



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

## Optimización y mejora en la evaluación y análisis de los estudios de bioequivalencia

María Isabel Moreno Arza

Trabajo presentado para optar al  
Título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director:

Francisco Abad-Santos

Madrid, 2016





Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Francisco Abad-Santos, Jefe de Sección del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa y Profesor Asociado del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que Dña. María Isabel Moreno Arza ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: "*Optimización y mejora en la evaluación y análisis de los estudios de bioequivalencia*", como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, se expide y firma la presente en Madrid, a 11 de abril de 2016.

Dr. Francisco Abad-Santos  
Profesor Asociado de Farmacología



A mi abuela María, porque no te olvido,  
y a Carmen y José Luís, mis padres.

# Índice

Abreviaturas y siglas.....	6
Introducción y justificación de esta tesis doctoral .....	8
1. <a href="#">Biodisponibilidad y bioequivalencia</a> .....	8
1.1. Parámetros de evaluación y demostración de bioequivalencia .....	9
1.2. Estudios de bioequivalencia .....	11
2. <a href="#">Fármaco genérico</a> .....	12
2.1. Sustitución de medicamentos genéricos.....	13
2.2. Historia de los medicamentos genéricos.....	14
2.2.1. Agencia reguladora estadounidense: Food and Drug Administration (FDA).....	14
2.2.2. La Ley Hatch-Waxman de 1984 .....	17
2.2.3. El escándalo de los medicamentos genéricos .....	18
2.3. Medicamentos genéricos en Europa .....	20
3. <a href="#">Evolución de la guía de bioequivalencia europea</a> .....	22
4. <a href="#">Optimización y mejora de la última actualización de la guía europea</a> .....	25
4.1. Utilidad de los estudios piloto en los ensayos de bioequivalencia .....	25
4.2. Efecto del truncado del AUC a tiempos inferiores a las 72 h en fármacos de vida media larga .....	26
4.3. Efecto del genotipo de los voluntarios en los parámetros farmacocinéticos .....	27
Objetivos de esta tesis doctoral.....	29
Resumen de resultados .....	30
Artículo 1: <a href="#">Utility of Pilot Studies for Predicting Ratios and Intra-subject     Variability in High Variability Drugs</a> .....	30
Artículo 2: <a href="#">Effect of Truncating AUC at 12, 24 and 48 hr When Evaluating the     Bioequivalence of Drugs with a Long Half-Life</a> .....	36
Artículo 3: <a href="#">Polymorphisms in CYP2D6 have a greater effect on variability of     risperidone pharmacokinetics than gender</a> .....	41
Discusión general.....	46
Conclusiones de esta tesis doctoral .....	54
Agradecimientos.....	56
Bibliografía .....	58
Anexo I: Guideline on the Investigation of Bioequivalence .....	63
Anexo II: Publicaciones .....	91



## Abreviaturas y siglas

<b>2 x 2</b>	2-secuencias, 2-periodos
<b>4 x 4</b>	4-secuencias, 4-periodos
<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ae</b>	Excreción urinaria acumulativa
<b>ANDA</b>	Abbreviated New Drug Application
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AUC</b>	Área bajo la curva (Area Under the Curve)
<b>AUC<sub>0-12</sub></b>	Área bajo la curva a las 12 horas
<b>AUC<sub>0-24</sub></b>	Área bajo la curva a las 24 horas
<b>AUC<sub>0-48</sub></b>	Área bajo la curva a las 48 horas
<b>AUC<sub>0-72</sub></b>	Área bajo la curva a las 72 horas
<b>AUC<sub>0-∞</sub></b>	Área bajo la curva extrapolada al infinito
<b>AUC<sub>0-t</sub></b>	Área bajo la curva a tiempo t
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea
<b>CCP</b>	Coefficiente de correlación de Pearson
<b>CHMP</b>	Committee for Medicinal Products for Human Use
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentración máxima de principio activo
<b>CV<sub>w</sub></b>	Coefficiente de variación intrasujeto
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>EMC</b>	Error de mínimos cuadrados
<b>EMEA</b>	European Medicines Evaluation Agency
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IP</b>	Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa
<b>ITH</b>	Instituto Teófilo Hernando
<b>MI</b>	Metabolizadores intermedios



<b>ML</b>	Metabolizadores lentos
<b>MR</b>	Metabolizadores rápidos
<b>MRT</b>	Mean residence time
<b>MU</b>	Metabolizadores ultrarrápidos
<b>NDA</b>	New Drug Application
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PKWP</b>	Pharmacokinetics Working Party
<b><math>t_{1/2}</math></b>	Tiempo de vida media
<b><math>T_{\text{máx}}</math></b>	Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de principio activo
<b><math>\lambda_z</math></b>	Velocidad de eliminación terminal del fármaco

## Introducción y justificación de esta tesis doctoral

La autorización de comercialización de cada medicamento se emite tras un proceso riguroso de evaluación durante el que se verifican las garantías de calidad químico-farmacéutica, se evalúa su eficacia y seguridad, y se establecen las condiciones de uso en las que se considera que la relación riesgo/beneficio es aceptable (1). La autorización de comercialización es tarea de las agencias reguladoras. En el caso de los Estados Unidos, la agencia reguladora es la Food and Drug Administration (FDA) y en el caso de Europa, la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency -EMA-). Estas agencias reguladoras mantienen una evaluación continuada de los medicamentos que están comercializados y autorizan cualquier cambio que se produzca en el medicamento en cuestión (1).

Un laboratorio farmacéutico que quiera solicitar la autorización de comercialización de un fármaco debe presentar todos los datos y estudios que sean requeridos para que se pueda evaluar la calidad, eficacia y seguridad del medicamento.

En el caso de la autorización de productos genéricos, es necesaria la realización de estudios de bioequivalencia que deben llevarse a cabo según los requisitos de las guías de las diferentes agencias reguladoras. En los ensayos de bioequivalencia, no son necesarios los estudios de seguridad y eficacia, ya que su evaluación se basa en la equivalencia farmacocinética, asumiéndose que se asume que su efecto depende de las concentraciones plasmáticas, como se explica posteriormente.

### 1. Biodisponibilidad y bioequivalencia

La biodisponibilidad de un fármaco indica la velocidad y la cantidad de la forma inalterada de un fármaco que llega a la circulación sistémica y, por lo tanto, está disponible para acceder a los tejidos y producir un efecto (2). La biodisponibilidad no solo depende de los procesos de absorción, sino también de los de liberación de la forma farmacéutica y de la eliminación presistémica (2).

La bioequivalencia se define como la equivalencia farmacocinética entre dos preparados farmacéuticos, es decir, que tengan tanto la misma velocidad de absorción como fracción de absorción para que pueda asumirse que tendrían la misma eficacia y seguridad (2).

### 1.1. Parámetros de evaluación y demostración de bioequivalencia

En general, como parámetros de biodisponibilidad en un estudio farmacocinético en dosis única, se utilizan el Área Bajo la Curva (ABC o, en inglés, AUC) de concentraciones plasmáticas frente al tiempo, la concentración máxima que alcanza el principio activo en el lugar de acción ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y el momento en el que esto ocurre ( $T_{m\acute{a}x}$ ) (3). El AUC es un excelente parámetro para cuantificar la cantidad de principio activo absorbido y, por lo tanto, disponible para llegar al lugar de acción.  $T_{m\acute{a}x}$  da una idea de la velocidad de absorción y el parámetro  $C_{m\acute{a}x}$  es un estimador que serviría para ambas características de la biodisponibilidad, es decir, cantidad y velocidad de absorción (3). En la Figura 1 puede verse representada (concentración frente al tiempo) la curva de una formulación test y otra de referencia, así como los parámetros farmacocinéticos más importantes.

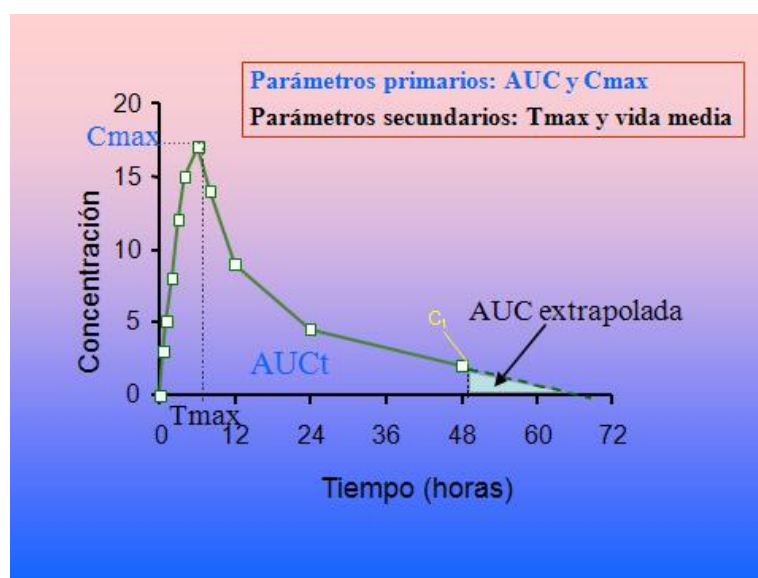


Figura 1. Parámetros farmacocinéticos

En los estudios de bioequivalencia de administración oral en dosis única para fármacos de liberación inmediata, la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency -EMA-) establece que deben calcularse al menos los siguientes

parámetros farmacocinéticos:  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-72}$  (si procede), el área residual,  $T_{m\acute{a}x}$  y  $C_{m\acute{a}x}$  (4) (Figura 1). El cálculo de  $AUC_{0-72}$  se requiere como variable principal cuando se trata de fármacos de vida media larga en sustitución de  $AUC_{0-t}$ .

El cálculo de AUC se realiza mediante el método trapezoidal y los de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $T_{m\acute{a}x}$  serían los observados directamente de la curva concentración frente al tiempo (3).

Es necesario un adecuado muestreo de las extracciones sanguíneas en función del tiempo (4, 5). El muestreo debe describir las fases de absorción, distribución y eliminación del fármaco (se calculan entre 12 y 18 muestras); así, debe incluirse un periodo de tiempo de 3 o más veces la vida media del fármaco (5). Por tanto, el muestreo debe cubrir la curva de concentración frente al tiempo durante el tiempo suficiente para estimar de forma fiable el grado de exposición al mismo, lo cual se consigue si el  $AUC_{0-t}$  cubre el 80 % del  $AUC_{0-\infty}$  (4). Para la estimación de  $AUC_{0-\infty}$ , es necesario el cálculo de la constante de velocidad de eliminación terminal del fármaco ( $\lambda_z$ ), siendo necesario para el cálculo al menos 3 o 4 muestras correspondientes a la fase logarítmica-lineal terminal del fármaco (4, 5) (Figura 1).

El tratamiento estadístico al que deben someterse los parámetros farmacocinéticos obtenidos es el cálculo de los intervalos de confianza clásicos al 90 % de la razón entre las medias de estos (3). Para ello hay que realizar previamente un análisis de la varianza (ANOVA), mediante el cual, tras asignar parte de la variabilidad a determinados factores conocidos (periodo, sujeto, secuencia y tratamiento), se obtendrá el valor de la varianza residual (error aleatorio más los no identificables, como, por ejemplo, la variabilidad del método analítico o la variabilidad del principio activo), necesaria para el cálculo de dichos intervalos (3). Además, para el cálculo de los intervalos es necesario que los datos se analicen mediante transformación logarítmica (4, 5).

Dos formulaciones son bioequivalentes si el intervalo de confianza (IC) del 90 % de la relación entre las medias de los parámetros farmacocinéticos ( $AUC_{0-t}$  o, cuando sea relevante,  $AUC_{0-72}$ , y  $C_{m\acute{a}x}$ ,) de la formulación test frente a la de referencia está dentro del intervalo aceptado de 80,00-125,00 % (4).

En algunos casos, la amplitud de los intervalos de aceptación de la AUC y de  $C_{m\acute{a}x}$  podrán ser modificados; por ejemplo, en el caso de fármacos de estrecho rango terapéutico en los que puede reducirse a un 10 % o cuando la variabilidad intrasujeto

supere el 30 % para alguno de los parámetros, en cuyo caso podrán ampliarse los límites para la  $C_{m\acute{a}x}$  (4).

La estimación de la bioequivalencia depende principalmente de dos factores: de la ratio de las medias y la variabilidad. El grado de similitud entre ambas formulaciones vendrá condicionado, en primer lugar, por la diferencia real de ambas formulaciones (cuyo mejor estimador es la media obtenida) y, en segundo lugar, por lo variable que sea, de tal manera que dos formulaciones que muestren unas medias idénticas para  $C_{m\acute{a}x}$ , AUC y  $T_{m\acute{a}x}$  podrían no ser bioequivalentes si fueran muy variables, ya que la amplitud del intervalo calculado en torno a la ratio de medias sería muy grande. Y, por el contrario, en un estudio de baja variabilidad, aun diferenciándose algo las medias, las formulaciones podrían resultar bioequivalentes al obtenerse un intervalo de confianza más estrecho (3).

Se entiende que una formulación demuestra **bioequivalencia** cuando el intervalo de confianza del 90 % está dentro de los límites de aceptación, **bioinequivalencia** cuando está completamente fuera de los límites de aceptación y **no bioequivalencia** cuando solo una parte del intervalo entra dentro de los límites de aceptación (6). En términos prácticos, es necesario demostrar inequivalencia para poder decir que la formulación test no es similar a la de referencia. En caso de demostrar que no hay bioequivalencia otro estudio con mayor poder estadístico podría ser capaz de demostrar bioequivalencia (6).

## 1.2. Estudios de bioequivalencia

Los estudios de bioequivalencia son un tipo especial de estudios farmacocinéticos cuyo objetivo es comparar las biodisponibilidades de dos especialidades farmacéuticas formuladas con la misma cantidad de principio activo para demostrar que son suficientemente similares. Pretenden demostrar la intercambiabilidad de ambas preparaciones, y la única suposición que se hace es que, a niveles plasmáticos iguales de un mismo principio activo, los efectos farmacológicos son iguales (3).

Estos estudios sirven para evitar tener que repetir los ensayos clínicos de eficacia y seguridad (2). Así, estos ensayos se utilizan para evaluar la velocidad y la cantidad de fármaco absorbida para:

- Diferentes formulaciones (por ejemplo, medicamento de marca frente a la que se quiere comercializar como genérico, o dos formulaciones del medicamento de marca) o diferentes formas de dosificación (por ejemplo, ensayos que se han realizado con comprimidos y se quieren comercializar en cápsulas).
- Un medicamento fabricado en dos sitios diferentes (por ejemplo, cambios de planta de fabricación o cambios de proveedor de materia prima).
- Un medicamento fabricado por dos técnicas diferentes (por ejemplo, métodos biotecnológicos y técnicas de síntesis).

## 2. Fármaco genérico

Según la guía europea, podemos definir un fármaco genérico como “todo medicamento que tenga la misma composición cuantitativa y cualitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica, y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrado por estudios adecuados de biodisponibilidad. Las diferentes sales, ésteres, isómeros, mezclas de isómeros complejos o derivados de principio activo se considerarán un mismo principio activo, a menos que tengan propiedades considerablemente diferentes en cuanto a seguridad y/o eficacia. Las diferentes formas farmacéuticas orales de liberación inmediata se considerarán una misma forma farmacéutica” (1, 4).

Un medicamento genérico, por tanto, debe contener el mismo principio activo y la misma dosis que el medicamento de referencia, pudiendo diferenciarse en los excipientes utilizados; ambos deben tener la misma forma farmacéutica y deben ser equivalentes.

El concepto de genérico no es el mismo en las diferentes agencias reguladoras del mundo y tampoco los rangos de aceptación de bioequivalencia (1, 7, 8). En cualquier caso, podemos concluir que el de la EMA es el más restrictivo (1). Esta heterogeneidad a nivel mundial, en cuanto a definiciones y regulaciones, dificulta la comparación de los medicamentos a nivel internacional (7).

## 2.1. Sustitución de medicamentos genéricos

Todos y cada uno de los medicamentos que se autorizan pueden ser prescritos, lo que significa que tienen una relación beneficio/riesgo favorable en las condiciones de uso autorizado. Un medicamento genérico comercializado puede ser prescrito con el mismo nivel de eficacia y seguridad que el de referencia. La mayoría de los países desarrollados que disponen de medicamentos genéricos en su mercado, y la propia Organización Mundial de la Salud (OMS), consideran que la demostración de bioequivalencia permite asumir la intercambiabilidad del genérico con el de referencia. Adicionalmente, se reconoce la intercambiabilidad con los demás medicamentos genéricos bioequivalentes, aunque esto no haya sido objeto de demostración formal como requisito para la autorización (1).

El establecimiento de políticas de sustitución de medicamentos en el momento de la dispensación es un aspecto que, aunque guarda una relación con el concepto técnico de intercambiabilidad del medicamento genérico, se sitúa en el de las políticas de medicamentos que establecen las autoridades sanitarias. Así, los conceptos técnicos que rigen la autorización de genéricos, de bioequivalencia e intercambiabilidad que manejan las agencias de medicamentos son idénticas en todos los países de la Unión Europea; sin embargo, las políticas de sustitución son distintas entre las agencias reguladoras del mundo, ya que dependen del sistema de salud de cada país (1).

En el caso de España, todos los medicamentos de referencia son sustituibles por genéricos y estos entre sí, salvo los que se encuentran recogidos en la Orden Ministerial SCO/2874/2007. Esta restricción nacional no cuestiona la bioequivalencia, si no que defiende que por tratarse de un medicamento catalogado como “principio de precaución adicional”, no se permite la sustitución sin conocimiento del médico prescriptor. En este grupo se encuentran los medicamentos de estrecho margen terapéutico, biológicos, que requieran medidas específicas de seguimiento o para el aparato respiratorio administrados por vía inhalatoria (1).

El hecho de que en España existan estas restricciones en la sustitución de fármacos genéricos no implica un reconocimiento de que la bioequivalencia no garantiza la intercambiabilidad en general, puesto que no hay evidencias de que existan problemas de sustitución en países donde sí lo permiten, como es el caso, por ejemplo, de Estados Unidos (1).

## 2.2. Historia de los medicamentos genéricos

### 2.2.1. Agencia Reguladora Estadunidense: Food and Drug Administration (FDA)

En la década de 1880, los profesionales sanitarios y farmacéuticos norteamericanos expresaron su preocupación sobre algunos remedios que estaban siendo publicitados libremente. Su contenido era secreto y algunos farmacéuticos comenzaron a recomendar sus propios remedios como sustitutos de la marca comercial. Para ayudar a los farmacéuticos en este esfuerzo, la Asociación Americana de Farmacéuticos desarrolló el Formulario Nacional, cuyo primer ejemplar fue publicado en 1888. Además, para acabar con los productos de imitación, se fundó la Asociación de Propietarios. El problema volvió aparecer en 1928, cuando una popular revista farmacéutica, "The Druggist Circular", publicó varios artículos en los que sugerían que la sustitución de medicamentos de marca por medicamentos genéricos no era apropiada, lo que generó gran confusión en la sociedad. El problema continuó en las siguientes dos décadas con la llegada de medicamentos "milagro" (antibióticos, sulfonamidas, esteroides y benzodiacepinas), que contribuyeron al aumento de duplicados de productos que contenían el mismo principio activo, pero que estaban elaborados por diferentes fabricantes y tenían distintos nombres comerciales (9).

La Food and Drug Administration (FDA) fue creada en **1906** por una ley denominada Wiley Act (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) para prevenir la fabricación, comercialización y transporte de alimentos, drogas, medicamentos y bebidas alcohólicas que pudieran estar adulterados, contaminados, clasificados inadecuadamente o ser nocivos para el consumo humano. La ley también tenía como objeto regular el tráfico de estas sustancias. La FDA es una agencia dependiente del Departamento de Salud y Servicios Humanos (Health and Human Services: HHS) (10).

La industrialización del medicamento comienza en la década de 1930, cuando aparecieron los primeros problemas de salud pública, como, por ejemplo, el caso del elixir de sulfanilamida en Estados Unidos en 1937. Así, se establecieron los primeros mecanismos de control de la toxicidad y de calidad del proceso de fabricación de los medicamentos (11).

En **1938** se modificó la ley para que las empresas que quisieran introducir nuevos fármacos en el mercado estuvieran obligadas a demostrar su seguridad, con el fin de que pudieran ser aprobados y comercializados. En **1962** una nueva enmienda



obligó a los fabricantes de medicamentos a demostrar la eficacia del medicamento para su indicación terapéutica. A raíz de esto, la FDA creó un programa de revisión de los fármacos introducidos entre **1938 y 1962**. A los medicamentos existentes antes de 1938 se les dio aprobación, asumiendo su eficacia y seguridad por la prueba del tiempo. Solo fueron aprobados para su comercialización aquellos medicamentos lanzados al mercado entre 1938 y 1962 cuya eficacia y seguridad pudo demostrarse. Se evaluaron más de 3.000 productos y alrededor de 900 fueron eliminados del mercado, mientras que a otros se les cambió la indicación terapéutica o fórmula farmacéutica. A este proceso de revisión de productos existentes se le denominó “solicitud abreviada de nuevo medicamento” (Abbreviated New Drug Application: ANDA) (10).

