	12	10	12	14	18	28	44	86	236
		226	62	30	20	16	14	16	18	26	38	62	122	336
		302	82	40	26	20	18	20	24	32	50	82	162	448
		388	106	52	32	24	22	24	30	42	62	106	208	576
		482	130	62	38	30	28	30	36	50	78	130	258	714
		582	158	76	46	36	32	34	44	62	94	158	312	864
		688	186	90	54	42	38	40	50	72	110	186	370	1022
		60.0	802	216	104	62	48	44	46	58	84	128	216	430
15.0	90	82	24	12	8	8	6	8	8	10	16	24	46	122
		144	40	20	14	10	10	10	12	16	24	40	78	212
		220	60	30	18	14	12	14	18	24	36	60	120	326
		312	86	42	26	18	18	18	24	34	50	86	168	464
		418	114	54	34	24	22	24	32	44	68	114	224	620
		536	144	70	42	30	28	30	40	56	86	144	288	796
		666	180	86	52	38	34	38	48	70	106	180	358	988
		806	216	104	62	46	40	44	58	84	128	216	432	1196
		954	256	122	74	52	48	52	68	98	152	256	512	1416
		60.0	1108	298	142	86	62	54	60	80	114	176	298	594

Figura 5. Desenho experimental para demonstrar bioequivalência mediante condições de estado de equilíbrio estacionário.



onde $ABC_{R,0-\infty}$ é a área sob a curva do produto referência se este tivesse sido administrado numa única dose, $ABC_{R,SS,0-\tau}$ e $ABC_{T,SS,0-\tau}$ são as áreas sob a curva dos produtos Referência e Teste estimadas durante os intervalos entre administrações ($0-\tau$), após atingir-se para um e outro o estado de equilíbrio estacionário.

Bibliografía:

D. Hauschke & coll. (1992). Sample size determination for bioequivalence assessment using a multiplicative model. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 20:557-561.

Diletti E, Hauschke D, Steinijs VW. (1992) Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*; (30), Supplement N°1. pp S51-58.

APÊNDICE de guia de Bioequivalência

Conteúdo

1. ESTUDOS ALTERNATIVOS	23
2. DESENHO DE ESTUDOS DE EQUIVALÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE FORMAS DE DOSAGEM ORAL	23
3. DESENHO DE ESTUDOS DE FORMAS DE DOSEGEM ORAL	25

1. ESTUDOS ALTERNATIVOS

Os estudos de equivalência *in vitro* poderiam respaldar a bioequivalência nos seguintes casos:

4. Quando se demonstrou bioequivalência, a informação de dissolução *in vitro* pode ser empregada para respaldar a equivalência de concentrações menores para essa formulação genérica. Nesses casos, para o método *in vitro* se requer que sejam reunidas todas as condições detalhadas a seguir:
 - As concentrações da dose diferem só em relação à concentração da substância ativa.
 - Sabe-se que o fármaco é associado com farmacocinética linear.
 - A composição das formulações é qualitativamente idêntica.
 - A proporção entre princípio ativo e excipiente para as diferentes dosagens é essencialmente a mesma ou, no caso de conteúdos muito baixos de princípio ativo, a proporção entre os excipientes é a mesma.
 - As novas formulações são fabricadas pelo mesmo laboratório produtor, no mesmo local de manufatura e com os mesmos procedimentos.
5. Quando tem uma mudança pouco significativa na formulação de um produto aprovado (ou prévio à aprovação de um produto que foi submetido a ensaios clínicos extensivos) e se determinou que a mudança só precisa de confirmação da equivalência *in vitro* com a formulação que foi submetida aos ensaios clínicos originais.
6. Garantir a consistência entre lotes de um produto.

2. DESENHO DE ESTUDOS DE EQUIVALÊNCIA *IN VITRO* DE FORMAS DE DOSAGEM ORAL

Um produto medicinal de administração oral está composto por uma ou mais substâncias farmacológicas, excipientes e a proporção entre eles. O tipo de excipientes e o método de elaboração do produto final são escolhidos com base no conteúdo, as propriedades físico-químicas e as propriedades

intrínsecas (*bulk properties*) do fármaco e suas propriedades de absorção. Tomadas em seu conjunto, isto outorga a cada produto certas características de dissolução.

Durante o desenvolvimento deste tipo de produto medicinal, é empregada uma prova de dissolução como ferramenta para identificar fatores de formulação que influenciam e podem ter efeitos cruciais na biodisponibilidade. Assim que são definidos a composição e o processo de elaboração do fármaco, se utiliza uma prova de dissolução no controle de qualidade dos lotes de escalado e dos lotes de produção para assegurar a congruência de lote a lote e controlar que os perfis de dissolução sejam similares aos lotes de laboratório. Além disso, a prova de dissolução também pode ser empregada para respaldar a biodisponibilidade de um novo produto farmacológico, a bioequivalência de um produto similar ou suas variações.

Por isso, os estudos de dissolução podem servir para vários propósitos:

- Asseguração da qualidade
 - Obter informação sobre lotes de prova utilizados em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e em ensaios clínicos para respaldar as especificações do produto.
 - Ser uma ferramenta para demonstrar congruência na elaboração.
 - Obter informação sobre os produtos de referência utilizados em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e em ensaios clínicos.
- Inferência indireta de bioequivalência
 - Para demonstrar semelhança entre as diferentes formulações de uma substância ativa e o produto medicinal de referência. Entendendo por diferentes formulações a variações de uma formulação ou novas formulações, ainda produtos essencialmente similares.
 - Para recopilar informação sobre a congruência entre lotes dos produtos (de prova e de referência) que serão utilizados como base para a seleção de lotes apropriados para o estudo *in vivo*.