**A finales de los años 60 y principios de los 70**, la introducción de sofisticadas técnicas de bioanálisis hizo posible la determinación de concentraciones de fármaco en los fluidos biológicos del orden de unidades de nanogramos por mililitro. Estas técnicas se aplicaron en la investigación de la biodisponibilidad de un producto de marca frente a su producto genérico, pudiendo determinar el grado de biodisponibilidad entre ambos productos. Durante esos años se publicaron muchos estudios que demostraban la diferencia de biodisponibilidad de fármacos químicamente equivalentes, como, por ejemplo, cloranficol, tetraciclinas, fenilbutazona y oxitetraciclinas. Otro ejemplo de relevancia histórica fue el de la digoxina, pues se descubrieron casos de fracaso terapéutico en pacientes tratados con este medicamento. Estos pacientes necesitaban dosis de mantenimiento de digoxina inusualmente altas y aun así presentaban bajas concentraciones del fármaco en plasma (12). Lindenbaum y col. (13) realizaron un estudio cruzado en el que se administró una única dosis de digoxina de 0.5 mg en cuatro voluntarios sanos. En el estudio se ensayaron distintas formulaciones del fármaco realizadas por distintos fabricantes y se observaron diferencias significativas en los picos de concentración del fármaco para cada una de las formulaciones. Una de las formulaciones presentaba un pico siete veces superior al resto de las formulaciones. Además, se observó que incluso las formulaciones elaboradas por el mismo fabricante presentaban diferencias importantes en los picos de concentración. En 1973, Wagner y col. (14) confirmaron que los hallazgos encontrados por Lindenbaum eran consecuencia de una falta de equivalencia entre las formulaciones. Esto podría deberse a la insuficiente o excesiva cantidad de principio activo de las diferentes formulaciones o a variaciones en el tamaño de las partículas, en la velocidad de disolución o desintegración o el efecto de

los excipientes. Algunas de estas teorías fueron demostradas por grupos de investigación de la época como Vitti y col. (15) y Wagner y col. (16).

Para solucionar estos problemas de bioinequivalencia de los fármacos duplicados, el Congreso Estadounidense creó la Oficina de Evaluación Tecnológica en **1974**. Este organismo tiene como principal objetivo servir de ayuda ante problemas de tipo científico, entre los que se encontraba la bioequivalencia entre fármacos (12).

El 7 de enero de **1977** la FDA publica la primera regulación sobre bioequivalencia y biodisponibilidad. En ella, la industria de productos genéricos ya podía encontrar la definición de biodisponibilidad, los requisitos de cómo realizar los estudios en vivo para demostrar bioequivalencia y las condiciones de comercialización. En estos años, las solicitudes abreviadas de nuevos medicamentos (ANDA) que se describen en esta regulación estaban circunscritas únicamente a los fármacos duplicados que se habían aprobado antes del 10 de octubre de 1962 (12).

En **1984**, con la promulgación de la Ley Hatch-Waxman, las ANDA se extendieron a los productos genéricos (10).

La Federal Food, Drug and Cosmetic Act existente hoy en día, con todas sus enmiendas, es la ley básica de medicamentos y alimentos en Estados Unidos. Tiene un propósito múltiple: primero, garantizar al público la pureza y seguridad para la ingesta y producción de alimentos bajo condiciones sanitarias apropiadas; segundo, garantizar que los cosméticos son seguros y se fabrican con ingredientes apropiados; tercero, que los medicamentos y dispositivos médicos son seguros y eficaces para el uso indicado; finalmente, que la información, promoción y comercialización de los productos es veraz e informativa (10).

La misión de la FDA es implementar las leyes que el Congreso norteamericano promulga, así como establecer normas para proteger la salud y seguridad del consumidor. La FDA regula el proceso de aprobación de todos los medicamentos de prescripción, sean estos genéricos o no. Los medicamentos nuevos son aprobados a través del proceso de solicitud de medicamento nuevo (New Drug Application: NDA), mientras que los medicamentos genéricos se aprueban mediante el proceso denominado "solicitud abreviada de nuevo medicamento" (Abbreviated New Drug Application: ANDA) (10).

### **2.2.2. La Ley Hatch-Waxman de 1984**

La Ley Hatch-Waxman (Ley Pública 98-417) fue promulgada el 24 de septiembre de 1984. Antes de su aprobación, la FDA había utilizado dos tipos de solicitud de comercialización de fármacos genéricos. Por un lado, los productos genéricos aprobados antes de octubre de 1962 solo tenían que demostrar la bioequivalencia del producto genérico con respecto al innovador (17). Por otro lado, en las aprobaciones de medicamentos genéricos posteriores a 1962 (enmienda de la ley de 1962), el fabricante debía demostrar la seguridad y la eficacia del medicamento genérico (17). Por tanto, los fabricantes de genéricos tenían que llevar a cabo exactamente los mismos estudios de seguridad y eficacia que los fabricantes originales para registrar y comercializar el producto (10). En algunas ocasiones, la FDA aceptaba los datos obtenidos de la literatura científica que apoyaban la demostración de seguridad y eficacia del medicamento para comercializar el producto genérico. Esto es lo que se conocía como “paper NDA”, pero no era muy habitual, ya que la FDA consideraba como reservada la información presentada por el fabricante innovador, y las empresas que tenían la patente rara vez publicaban datos relevantes que pudieran servir durante el proceso de comercialización de estos genéricos (17).

Los antibióticos no se vieron afectados por los cambios introducidos por la ley de 1962, puesto que únicamente estaban sometidos a la demostración de bioequivalencia para su comercialización. En cualquier caso, la enmienda a la ley de 1962 hizo que la autorización de genéricos fuera lenta y costosa. Antes de la aprobación de la ley, existían relativamente pocos medicamentos genéricos en Estados Unidos (17). En 1983 solo el 35 % de los medicamentos de marca más vendidos con las patentes caducadas se encontraban con la competencia de los genéricos, y la cuota de mercado de estos genéricos era del 13 % (18, 19).

En general, las empresas de productos genéricos estaban sumidas en el desánimo, debido a las barreras existentes y al elevadísimo coste que suponía desarrollar los fármacos (10).

La Ley Hatch-Waxman permitió disminuir este coste de desarrollo de los productos genéricos mediante la simplificación y acortamiento del proceso, pero siempre obligando a demostrar la equivalencia del genérico con respecto al producto de referencia mediante rigurosos requisitos basados en principios científicos bien desarrollados. Además, estipuló que el proceso de fabricación del medicamento debía

adherirse a todas las regulaciones aprobadas por la FDA. Esto permitió a los fabricantes de medicamentos genéricos comenzar sus actividades de desarrollo antes de que la patente del producto original caducara (10).

Esta ley otorga a la primera compañía de productos genéricos cuyo producto es aprobado por la FDA la exclusividad para comercializarlo durante 180 días, lo que permite la recuperación de la inversión en el desarrollo del producto genérico. Por otro lado, esa misma norma, con el fin de ayudar a las empresas que fabrican productos de marca, permite a estas desafiar judicialmente a las compañías que fabrican productos genéricos para proteger su propiedad intelectual (patente), retrasando así la aprobación del producto genérico hasta los 30 meses (10).

Por tanto, aunque la Ley Hatch-Waxman fue aprobada por abrumadora mayoría en el Congreso de Estados Unidos, fue, y sigue siendo, un compromiso incómodo que mantiene un delicado equilibrio entre los intereses de la industria del medicamento de marca y la industria de medicamentos genéricos (17).

### 2.2.3. El escándalo de los medicamentos genéricos

El comienzo de la industria moderna de medicamentos genéricos estuvo marcado por el fraude y otro tipo de delitos por parte de algunas compañías que casi destruyeron la industria antes de que pudiera iniciarse. El fraude fue generalizado entre 1984 y 1989, llegando a ser conocido colectivamente como el escándalo de los medicamentos genéricos (17).

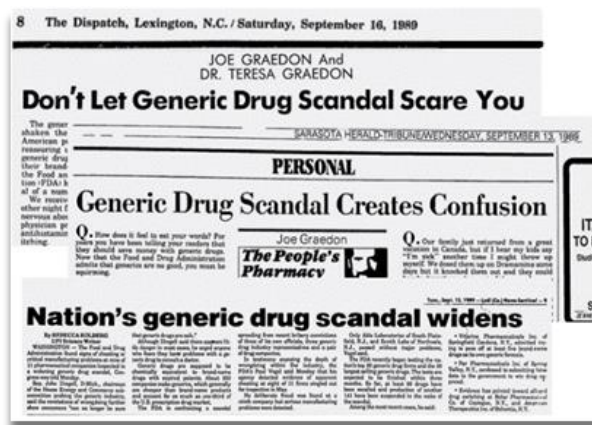


Figura 2. Titulares de prensa del año 1989

El escándalo de los medicamentos genéricos redujo la percepción de la calidad de los medicamentos genéricos por parte del consumidor. La Ley Hatch-Waxman abrió la puerta a la competencia en la venta de nuevos medicamentos genéricos con respecto a medicamentos de marca. Además, como se ha explicado anteriormente, esta ley concedió 180 días de exclusividad de comercialización del genérico a la primera solicitud abreviada de nuevo medicamento (ANDA). A esto se unía la política de la FDA, basada en revisar lo primero que llegaba, lo que se conocía como "first in, first reviewed". Las empresas de genéricos sabían que el primer producto genérico aprobado obtendría precios relativamente altos y conseguiría la mayor parte del mercado de genéricos, mientras que los aprobados posteriormente obtendrían menores márgenes. Por lo tanto, se inició una carrera en el desarrollo de productos para ser el primero en obtener la aprobación de un producto determinado. El fraude comenzó desde el primer día de la nueva industria y se demostró que algunos de los revisores de la FDA habían sido sobornados para manipular su política de "first in, first reviewed" (17).

La empresa Bolar Pharmaceuticals envió y presentó 40 solicitudes ANDA a la FDA el 23 de noviembre de 1984. Posteriormente, se descubrió que todas estas solicitudes habían sido fraudulentas, generadas con el propósito de ser los primeros en conseguir las autorizaciones y conseguir la exclusividad de comercialización dentro de los tiempos establecidos. La compañía de genéricos Mylan Laboratories se había quejado a la división de evaluación de productos genéricos de la FDA de que, mientras sus solicitudes ANDA no estaban siendo revisadas según el principio "first in, first reviewed", había otras que parecían estar recibiendo un trato especial. En **1988**, Mylan Laboratories, frustrada por la falta de respuesta a sus quejas de favoritismo, contrató a un detective privado para investigar lo que estaba ocurriendo. Consiguieron demostrar la corrupción de los colaboradores de la división de productos genéricos y se envió el asunto a la Cámara de Representantes del Subcomité de Energía y Comercio del Comité de Supervisión e Investigaciones. El Subcomité inició una investigación que reveló la existencia de sobornos y actividades fraudulentas, resultando acusados funcionarios de la FDA, así como compañías farmacéuticas de genéricos y algunos de sus ejecutivos, directivos y empleados. La investigación continuó durante varios años e investigadores del Departamento de Justicia y del Departamento de Salud y Servicios Humanos descubrieron que no solo había habido sobornos, sino que algunas empresas habían presentado datos fraudulentos sobre la demostración de bioequivalencia de algunos de sus productos genéricos. Un total de 30 personas y 9 empresas se vieron implicadas en el escándalo de los medicamentos genéricos (17).

El representante John Dingell, Presidente del Subcomité, declaró que la industria de medicamentos genéricos era "la más corrupta, de manera generalizada, que este subcomité ha descubierto" (20).

A finales de **1990**, la confianza del público en los medicamentos genéricos y en la capacidad de la FDA para regular la industria de los medicamentos estaba gravemente dañada (17).

En la Figura 2 se muestra el fuerte impacto que tuvo el escándalo de los medicamentos genéricos en aquella época. Entre los 1.009 consumidores encuestados por Gallup en octubre de 1989, con un amplio rango de edades, para conocer sus actitudes hacia los medicamentos genéricos tras el escándalo, el 51 % pensaba que los medicamentos genéricos no se fabricaban con los mismos estándares que los medicamentos de marca y más del 70 % indicó que, en mayor o menor medida, el escándalo había afectado a su confianza en los medicamentos genéricos (17).

En **1992** hubo intentos de restablecer la credibilidad de la comercialización de los fármacos genéricos con la introducción de legislación que reforzaba una monitorización estricta de la calidad del producto y de la bioequivalencia. A pesar de esta legislación, el debate sobre las circunstancias apropiadas en las que poder sustituir un fármaco comercial por su genérico todavía no ha sido resuelto (20).

### **2.3. Medicamentos genéricos en Europa**

Después del desastre de la talidomida en 1962, aparecieron leyes relacionadas con la seguridad y eficacia de los medicamentos y, además, se reconoció la necesidad de la evaluación de estos tras ser autorizados para su comercialización (11). Como hemos visto, el primer país que tomó la iniciativa fue Estados Unidos en **1962**, aprobando la enmienda del 10 de octubre de ese año. El siguiente país, ya en Europa, que revisó su legislación y la modificó en 1963 fue Reino Unido, que creó un comité de seguridad de fármacos; más tarde, en 1964, puso en marcha el primer sistema de farmacovigilancia, con la creación de la "tarjeta amarilla". Sin embargo, países como Alemania no revisaron su legislación hasta que fueron obligados por la directiva de la Comunidad Económica Europea (CEE) de **1965** (21). La Directiva 65/65/CEE del Consejo, de 26 de enero de 1965, relativa a la aproximación de las disposiciones

legales, reglamentarias y administrativas sobre medicamentos, fue la primera en fijar los principios básicos de la regulación de medicamentos en Europa.

Hasta **1995**, en Europa, todas las agencias de cada país realizaban la evaluación de autorización de comercialización de medicamentos siguiendo las directrices de 1965. Hasta esa fecha, los expedientes de registro no eran exhaustivos y las evaluaciones de los estudios se basaban en la literatura científica, las guías americanas y en la guía europea sobre estudios farmacocinéticos en humanos (22, 23). Fue en la **década de 1990** cuando se decidió introducir nuevos procedimientos de autorización de medicamentos para asegurar su disponibilidad para todos los ciudadanos de la Unión Europea y acelerar los procesos de evaluación, así como de los recursos. Por ello, **en 1993** se crea la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (European Medicines Evaluation Agency -EMA-), que en el año 2005 pasó a conocerse como la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency -EMA-) (11).

En 1991 se publicó la primera guía europea de bioequivalencia “Investigation of Bioavailability and Bioequivalence” (24) para tratar de estandarizar y regular los procedimientos de aprobación de medicamentos genéricos en Europa (23, 25).

En julio de 2001 la guía es actualizada por primera vez: “Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence” (26). Esta revisión se complementa con el documento de preguntas y repuestas de 2006 “Question and Answers on the Bioavailability and Bioequivalence Guideline” (27), que aborda y clarifica cuestiones que no se habían especificado antes en la guía.

No obstante, la guía seguía sin definir y estandarizar cuestiones como, por ejemplo, las exenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (Biopharmaceutics Classification System), el uso de la concentración de metabolitos o del fármaco padre en sangre o la evaluación de bioequivalencia en fármacos de alta variabilidad (23). Además, el aumento de solicitudes de aprobación de comercialización de productos genéricos por ambos procedimientos, los continuos desacuerdos entre los estados miembros de la Unión Europea y el “Committee for Medicinal Products for Human Use” (CHMP), junto con las diversas interpretaciones de la guía, condujeron a una nueva actualización, cuya discusión comenzó en el año 2007 (23, 28).



Esta nueva actualización era necesaria, por un lado, para homogeneizar los requisitos en la Unión Europea y, por otro lado, para llevar a cabo avances científicos en el campo de la bioequivalencia (28).

La última actualización de la guía se publicó en enero de 2010 bajo el título “Guideline on the Investigation of Bioequivalence” (4) y debe revisarse junto con el documento de preguntas y respuestas “Questions and Answers: positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party (PKWP)” (29). Esta actualización se limita a formas farmacéuticas de liberación inmediata con acción sistémica, aunque en su Apéndice II (8) se especifican los requisitos para estudios de bioequivalencia de diferentes formas farmacéuticas. Además, existen guías específicas para fármacos de liberación retardada (30).

### **3. Evolución de la guía de bioequivalencia europea**

En la Figura 3 se muestran los cambios más importantes que ha sufrido la guía de la EMA desde 1991 hasta la actualidad. La tendencia durante estos años ha consistido en estandarizar los procedimientos durante la realización de los ensayos clínicos y en el análisis de los datos para que los resultados puedan ser comparables.

Entre los cambios más importantes puede destacarse el truncado del AUC a las 72 h en los fármacos de vida media larga, la definición de fármacos de alta variabilidad, el cálculo del  $CV_w$  y la posibilidad de ensanchar el intervalo de aceptación de bioequivalencia de la  $C_{m\acute{a}x}$  en función del  $CV_w$  para diseños replicados. El intervalo de aceptación de la  $C_{m\acute{a}x}$  puede llegar a ensancharse hasta un 69,84-143,19 % cuando el  $CV_w$  es mayor o igual al 50 %.

En esta última guía se determina el intervalo de aceptación para AUC o  $C_{m\acute{a}x}$  en fármacos de estrecho rango terapéutico y se acepta el uso del diseño en dos etapas para la demostración de bioequivalencia y las consideraciones estadísticas a tener en cuenta. Otra actualización importante es la posibilidad de las exenciones in vitro, o bioexenciones, en las que para determinados fármacos se permite la comercialización del medicamento genérico con los datos procedentes de los estudios in vitro únicamente.



Puede encontrarse información más detallada sobre los requisitos actuales en relación con los ensayos de bioequivalencia en el Anexo I.

		1	2	3
<b>Definiciones</b>	Equivalente Farmacéutico Alternativo Farmacéutico Bioequivalentes Biodisponibilidad Productos esencialmente similares Equivalentes terapéuticos	Bioequivalencia Productos esencialmente similares Equivalencia terapéutica	Desaparecen las definiciones de Biodisponibilidad, Productos esencialmente similares y Equivalentes terapéuticos Medicamento genérico. Se modifica el concepto de bioequivalencia	
<b>Diseño</b>	Cruzado Aleatorizado Dosis única Dos periodos Periodo de lavado (> 3 t <sub>1/2</sub> ) Tiempo de muestreo que cubran el 80 % de AUC No menos de 12 sujetos	Diseño paralelo para fármacos de t <sub>1/2</sub> larga Diseño replicado para fármacos alta variabilidad Tiempo de muestreo: 3 o 4 muestras en la fase de eliminación	Periodo de lavado (> 5 t <sub>1/2</sub> ) Múltiples dosis solo en pacientes o cuando no se puede medir concentraciones con una única dosis. Muestreo para fármacos de t <sub>1/2</sub> larga hasta 72 h El muestreo en sustancias endógenas necesita calcular el valor basal. Para fármacos que necesitan estudios de bioequivalencia con y sin comida se pueden hacer dos estudios cruzados o uno replicado. Diseño en dos fases	
<b>Sujetos</b>	Voluntarios Sanos Pacientes en el caso de toxicidad Entre 18-55 años Ayuno antes de la administración Condiciones de ingesta de comida y líquidos, ejercicio físico estandarizado antes y después de la administración Preferible no fumadores No tratamientos concomitantes antes y durante el estudio Evitar alimentos que alteren circulación hepática, función renal o gastrointestinal	Evaluar riesgo embarazo en mujeres en edad fértil Índice de Masa Corporal (IMC) dentro de la normalidad Visita de reclutamiento que incluya exploración física, pruebas de laboratorio, revisión historia médica Pruebas adicionales dependiendo del grupo terapéutico Preferible no fumadores (10 cig/día) No consumo drogas de abuso o alcohol. Tener en cuenta recomendaciones administración ficha técnica Volumen de administración 150 ml Tener en cuenta fenotipo (diseños paralelos o en cruzados por razones seguridad o farmacocinéticas)	Mayores de 18 años IMC entre 18.5-30.0 kg/m <sup>2</sup> Ayuno 8 h antes de la administración Líquidos no permitidos 1 h antes y 1 h después de la administración Comida al menos 4 h después de la administración Administración con comida según ficha técnica. Si no específica: 30 min antes de la administración y aporte calórico según guía. No permitidos productos de herbario Permitidos contraceptivos. Permitidos tratamientos concomitantes por AE que no interaccionen con el método analítico No fumadores	
<b>Mide</b>	AUC <sub>0-∞</sub> , AUC <sub>0-t</sub> , C <sub>max</sub> , Ae, Ae <sub>∞</sub> , dAe/dt, T <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> y MRT.	Preferiblemente fármaco padre Mejor p/ asma que orina AUC <sub>0-∞</sub> , AUC <sub>0-t</sub> , C <sub>max</sub> , Ae, Ae <sub>∞</sub> , T <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> y MRT. Modelo no compartimental	Fármaco padre 2 Enantiómeros (según condiciones de la guía) AUC <sub>0-∞</sub> , AUC <sub>0-t</sub> , AUC <sub>∞</sub> , T <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> , área residual, Vz, Vz <sub>d</sub>	
<b>Análisis químico</b>	Método analítico que cumpla criterios de especificidad, sensibilidad, precisión y esté validado. Investigación de sustancias químicas activas	Según buenas prácticas de laboratorio	Límite de cuantificación en relación al efecto "carryover"	
<b>Test/Referencia</b>	Deben cumplirse las normas de Correcta Fabricación comercializado Deben presentarse los estudios in vitro de la disolución test	Anexo 13 Soluciones sólidas formulación test: lote a escala 1/10 de producción o 100000 unidades Requerimientos disoluciones in vitro Apéndice II	El lote de la formulación test no puede diferir más de un 5 % con respecto al lote de la referencia	
<b>Análisis</b>	Intervalo de Confianza del 90 % Transformación logarítmica Rango de aceptación de AUC <sub>0-∞</sub> , V <sub>Cmax</sub> : 0.8- 1.25 % El rango puede estrecharse o ensancharse para ambos parámetros	ANOVA Rango de aceptación de AUC <sub>0-∞</sub> , V <sub>Cmax</sub> : 0.8- 1.25 % El rango puede estrecharse para ambos parámetros El rango de C <sub>max</sub> puede ensancharse	Razones exclusión de sujetos del análisis Rango de aceptación de AUC <sub>0-∞</sub> , V <sub>Cmax</sub> : 80.00- 125.00 % Rango de aceptación de AUC <sub>0-∞</sub> , V <sub>Cmax</sub> : fármacos estrecho Rango terapéutico: 90.00- 111.11 % El rango puede ensancharse para C <sub>max</sub> según intervalos definidos en función de la variabilidad del fármaco	
<b>Solicitud de principio activo aprobado</b>	Situaciones en las que no es requerido los estudios de bioequivalencia	Formas orales de liberación inmediata Soluciones orales Formas no orales de liberación inmediata Formas de liberación modificada o transdermicas Combinación de productos Soluciones parenterales Gases Productos de aplicación local	Otros Exención basada en "Biopharmaceutics Classification System"	

Figura 3. Resumen de cambios de la guía de bioequivalencia europea.

#### **4. Optimización y mejora de la última actualización de la guía europea**

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de las líneas de investigación del Instituto Teófilo Hernando (ITH) y del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa (IP). Nuestro trabajo se ha basado en los datos obtenidos a partir de los ensayos clínicos de bioequivalencia en voluntarios sanos realizados en la Unidad de Fase I del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa desde 1997 hasta 2014.

Nuestro principal objetivo ha sido utilizar los datos disponibles obtenidos a partir de estos ensayos clínicos para intentar encontrar áreas de mejora en la última actualización de la guía de la EMA de bioequivalencia (8), siendo el principal propósito iniciar nuevos debates entre la comunidad científica y avanzar en la estandarización de los estudios de bioequivalencia.

Teniendo en cuenta esto, nos hemos centrado en explorar la predicción de estudio piloto en fármacos de alta variabilidad, el truncado del área bajo la curva (AUC) en fármacos de vida media larga a tiempos inferiores a las 72 h y el efecto del genotipo en los parámetros farmacocinéticos.

##### **4.1. Utilidad de los estudios piloto en los ensayos de bioequivalencia**

En el desarrollo de fármacos genéricos, los ensayos piloto se utilizan para identificar la adecuada formulación test para el ensayo de bioequivalencia pivotal (5, 31). La agencia reguladora americana (Food and Drug Administration -FDA-) recomienda que los estudios piloto se lleven a cabo en un número reducido de voluntarios antes de realizar el ensayo pivotal (12).

Los estudios piloto se utilizan principalmente para recabar información sobre aspectos tales como la validación y determinación del método analítico, la evaluación de la variabilidad del fármaco y la optimización de los tiempos de muestreo para la determinación de los parámetros farmacocinéticos (5, 32)

Los resultados de los estudios piloto son raramente publicados en revistas científicas (32-34) y en la literatura no hay una guía metodológica formal sobre cómo realizar este tipo de estudios (33). Sin embargo, sí es posible encontrar autores como

Fuglsang (35), Mathew y col. (36), Wang y col. (31) y Pan y col. (37), que han estudiado diferentes métodos y herramientas para el desarrollo de los estudios piloto. La estandarización de estos procedimientos podría asegurar un diseño y desarrollo apropiados de los estudios piloto, lo cual conduciría a una correcta evaluación del fármaco y a un diseño adecuado del estudio pivotal.

El propósito de un estudio piloto no es la demostración de bioequivalencia, aunque esto podría ayudar a desarrollar el diseño adecuado del estudio pivotal (31-36, 38, 39). Nosotros creemos que principalmente es importante realizar un estudio piloto antes de realizar el estudio pivotal en dos situaciones: cuando la variabilidad del fármaco es desconocida -porque no hay estudios previos que puedan ayudarnos a calcular el tamaño muestral- y cuando se quiere evaluar la similitud de la formulación test y de referencia a partir de los resultados obtenidos en los estudios in vitro (35, 38).

Por tanto, nuestro objetivo es evaluar la utilidad de los estudios piloto para su aplicación en un estudio pivotal en fármacos de alta variabilidad.

#### **4.2. Efecto del truncado del AUC a tiempos inferiores a las 72 h en fármacos de vida media larga**

La guía de la EMA para la realización de estudios de bioequivalencia establece que dos formulaciones son bioequivalentes si el 90 % del intervalo de confianza (IC) de la ratio de la media de los parámetros farmacocinéticos de la formulación test y referencia están dentro del intervalo de aceptación del 80,00-125,00 % (4). En el caso de fármacos de vida media larga, la última actualización de la guía europea permite el truncado de AUC a las 72 h como alternativa al cálculo de AUC a tiempo  $t$ , ya que la fase de absorción se completa en las primeras 72 h (4). Por tanto, un muestreo superior a las 72 h no es necesario para formulaciones de liberación inmediata, independientemente de la vida media del fármaco (4).

La completa absorción del fármaco suele ocurrir en las primeras 24 h, por tanto, el truncado de AUC a las 24 o 48 h como parámetro principal debería ser suficiente. Además, en la fase de absorción es donde las concentraciones plasmáticas del fármaco frente al tiempo son más sensibles y decisivas para la detección de las diferencias entre las formulaciones, mejor que cuando el fármaco es eliminado por completo (40).

El truncado de AUC a tiempos inferiores a las 72 h podría ser interesante en fármacos de vida media larga, no solo en lo que se refiere a la participación de los voluntarios, sino también en términos de cumplimiento de las visitas del ensayo y en cuanto al análisis y los costes del estudio (40).

El propósito de nuestro trabajo fue analizar el criterio de aceptación de bioequivalencia para el truncado de AUC a las 48, 24 y 12 h, en comparación con el truncado de AUC a las 72 h.

#### **4.3. Efecto del genotipo de los voluntarios en los parámetros farmacocinéticos**

El número de sujetos que deben incluirse en un estudio ha de basarse en un cálculo apropiado del tamaño muestral para asegurar el poder estadístico adecuado que permita que los parámetros farmacocinéticos entren dentro del intervalo de aceptación de bioequivalencia. El tamaño muestral se ve influido por la variabilidad intrasujeto o coeficiente de variabilidad intrasujeto ( $CV_w$ ) de los parámetros farmacocinéticos (41-43). Cuanto mayor es dicho coeficiente, mayor es el número de voluntarios que deberían incluirse en el estudio y, por consiguiente, mayores son los costes del mismo. El  $CV_w$  depende del tipo de fármaco, siendo mayor en fármacos de alta variabilidad (41, 43, 44). Un fármaco de alta variabilidad se define como aquel en el que el  $CV_w$  de AUC o  $C_{máx}$  -o ambos- son iguales o superiores al 30 % (4, 45-48). Por tanto, la bioequivalencia de estas formulaciones es difícil, ya que es necesario un elevado número de voluntarios para llevar a cabo el ensayo de bioequivalencia (47-49).

La variabilidad farmacocinética puede estar asociada al sexo y a polimorfismos genéticos, ya que ambos afectan al aclaramiento del fármaco (50). El aclaramiento del fármaco debe mantenerse estable a lo largo de los periodos, de forma que la fracción de dosis biodisponible para la formulación test y de referencia pueda ser comparada con precisión. Por tanto, aquellos voluntarios cuyos aclaramientos varían de forma significativa podrían mostrar diferencias en las concentraciones plasmáticas de los productos que pueden no estar relacionadas con las diferencias en la biodisponibilidad, sino más bien con variaciones en su propio metabolismo (51).

Un 25 % de los fármacos se metaboliza por el CYP2D6. El gen CYP2D6 es altamente polimórfico y sus alelos están relacionados con una ausencia de actividad catalítica o con un aumento. Aproximadamente el 5-10 % de los caucásicos son portadores de dos copias del gen inactivo de CYP2D6 y, por tanto, han sido determinados con capacidad metabólica deficiente o metabolizadores lentos (52-54). Sin embargo, el 5-10 % de los españoles tienen un metabolismo ultrarrápido o se denominan metabolizadores ultrarrápidos, ya que son portadores de más de dos copias del gen activas (52-56). Aquellos sujetos con un alelo inactivo se denominan metabolizadores intermedios, mientras que si tienen dos alelos activos se denominan metabolizadores rápidos.

La risperidona es un fármaco que se metaboliza a través del CYP2D6 y es metabolizado a su metabolito activo, 9-hidroxisperidona (57), teniendo este la misma actividad farmacológica que la risperidona (58). En estado estacionario, las concentraciones plasmáticas de risperidona muestran grandes diferencias inter pacientes en dosis terapéuticas (59). La biotransformación de polimorfismos en el CYP2D6 conduce a un efecto sobre los parámetros farmacocinéticos de risperidona, con un incremento en el AUC para los metabolizadores lentos en comparación con los metabolizadores rápidos (60, 61). Además, estos estudios farmacocinéticos han documentado que el genotipo de CYP2D6 tiene mayor efecto sobre los parámetros farmacocinéticos, pero no sobre el total de la molécula activa (60, 61) .

Utilizando como modelo la risperidona, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto del genotipo en el  $CV_w$  en fármacos metabolizados por enzimas fase I o II polimórficas.

# Objetivos de esta tesis doctoral

Los objetivos de esta tesis doctoral se centran en la investigación de posibles áreas de mejora y de optimización de la guía europea de bioequivalencia.

## ***1. Evaluar la utilidad de los estudios piloto para los fármacos de alta variabilidad:***

1.1. Evaluar la utilidad de los estudios piloto en la predicción de la ratio y del coeficiente de variabilidad intrasujeto para su aplicación al estudio pivotal.

1.2. Evaluar la influencia de los diseños de los estudios piloto en la predicción de los resultados de las variables farmacocinéticas.

## ***2. Evaluar la utilidad del truncado del AUC a tiempos cortos para los fármacos de vida media larga:***

2.1. Analizar el efecto del truncado de AUC a las 48, 24 y 12 h sobre el criterio de aceptación de bioequivalencia en comparación con el truncado a las 72 h.

2.2. Evaluar el efecto del truncado de AUC a las 48, 24 y 12 h sobre el coeficiente de variación intrasujeto.

2.3. Evaluar el efecto del truncado de AUC a las 48, 24 y 12 h sobre la ratio de medias.

## ***3. Evaluar la utilidad de la farmacogenética para reducir la variabilidad de fármacos metabolizados por enzimas fase I y II polimórficas:***

3.1 Evaluar el efecto del polimorfismo CYP2D6 sobre el coeficiente de variación intrasujeto.

3.2. Evaluar el efecto del polimorfismo de CYP2D6 sobre el cálculo del número de sujetos necesarios

## Resumen de resultados

### **Artículo 1** (disponible de forma íntegra en Anexo II):

Moreno I, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T and Abad-Santos F. Utility of Pilot Studies for Predicting Ratios and Intra-subject Variability in High Variability Drugs. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2016 Jan 25. doi: 10.1111/bcpt.12558. [Epub ahead of print]. PMID: 26806812

### **OBJETIVO 1. [Evaluar la utilidad de los estudios piloto para los fármacos de alta variabilidad.](#)**

#### **Materiales y Métodos**

Los estudios piloto utilizados en este trabajo son simulaciones basadas en 7 ensayos de bioequivalencia realizados en la Unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario de La Princesa. Los ensayos seleccionados compartían el mismo diseño: abierto (excepto para el analista), dosis única, cruzado y replicado (4-periodos, 4-secuencias). Se eligieron ensayos con diseño replicado, ya que son más adecuados para la determinación del  $CV_w$ .

Los principios activos utilizados fueron de alta variabilidad: atorvastatina, barnidipino, bosentán, celecoxib, omeprazol, telmisartán y valsartán.

El tamaño muestral de los ensayos seleccionados fue de entre 24 y 48 voluntarios sanos, de ambos sexos y con edades de entre 18 y 55 años. La administración de las formulaciones se realizó en condiciones de ayuno, excepto para omeprazol y barnidipino, que se administraron con comida. Los criterios de selección fueron similares para todos los estudios.

Los voluntarios dieron su consentimiento a participar en el estudio antes de realizar cualquier procedimiento del mismo y el estudio fue evaluado y aprobado por un Comité Ético de Investigación Clínica y por las autoridades reguladoras competentes.

Todos los estudios seleccionados demostraron ser bioequivalentes, excepto en el caso de barnidipino.



Se realizaron 100 simulaciones de estudios piloto con cada uno de estos 7 ensayos para los siguientes diseños: 2 x 2 (2-secuencias, 2-periodos) con 6 voluntarios; 2 x 2 con 12 voluntarios; 4 x 4 (4-secuencias, 4-periodos) con 4 voluntarios y 4 x 4 con 8 voluntarios. Todas las simulaciones fueron seleccionadas aleatoriamente, de tal forma que el diseño fue balanceado por secuencias, periodos y formulaciones.

Los parámetros farmacocinéticos ( $AUC_{0-t}$  y  $C_{m\acute{a}x}$ ) y el  $CV_w$  fueron calculados tal y como recomienda la guía europea (4, 29).

Se calculó el índice de predicción de los estudios piloto a partir de la ratio y del  $CV_w$  de  $AUC_{0-t}$  y  $C_{m\acute{a}x}$ . Se define el índice de predicción como el porcentaje de valores que entran dentro del  $\pm 10\%$  y  $\pm 20\%$  del valor real de ambos parámetros, teniendo en cuenta que el valor real es el valor obtenido en el ensayo clínico original. Para las comparaciones del  $CV_w$  se utilizó siempre el coeficiente de variación intrasujeto de la formulación de referencia.

Se calculó el porcentaje de estudios piloto que demostraron ser bioequivalentes para cada una de las 100 simulaciones de los 7 fármacos analizados. Se consideró que los estudios piloto demostraban ser bioequivalentes solo si el 90 % del IC de media de las ratios de ambos parámetros farmacocinéticos ( $AUC_{0-t}$  and  $C_{m\acute{a}x}$ ) entraban dentro de los límites de aceptación de 80.00-125.00 % (4).

El criterio de aceptación de  $C_{m\acute{a}x}$  no fue ampliado para ninguno de los fármacos de los ensayos originales, tal como permite la EMA en el caso de fármacos de alta variabilidad (4).

## Resultados

### 1. Índice de predicción de estudios piloto.

En la Tabla 1 se muestran los rangos de valores de la ratio y el  $CV_w$  de los parámetros farmacocinéticos de las 100 simulaciones en función del tipo de diseño y tamaño muestral analizados con respecto a su valor real para cada uno de los ensayos analizados.

Independientemente del principio activo, los resultados fueron similares, por un lado, para el diseño 2 x 2 con 6 voluntarios y el diseño 4 x 4 con 4 voluntarios, y, por otro lado, para el diseño 2 x 2 con 12 voluntarios y el diseño 4 x 4 con 8 voluntarios. La variabilidad más alta se encontró en los dos diseños con menor número de voluntarios.

El rango de valores parece estrecharse más para los diseños 2 x 2 con 12 voluntarios y 4 x 4 con 8 voluntarios, como consecuencia del aumento de tamaño muestral (Tabla 1).

**Tabla 1. Rango de valores de los parámetros farmacocinéticos analizados en los estudios piloto para cada principio activo.**

Principio activo y parámetros farmacocinéticos (valor real)		Parámetros farmacocinéticos (rango de valores de estudios piloto) N=100 por grupo de cada principio activo			
Atorvastatina 24 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	106,97	90,52-121,19	88,04-127,77	96,35-119,80	95,86-117,84
Ratio C <sub>máx</sub>	98,10	59,14-147,51	49,72-151,35	71,37-141,20	68,12-128,92
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	13,47	2,23-25,56	0,39-35,17	6,10-17,85	4,50-19,97
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	38,42	13,43-82,94	0,61-81,82	17,29-60,76	11,21-66,80
Barnidipino 48 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	124,90	84,35-183,52	86,22-187,26	99,85-154,95	86,55-158,47
Ratio C <sub>máx</sub>	127,55	68,89-205,78	60,17-200,82	84,72-170,35	71,09-170,01
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	27,35	5,67-54,64	0,14-83,98	15,50-46,10	6,73-45,20
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	36,91	7,01-98,09	1,14-118,00	15,14-71,82	15,47-59,84
Bosentan 24 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	97,98	75,23-134,92	81,99-141,99	80,71-118,30	83,45-108,09
Ratio C <sub>máx</sub>	101,15	66,86-168,94	77,55-157,76	73,39-142,44	79,92-128,59
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	20,45	3,52-41,06	0,46-53,07	8,10-29,66	6,02-36,32
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	34,72	8,91-56,68	1,28-85,65	20,93-48,89	13,05-59,22
Celecoxib 24 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	101,54	82,91-135,93	82,41-121,28	89,91-114,77	90,94-112,89
Ratio C <sub>máx</sub>	94,24	60,93-157,95	72,25-130,80	75,93-117,70	74,21-117,70
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	16,86	2,19-33,82	0,61-45,16	5,97-26,70	5,14-26,71
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	30,63	7,72-79,50	0,14-63,87	9,65-46,64	10,97-50,99
Omeprazol 36 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	93,91	73,27-118,99	74,05-104,47	78,00-109,67	80,31-110,17
Ratio C <sub>máx</sub>	93,62	68,59-121,58	59,68-120,15	68,36-117,24	73,28-112,81
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	24,94	5,21-37,09	0,3-87,13	8,25-29,72	2,44-45,64
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	32,97	4,80-55,52	0,00-83,33	9,22-42,03	11,42-49,53
Telmisartan 36 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	97,08	71,47-123,06	75,59-122,91	83,07-110,66	83,45-111,73
Ratio C <sub>máx</sub>	99,21	61,99-211,75	53,56-166,81	75,07-141,43	67,79-144,63
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	19,13	4,03-41,16	0,26-54,24	7,68-30,60	16,06-32,27
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	47,17	13,64-88,21	0,6-180,30	26,98-70,69	8,81-88,46
Valsartan 32 voluntarios		2 x 2 6 voluntarios	4 x 4 4 voluntarios	2 x 2 12 voluntarios	4 x 4 8 voluntarios
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	92,80	72,31-114,11	71,05-124,02	76,84-108,54	77,1-109,73
Ratio C <sub>máx</sub>	97,03	67,11-131,45	67,47-133,14	84,74-117,05	76,50-116,11
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	22,07	4,77-46,74	0,49-50,19	13,07-38,33	10,38-38,33
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	28,95	5,33-52,41	0,28-56,60	15,85-42,43	6,71-48,69

En la Tabla 2 aparecen los resultados de los índices de predicción de los estudios piloto en función del tipo de diseño, número de voluntarios y principio activo analizado. El porcentaje del índice de predicción parece mejorar para el índice de predicción de  $\pm 20\%$  del valor real, siempre siendo mejor para el AUC que para la  $C_{m\acute{a}x}$  y para la ratio que para el  $CV_w$  en cualquiera de los casos. En concreto, el mejor índice de predicción para los parámetros analizados en la Tabla 2 son con el índice de predicción del  $\pm 20\%$  del valor real para el diseño  $2 \times 2$  con 12 voluntarios y el diseño  $4 \times 4$  con 8 voluntarios.

**Tabla 2. Índice de predicción del estudio piloto en función del principio activo, diseño y tamaño muestral.**

Principio activo y parámetros farmacocinético	Índice de predicción del estudio piloto $\pm 10\%$ y $\pm 20\%$ del valor real (%) N=100 por grupo de cada principio activo							
	2 x 2 6 voluntarios		4 x 4 4 voluntarios		2 x 2 12 voluntarios		4 x 4 8 voluntarios	
<b>Atorvastatina</b> 24 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	92	100	81	100	99	100	99	100
Ratio C <sub>máx</sub>	35	63	38	67	45	78	48	90
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	19	39	8	20	40	61	27	54
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	11	24	13	32	30	52	31	47
<b>Barnidipino</b> 48 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	47	83	56	86	68	97	70	96
Ratio C <sub>máx</sub>	35	61	41	73	51	87	50	89
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	8	19	7	18	20	37	24	42
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	22	26	12	28	26	49	26	58
<b>Bosentán</b> 24 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	40	86	70	97	74	98	94	100
Ratio C <sub>máx</sub>	26	56	47	77	38	75	73	97
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	18	33	8	22	35	61	20	51
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	22	41	6	11	44	67	25	39
<b>Celecoxib</b> 24 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	76	93	84	100	94	100	98	100
Ratio C <sub>máx</sub>	40	83	63	89	74	98	72	96
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	14	26	9	18	23	50	29	56
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	19	37	8	17	25	48	31	53
<b>Omeprazol</b> 36 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	68	93	80	99	85	100	93	100
Ratio C <sub>máx</sub>	45	87	55	85	57	94	79	97
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	18	30	4	9	23	40	4	9
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	18	32	11	20	28	47	34	58
<b>Telmisartán</b> 36 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	72	93	70	95	87	100	91	100
Ratio C <sub>máx</sub>	26	62	34	60	55	84	49	85
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	17	22	10	23	27	48	26	48
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	22	32	4	11	30	58	17	38
<b>Valsartán</b> 32 voluntarios								
Índice de predicción	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
Ratio AUC <sub>0-t</sub>	67	92	58	88	89	100	84	100
Ratio C <sub>máx</sub>	55	89	54	80	75	99	74	100
CV <sub>w</sub> (%) AUC <sub>0-t</sub>	18	39	10	20	34	56	23	48
CV <sub>w</sub> (%) C <sub>máx</sub>	25	52	16	21	35	72	24	52

**Tabla 3. Índice de predicción del estudio piloto  $\pm 10$  % del valor real en función del diseño y tamaño muestral.**

Estudio Piloto	Mediana, valores máximos y mínimos de los parámetros farmacocinéticos (%)			
	Ratio AUC <sub>0-t</sub>	Ratio C <sub>máx</sub>	CV <sub>w</sub> AUC <sub>0-t</sub>	CV <sub>w</sub> C <sub>máx</sub>
2 x 2 6 voluntarios N =7	68 (40-92)	35 (26-55)	18 (8-19)	22 (11-25)
4 x 4 4 voluntarios N =7	70 (56-84)	47 (34-63)	8 (4-10)	11 (4-16)
2 x 2 12 voluntarios N =7	87 (68-99)	55 (38-75)	27 (20-40)	30 (25-44)
4 x 4 8 voluntarios N =7	93 (70-99)	72 (48-79)	24 (4-29)	26 (17-34)

Si nos basamos en los resultados que se muestran en las Tablas 3 y 4, en las que las medianas del índice de predicción se calcularon en función del diseño y número de voluntarios, los mejores índices de predicción  $\pm 10$  % y  $\pm 20$  % para cualquier parámetro farmacocinético se hallaron en los diseños de 2 x 2 con 12 voluntarios y 4 x 4 con 8 voluntarios. Independientemente del diseño o el número de sujetos en el estudio piloto, el índice de predicción fue mayor para la ratio de AUC<sub>0-t</sub> que para la de C<sub>máx</sub>, debido a la alta variabilidad de este último parámetro. Este efecto no se observa en el caso del CV<sub>w</sub> de ambos parámetros farmacocinéticos, ya que los mejores resultados son de aproximadamente el 50 % para una predicción de  $\pm 20$  % del valor real.