A metodologia da prova deve estar de acordo com os requerimentos farmacopeicos, a menos que esses requerimentos demonstrem ser insatisfatórios. Pode-se considerar o uso de métodos alternativos quando for justificado que são discriminatórios e capazes de diferenciar entre lotes com desempenho aceitável e não aceitável do produto *in vivo*.

Caso um ingrediente ativo seja considerado altamente solúvel, é razoável esperar que não gere problemas de biodisponibilidade se, além disso, o sistema de dosagem se dissolve rapidamente na faixa de pH fisiológico esperado depois da administração do produto. Nessas situações pode não ser necessário realizar um estudo de bioequivalência em função dos antecedentes do caso e na semelhança dos perfis de dissolução que se baseiam em provas de discriminação que cumpram com 85% de dissolução em 15 - 30 minutos ¹. A semelhança deve se justificar pelos perfis de dissolução, cobrindo

pelo menos três pontos temporais diferentes que se conseguem com três tampões (*buffers*) diferentes (normalmente faixa de pH 1-6,8; nos casos em que se considera necessária a faixa pH 1-8).

3. DESENHO DE ESTUDOS DE FORMAS DE DOSAGEM ORAL

3.1 Princípios básicos

A prova *in vitro* deve ser um fator de predição validado da dissolução *in vivo* do produto, isto é, as condições de prova *in vitro* devem ter estado relacionadas previamente a condições *in vivo*. Não se pode empregar uma prova *in vitro* quando o tempo médio de dissolução é maior ao tempo médio de absorção. Além disso, quanto mais comprido for o tempo de dissolução, mais fácil será a extrapolação entre condições *in vitro* e *in vivo*. Por isso, não é recomendável realizar provas *in vitro* quando o tempo de dissolução é muito comprido.

3.2 Condições experimentais

As condições para realizar estudos de equivalência *in vitro* devem estar definidas claramente, (p. ex. pH, temperatura, meio de dissolução, agitação, etc.) Indica-se o uso de pelo menos três condições de pH a fim de oferecer certa confiança à extrapolação das condições *in vitro* às condições *in vivo*. Caso se considere que não são necessários estudos a diferentes pH, deverá ser justificado. As especificações do equipamento empregado para um estudo de equivalência *in vitro* deverão estar definidas por organismos de referência internacional. Deverá ser utilizado um método analítico validado para analisar o nível de substância ativa liberada.

3.3 Toma de amostras

As amostras tomadas para ensaios *in vitro* são comprimidos, quantidades definidas de uma pasta ou pó em uma embalagem especificada. Essas amostras são tomadas seguindo um planejamento previamente estabelecido no protocolo e baseado em um procedimento de aleatorização. O planejamento deve levar em conta os fatores incluídos no desenho experimental (p. ex. lotes do produto). O procedimento de amostragem deve ser o mesmo tanto para a formulação de referência como para a de prova. Quando for possível, o conjunto final de amostras de cada formulação deve ser representativo de toda a população: p. ex., a quantidade de lotes dos que são obtidas as amostras para a prova *in vitro* deve estar relacionada com a variabilidade esperada entre os lotes.

3.4 Desenho experimental

O desenho experimental deve levar em conta as principais fontes de variação, que provavelmente influenciem o resultado final: lote do produto, tempo de conservação, equipamento utilizado na prova (p. ex., uma embalagem numa prova de dissolução). Devem-se tomar precauções para evitar o viés, como uma distribuição equitativa de unidades de cada formulação em cada prova analítica. Quando for pertinente, devem ser realizadas réplicas das determinações, a fim de levar em consideração a variação inerente ao método analítico.

3.4.1 Tamanho da amostra

Caso seja relevante utilizar um desenho similar ao estudo de bioequivalência *in vivo*, deve-se determinar o tamanho da amostra para subministrar suficiente potência na demonstração da equivalência. O coeficiente da variação empregado no cálculo do tamanho da amostra deve ser obtido de estudos piloto ou estimar-se a partir da variabilidade do método analítico. Estes pontos devem estar documentados no protocolo.

3.4.2 Análise estatística para estudos de dissolução *in vitro*

Os parâmetros devem ser selecionados *a priori* e devem estar justificados em relação à correlação com a farmacocinética. Pode basta com discutir a relação entre o tempo de dissolução e a taxa de absorção para os produtos comparados (isto é, quando o processo de dissolução não é o passo limitante da velocidade e a magnitude de absorção). A equivalência *in vitro* pode ser demonstrada mediante a comparação dos perfis de dissolução após o ajuste a um modelo matemático ou mediante a comparação de parâmetros como tempo de dissolução de 50%, tempo de dissolução de 90% e área sob a curva (AUC do inglês). A análise estatística pode ser semelhante à utilizada em um estudo de bioequivalência. No entanto, o intervalo de equivalência predeterminado deve estar justificado cuidadosamente. Deve-se lembrar que a extensão de estudos *in vivo* só é possível quando os resultados dos estudos *in vitro* levam a deduzir um comportamento farmacocinético semelhante entre os dois produtos comparados.

¹ Pharmaceutical Research. Vol 15, No. 1, 1998 – Review “Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms” Jennifer Dressman, Gordon Amidon, Christos Reppas and Vinod Shah.