**Tabla 4. Índice de predicción del estudio piloto  $\pm 20$  % del valor real en función del diseño y tamaño muestral.**

Estudio Piloto	Mediana, valores máximos y mínimos de los parámetros farmacocinéticos (%)			
	Ratio AUC <sub>0-t</sub>	Ratio C <sub>máx</sub>	CV <sub>w</sub> AUC <sub>0-t</sub>	CV <sub>w</sub> C <sub>máx</sub>
2 x 2 6 voluntarios N =7	93 (83-100)	63 (56-89)	30 (19-39)	32 (24-52)
4 x 4 4 voluntarios N =7	97 (86-100)	77 (60-89)	20 (9-23)	20 (11-32)
2 x 2 12 voluntarios N =7	100 (97-100)	87 (75-99)	50 (37-61)	52 (47-52)
4 x 4 8 voluntarios N =7	100 (96-100)	96 (85-100)	48 (9-23)	52 (38-58)

De estos datos se puede concluir que los estudios pilotos predicen muy bien la ratio de  $AUC_{0-t}$ , peor las ratios de  $C_{m\acute{a}x}$  y bastante mal la variabilidad de los dos parámetros. En cualquier caso, los mejores resultados se obtuvieron con los diseños de 2 x 2 de 12 voluntarios y con los de 4 x 4 de 8 voluntarios.

## 2. La aceptación de bioequivalencia en los estudios piloto

En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de estudios piloto en los que se demostró la bioequivalencia para cada simulación según el tipo de diseño y tamaño muestral analizado.

En el caso de barnidipino y telmisartán, se observó un porcentaje muy bajo de la bioequivalencia. Habría que tener en cuenta que el ensayo original de barnidipino no demostró ser bioequivalente.

En cuanto al tipo de diseño, se obtuvieron los porcentajes más altos para el diseño de 2 x 2 con 12 voluntarios y el diseño de 4 x 4 con 8 voluntarios. El porcentaje más alto en los estudios piloto se obtuvo con celecoxib (35 % en el diseño de 4 x 4 con 8 voluntarios). El diseño de 4 x 4 con 8 voluntarios parece ser mejor que el diseño 2 x 2 con 12 voluntarios en todos los casos, excepto en omeprazol con comida.

**Tabla 5. Porcentaje de estudios piloto que demuestran bioequivalencia.**

Principio activo	2 x 2 6 voluntarios (%)	4 x 4 4 voluntarios (%)	2 x 2 12 voluntarios (%)	4 x 4 8 voluntarios (%)
Atorvastatina	0	2	2	7
Barnidipino	1	0	2	0
Bosentán	2	0	5	16
Celecoxib	0	2	12	35
Omeprazol	9	5	31	15
Telmisartán	0	0	0	1
Valsartán	6	3	8	26

**Artículo 2** (disponible de forma íntegra en Anexo II):

Moreno I, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T and Abad-Santos F. Effect of Truncating AUC at 12, 24 and 48 hr When Evaluating the Bioequivalence of Drugs with a Long Half-Life. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016 Jan; 118(1):53-7. doi: 10.1111/bcpt.12432. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26086613

**OBJETIVO 2. Evaluar la utilidad del truncado del AUC a tiempos cortos para los fármacos de vida media larga.**

**Materiales y Métodos**

Para evaluar este objetivo, los fármacos seleccionados fueron de liberación inmediata y las vidas medias de la formulación test y de referencia fueron iguales o superiores a las 15 h. Este valor fue elegido como referencia, ya que son suficientes 5 vidas para asegurar el completo lavado del fármaco (4) y su muestreo hasta las 72 h. Fueron analizados un total de 15 principios activos (28 formulaciones).

Todos los fármacos fueron comprimidos, excepto en el caso de aripiprazol, desloratadina y olanzapina, que también se presentaron como comprimidos bucodispersables.

Todos los ensayos compartían el mismo diseño: abierto (excepto para el analista), cruzado, dosis única, realizado en dos periodos, en voluntarios sanos en ayunas. El tamaño muestral de los estudios estaba entre 12 y 48 voluntarios, de ambos sexos y con edades comprendidas entre los 18 y 55 años (Tabla 6). Los criterios de selección fueron similares para todos los estudios. Los voluntarios dieron su consentimiento antes de ser sometidos a cualquier procedimiento de los estudios.

**Tabla 6. Mediana de los tiempos de vida media para cada formulación, número y sexo de voluntarios participantes.**

Principio Activo	Mediana de $t_{1/2}$ test (h)	Mediana $t_{1/2}$ ref. (h)	Número de voluntarios y sexo
Amlodipino comprimidos 1	34	32	36 (18 H/18 M)
Amlodipino comprimidos 2	37	37	36 (18 H/18 M)
Amlodipino comprimidos 3	33	33	23 (12 H/11 M)
Aripiprazol comprimidos 1	44	49	24 (15 H/9 M)
Aripiprazol comprimidos 2	47	53	26 (18 H/12 M)
Aripiprazol comprimidos 3	50	44	30 (17 H/13 M)
Aripiprazol (bucodispersable) 1	38	41	34 (15H/19 M)
Aripiprazol (bucodispersable) 2	49	52	36 (18 H/18 M)
Aripiprazol (bucodispersable) 3	50	47	36 (18 H/18 M)
Citalopram comprimidos	33	31	24 (12 H/12 M)
Desloratadina comprimidos	17	16	37 (19 H/18 M)
Desloratadina (bucodispersable)	17	17	37 (19 H/18 M)
Digoxina comprimidos	88	93	40 (20 H/20 M)
Donepezilo comprimidos	62	61	36 (18 H/18 M)
Efavirenz comprimidos 1	55	56	12 (6 H/6 M)
Efavirenz comprimidos 2	62	56	12 (6 H/6 M)
Efavirenz comprimidos 3	60	61	12 (6 H/6 M)
Flunarizina comprimidos	397	288	30 (15 H/15 M)
Mirtazapina comprimidos	24	23	36 (18 H/18 M)
Nevirapina comprimidos	28	31	24 (12 H/12 M)
Olanzapina comprimidos	31	29	30 (15 H/15M)
Olanzapina (bucodispersable)	33	33	30 (15 H/15 M)
Rosuvastatina comprimidos 1	15	13	36 (19 H/17M)
Rosuvastatina comprimidos 2	14	16	36 (17 H/19 M)
Sertralina comprimidos 1	26	26	24 (12H/12 M)
Sertralina comprimidos 2	23	24	24 (12 H/12 M)
Tadalafilo comprimidos	26	25	36 (19 H/17 M)
Telmisartán comprimidos	22	20	48 (22 H/26 M)

Mediana  $t_{1/2}$  test: Mediana de la vida media de la formulación test; Mediana  $t_{1/2}$  ref.: Mediana de la vida media de la formulación de referencia; H: hombre; M: mujer.

Se evaluó el efecto del truncado del AUC a 12, 24 y 48 h con respecto al truncado a 72 h, que es el recomendado por la EMA.

El AUC y el  $CV_w$  fueron calculados tal y como recomienda la guía europea (4) y el truncado de AUC a los diferentes tiempos fue calculado usando la regla trapezoidal lineal.

El grado de acuerdo del truncado de AUC a los distintos tiempos fue determinado mediante el índice Kappa, según la clasificación de Landis y Koch (62). La correlación lineal de la media de AUC, la ratio de AUC y el  $CV_w$  de AUC se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson (CCP).

Mediante el test estadístico de medidas repetidas de la ANOVA se determinó si existían diferencias significativas en los resultados de  $CV_w$ , la ratio y la media de AUC a cada uno de los tiempos de truncado.

## Resultados

### 1. Criterio de aceptación de bioequivalencia

La Figura 4 muestra que el 4 % de los estudios demostró no ser bioequivalente en la selección de fármacos con una vida media  $\geq 15$  h (la flunarizina fue la única que demostró no ser bioequivalente para los todos tiempos de truncado analizados). El resto de fármacos demostraron bioequivalencia y mantuvieron dicho criterio de aceptación para los cuatro tiempos de truncado de AUC, a excepción de un caso de aripiprazol comprimidos y otro de efavirenz comprimidos, que dejaron de ser bioequivalentes para  $AUC_{0-12}$ .

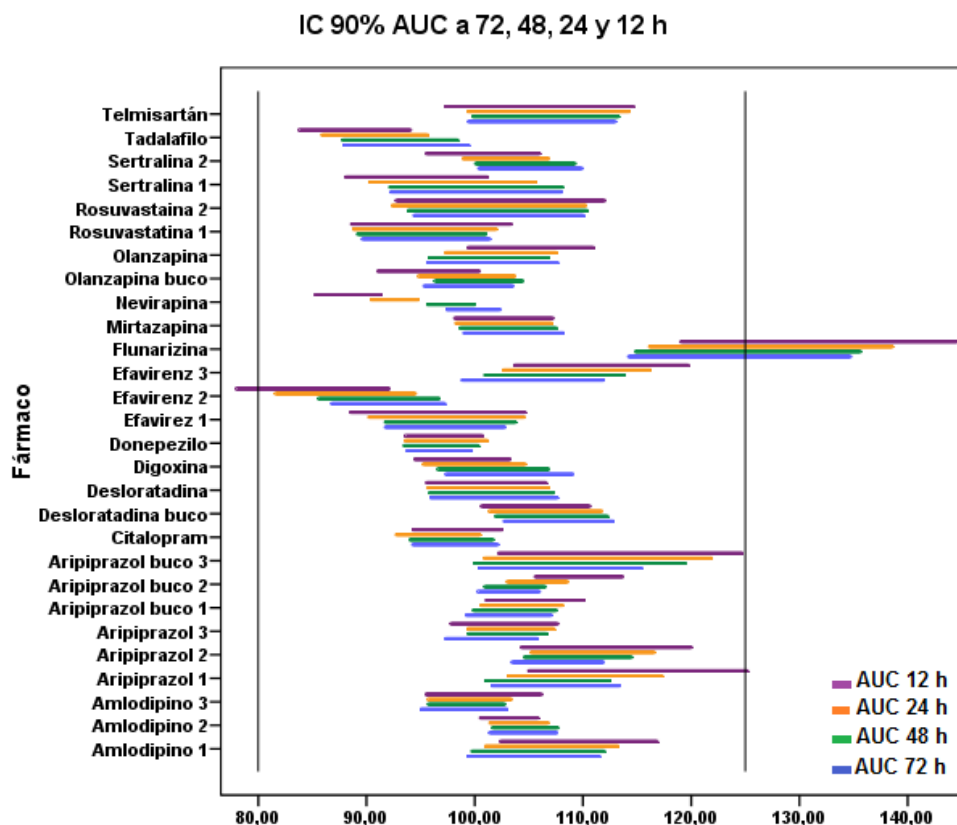


Figura 4. Criterio de aceptación de bioequivalencia en función del AUC truncado a distintos tiempos. Los límites de aceptación son del 80,00-125,00 % para el IC del 90 %, excepto para el caso de digoxina, cuyos límites se estrecharon al 90,00-111,11 %.



Cuando se comparó el grado de acuerdo entre  $AUC_{0-72}$  y los otros puntos de truncado ( $AUC_{0-48}$ ,  $AUC_{0-24}$  y  $AUC_{0-12}$ ), la bioequivalencia fue "casi perfecta" entre  $AUC_{0-72}$  y  $AUC_{0-48}$  y  $AUC_{0-24}$ , según la clasificación de Landis y Koch (62) ( $Kappa = 1$ ) (Tabla 7). Mientras tanto, en el caso de  $AUC_{0-12}$ , el grado de acuerdo en relación con  $AUC_{0-72}$  fue "moderado" ( $Kappa = 0,472$ ). Por lo tanto, el grado de acuerdo es mejor para  $AUC_{0-48}$  y  $AUC_{0-24}$  que para  $AUC_{0-12}$ .

**Tabla 7. Grado de acuerdo de  $AUC_{0-72}$  en función de AUC at 48, 24 and 12 h según la clasificación de Landis and Koch (62)**

	Medida de acuerdo Kappa	Clasificación de Landis and Koch
<b><math>AUC_{0-72}</math> vs <math>AUC_{0-48}</math></b>	1	Concordancia casi perfecta
<b><math>AUC_{0-72}</math> vs <math>AUC_{0-24}</math></b>	1	Concordancia casi perfecta
<b><math>AUC_{0-72}</math> vs <math>AUC_{0-12}</math></b>	0, 472	Concordancia moderada

El CCP para la media de AUC de las formulaciones test y de referencia en función de la media de  $AUC_{0-72}$  fue peor para  $AUC_{0-12}$  que para el resto de tiempos de truncado. En el caso de la media de AUC de la formulación test, el CCP fue 0,930 para  $AUC_{0-12}$  en comparación con 0,976 y 0,996 para  $AUC_{0-24}$  y  $AUC_{0-48}$ , respectivamente. Se encontraron resultados similares para la media de AUC de la formulación de referencia, CCP de 0,944 para  $AUC_{0-12}$ , 0,976 para  $AUC_{0-24}$  y 0,997 para  $AUC_{0-48}$ .

## 2. La variación en $CV_w$ en el truncado de AUC

Según los resultados de las AUC truncadas a los diferentes puntos de tiempo (Tabla 8), se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el  $CV_w$  de AUC truncado a las 72, 48 y 24 h frente al  $CV_w$  de  $AUC_{0-12}$ .

**Tabla 8. Medias del  $CV_w$  para  $AUC_{0-72}$ ,  $AUC_{0-48}$ ,  $AUC_{0-24}$  y  $AUC_{0-12}$ .**

	Media y DE de $CV_w$ %		Valor p en comparación con $AUC_{0-12}$	Valor p en comparación con $AUC_{0-72}$	CCP en relación con $AUC_{0-72}$
<b><math>AUC_{0-72}</math></b>	10,859	1,454	0,000		
<b><math>AUC_{0-48}</math></b>	10,794	1,490	0,000	0,732	0,969
<b><math>AUC_{0-24}</math></b>	11,201	1,499	0,000	0,264	0,929
<b><math>AUC_{0-12}</math></b>	12,692	1,449		0,000	0,868

DE: Desviación Estándar; CCP: Coeficiente de Correlación de Pearson; N=28 formulaciones

El CCP en el  $CV_w$  es peor a medida que disminuye el tiempo de la AUC truncado en relación con  $AUC_{0-72}$ , pero solo es menor de 0,9 para el  $AUC_{0-12}$ .

### 3. La variación en la ratio del truncado de AUC

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la media de la ratio de AUC para cualquiera de los puntos de tiempo de truncado (Tabla 9). El CCP para la ratio de  $AUC_{0-72}$  frente a  $AUC_{0-48}$ ,  $AUC_{0-24}$  y  $AUC_{0-12}$  disminuye a medida que el tiempo de truncado es menor, pero en todos los casos se mantiene mayor de 0,9.

**Tabla 9. Medias de la ratio para  $AUC_{0-72}$ ,  $AUC_{0-48}$ ,  $AUC_{0-24}$  y  $AUC_{0-12}$ .**

	Media y DE de la ratio		Valor p en comparación con $AUC_{0-12}$	Valor p en comparación con $AUC_{0-72}$	CCP en relación con $AUC_{0-72}$
<b><math>AUC_{0-72}</math></b>	102,494	6,003	0,769		
<b><math>AUC_{0-48}</math></b>	102,291	6,864	0,914	0,491	0,980
<b><math>AUC_{0-24}</math></b>	102,067	8,172	0,762	0,471	0,951
<b><math>AUC_{0-12}</math></b>	102,205	9,955		0,769	0,909

DE: Desviación Estándar; CCP: Coeficiente de Correlación de Pearson; N=28 formulaciones

**Artículo 3** (disponible de forma íntegra en Anexo II):

Cabaleiro T, Ochoa D, Román M, Moreno I, López-Rodríguez R, Novalbos J and Abad-Santos F. Polymorphisms in CYP2D6 have a greater effect on variability of risperidone pharmacokinetics than gender. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Feb;116(2):124-8. doi: 10.1111/bcpt.12286. Epub 2014 Jul 25. PMID: 24975366

**OBJETIVO 3.** **Evaluar la utilidad de la farmacogenética para reducir la variabilidad de fármacos metabolizados por enzimas fase I y II polimórficas.**

**Materiales y Métodos**

Esta parte del trabajo se basa en dos ensayos clínicos de bioequivalencia de risperidona realizados en el Hospital Universitario de La Princesa en 2003. Los dos ensayos tenían el mismo diseño: abierto (excepto para el analista), cruzado, dosis única, realizado en dos periodos, en voluntarios sanos en ayunas.

El tamaño muestral total de los dos ensayos fue de 70 voluntarios (35 mujeres y 35 hombres). Los criterios de selección fueron similares para todos los estudios. Los voluntarios dieron su consentimiento antes de ser sometidos a cualquier procedimiento de los estudios. Ambos estudios demostraron ser bioequivalentes.

Los parámetros farmacocinéticos ( $AUC_{0-t}$  y  $C_{máx}$ ) y el  $CV_w$  se calcularon tal como recomienda la guía europea (4). El cálculo del tamaño muestral (N) se realizó usando la fórmula de González-Vacarezza y col. (63).

El CYP2D6 se genotipó en los 70 voluntarios. El ADN se extrajo a partir de 4 ml de sangre periférica, utilizando un extractor automático de ADN (MagNa Pure LC; Roche; Indianapolis, Indiana, Estados Unidos). La concentración de ADN se cuantificó espectrofotométricamente usando un NanoDrop®. Las muestras se analizaron usando Pharmachip (64), herramienta disponible comercialmente idónea para el genotipado farmacogenético (65, 66).

Según los procedimientos estándar, el alelo CYP2D6\*1 se define como el que carece de mutaciones analizadas en el gen CYP2D6. Los fenotipos se determinaron siguiendo el sistema de puntuación de la actividad, publicado por Gaedigk y col. (67), que asigna puntos de la siguiente forma: 0 puntos para los alelos inactivos \*3, \*4, \*5,

\*6 y \*7; 0,5 puntos para los alelos \*9, \*10 y \*41; 1 punto para los alelos de tipo salvaje \*1, \*2 y \*35; y 2 puntos para la duplicación de \*1 o \*2. Una actividad con puntuación superior a 2 se clasifica como metabolizadores ultrarrápidos (MU); un valor de 1,5-2, como metabolizadores rápidos (MR); de 0,5-1, como metabolizadores intermedios (MI); y, por último, la puntuación de 0, como metabolizadores lentos (ML).

## Resultados

Los 70 voluntarios sanos de raza caucásica recibieron una dosis única de 1 mg de risperidona y fueron incluidos en el análisis farmacocinético. El grupo masculino estaba compuesto por 35 voluntarios (edad media  $28,1 \pm 3,2$  años; rango 23-35 años). Por su parte, el grupo femenino también comprendía 35 voluntarios (edad media  $28,2 \pm 2,6$  años; rango 25-39 años).

Todos los voluntarios fueron genotipados para CYP2D6 y se dividieron en cuatro grupos fenotípicos (ML, MI, MR y MU), como se muestra en la Tabla 10. La mayoría de los sujetos fueron incluidos en los grupos MR y MI (82,9 %). La Tabla 11 muestra el error de mínimos cuadrados de la ANOVA y  $CV_w$  para cada fenotipo. Los voluntarios del grupo ML mostraron la menor variabilidad. El  $CV_w$  de AUC y  $C_{máx}$  de risperidona fue de dos a tres veces mayor en los voluntarios de los grupos MI y MR que en los de los grupos ML y MU.

Tabla 10. Distribución de polimorfismos in CYP2D6 según el sexo de los 70 voluntarios.

	Genotipo	Actividad	Hombres	Mujeres
<b>MU</b>	*1 x n/*1	>2	1	
	*1 x n/*2	>2	3	
	*1 x n/*41	>2	1	
	*2 x n/*2	>2		1
	<b>Total por sexo</b>		<b>5</b>	<b>1</b>
	<b>Total (%)</b>	<b>6 (8,57)</b>		
<b>MR</b>	*1/*1	2	4	7
	*1/*2	2	3	1
	*1/ x n/*4	2	1	5
	*1/*35	2	1	2
	*2/*2	2	1	
	*2/ x n/*4	2	1	
	*2/*35	2	1	
	*35/*35	2	1	
	*1/*9	1,5	1	
	*1/*10	1,5		1
	*1/*41	1,5		2
	*2/*9	1,5		1
	*2/*10	1,5	1	
	<b>Total por sexo</b>		<b>15</b>	<b>19</b>
		<b>Total (%)</b>	<b>34 (48,57)</b>	
<b>MI</b>	*1/*4	1	8	4
	*1/*5	1	1	1
	*2/*3	1	1	
	*2/*5	1		1
	*2/*6	1		1
	*4/*35	1		1
	*6/*35	1		1
	*41/*41	1		1
	*4/*9	0,5		1
	*4/*41	0,5	1	2
	<b>Total por sexo</b>		<b>11</b>	<b>13</b>
		<b>Total (%)</b>	<b>24 (34,39)</b>	
<b>PM</b>	*4/*4	0	2	1
	*4/*5	0	2	
	*4/*6	0		1
	<b>Total por sexo</b>		<b>4</b>	<b>2</b>
	<b>Total (%)</b>	<b>6 (8,57)</b>		

ML, metabolizadores lentos; MI, metabolizadores intermedios; MR, metabolizadores rápidos; MU, metabolizadores ultrarrápidos.

**Tabla 11. Análisis del error de mínimos cuadrados (EMC) y el coeficiente de variabilidad intrasujeto ( $CV_w$ ) para cada grupo fenotípico de los estudios de bioequivalencia de risperidona**

	ML n = 6	MI n = 24	MR n = 34	MU n = 6	Total n = 70
LnAUC <sub>0-t</sub>					
EMC	0,018	0,104	0,079	0,030	0,084
$CV_w$	13,3	33,2	28,7	17,4	29,6
% <sup>1</sup>	0	148,73	115,01	30,28	121,78
Ln C <sub>máx</sub>					
EMC	0,012	0,072	0,113	0,007	0,094
$CV_w$	10,9	27,3	34,7	8,7	31,5
% <sup>1</sup>	0	150,43	217,63	-27,27	188,33

ML, metabolizadores lentos; MI, metabolizadores intermedios; MR, metabolizadores rápidos; MU, metabolizadores ultrarrápidos.

<sup>1</sup>% de incremento en el  $CV_w$  con respecto al grupo de ML.

La estimación del tamaño de la muestra para estudios de bioequivalencia se presenta en la Tabla 12. En el caso de  $C_{máx}$ , el número de sujetos se reduce en un 82 % si se incluye solo el grupo de ML (se pasa de 34 a 6 sujetos para una ratio de 1,00). Del mismo modo, se observó una reducción de 85 % cuando se incluyó a los voluntarios del grupo de MU (de 34 a 5 sujetos para una ratio de 1,00). Sin embargo, cuando solo se incluyeron los grupos de MR o MI, la tendencia fue opuesta (Tabla 3).

**Tabla 12. Estimación de tamaño muestral de los estudios de bioequivalencia de risperidona según el grupo fenotípico y la ratio de los parámetros farmacocinéticos.**

	T/R	ML	MI	MR	MU	Total
LnAUC <sub>0-t</sub>	1,00	8	37	28	12	30
	1,05	12	64	48	19	51
LnC <sub>máx</sub>	1,00	6	26	40	5	34
	1,05	9	44	69	7	37

Tamaño muestral estimado con la fórmula de González-Vacarezza y col. (63) para las ratios de la formulación test (T) y de referencia (R) de 1,00 y 1,05.

ML, metabolizadores lentos; MI, metabolizadores intermedios; MR, metabolizadores rápidos; MU, metabolizadores ultrarrápidos.

El  $CV_w$  fue ligeramente inferior en las mujeres (27,1 %  $CV_w$  para AUC<sub>0-t</sub> y 25,7 % para  $C_{máx}$ ) que para los hombres (31,6 % y 35,1 %, respectivamente) (Tabla 13). Si calculamos el  $CV_w$  en los grupos MR y MI, la variabilidad es mucho menor en las mujeres (27,9 % para AUC<sub>0-t</sub> y el 25,7 % para  $C_{máx}$ ) que en los hombres (33,3 % para AUC<sub>0-t</sub> y el 37,2 % para  $C_{máx}$ ) (Tabla 13). En el caso de la risperidona, el número de sujetos podría reducirse en un 30 % si se incluye solo a las mujeres.

**Tabla 13. Análisis del error de mínimos cuadrados (EMC), del coeficiente de variabilidad intrasujeto ( $CV_w$ ) y de tamaño muestral para hombres y mujeres de los estudios de bioequivalencia de risperidona, considerando los grupos fenotípicos MR y MI.**

Todos los voluntarios	Mujeres n=35	Hombres n=35	Total n=70
<b>LnAUC<sub>0-t</sub></b>			
EMC	0,071	0,095	0,084
$CV_w$	27,1	31,6	29,6
% <sup>1</sup>	0	16,51	9,07
N <sup>2</sup>	26	34	30
<b>LnC<sub>máx</sub></b>			
EMC	0,064	0,116	0,094
$CV_w$	25,7	35,1	31,5
% <sup>1</sup>	0	36,43	22,20
N <sup>2</sup>	23	41	34
<b>Voluntarios MR -MI</b>	<b>Mujeres n=32</b>	<b>Hombres n=26</b>	<b>Total n=70</b>
<b>LnAUC<sub>0-t</sub></b>			
EMC	0,075	0,105	0,087
$CV_w$	27,9	33,3	30,1
% <sup>1</sup>	0	19,25	7,82
N <sup>2</sup>	27	37	31
<b>LnC<sub>máx</sub></b>			
EMC	0,064	0,129	0,093
$CV_w$	25,7	37,2	31,3
% <sup>1</sup>	0	44,82	21,90
N <sup>2</sup>	23	46	33

ML, metabolizadores lentos; MR, metabolizadores rápidos.

<sup>1</sup>% de incremento en el  $CV_w$  con respecto a las mujeres.

<sup>2</sup> N= tamaño muestral para la ratio T/R de 1,00.

## Discusión general

### El camino a la estandarización

La guía de la EMA tiene como objetivo especificar los requisitos para el diseño, realización y evaluación de los estudios de bioequivalencia (4) en Europa. La última actualización de esta guía ha conseguido estandarizar y resolver algunos de los problemas del campo de la bioequivalencia (23, 28, 68-72), aunque estos no siempre son tratados de la misma manera por las autoridades sanitarias (23), lo que podría dificultar la armonización de la guía a nivel europeo. Veerbereck y col. (23) van más lejos, concluyendo que la última actualización de la guía no ha incluido entre sus objetivos el alcance de la armonización global para garantizar la seguridad y eficacia de los fármacos en cualquier parte del mundo. Sin embargo, García Arieta y col. (28) afirman que Europa actualmente tiene la guía que más ha evolucionado dentro de los países que conforman la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano. Esta guía presenta novedosas aportaciones que mejoran el entendimiento de los requisitos europeos en la evaluación de los estudios de bioequivalencia (28). Existe un largo camino para la armonización y estandarización global de los estudios de bioequivalencia, aunque sí que se han conseguido grandes avances que aseguran un mayor consenso y calidad en la comercialización de los fármacos a nivel europeo.

Es importante que se sigan lanzando debates científicos sobre posibles problemas en la realización de los estudios de bioequivalencia para avanzar y mejorar esta guía europea. Autores como A. Marzo, M. Marzo y col. (69-71) defienden que existen algunos problemas que deben aclararse en futuras actualizaciones de la guía, como, por ejemplo, el fenómeno del pico múltiple, el manejo de ensayos de bioequivalencia con sustancias endógenas y los conflictos éticos en la administración de determinados fármacos en dosis repetidas a voluntarios.

Nuestro trabajo aporta nuevas áreas de mejora que se deben tener en cuenta en los debates científicos y en las próximas actualizaciones de la guía.



### Utilidad de los estudios piloto en los ensayos de bioequivalencia

En el primero de los tres artículos presentados en esta tesis se evaluó la utilidad de los estudios piloto con fármacos de alta variabilidad, en los que es más difícil demostrar la bioequivalencia, principalmente para la  $C_{m\acute{a}x}$ . El grado de predicción fue muy bueno para la ratio de AUC y considerable para la de  $C_{m\acute{a}x}$ . Sin embargo, los resultados del  $CV_w$  no fueron buenos predictores y, por lo tanto, podemos decir que los estudios piloto no parecen servir para determinar el tamaño muestral que se debe utilizar en el estudio pivotal. Sí que son útiles para evaluar si la nueva formulación se comporta de forma similar a la de referencia.

Por el contrario, en un estudio similar, Marzo y col. (38) concluyeron que los estudios piloto con 6 voluntarios en diseño 2 x 2 para fármacos de baja variabilidad pueden predecir el tamaño muestral. No obstante, en su publicación no muestran los resultados del  $CV_w$ , aunque realizaron un mayor número de simulaciones que en nuestro caso. En cuanto a la predicción de los parámetros farmacocinéticos, los resultados fueron similares a los nuestros(38).

Autores como Wang y col. (31) defienden que los estudios piloto solo son útiles para el cálculo del tamaño muestral en fármacos de baja variabilidad. Por su parte, Ramírez y col. (73) confirman que los estudios piloto con menos de 12 voluntarios no son suficientes para determinar el tamaño muestral de un estudio pivotal. Es posible que para fármacos de alta variabilidad se requieran estudios piloto con un mayor tamaño muestral para calcular correctamente el CV.

En cuanto al tipo de diseño más apropiado para este tipo de fármacos, se observaron los mejores resultados para el diseño 2 x 2 de 12 voluntarios y 4 x 4 con 8 voluntarios. El diseño replicado en los estudios piloto se evaluó con la intención de valorar si se obtenían mejores resultados en el cálculo del  $CV_w$ , aunque en este caso los resultados fueron similares para ambos estudios. Por tanto, puede determinarse que el mejor diseño, por ser menos complejo, es el 2 x 2 con 12 voluntarios. Llama la atención que los estudios replicados no predijeran los resultados del  $CV_w$  mejor que el diseño simple 2 x 2, teniendo en cuenta que para la estimación de este parámetro es necesario el diseño replicado (4), ya que para calcular la variabilidad intrasujeto necesitamos que cada voluntario reciba al menos dos veces la misma formulación en dos ocasiones distintas (74).

En la literatura puede encontrarse bastante variabilidad en cuanto al número de voluntarios que se deben utilizar en un estudio piloto. Por ejemplo, Marzo y col. (38) y Portolés y col. (75) consiguieron predecir la demostración de bioequivalencia en el estudio pivotal usando un estudio piloto de 6 y 3 voluntarios, respectivamente. En el caso de Zhan y col. (39), lo hicieron con un estudio piloto de 14 voluntarios. Por su parte, autores como Julious (76) defienden la realización de estudios piloto con 12 voluntarios, mientras que Wang y col. (31) afirman que generalmente los estudios piloto se realizan con entre 8 y 12 voluntarios. Por último, cabe indicar que las autoridades reguladoras recomiendan la realización de estudios piloto con al menos 12 voluntarios (4, 5, 39, 73).

La demostración de bioequivalencia no es el propósito de los estudios piloto, pero en este trabajo se evaluó a modo exploratorio. Se observó un bajo porcentaje de estudios bioequivalentes, ya que se trataba de estudios con bajo tamaño muestral para fármacos de alta variabilidad, lo que podría hacernos pensar que estos resultados se deben al azar.

De esta forma, podemos concluir que los estudios piloto no son útiles para calcular el tamaño muestral adecuado que se debe aplicar al estudio pivotal, pero sí podrían ser útiles para evaluar la similitud entre las formulaciones test y de referencia.

En la guía de la EMA no hay recomendaciones sobre el diseño y realización de los estudios piloto para ensayos de bioequivalencia. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nuestra propuesta sería la utilización de estudios piloto con diseño 2 x 2 con al menos 12 voluntarios para valorar la ratio de los parámetros farmacocinéticos, mientras que para determinar el cálculo del tamaño muestral del estudio pivotal, sería adecuada la aplicación directa del diseño en dos etapas (4, 29, 36, 37, 51, 77), como se especifica en la última actualización de la guía. Sin embargo, A. Marzo y col. (69) se oponen al uso del diseño en dos etapas, prefiriendo la realización de estudios piloto.

Las limitaciones de este trabajo residen en el reducido número de formulaciones no bioequivalentes. Además, debería aumentarse la variedad de fármacos analizados y el número de simulaciones por ensayo. La validación y confirmación de estos resultados ayudaría en la decisión de en qué situaciones es preferible realizar un estudio piloto o ir directamente al pivotal.

### Optimización de los tiempos de muestreo de fármacos de vida media larga

En el segundo artículo se ha estudiado el efecto del truncado de AUC a tiempos inferiores a las 72 h en fármacos de vida media larga. Según la guía europea, en el caso de fármacos de vida media larga es suficiente el truncado de AUC a las 72 h, independientemente de la vida media del fármaco (4). Sin embargo, en la mayoría de fármacos de liberación inmediata el proceso de absorción ocurre en las primeras 24 h, por lo que el tiempo de muestreo podría ser acortado.

En nuestros resultados encontramos que el grado de acuerdo de AUC truncada a las 24 y 48 h fue mayor que el truncado a las 12 h con respecto a  $AUC_{0-72}$ . Además, solo dos formulaciones dejaron de ser bioequivalentes (comprimidos de aripiprazol y efavirenz) al truncar AUC a las 12 h. Aunque el truncado de AUC a las 24 o 48 h podría parecer menos restrictivo que el de las 72 h, debería tenerse en cuenta que solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el  $CV_w$  de  $AUC_{0-12}$  cuando se comparó con los  $CV_w$  de truncado a las 72, 48 y 24 h. El hecho de que el  $CV_w$  no se vea afectado por el truncado de AUC a las 72 h fue demostrado por Khandave y col. (40). Además, el coeficiente de correlación de Pearson para el  $CV_w$  y de la ratio de  $AUC_{0-72}$  en relación a los otros tiempos de truncado mostró el peor resultado para  $AUC_{0-12}$ . El incremento en el  $CV_w$  de  $AUC_{0-12}$  con respecto al  $CV_w$  a los otros tiempos de truncado podría explicar por qué algunas de las formulaciones no demostraron ser bioequivalentes en ese tiempo y esto podría deberse a que a ese tiempo no se está teniendo en cuenta el proceso global de la absorción. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la media de las ratios para ninguno de los tiempos evaluados.

Habría que tener en cuenta que Najib y col. (78) demostraron que el  $CV_w$  no aumentaba con el truncado de AUC a las 72 h en comparación con la variabilidad de los tiempos de truncado clásicos, y aconsejaban el uso del truncado a las 72 h con cautela. Sin embargo, tal como argumentaban Khandave y col., no todos los fármacos evaluados eran de vida media larga (21).

Oishi y col. (79) argumentan que, en el caso de formulaciones de liberación inmediata, la fase de eliminación después del pico de concentración depende de las propiedades farmacocinéticas de la sustancia activa, más que de los perfiles de disolución de la formulación. En este trabajo nos estamos centrando en la fase de absorción del fármaco, por lo que debería ser más fácil detectar diferencias entre las

formulaciones. Por tanto, el truncado de AUC a las 48 h o, incluso mejor, a las 24 h, podría ser más sensible para evaluar diferencias entre las formulaciones, ya que la fase de absorción tiene mayor impacto sobre el parámetro analizado. En teoría, debería ser más sencillo demostrar bioequivalencia con  $AUC_{0-\infty}$  que con  $AUC_{0-72}$ ,  $AUC_{0-48}$  o  $AUC_{0-24}$ , debido a que hay una mayor influencia de la fase de eliminación y esta no está relacionada con la formulación, sino con el propio sujeto.

Una de las limitaciones de este trabajo es el pequeño número de estudios no bioequivalentes que se analizan. Mahmood realizó unas simulaciones con dos estudios no bioequivalentes y concluyó que el truncado de AUC a las 72 h podría ser útil, pero cabe la posibilidad de encontrar falsos positivos (80). Habría que validar estos tiempos con formulaciones no bioequivalentes en un mayor número de fármacos y en otros diseños (81).

A pesar de las ventajas de poder utilizar como parámetro principal el truncado de AUC a las 72 h, existen autores como A. Marzo y col. (69) que desconfían de este parámetro y defienden que se prolonguen los tiempos de muestreo más allá de las 72 h, ya que ellos y otros investigadores no pudieron demostrar bioequivalencia a las 72 h, pero sí a tiempos de truncado mayores.

Por todo esto, en este segundo artículo concluimos que es suficiente el truncado a las 48 o 24 h para demostrar la bioequivalencia de fármacos de vida media larga.

Aunque otros autores han demostrado bioequivalencia con el truncado de AUC a las 12, 24 y 48 h en estudios similares a este (82-87), no analizaron el efecto de la variabilidad intrasujeto y no se propusieron como objetivo principal evaluar el efecto del truncado de AUC a tiempos inferiores a las 72 h. El hecho de que no haya resultados en la bibliografía que determinen el comportamiento del criterio de aceptación de AUC a tiempos inferiores a las 72 h impide que la guía de la EMA pueda tomar otros tiempos de truncado como variables principales en la evaluación de los estudios de bioequivalencia. La realización de estudios confirmatorios de estos resultados ayudaría a la implantación de estas mejoras en la guía europea, puesto que si se acortaran los tiempos de truncado de AUC hasta las 24 y 48 h en fármacos de vida media larga, se reduciría el número de extracciones, las visitas y los costes del estudio. Sería también interesante que tanto la EMA como las Agencias Europeas de cada país solicitaran la inclusión de los resultados de AUC a estos tiempos de

truncado en el informe final del estudio. Esto ayudaría a recabar información a nivel europeo para evidenciar si puede acortarse el tiempo de truncado en este tipo de estudios.

### Farmacogenética en la selección de voluntarios de los estudios de bioequivalencia

En el tercer y último artículo presentado en esta tesis evaluamos el efecto de la farmacogenética en el  $CV_w$  con la idea de optimizar los resultados de los parámetros farmacocinéticos y del cálculo del tamaño muestral. Los estudios de bioequivalencia deben realizarse en muestras homogéneas y representativas de la población en general para garantizar la validez externa de los resultados. Este enfoque es esencial para el análisis de la seguridad y de la eficacia del fármaco, así como para asegurar que los resultados son extrapolables a la población general. Sin embargo, el objetivo principal de los estudios de bioequivalencia es evaluar las diferencias en la biodisponibilidad entre los productos farmacéuticos. Por lo tanto, la disminución de la variabilidad intrasujeto podría mejorar la precisión de los parámetros farmacocinéticos, tales como la absorción, el metabolismo y la eliminación.

Cuanto mayor es la variabilidad intrasujeto de un fármaco, mayor es el número de voluntarios que deben incluirse en el estudio de bioequivalencia. Aunque la guía europea solo aconseja el fenotipado y/o genotipado de los voluntarios en diseños paralelos (28, 88) por sus efectos en la variabilidad interindividual, también debería tenerse en cuenta en los estudios cruzados de dosis única con fármacos que se metabolizan a través de enzimas de fase I y II (20). En concreto, existe una guía específica de farmacogenética sobre la metodología que debe seguirse en la evaluación de la farmacocinética, abarcando todas las fases del desarrollo del fármaco, pero con la finalidad de evaluar e investigar el efecto de la variabilidad interindividual en los sujetos en este tipo de fármacos (88).

Hemos evaluado el efecto del genotipo en el  $CV_w$  y hemos observado que para el ejemplo de la risperidona que es metabolizada por la vía del CYP2D6, el  $CV_w$  debería de tenerse en cuenta a la hora de calcular el tamaño muestral de un ensayo de bioequivalencia. En este caso, los metabolizadores lentos fueron los que presentaron unos valores de  $CV_w$  más bajos para los parámetros farmacocinéticos y, por lo tanto, ayudarían a reducir el tamaño muestral necesario para evaluar la

bioequivalencia de este fármaco. Además, de esta forma se reduciría la variabilidad de aclaramiento del fármaco y sería más fácil detectar diferencias entre los parámetros farmacocinéticos debidas a las formulaciones analizadas. González-Vacarezza y col. (63) llegaron a estas mismas conclusiones en otro trabajo similar para mirtazapina. Sin embargo, en otro trabajo en el que utilizaron como modelo tacrolimus, que se metaboliza por el CYP3A5, observaron que el  $CV_w$  era mayor para metabolizadores lentos que para metabolizadores rápidos (89). En el caso de voriconazol, que se metaboliza por la vía del CYP2C19, Chung y col. (90) observaron el mismo comportamiento que para el tacrolimus. Una de las limitaciones de estos estudios es el reducido número de voluntarios para cada fenotipo.

El porcentaje de metabolizadores lentos para las isoenzimas CYP2D6 y CYP2C19 en la población caucásica es de 5.4-8.9 % y 2.7-5.4 %, respectivamente (70). Marzo y col. (70) afirman que para los diseños cruzados de dosis única, este tipo de metabolizadores no afectan a la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos. Por el contrario, para diseños paralelos o de dosis múltiple, este tipo de voluntarios no deben ser incluidos, ya que, en el caso de los diseños de dosis múltiple, podría haber problemas de seguridad, y en el caso del diseño paralelo, cabría la posibilidad de que estén presentes solo en uno de los grupos de tratamiento, lo que podría afectar a los resultados (70).

La guía de la EMA debería promover, por un lado, que se genotipe a los voluntarios participantes en ensayos de bioequivalencia en este tipo de fármacos para explorar y seguir estudiando el efecto de la farmacogenética sobre el  $CV_w$  y, por otro, la realización de estudios de bioequivalencia en los que la selección de los voluntarios se basara en el fenotipo con menor variabilidad intrasujeto para afinar en la comparación entre las formulaciones analizadas.



# Conclusiones de esta tesis doctoral

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

## **1. Utilidad de los estudios piloto para los fármacos de alta variabilidad:**

- Los estudios piloto pueden ser útiles en la predicción de los parámetros farmacocinéticos.
- Los estudios piloto no parecen útiles en la predicción del  $CV_w$  necesario para calcular el tamaño muestral en fármacos de alta variabilidad.
- El diseño adecuado en un estudio piloto es el 2 x 2 con al menos 12 voluntarios.
- El grado de predicción fue similar para diseños 2 x 2 con 12 voluntarios que para diseños 4 x 4 con 8 voluntarios.

En la guía europea no hay recomendaciones sobre el diseño y realización de los estudios piloto para ensayos de equivalencia. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, proponemos la utilización de estudios piloto con diseño 2 x 2 con al menos 12 voluntarios para valorar la ratio de los parámetros farmacocinéticos, mientras que para determinar el cálculo del tamaño muestral del estudio pivotal, sería adecuado utilizar el diseño en dos etapas.

## **2. Utilidad del truncado del AUC a tiempos cortos para los fármacos de vida media larga:**

- El truncado de AUC a 48 y 24 h es sensible y adecuado para determinar si dos formulaciones son bioequivalentes en comparación con el truncado actual a 72 h.
- El coeficiente de variación intrasujeto no se vio afectado para los tiempos de truncado de AUC a las 72, 48 y 24 h.



- La ratio de AUC no se vio afectada por el truncado a los distintos tiempos.

**Es suficiente el truncado a las 48 o 24 h para demostrar la bioequivalencia de fármacos de vida media larga. Si estos resultados se aplicaran, se reducirían aun más el número de extracciones, las visitas y los costes del estudio.**

### **3. Utilidad de la farmacogenética para reducir la variabilidad de fármacos metabolizados por enzimas fase I y II polimórficas:**

- El polimorfismo CYP2D6 afecta al coeficiente de variación intrasujeto de risperidona.
- Elegir sujetos metabolizadores lentos o ultrarrápidos reduce el tamaño muestral necesario para demostrar bioequivalencia.

**La guía europea debería explorar y profundizar en los efectos de la farmacogenética en la determinación de los parámetros farmacocinéticos de los ensayos de bioequivalencia y en el cálculo del tamaño muestral.**

Estas conclusiones podrían contribuir a la estandarización de los ensayos de bioequivalencia y podrían ser temas de discusión a tener en cuenta en la próxima actualización de la guía de bioequivalencia europea.

## Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a los voluntarios y al equipo de profesionales que ha participado en los ensayos clínicos, al Instituto Teófilo Hernando, al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa y a la Universidad Autónoma de Madrid.

Con la satisfacción de haber finalizado este trabajo, fruto de la colaboración y el esfuerzo realizados durante muchos años, mi mayor deseo es que con él podamos aportar nuestro grano de arena al avance de los estudios de bioequivalencia. Esto solo nos lo dirá el tiempo.

Para mí, el reto más importante ha sido dedicar el tiempo libre a este proyecto y compaginarlo con la vida laboral. En ello he implicado a los que tenía más cerca. He tenido mucha suerte, porque he estado rodeada de las mejores personas, que han sabido hacerme mantener el espíritu de lucha y la convicción de que todo lo que uno decide empezar debe acabarlo.

A los que pensaron que no llegaría este día les doy las gracias. Eso me ha servido para sacar más fuerzas en la recta final.

Gracias a Antonio García, a Francisco Abad-Santos y al Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de La Princesa. Con vosotros he tenido la oportunidad de desarrollar mi carrera científica y profesional. Vaya donde vaya sé que muchos de mis méritos serán consecuencia de las oportunidades que me brindasteis durante los años que trabajé con vosotros.

Gracias, Francisco, por tu paciencia, por haberme guiado y ayudado durante la elaboración de esta tesis doctoral.

Gracias a mis amigos, siempre animándome y convencidos de que tarde o temprano lo conseguiría. A mis amigas de toda la vida: Carol, Cristina, Elena y Vanesa. A mis amigas de la Facultad: Elena y Ester. A los amigos del trabajo: María, Tere y Elba, mis tres tesoros; y Ana, Rocío, Carmen, Alejandra y Sergio, con los que pasé los mejores momentos.

Gracias a mi familia y, en especial, a mis padres. Vosotros me habéis enseñado que con esfuerzo, dedicación y sacrificio uno puede alcanzar cualquier meta. Siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones y habéis luchado por que tenga las oportunidades que a vosotros la vida no os brindó.

Gracias a mi tía Conchi, que me acogió en su casa para que pudiera iniciar mis estudios en la Universidad. Siempre estás cuando te necesito.

Gracias a mi abuela María, que, aunque ya no está conmigo, ha sido una figura muy importante en mi vida y siempre me acompaña.

Por último, gracias a Jorge. Tal vez con una mirada puedas entender lo que has significado y significas para mí. La tesis solo ha sido un capítulo y ahora nos quedan muchos más.

## Bibliografía

1. Arieta AG, Solá CA, García CH. Medicamentos genéricos: evidencias y mitos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 2010;34(3):71-82.
2. Flores J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología humana*. Farmacología humana. 1992.
3. Rodríguez MdVD. *Genéricos: claves para su conocimiento y comprensión*: Editores Médicos, SA; 1999.
4. CHMP. Guideline on the investigation of bioequivalence. Guideline. London: EMA (European Medicines Agency), 2010 20 January 2010. Report No.
5. FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence, Studies for Orally Administered Drug Products, General Considerations. Guideline. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services 2003 March 2003. Report No.
6. García-Arieta A. The failure to show bioequivalence is not evidence against generics. *British journal of clinical pharmacology*. 2010;70(3):452-3.
7. Alfonso-Cristancho R, Andia T, Barbosa T, Watanabe JH. Definition and Classification of Generic Drugs Across the World. *Applied health economics and health policy*. 2015;13(1):5-11.
8. Tamboli AM, Todkar P, Zope P, Sayyad F. An overview on bioequivalence: regulatory consideration for generic drug products. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2012;2010.
9. Ascione FJ, Kirking DM, Gaither CA, Welage LS. Historical overview of generic medication policy. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington, DC: 1996)*. 2000;41(4):567-77.
10. Stahl EG. Política de medicamentos en Estados Unidos de América. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2009;26(4):537-43.
11. López-Muñoz F, González CÁ. *Historia de la Psicofarmacología*: Ed. Médica Panamericana; 2007.
12. Shargel L, Kanfer I. *Generic drug product development: solid oral dosage forms*: CRC Press; 2013.
13. Lindenbaum J, Mellow MH, Blackstone MO, Butler Jr VP. Variation in biologic availability of digoxin from four preparations. *New England Journal of Medicine*. 1971;285(24):1344-7.
14. Wagner JG, Christensen M, Sakmar E, Blair D, Yates JD, Willis PW, et al. Equivalence lack in digoxin plasma levels. *JAMA*. 1973;224(2):199-204.
15. Vitti TG, Banes D, Byers TE. Bioavailability of digoxin. *New England Journal of Medicine*. 1971;285(25):1433-4.
16. Lawrence XY, Li BV. *FDA Bioequivalence Standards*: Springer; 2014.
17. Boehm G, Yao L, Han L, Zheng Q. Development of the generic drug industry in the US after the Hatch-Waxman Act of 1984. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(5):297-311.
18. Caves RE, Whinston MD, Hurwitz MA, Pakes A, Temin P. Patent expiration, entry, and competition in the US pharmaceutical industry. *Brookings papers on economic activity Microeconomics*. 1991;1991:1-66.
19. Reiffen D, Ward MR. Generic drug industry dynamics. *Review of Economics and Statistics*. 2005;87(1):37-49.
20. Meredith P. Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clinical therapeutics*. 2003;25(11):2875-90.
21. Juárez JNB. Talidomina. *Actualidad en farmacología y terapéutica*. 2014;12(1):39-46.
22. Communities CoE. *Pharmacokinetic Studies in Man*. 1988;3.
23. Verbeeck RK, Musuamba FT. The revised EMA guideline for the investigation of bioequivalence for immediate release oral formulations with systemic action. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012;15(3):376-88.

24. Communities CoE. Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. 1991 December 1991. Report No.
25. Kanfer I, Shargel L. Generic Drug Product Development: International Regulatory Requirements for Bioequivalence: CRC Press; 2010.
26. CPMP. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Guideline. London: EMEA (European Medicines Evaluation Agency), 2001 26 July 2001. Report No.
27. CHMP. Questions & Answers on the Bioavailability and Bioequivalence Guideline London: EMA (European Medicines Agency), 2006 27 July 2006. Report No.
28. Garcia-Arieta A, Gordon J. Bioequivalence requirements in the European Union: critical discussion. *The AAPS journal*. 2012;14(4):738-48.
29. CHMP. Questions & Answers: positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party (PKWP). London: 2015 22 January 2015. Report No.
30. CHMP. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms. London: EMA (European Medicines Agency), 2014 20 November 2014. Report No.
31. Wang Y, Zhou S. Pilot trial for the assessment of relative bioavailability in generic drug product development: statistical power. *Journal of biopharmaceutical statistics*. 1999;9(1):179-87.
32. Arain M, Campbell MJ, Cooper CL, Lancaster GA. What is a pilot or feasibility study? A review of current practice and editorial policy. *BMC medical research methodology*. 2010;10:67.
33. Lancaster GA, Dodd S, Williamson PR. Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *Journal of evaluation in clinical practice*. 2004;10(2):307-12.
34. Thabane L, Ma J, Chu R, Cheng J, Ismaila A, Rios LP, et al. A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC medical research methodology*. 2010;10:1.
35. Fuglsang A. Pilot and Repeat Trials as Development Tools Associated with Demonstration of Bioequivalence. *The AAPS journal*. 2015;17(3):678-83.
36. Mathew TWY. Pilot-pivotal trials for average bioequivalence. *Journal of Statistical Planning and Inference*. 2007;138(2008):2106 – 16.
37. Pan G, Wang Y. Average bioequivalence evaluation: general methods for pilot trials. *Journal of biopharmaceutical statistics*. 2006;16(2):207-25.
38. Marzo A, Fibbioli M, Marone C, Cerutti B. The degree of predictivity in pilot studies on six subjects in bioequivalence trials. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2004;49(3):283-6.
39. Zhang S, Kan Q, Wen JG, Zhao J, Sheng Y, Li Y, et al. Pilot and pivotal study to evaluate the bioequivalence of two paroxetine 40 mg tablet formulations in healthy Chinese subjects. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;50(7):514-23.
40. Khandave SS OS, Sawant SV, Joshi SS Evaluation of Performance of the Truncated Area Under Curve (AUC) as a Primary Pharmacokinetic Parameter in Bioequivalence Studies. *Journal Bioequivalence and Availability*. 2010;2:77-80.
41. Chow S-C, Wang H. On sample size calculation in bioequivalence trials. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2001;28(2):155-69.
42. Hauck W, Parekh A, Lesko L, Chen M, Williams R. Limits of 80%-125% for AUC and 70%-143% for Cmax. What is the impact on bioequivalence studies? *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;39(8):350-5.
43. Hauschke D. Letter to the Editor: A Note on Sample Size Calculation in Bioequivalence Trials. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2002;29(1):89-94.
44. Ramirez E, Guerra P, Laosa O, Duque B, Tabares B, Lei S, et al. The importance of sample size, log-mean ratios, and intrasubject variability in the acceptance criteria of 108 bioequivalence studies. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64(8):783-93.

45. Blume HH, Midha KK. Bio-international 92, conference on bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1993;82(11):1186-9.
46. Davit B, Braddy AC, Conner DP, Yu LX. International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: a survey of similarities and differences. *The AAPS journal*. 2013;15(4):974-90.
47. Diliberti C. Why bioequivalence of highly variable drugs is an issue. Advisory Committee for Pharmaceutical Sciences Meeting Transcript, April 14, 2004.
48. Midha K, Rawson M, Hubbard J. The bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;43(10).
49. Haidar SH, Davit B, Chen M-L, Conner D, Lee L, Li QH, et al. Bioequivalence approaches for highly variable drugs and drug products. *Pharmaceutical research*. 2008;25(1):237-41.
50. Chen ML, Lee SC, Ng MJ, Schuirmann DJ, Lesko LJ, Williams RL. Pharmacokinetic analysis of bioequivalence trials: Implications for sex-related issues in clinical pharmacology and biopharmaceutics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2000;68(5):510-21.
51. Van Peer A. Variability and impact on design of bioequivalence studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(3):146-53.
52. Bertilsson L, Dahl ML, Dalén P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *British journal of clinical pharmacology*. 2002;53(2):111-22.
53. Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell biochemistry and function*. 2006;24(5):381-5.
54. Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stüber F. Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping. *Clinical chemistry*. 2002;48(9):1412-7.
55. Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl M-L, et al. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics and Genomics*. 1999;9(5):657.
56. González I, Pérez B, Alvarez M, Dorado P, Llerena A. [Study of debrisoquine hydroxylation polymorphism (CYP2D6) in the Cuban population compared to Spaniards]. *Medicina clinica*. 2007;128(20):772-4.
57. Fang J, Bourin M, Baker GB. Metabolism of risperidone to 9-hydroxyrisperidone by human cytochromes P450 2D6 and 3A4. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1999;359(2):147-51.
58. Heykants J, Huang M, Mannens G, Meuldermans W, Snoeck E, Van Beijsterveldt L, et al. The pharmacokinetics of risperidone in humans: a summary. *The Journal of clinical psychiatry*. 1994;55:13-7.
59. DeVane CL. Brief comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the traditional and newer antipsychotic drugs. *American journal of health-system pharmacy*. 1995;52(suppl 1):S15-S8.
60. Novalbos J, López-Rodríguez R, Román M, Gallego-Sandín S, Ochoa D, Abad-Santos F. Effects of CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of risperidone in healthy volunteers. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2010;30(5):504-11.
61. Scordo MG, Spina E, Facciola G, Avenoso A, Johansson I, Dahl M-L. Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. *Psychopharmacology*. 1999;147(3):300-5.
62. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
63. Gonzalez-Vacarezza N, Abad-Santos F, Carcas-Sansuan A, Dorado P, Penas-Lledo E, Estevez-Carrizo F, et al. Use of pharmacogenetics in bioequivalence studies to reduce sample size: an example with mirtazapine and CYP2D6. *The pharmacogenomics journal*. 2013;13(5):452-5.

64. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clinical chemistry*. 2005;51(7):1137-44.
65. Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Gomez-Dominguez B, Lopez-Rodriguez R, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, et al. Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: screening in a Spanish population. *Pharmacogenomics*. 2010;11(11):1619-25.
66. Cuyàs E, Olano-Martín E, Khymenets O, Hernández L, Jofre-Monseny L, Grandoso L, et al. Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMAchip™. *Pharmacogenomics*. 2010;11(2):257-66.
67. Gaedigk A, Simon S, Pearce R, Bradford L, Kennedy M, Leeder J. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;83(2):234-42.
68. Houin G. Bioequivalence studies: a new EMA guideline. *Arzneimittel-Forschung*. 2010;60(4).
69. Marzo A. Development Steps of Pharmacokinetics: A Perspective on Bioanalytical Methods and Bioequivalence. *Current clinical pharmacology*. 2012;7(4):328-32.
70. Marzo A, Fontana E. Critical considerations into the new EMA guideline on bioequivalence. *Arzneimittel-Forschung*. 2010;61(4):207-20.
71. Marzo M, Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, Caciagli F, Marzo A. Synergic development of pharmacokinetics and bioanalytical methods as support of pharmaceutical research. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2015:0394632015589531.
72. Morais JA, Lobato Mdo R. The new European Medicines Agency guideline on the investigation of bioequivalence. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(3):221-5.
73. Ramirez E, Abaira V, Guerra P, Borobia AM, Duque B, Lopez JL, et al. A preliminary model to avoid the overestimation of sample size in bioequivalence studies. *Drug research*. 2013;63(2):98-103.
74. Karalis V, Macheras P, Van Peer A, Shah VP. Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. *Pharmaceutical research*. 2008;25(8):1956-62.
75. Portoles A, Filipe A, Almeida S, Terleira A, Vallee F, Vargas E. Bioequivalence study of two different tablet formulations of carvedilol in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*. 2005;55(4):212-7.
76. Julious SA. Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study. *Pharmaceut Statist*. 2005;4:287-91.
77. Zintzaras E, Bouka P. Bioequivalence studies: biometrical concepts of alternative designs and pooled analysis. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 1999;24(3):225-32.
78. Najib. Effect of Truncated AUC Method on Drug Bioequivalence in Humans. *Journal Bioequivalence and Availability*. 2009;1:112-4.
79. Oishi M, Chiba K, Fukushima T, Tomono Y, Suwa T. Different truncation methods of AUC between Japan and the EU for bioequivalence assessment: influence on the regulatory judgment. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2012;27(6):658-62.
80. Mahmood I. Impact of truncated area under the curve on failed bioequivalence studies: a computer simulation analysis. *Drug metabolism and drug interactions*. 2004;20(1-2):77-83.
81. El-Tahtawy A, Harrison F, Zirkelbach JF, Jackson AJ. Bioequivalence of long half-life drugs--informative sampling determination--using truncated area in parallel-designed studies for slow sustained-release formulations. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(11):4337-46.
82. Almeida S, Filipe A, Neves R, Desjardins I, Shink E, Castillo A. Bioequivalence study of two different tablet formulations of donepezil using truncated areas under the curve. A single-center, single-dose, randomized, open-label, 2-way crossover study under fasting conditions. *Arzneimittel-Forschung*. 2010;60(3):116-23.

83. Almeida S, Filipe A, Neves R, Pinho C, Pedroso P, Castillo A, et al. Truncated areas under the curve in the assessment of pioglitazone bioequivalence. Data from a single-center, single-dose, randomized, open-label, 2-way cross-over bioequivalence study of two formulations of pioglitazone 45 mg tablets under fasting conditions. *Arzneimittel-Forschung*. 2011;61(1):32-9.
84. Almeida S, Spinola AC, Filipe A, Trabelsi F, Farre A. Truncated AUCs in the assessment of the bioequivalence of topiramate, a long half-life drug. *Arzneimittel-Forschung*. 2007;57(5):249-53.
85. Erkent U, Koytchev R. The use of truncated area under the curves in the bioequivalence evaluation of long half-life drugs. Studies with donepezil and memantine. *Arzneimittel-Forschung*. 2008;58(5):255-8.
86. Marzo A, Monti NC, Vuksic D. Experimental, extrapolated and truncated areas under the concentration-time curve in bioequivalence trials. *European journal of clinical pharmacology*. 1999;55(9):627-31.
87. Portoles A, Almeida S, Terleira A, de Pablo I, Filipe A, Cruz Caturla M, et al. Truncated AUC in the evaluation of fluconazole bioequivalence. A cross-over, randomised, open-label study in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*. 2004;54(11):752-6.
88. CHMP. Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products Guideline. London: EMA (European Medicines Agency), 2011 12 December 2011. Report No.
89. Chung JY, Lee YJ, Jang SB, Lim LA, Park MS, Kim KH. CYP3A5\* 3 genotype associated with intrasubject pharmacokinetic variation toward tacrolimus in bioequivalence study. *Therapeutic drug monitoring*. 2010;32(1):67-72.
90. Chung H, Lee H, Han H, An H, Lim KS, Lee Y, et al. A pharmacokinetic comparison of two voriconazole formulations and the effect of CYP2C19 polymorphism on their pharmacokinetic profiles. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:2609.



# **Anexo I: Guideline on the Investigation of Bioequivalence**



European Medicines Agency

London, 20 January 2010

Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr \*\*

**COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE  
(CHMP)**

**GUIDELINE ON THE INVESTIGATION OF BIOEQUIVALENCE**

<b>DISCUSSION IN THE JOINT EFFICACY AND QUALITY WORKING GROUP</b>	December 1997 – October 1998
<b>TRANSMISSION TO CPMP</b>	July 1998
<b>RELEASE FOR CONSULTATION</b>	December 1998
<b>DEADLINE FOR COMMENTS</b>	June 1999
<b>DISCUSSION IN THE DRAFTING GROUP</b>	February – May 2000
<b>TRANSMISSION TO CPMP</b>	July – December 2000
<b>RELEASE FOR CONSULTATION</b>	December 2000
<b>DEADLINE FOR COMMENTS</b>	March 2001
<b>DISCUSSION IN THE DRAFTING GROUP</b>	March - May 2001
<b>TRANSMISSION TO CPMP</b>	July 2001
<b>ADOPTION BY CPMP</b>	July 2001
<b>DATE FOR COMING INTO OPERATION</b>	January 2002
<b>DISCUSSION ON REV. 1 IN THE PK-GROUP OF THE EFFICACY WORKING PARTY</b>	May 2007-July 2008
<b>DISCUSSION ON REV. 1 BY THE QUALITY WORKING PARTY</b>	June 2008
<b>DRAFT REV. 1 AGREED BY THE EFFICACY WORKING PARTY</b>	8 July 2008
<b>ADOPTION REV. 1 BY CHMP FOR RELEASE FOR CONSULTATION</b>	24 July 2008
<b>END OF CONSULTATION REV. 1 (DEADLINE FOR COMMENTS)</b>	31 January 2009

7 Westferry Circus, Canary Wharf, London, E14 4HB, UK  
Tel. (44-20) 74 18 84 00 Fax (44-20) 74 18 86 13  
E-mail: mail@ema.europa.eu http://www.ema.europa.eu

© European Medicines Agency, 2010. Reproduction is authorised provided the source is acknowledged.

<b>REV. 1 AGREED BY THE EFFICACY WORKING PARTY</b>	January 2010
<b>REV. 1 ADOPTION BY CHMP</b>	20 January 2010
<b>REV. 1 DATE FOR COMING INTO EFFECT</b>	1 August 2010

This guideline will replace the “Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence” CPMP/QWP/EWP/1401/98 and the related questions in the Q&A document (CHMP/EWP/40326/06). This guideline includes recommendations on BCS-based biowaivers.

\* The correction includes changes in section 4.1.4 "Study conduct", sub-section "Fasting or fed conditions", last paragraph (page 10): replacement of the unit "calories" against "kcal"; correction in section 4.1.8 "Evaluation", sub-section "Parameters to be analysed and acceptance limits", last paragraph (page15): deletion of "for AUC" in the cross-reference to section 4.1.9.

\*\* The correction concerns a typographical correction in Appendix II – paragraph on “Non-oral immediate release dosage forms with systemic action”.

<b>KEYWORDS</b>	<i>Bioequivalence, pharmacokinetics, biowaiver, in vitro dissolution, generics</i>
-----------------	--

**GUIDELINE ON THE INVESTIGATION OF BIOEQUIVALENCE**

**TABLE OF CONTENTS**

<b>EXECUTIVE SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
1.1 BACKGROUND .....	4
1.2 GENERIC MEDICINAL PRODUCTS .....	4
1.3 OTHER TYPES OF APPLICATION.....	4
<b>2. SCOPE</b> .....	<b>4</b>
<b>3. LEGAL BASIS</b> .....	<b>5</b>
<b>4. MAIN GUIDELINE TEXT</b> .....	<b>5</b>
4.1 DESIGN, CONDUCT AND EVALUATION OF BIOEQUIVALENCE STUDIES .....	5
4.1.1 Study design.....	6
4.1.2 Reference and test product .....	6
4.1.3 Subjects.....	8
4.1.4 Study conduct .....	8
4.1.5 Characteristics to be investigated .....	10
4.1.6 Strength to be investigated .....	11
4.1.7 Bioanalytical methodology.....	13
4.1.8 Evaluation .....	13
4.1.9 Narrow therapeutic index drugs.....	16
4.1.10 Highly variable drugs or drug products.....	17
4.2 <i>IN VITRO</i> DISSOLUTION TESTS .....	17
4.2.1 <i>In vitro</i> dissolution tests complementary to bioequivalence studies.....	17
4.2.2 <i>In vitro</i> dissolution tests in support of biowaiver of strengths .....	17
4.3 STUDY REPORT .....	18
4.3.1 Bioequivalence study report.....	18
4.3.2 Other data to be included in an application.....	18
4.4 VARIATION APPLICATIONS .....	18
<b>DEFINITIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>APPENDIX I</b> .....	<b>20</b>
DISSOLUTION TESTING AND SIMILARITY OF DISSOLUTION PROFILES .....	20
<b>APPENDIX II</b> .....	<b>22</b>
BIOEQUIVALENCE STUDY REQUIREMENTS FOR DIFFERENT DOSAGE FORMS.....	22
<b>APPENDIX III</b> .....	<b>25</b>
BCS-BASED BIOWAIVER .....	25

## EXECUTIVE SUMMARY

This guideline specifies the requirements for the design, conduct, and evaluation of bioequivalence studies for immediate release dosage forms with systemic action.

### 1. INTRODUCTION

#### 1.1 Background

Two medicinal products containing the same active substance are considered bioequivalent if they are pharmaceutically equivalent or pharmaceutical alternatives and their bioavailabilities (rate and extent) after administration in the same molar dose lie within acceptable predefined limits. These limits are set to ensure comparable *in vivo* performance, i.e. similarity in terms of safety and efficacy.

In bioequivalence studies, the plasma concentration time curve is generally used to assess the rate and extent of absorption. Selected pharmacokinetic parameters and preset acceptance limits allow the final decision on bioequivalence of the tested products. AUC, the area under the concentration time curve, reflects the extent of exposure.  $C_{max}$ , the maximum plasma concentration or peak exposure, and the time to maximum plasma concentration,  $t_{max}$ , are parameters that are influenced by absorption rate.

It is the objective of this guideline to specify the requirements for the design, conduct, and evaluation of bioequivalence studies. The possibility of using *in vitro* instead of *in vivo* studies is also addressed.

#### 1.2 Generic medicinal products

In applications for generic medicinal products according to Directive 2001/83/EC, Article 10(1), the concept of bioequivalence is fundamental. The purpose of establishing bioequivalence is to demonstrate equivalence in biopharmaceutics quality between the generic medicinal product and a reference medicinal product in order to allow bridging of preclinical tests and of clinical trials associated with the reference medicinal product. The current definition for generic medicinal products is found in Directive 2001/83/EC, Article 10(2)(b), which states that a generic medicinal product is a product which has the same qualitative and quantitative composition in active substances and the same pharmaceutical form as the reference medicinal product, and whose bioequivalence with the reference medicinal product has been demonstrated by appropriate bioavailability studies. The different salts, esters, ethers, isomers, mixtures of isomers, complexes or derivatives of an active substance are considered to be the same active substance, unless they differ significantly in properties with regard to safety and/or efficacy. Furthermore, the various immediate-release oral pharmaceutical forms shall be considered to be one and the same pharmaceutical form.

#### 1.3 Other types of application

Other types of applications may also require demonstration of bioequivalence, including variations, fixed combinations, extensions and hybrid applications.

The recommendations on design and conduct given for bioequivalence studies in this guideline may also be applied to comparative bioavailability studies evaluating different formulations used during the development of a new medicinal product containing a new chemical entity and to comparative bioavailability studies included in extension or hybrid applications that are not based exclusively on bioequivalence data.

### 2. SCOPE

This guideline focuses on recommendations for bioequivalence studies for immediate release formulations with systemic action. It also sets the relevant criteria under which bioavailability studies need not be required (either waiver for additional strength, see section 4.1.6, a specific type of formulation, see Appendix II or BCS based Biowaiver, see Appendix III).

Specific recommendations regarding bioequivalence studies for modified release products, transdermal products and orally inhaled products are given in other guidelines (see section 3).

The scope is limited to chemical entities. Recommendation for the comparison of biologicals to reference medicinal products can be found in guidelines on similar biological medicinal products.

In case bioequivalence cannot be demonstrated using drug concentrations, in exceptional circumstances pharmacodynamic or clinical endpoints may be needed. This situation is outside the scope of this guideline and the reader is referred to therapeutic area specific guidelines.

Although the concept of bioequivalence possibly could be considered applicable for herbal medicinal products, the general principles outlined in this guideline are not applicable to herbal medicinal products, for which active constituents are less well defined than for chemical entities.

Furthermore, this guideline does not cover aspects related to generic substitution as this is subject to national regulation.

### **3. LEGAL BASIS**

This guideline applies to Marketing Authorisation Applications for human medicinal products submitted in accordance with the Directive 2001/83/EC as amended, under Art. 10 (1) (generic applications). It may also be applicable to Marketing Authorisation Applications for human medicinal products submitted under Art. 8(3) (full applications), Art. 10b (fixed combination), Art. 10(3) (hybrid applications) of the same Directive, and for extension and variation applications in accordance with Commission Regulations (EC) No 1084/2003 and 1085/2003 as well.

This guideline should be read in conjunction with the Annex I of Directive 2001/83/EC as amended, as well as European and ICH guidelines for conducting clinical trials, including those on:

- General Considerations for Clinical Trials (ICH topic E8, CPMP/ICH/291/95)
- Guideline for Good Clinical Practice (ICH E6 (R1), CPMP/ICH/135/95)
- Statistical Principles for Clinical Trials (ICH E9, CPMP/ICH/363/96)
- Structure and Content of Clinical Study Reports (ICH E3, CPMP/ICH/137/95)
- CHMP guidance for users of the centralised procedure for generics/hybrid applications (EMA/CHMP/225411/2006)
- Pharmacokinetic studies in man (Eudralex, Volume 3, 3CC3a)
- Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Sections I and II (CPMP/QWP/604/96, CPMP/EWP/280/96)
- Fixed Combination Medicinal Products (CPMP/EWP/240/95 Rev 1)
- Requirements for clinical documentation for orally inhaled products (OIP) including the requirements for demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products for use in the treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (CPMP/EWP/4151/00 rev 1)
- Clinical Requirements for Locally Applied, Locally Acting Products containing Known Constituents (CPMP/EWP/239/95)

The guideline should also be read in conjunction with relevant guidelines on pharmaceutical quality. The test products used in the bioequivalence study must be prepared in accordance with GMP-regulations including Eudralex volume 4.

Bioequivalence trials conducted in the EU/EEA have to be carried out in accordance with Directive 2001/20/EC. Trials conducted outside of the Union and intended for use in a Marketing Authorisation Application in the EU/EEA have to be conducted to the standards set out in Annex I of the community code, Directive 2001/83/EC as amended.

Companies may also apply for CHMP Scientific Advice, via the EMA, for specific queries not covered by existing guidelines.

### **4. MAIN GUIDELINE TEXT**

#### **4.1 Design, conduct and evaluation of bioequivalence studies**

The number of studies and study design depend on the physico-chemical characteristics of the substance, its pharmacokinetic properties and proportionality in composition, and should be justified accordingly. In particular it may be necessary to address the linearity of pharmacokinetics, the need for studies both in fed and fasting state, the need for enantioselective analysis and the possibility of waiver for additional strengths (see sections 4.1.4, 4.1.5 and 4.1.6).



Module 2.7.1 should list all relevant studies carried out with the product applied for, i.e. bioequivalence studies comparing the formulation applied for (i.e. same composition and manufacturing process) with a reference medicinal product marketed in EU. Studies should be included in the list regardless of the study outcome. Full study reports should be provided for all studies, except pilot studies for which study report synopses (in accordance with ICH E3) are sufficient. Full study reports for pilot studies should be available upon request. Study report synopses for bioequivalence or comparative bioavailability studies conducted during formulation development should also be included in Module 2.7. Bioequivalence studies comparing the product applied for with non-EU reference products should not be submitted and do not need to be included in the list of studies.

#### 4.1.1 Study design

The study should be designed in such a way that the formulation effect can be distinguished from other effects.

##### Standard design

If two formulations are compared, a randomised, two-period, two-sequence single dose crossover design is recommended. The treatment periods should be separated by a wash out period sufficient to ensure that drug concentrations are below the lower limit of bioanalytical quantification in all subjects at the beginning of the second period. Normally at least 5 elimination half-lives are necessary to achieve this.

##### Alternative designs

Under certain circumstances, provided the study design and the statistical analyses are scientifically sound, alternative well-established designs could be considered such as parallel design for substances with very long half-life and replicate designs e.g. for substances with highly variable pharmacokinetic characteristics (see section 4.1.10).

Conduct of a multiple dose study in patients is acceptable if a single dose study cannot be conducted in healthy volunteers due to tolerability reasons, and a single dose study is not feasible in patients.

In the rare situation where problems of sensitivity of the analytical method preclude sufficiently precise plasma concentration measurements after single dose administration and where the concentrations at steady state are sufficiently high to be reliably measured, a multiple dose study may be acceptable as an alternative to the single dose study. However, given that a multiple dose study is less sensitive in detecting differences in  $C_{max}$ , this will only be acceptable if the applicant can adequately justify that the sensitivity of the analytical method cannot be improved and that it is not possible to reliably measure the parent compound after single dose administration taking into account also the option of using a supra-therapeutic dose in the bioequivalence study (see also section 4.1.6). Due to the recent development in the bioanalytical methodology, it is unusual that parent drug cannot be measured accurately and precisely. Hence, use of a multiple dose study instead of a single dose study, due to limited sensitivity of the analytical method, will only be accepted in exceptional cases.

In steady-state studies, the washout period of the previous treatment can overlap with the build-up of the second treatment, provided the build-up period is sufficiently long (at least 5 times the terminal half-life).

#### 4.1.2 Reference and test product

##### Reference Product

For Article 10(1) and 10(3) marketing authorisation applications reference must be made to the dossier of a reference medicinal product for which a marketing authorisation is or has been granted in the Union on the basis of a complete dossier in accordance with Articles 8(3), 10a, 10b or 10c of Directive 2001/83/EC, as amended. The product used as reference product in the bioequivalence study should be part of the global marketing authorisation of the reference medicinal product (as defined in Article 6(1) second subparagraph of Directive 2001/83/EC). The choice of the reference medicinal product identified by the applicant in Module 1.2 Application form for which bioequivalence has been

demonstrated by appropriate bioavailability studies, should be justified in section 1.5.2 “Information for generic, hybrid or bio-similar applications”.

Test products in an application for a generic or hybrid product or an extension of a generic/hybrid product are normally compared with the corresponding dosage form of a reference medicinal product, if available on the market.

In an application for extension of a medicinal product which has been initially approved under Art. 8(3) of Directive 2001/83/EC and when there are several dosage forms of this medicinal product on the market, it is recommended that the dosage form used for the initial approval of the concerned medicinal product (and which was used in clinical efficacy and safety studies) is used as reference product, if available on the market.

The selection of the reference product used in a bioequivalence study should be based on assay content and dissolution data and is the responsibility of the Applicant. Unless otherwise justified, the assayed content of the batch used as test product should not differ more than 5% from that of the batch used as reference product determined with the test procedure proposed for routine quality testing of the test product. The Applicant should document how a representative batch of the reference product with regards to dissolution and assay content has been selected. It is advisable to investigate more than one single batch of the reference product when selecting reference product batch for the bioequivalence study.

#### Test product

The test product used in the study should be representative of the product to be marketed and this should be discussed and justified by the applicant.

For example, for oral solid forms for systemic action:

- a) The test product should usually originate from a batch of at least 1/10 of production scale or 100,000 units, whichever is greater, unless otherwise justified.
- b) The production of batches used should provide a high level of assurance that the product and process will be feasible on an industrial scale.  
  
In case of a production batch smaller than 100,000 units, a full production batch will be required.
- c) The characterisation and specification of critical quality attributes of the drug product, such as dissolution, should be established from the test batch, i.e. the clinical batch for which bioequivalence has been demonstrated.
- d) Samples of the product from additional pilot and / or full scale production batches, submitted to support the application, should be compared with those of the bioequivalence study test batch, and should show similar in vitro dissolution profiles when employing suitable dissolution test conditions (see Appendix I).

Comparative dissolution profile testing should be undertaken on the first three production batches.

If full scale production batches are not available at the time of submission, the applicant should not market a batch until comparative dissolution profile testing has been completed.

The results should be provided at a Competent Authority’s request or if the dissolution profiles are not similar together with proposed action to be taken.

For other immediate release pharmaceutical forms for systemic action, justification of the representative nature of the test batch should be similarly established.

#### Packaging of study products

The reference and test products should be packed in an individual way for each subject and period, either before their shipment to the trial site, or at the trial site itself. Packaging (including labelling) should be performed in accordance with good manufacturing practice, including Annex 13 to the EU guide to GMP. Where necessary and in accordance with local regulations, sites should be authorised, as provided for in Article 13(1) of Directive 2001/20/EC, except where the provisions of Article 9(2)



of Directive 2005/28/EC apply. Third country sites should be able to demonstrate standards equivalent to these GMP requirements compliant with local requirements.

It should be possible to identify unequivocally the identity of the product administered to each subject at each trial period. Packaging, labelling and administration of the products to the subjects should therefore be documented in detail. This documentation should include all precautions taken to avoid and identify potential dosing mistakes. The use of labels with a tear-off portion is recommended.

#### **4.1.3 Subjects**

##### **Number of subjects**

The number of subjects to be included in the study should be based on an appropriate sample size calculation. The number of evaluable subjects in a bioequivalence study should not be less than 12.

##### **Selection of subjects**

The subject population for bioequivalence studies should be selected with the aim of permitting detection of differences between pharmaceutical products. In order to reduce variability not related to differences between products, the studies should normally be performed in healthy volunteers unless the drug carries safety concerns that make this unethical. This model, *in vivo* healthy volunteers, is regarded as adequate in most instances to detect formulation differences and to allow extrapolation of the results to populations for which the reference medicinal product is approved (the elderly, children, patients with renal or liver impairment, etc.).

The inclusion/exclusion criteria should be clearly stated in the protocol. Subjects should be 18 years of age or older and preferably have a Body Mass Index between 18.5 and 30 kg/m<sup>2</sup>.

The subjects should be screened for suitability by means of clinical laboratory tests, a medical history, and a physical examination. Depending on the drug's therapeutic class and safety profile, special medical investigations and precautions may have to be carried out before, during and after the completion of the study. Subjects could belong to either sex; however, the risk to women of childbearing potential should be considered. Subjects should preferably be non-smokers and without a history of alcohol or drug abuse. Phenotyping and/or genotyping of subjects may be considered for safety or pharmacokinetic reasons.

In parallel design studies, the treatment groups should be comparable in all known variables that may affect the pharmacokinetics of the active substance (e.g. age, body weight, sex, ethnic origin, smoking status, extensive/poor metabolic status). This is an essential pre-requisite to give validity to the results from such studies.

If the investigated active substance is known to have adverse effects, and the pharmacological effects or risks are considered unacceptable for healthy volunteers, it may be necessary to include patients instead, under suitable precautions and supervision.

#### **4.1.4 Study conduct**

##### **Standardisation**

The test conditions should be standardised in order to minimise the variability of all factors involved except that of the products being tested. Therefore, it is recommended to standardise diet, fluid intake and exercise.

The time of day for ingestion should be specified. Subjects should fast for at least 8 hours prior to administration of the products, unless otherwise justified. As fluid intake may influence gastric passage for oral administration forms, the test and reference products should be administered with a standardised volume of fluid (at least 150 ml). It is recommended that water is allowed as desired except for one hour before and one hour after drug administration and no food is allowed for at least 4 hours post-dose. Meals taken after dosing should be standardised in regard to composition and time of administration during an adequate period of time (e.g. 12 hours).

In case the study is to be performed during fed conditions, the timing of administration of the drug product in relation to food intake is recommended to be according to the SmPC of the originator product. If no specific recommendation is given in the originator SmPC, it is recommended that

subjects should start the meal 30 minutes prior to administration of the drug product and eat this meal within 30 minutes.

As the bioavailability of an active moiety from a dosage form could be dependent upon gastrointestinal transit times and regional blood flows, posture and physical activity may need to be standardised.

The subjects should abstain from food and drinks, which may interact with circulatory, gastrointestinal, hepatic or renal function (e.g. alcoholic drinks or certain fruit juices such as grapefruit juice) during a suitable period before and during the study. Subjects should not take any other concomitant medication (including herbal remedies) for an appropriate interval before as well as during the study. Contraceptives are, however, allowed. In case concomitant medication is unavoidable and a subject is administered other drugs, for instance to treat adverse events like headache, the use must be reported (dose and time of administration) and possible effects on the study outcome must be addressed. In rare cases, the use of a concomitant medication is needed for all subjects for safety or tolerability reasons (e.g. opioid antagonists, anti-emetics). In that scenario, the risk for a potential interaction or bioanalytical interference affecting the results must be addressed.

Medicinal products that according to the originator SmPC are to be used explicitly in combination with another product (e.g. certain protease inhibitors in combination with ritonavir) may be studied either as the approved combination or without the product recommended to be administered concomitantly.

In bioequivalence studies of endogenous substances, factors that may influence the endogenous baseline levels should be controlled if possible (e.g. strict control of dietary intake).

#### **Sampling times**

A sufficient number of samples to adequately describe the plasma concentration-time profile should be collected. The sampling schedule should include frequent sampling around predicted  $t_{max}$  to provide a reliable estimate of peak exposure. In particular, the sampling schedule should be planned to avoid  $C_{max}$  being the first point of a concentration time curve. The sampling schedule should also cover the plasma concentration time curve long enough to provide a reliable estimate of the extent of exposure which is achieved if  $AUC_{(0-t)}$  covers at least 80% of  $AUC_{(0-\infty)}$ . At least three to four samples are needed during the terminal log-linear phase in order to reliably estimate the terminal rate constant (which is needed for a reliable estimate of  $AUC_{(0-\infty)}$ ).  $AUC$  truncated at 72 h ( $AUC_{(0-72h)}$ ) may be used as an alternative to  $AUC_{(0-t)}$  for comparison of extent of exposure as the absorption phase has been covered by 72 h for immediate release formulations. A sampling period longer than 72 h is therefore not considered necessary for any immediate release formulation irrespective of the half life of the drug.

In multiple-dose studies, the pre-dose sample should be taken immediately before (within 5 minutes) dosing and the last sample is recommended to be taken within 10 minutes of the nominal time for the dosage interval to ensure an accurate determination of  $AUC_{(0-\tau)}$ .

If urine is used as the biological sampling fluid, urine should normally be collected over no less than three times the terminal elimination half-life. However, in line with the recommendations on plasma sampling, urine does not need to be collected for more than 72 h. If rate of excretion is to be determined, the collection intervals need to be as short as feasible during the absorption phase (see also section 4.1.5).

For endogenous substances, the sampling schedule should allow characterisation of the endogenous baseline profile for each subject in each period. Often, a baseline is determined from 2-3 samples taken before the drug products are administered. In other cases, sampling at regular intervals throughout 1-2 day(s) prior to administration may be necessary in order to account for fluctuations in the endogenous baseline due to circadian rhythms (see section 4.1.5).

#### **Fasting or fed conditions**

In general, a bioequivalence study should be conducted under fasting conditions as this is considered to be the most sensitive condition to detect a potential difference between formulations. For products where the SmPC recommends intake of the reference medicinal product on an empty stomach or irrespective of food intake, the bioequivalence study should hence be conducted under fasting

conditions. For products where the SmPC recommends intake of the reference medicinal product only in fed state, the bioequivalence study should generally be conducted under fed conditions.

However, for products with specific formulation characteristics (e.g. microemulsions, solid dispersions), bioequivalence studies performed under both fasted and fed conditions are required unless the product must be taken only in the fasted state or only in the fed state.

In cases where information is required in both the fed and fasted states, it is acceptable to conduct either two separate two-way cross-over studies or a four-way cross-over study.

In studies performed under fed conditions, the composition of the meal is recommended to be according to the SmPC of the originator product. If no specific recommendation is given in the originator SmPC, the meal should be a high-fat (approximately 50 percent of total caloric content of the meal) and high-calorie (approximately 800 to 1000 kcal) meal. This test meal should derive approximately 150, 250, and 500-600 kcal from protein, carbohydrate, and fat, respectively. The composition of the meal should be described with regard to protein, carbohydrate and fat content (specified in grams, calories and relative caloric content (%)).

#### 4.1.5 Characteristics to be investigated

##### Pharmacokinetic parameters

Actual time of sampling should be used in the estimation of the pharmacokinetic parameters. In studies to determine bioequivalence after a single dose,  $AUC_{(0-t)}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$ , residual area,  $C_{max}$  and  $t_{max}$  should be determined. In studies with a sampling period of 72 h, and where the concentration at 72 h is quantifiable,  $AUC_{(0-\infty)}$  and residual area do not need to be reported; it is sufficient to report AUC truncated at 72h,  $AUC_{(0-72h)}$ . Additional parameters that may be reported include the terminal rate constant,  $\lambda_z$ , and  $t_{1/2}$ .

In studies to determine bioequivalence for immediate release formulations at steady state,  $AUC_{(0-\tau)}$ ,  $C_{max,ss}$ , and  $t_{max,ss}$  should be determined.

When using urinary data,  $Ae_{(0-t)}$  and, if applicable,  $R_{max}$  should be determined.

Non-compartmental methods should be used for determination of pharmacokinetic parameters in bioequivalence studies. The use of compartmental methods for the estimation of parameters is not acceptable.

##### Parent compound or metabolites

###### General recommendations

In principle, evaluation of bioequivalence should be based upon measured concentrations of the parent compound. The reason for this is that  $C_{max}$  of a parent compound is usually more sensitive to detect differences between formulations in absorption rate than  $C_{max}$  of a metabolite.

###### Inactive pro-drugs

Also for inactive prodrugs, demonstration of bioequivalence for parent compound is recommended. The active metabolite does not need to be measured. However, some pro-drugs may have low plasma concentrations and be quickly eliminated resulting in difficulties in demonstrating bioequivalence for parent compound. In this situation it is acceptable to demonstrate bioequivalence for the main active metabolite without measurement of parent compound. In the context of this guideline, a parent compound can be considered to be an inactive pro-drug if it has no or very low contribution to clinical efficacy.

###### Use of metabolite data as surrogate for active parent compound

The use of a metabolite as a surrogate for an active parent compound is not encouraged. This can only be considered if the applicant can adequately justify that the sensitivity of the analytical method for measurement of the parent compound cannot be improved and that it is not possible to reliably measure the parent compound after single dose administration taking into account also the option of using a higher single dose in the bioequivalence study (see also section 4.1.6). Due to recent developments in bioanalytical methodology it is unusual that parent drug cannot be measured



accurately and precisely. Hence, the use of a metabolite as a surrogate for active parent compound is expected to be accepted only in exceptional cases. When using metabolite data as a substitute for active parent drug concentrations, the applicant should present any available data supporting the view that the metabolite exposure will reflect parent drug and that the metabolite formation is not saturated at therapeutic doses.

### Enantiomers

The use of achiral bioanalytical methods is generally acceptable. However, the individual enantiomers should be measured when all the following conditions are met:

- (1) the enantiomers exhibit different pharmacokinetics
- (2) the enantiomers exhibit pronounced difference in pharmacodynamics
- (3) the exposure (AUC) ratio of enantiomers is modified by a difference in the rate of absorption.

The individual enantiomers should also be measured if the above conditions are fulfilled or are unknown. If one enantiomer is pharmacologically active and the other is inactive or has a low contribution to activity, it is sufficient to demonstrate bioequivalence for the active enantiomer.

### The use of urinary data

The use of urinary excretion data as a surrogate for a plasma concentration may be acceptable in determining the extent of exposure where it is not possible to reliably measure the plasma concentration-time profile of parent compound. However, the use of urinary data has to be carefully justified when used to estimate peak exposure. If a reliable plasma  $C_{max}$  can be determined, this should be combined with urinary data on the extent of exposure for assessing bioequivalence. When using urinary data, the applicant should present any available data supporting that urinary excretion will reflect plasma exposure.

### Endogenous substances

If the substance being studied is endogenous, the calculation of pharmacokinetic parameters should be performed using baseline correction so that the calculated pharmacokinetic parameters refer to the additional concentrations provided by the treatment. Administration of supra-therapeutic doses can be considered in bioequivalence studies of endogenous drugs, provided that the dose is well tolerated, so that the additional concentrations over baseline provided by the treatment may be reliably determined. If a separation in exposure following administration of different doses of a particular endogenous substance has not been previously established this should be demonstrated, either in a pilot study or as part of the pivotal bioequivalence study using different doses of the reference formulation, in order to ensure that the dose used for the bioequivalence comparison is sensitive to detect potential differences between formulations.

The exact method for baseline correction should be pre-specified and justified in the study protocol. In general, the standard subtractive baseline correction method, meaning either subtraction of the mean of individual endogenous pre-dose concentrations or subtraction of the individual endogenous pre-dose AUC, is preferred. In rare cases where substantial increases over baseline endogenous levels are seen, baseline correction may not be needed.

In bioequivalence studies with endogenous substances, it cannot be directly assessed whether carry-over has occurred, so extra care should be taken to ensure that the washout period is of an adequate duration.

#### 4.1.6 Strength to be investigated

If several strengths of a test product are applied for, it may be sufficient to establish bioequivalence at only one or two strengths, depending on the proportionality in composition between the different strengths and other product related issues described below. The strength(s) to evaluate depends on the linearity in pharmacokinetics of the active substance.

In case of non-linear pharmacokinetics (i.e. not proportional increase in AUC with increased dose) there may be a difference between different strengths in the sensitivity to detect potential differences between formulations. In the context of this guideline, pharmacokinetics is considered to be linear if the difference in dose-adjusted mean AUCs is no more than 25% when comparing the studied strength

(or strength in the planned bioequivalence study) and the strength(s) for which a waiver is considered. In order to assess linearity, the applicant should consider all data available in the public domain with regard to the dose proportionality and review the data critically. Assessment of linearity will consider whether differences in dose-adjusted AUC meet a criterion of  $\pm 25\%$ .

If bioequivalence has been demonstrated at the strength(s) that are most sensitive to detect a potential difference between products, *in vivo* bioequivalence studies for the other strength(s) can be waived.

#### General biowaiver criteria

The following general requirements must be met where a waiver for additional strength(s) is claimed:

- a) the pharmaceutical products are manufactured by the same manufacturing process,
- b) the qualitative composition of the different strengths is the same,
- c) the composition of the strengths are quantitatively proportional, i.e. the ratio between the amount of each excipient to the amount of active substance(s) is the same for all strengths (for immediate release products coating components, capsule shell, colour agents and flavours are not required to follow this rule).  
If there is some deviation from quantitatively proportional composition, condition c is still considered fulfilled if condition i) and ii) or i) and iii) below apply to the strength used in the bioequivalence study and the strength(s) for which a waiver is considered
  - i. the amount of the active substance(s) is less than 5 % of the tablet core weight, the weight of the capsule content
  - ii. the amounts of the different core excipients or capsule content are the same for the concerned strengths and only the amount of active substance is changed
  - iii. the amount of a filler is changed to account for the change in amount of active substance. The amounts of other core excipients or capsule content should be the same for the concerned strengths
- d) appropriate *in vitro* dissolution data should confirm the adequacy of waiving additional *in vivo* bioequivalence testing (see section 4.2).

#### Linear pharmacokinetics

For products where all the above conditions a) to d) are fulfilled, it is sufficient to establish bioequivalence with only one strength.

The bioequivalence study should in general be conducted at the highest strength. For products with linear pharmacokinetics and where the drug substance is highly soluble (see Appendix III), selection of a lower strength than the highest is also acceptable. Selection of a lower strength may also be justified if the highest strength cannot be administered to healthy volunteers for safety/tolerability reasons. Further, if problems of sensitivity of the analytical method preclude sufficiently precise plasma concentration measurements after single dose administration of the highest strength, a higher dose may be selected (preferably using multiple tablets of the highest strength). The selected dose may be higher than the highest therapeutic dose provided that this single dose is well tolerated in healthy volunteers and that there are no absorption or solubility limitations at this dose.

#### Non-linear pharmacokinetics

For drugs with non-linear pharmacokinetics characterised by a more than proportional increase in AUC with increasing dose over the therapeutic dose range, the bioequivalence study should in general be conducted at the highest strength. As for drugs with linear pharmacokinetics a lower strength may be justified if the highest strength cannot be administered to healthy volunteers for safety/tolerability reasons. Likewise a higher dose may be used in case of sensitivity problems of the analytical method in line with the recommendations given for products with linear pharmacokinetics above.

For drugs with a less than proportional increase in AUC with increasing dose over the therapeutic dose range, bioequivalence should in most cases be established both at the highest strength and at the lowest strength (or a strength in the linear range), i.e. in this situation two bioequivalence studies are needed. If the non-linearity is not caused by limited solubility but is due to e.g. saturation of uptake transporters and provided that conditions a) to d) above are fulfilled and the test and reference products do not contain any excipients that may affect gastrointestinal motility or transport proteins, it is sufficient to demonstrate bioequivalence at the lowest strength (or a strength in the linear range).

Selection of other strengths may be justified if there are analytical sensitivity problems preventing a study at the lowest strength or if the highest strength cannot be administered to healthy volunteers for safety/tolerability reasons.

#### Bracketing approach

Where bioequivalence assessment at more than two strengths is needed, e.g. because of deviation from proportional composition, a bracketing approach may be used. In this situation it can be acceptable to conduct two bioequivalence studies, if the strengths selected represent the extremes, e.g. the highest and the lowest strength or the two strengths differing most in composition, so that any differences in composition in the remaining strengths is covered by the two conducted studies.

Where bioequivalence assessment is needed both in fasting and in fed state and at two strengths due to nonlinear absorption or deviation from proportional composition, it may be sufficient to assess bioequivalence in both fasting and fed state at only one of the strengths. Waiver of either the fasting or the fed study at the other strength(s) may be justified based on previous knowledge and/or pharmacokinetic data from the study conducted at the strength tested in both fasted and fed state. The condition selected (fasting or fed) to test the other strength(s) should be the one which is most sensitive to detect a difference between products.

#### Fixed combinations

The conditions regarding proportional composition should be fulfilled for all active substances of fixed combinations. When considering the amount of each active substance in a fixed combination the other active substance(s) can be considered as excipients. In the case of bilayer tablets, each layer may be considered independently.

#### **4.1.7 Bioanalytical methodology**

The bioanalytical part of bioequivalence trials should be performed in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP). However, as human bioanalytical studies fall outside the scope of GLP, the sites conducting the studies are not required to be monitored as part of a national GLP compliance programme.

The bioanalytical methods used must be well characterised, fully validated and documented to yield reliable results that can be satisfactorily interpreted. Within study validation should be performed using Quality control samples in each analytical run.

The main characteristics of a bioanalytical method that is essential to ensure the acceptability of the performance and the reliability of analytical results are: selectivity, lower limit of quantitation, the response function (calibration curve performance), accuracy, precision and stability.

The lower limit of quantitation should be 1/20 of  $C_{max}$  or lower, as pre-dose concentrations should be detectable at 5% of  $C_{max}$  or lower (see section 4.1.8. *Carry-over effects*).

Reanalysis of study samples should be predefined in the study protocol (and/or SOP) before the actual start of the analysis of the samples. Normally reanalysis of subject samples because of a pharmacokinetic reason is not acceptable. This is especially important for bioequivalence studies, as this may bias the outcome of such a study.

Analysis of samples should be conducted without information on treatment.

#### **4.1.8 Evaluation**

In bioequivalence studies, the pharmacokinetic parameters should in general not be adjusted for differences in assayed content of the test and reference batch. However, in exceptional cases where a reference batch with an assay content differing less than 5% from test product cannot be found (see section 4.1.2) content correction could be accepted. If content correction is to be used, this should be pre-specified in the protocol and justified by inclusion of the results from the assay of the test and reference products in the protocol.



**Subject accountability**

Ideally, all treated subjects should be included in the statistical analysis. However, subjects in a crossover trial who do not provide evaluable data for both of the test and reference products (or who fail to provide evaluable data for the single period in a parallel group trial) should not be included.

The data from all treated subjects should be treated equally. It is not acceptable to have a protocol which specifies that 'spare' subjects will be included in the analysis only if needed as replacements for other subjects who have been excluded. It should be planned that all treated subjects should be included in the analysis, even if there are no drop-outs.

In studies with more than two treatment arms (e.g. a three period study including two references, one from EU and another from USA, or a four period study including test and reference in fed and fasted states), the analysis for each comparison should be conducted excluding the data from the treatments that are not relevant for the comparison in question.

**Reasons for exclusion**

Unbiased assessment of results from randomised studies requires that all subjects are observed and treated according to the same rules. These rules should be independent from treatment or outcome. In consequence, the decision to exclude a subject from the statistical analysis must be made before bioanalysis.

In principle any reason for exclusion is valid provided it is specified in the protocol and the decision to exclude is made before bioanalysis. However the exclusion of data should be avoided, as the power of the study will be reduced and a minimum of 12 evaluable subjects is required.

Examples of reasons to exclude the results from a subject in a particular period are events such as vomiting and diarrhoea which could render the plasma concentration-time profile unreliable. In exceptional cases, the use of concomitant medication could be a reason for excluding a subject.

The permitted reasons for exclusion must be pre-specified in the protocol. If one of these events occurs it should be noted in the CRF as the study is being conducted. Exclusion of subjects based on these pre-specified criteria should be clearly described and listed in the study report.

Exclusion of data cannot be accepted on the basis of statistical analysis or for pharmacokinetic reasons alone, because it is impossible to distinguish the formulation effects from other effects influencing the pharmacokinetics.

The exceptions to this are:

- 1) A subject with lack of any measurable concentrations or only very low plasma concentrations for reference medicinal product. A subject is considered to have very low plasma concentrations if its AUC is less than 5% of reference medicinal product geometric mean AUC (which should be calculated without inclusion of data from the outlying subject). The exclusion of data due to this reason will only be accepted in exceptional cases and may question the validity of the trial.
- 2) Subjects with non-zero baseline concentrations  $> 5\%$  of  $C_{max}$ . Such data should be excluded from bioequivalence calculation (see carry-over effects below).

The above can, for immediate release formulations, be the result of subject non-compliance and an insufficient wash-out period, respectively, and should as far as possible be avoided by mouth check of subjects after intake of study medication to ensure the subjects have swallowed the study medication and by designing the study with a sufficient wash-out period. The samples from subjects excluded from the statistical analysis should still be assayed and the results listed (see *Presentation of data* below).

As stated in section 4.1.4,  $AUC_{(0-t)}$  should cover at least 80% of  $AUC_{(0-\infty)}$ . Subjects should not be excluded from the statistical analysis if  $AUC_{(0-t)}$  covers less than 80% of  $AUC_{(0-\infty)}$ , but if the percentage is less than 80% in more than 20% of the observations then the validity of the study may need to be discussed. This does not apply if the sampling period is 72 h or more and  $AUC_{(0-72h)}$  is used instead of  $AUC_{(0-t)}$ .

**Parameters to be analysed and acceptance limits**

In studies to determine bioequivalence after a single dose, the parameters to be analysed are  $AUC_{(0-t)}$ , or, when relevant,  $AUC_{(0-72h)}$ , and  $C_{max}$ . For these parameters the 90% confidence interval for the ratio of the test and reference products should be contained within the acceptance interval of 80.00-125.00%. To be inside the acceptance interval the lower bound should be  $\geq 80.00\%$  when rounded to two decimal places and the upper bound should be  $\leq 125.00\%$  when rounded to two decimal places.

For studies to determine bioequivalence of immediate release formulations at steady state,  $AUC_{(0-\infty)}$  and  $C_{max,ss}$  should be analysed using the same acceptance interval as stated above.

In the rare case where urinary data has been used,  $Ae_{(0-t)}$  should be analysed using the same acceptance interval as stated above for  $AUC_{(0-t)}$ .  $R_{max}$  should be analysed using the same acceptance interval as for  $C_{max}$ .

A statistical evaluation of  $t_{max}$  is not required. However, if rapid release is claimed to be clinically relevant and of importance for onset of action or is related to adverse events, there should be no apparent difference in median  $t_{max}$  and its variability between test and reference product.

In specific cases of products with a narrow therapeutic range, the acceptance interval may need to be tightened (see section 4.1.9). Moreover, for highly variable drug products the acceptance interval for  $C_{max}$  may in certain cases be widened (see section 4.1.10).

**Statistical analysis**

The assessment of bioequivalence is based upon 90% confidence intervals for the ratio of the population geometric means (test/reference) for the parameters under consideration. This method is equivalent to two one-sided tests with the null hypothesis of bioequivalence at the 5% significance level.

The pharmacokinetic parameters under consideration should be analysed using ANOVA. The data should be transformed prior to analysis using a logarithmic transformation. A confidence interval for the difference between formulations on the log-transformed scale is obtained from the ANOVA model. This confidence interval is then back-transformed to obtain the desired confidence interval for the ratio on the original scale. A non-parametric analysis is not acceptable.

The precise model to be used for the analysis should be pre-specified in the protocol. The statistical analysis should take into account sources of variation that can be reasonably assumed to have an effect on the response variable. The terms to be used in the ANOVA model are usually sequence, subject within sequence, period and formulation. Fixed effects, rather than random effects, should be used for all terms.

**Carry-over effects**

A test for carry-over is not considered relevant and no decisions regarding the analysis (e.g. analysis of the first period only) should be made on the basis of such a test. The potential for carry-over can be directly addressed by examination of the pre-treatment plasma concentrations in period 2 (and beyond if applicable).

If there are any subjects for whom the pre-dose concentration is greater than 5 percent of the  $C_{max}$  value for the subject in that period, the statistical analysis should be performed with the data from that subject for that period excluded. In a 2-period trial this will result in the subject being removed from the analysis. The trial will no longer be considered acceptable if these exclusions result in fewer than 12 subjects being evaluable. This approach does not apply to endogenous drugs.

**Two-stage design**

It is acceptable to use a two-stage approach when attempting to demonstrate bioequivalence. An initial group of subjects can be treated and their data analysed. If bioequivalence has not been demonstrated an additional group can be recruited and the results from both groups combined in a final analysis. If this approach is adopted appropriate steps must be taken to preserve the overall type I error of the experiment and the stopping criteria should be clearly defined prior to the study. The analysis of the first stage data should be treated as an interim analysis and both analyses conducted at adjusted significance levels (with the confidence intervals accordingly using an adjusted coverage probability



which will be higher than 90%). For example, using 94.12% confidence intervals for both the analysis of stage 1 and the combined data from stage 1 and stage 2 would be acceptable, but there are many acceptable alternatives and the choice of how much alpha to spend at the interim analysis is at the company's discretion. The plan to use a two-stage approach must be pre-specified in the protocol along with the adjusted significance levels to be used for each of the analyses.

When analysing the combined data from the two stages, a term for stage should be included in the ANOVA model.

#### **Presentation of data**

All individual concentration data and pharmacokinetic parameters should be listed by formulation together with summary statistics such as geometric mean, median, arithmetic mean, standard deviation, coefficient of variation, minimum and maximum. Individual plasma concentration/time curves should be presented in linear/linear and log/linear scale. The method used to derive the pharmacokinetic parameters from the raw data should be specified. The number of points of the terminal log-linear phase used to estimate the terminal rate constant (which is needed for a reliable estimate of  $AUC_{\infty}$ ) should be specified.

For the pharmacokinetic parameters that were subject to statistical analysis, the point estimate and 90% confidence interval for the ratio of the test and reference products should be presented.

The ANOVA tables, including the appropriate statistical tests of all effects in the model, should be submitted.

The report should be sufficiently detailed to enable the pharmacokinetics and the statistical analysis to be repeated, e.g. data on actual time of blood sampling after dose, drug concentrations, the values of the pharmacokinetic parameters for each subject in each period and the randomisation scheme should be provided.

Drop-out and withdrawal of subjects should be fully documented. If available, concentration data and pharmacokinetic parameters from such subjects should be presented in the individual listings, but should not be included in the summary statistics.

The bioanalytical method should be documented in a pre-study validation report. A bioanalytical report should be provided as well. The bioanalytical report should include a brief description of the bioanalytical method used and the results for all calibration standards and quality control samples. A representative number of chromatograms or other raw data should be provided covering the whole concentration range for all standard and quality control samples as well as the specimens analysed. This should include all chromatograms from at least 20% of the subjects with QC samples and calibration standards of the runs including these subjects.

If for a particular formulation at a particular strength multiple studies have been performed some of which demonstrate bioequivalence and some of which do not, the body of evidence must be considered as a whole. Only relevant studies, as defined in section 4.1, need be considered. The existence of a study which demonstrates bioequivalence does not mean that those which do not can be ignored. The applicant should thoroughly discuss the results and justify the claim that bioequivalence has been demonstrated. Alternatively, when relevant, a combined analysis of all studies can be provided in addition to the individual study analyses. It is not acceptable to pool together studies which fail to demonstrate bioequivalence in the absence of a study that does.

#### **4.1.9 Narrow therapeutic index drugs**

In specific cases of products with a narrow therapeutic index, the acceptance interval for AUC should be tightened to 90.00-111.11%. Where  $C_{max}$  is of particular importance for safety, efficacy or drug level monitoring the 90.00-111.11% acceptance interval should also be applied for this parameter. It is not possible to define a set of criteria to categorise drugs as narrow therapeutic index drugs (NTIDs) and it must be decided case by case if an active substance is an NTID based on clinical considerations.

#### 4.1.10 Highly variable drugs or drug products

Highly variable drug products (HVDP) are those whose intra-subject variability for a parameter is larger than 30%. If an applicant suspects that a drug product can be considered as highly variable in its rate and/or extent of absorption, a replicate cross-over design study can be carried out.

Those HVDP for which a wider difference in  $C_{max}$  is considered clinically irrelevant based on a sound clinical justification can be assessed with a widened acceptance range. If this is the case the acceptance criteria for  $C_{max}$  can be widened to a maximum of 69.84 – 143.19%. For the acceptance interval to be widened the bioequivalence study must be of a replicate design where it has been demonstrated that the within-subject variability for  $C_{max}$  of the reference compound in the study is >30%. The applicant should justify that the calculated intra-subject variability is a reliable estimate and that it is not the result of outliers. The request for widened interval must be prospectively specified in the protocol.

The extent of the widening is defined based upon the within-subject variability seen in the bioequivalence study using scaled-average-bioequivalence according to  $[U, L] = \exp [\pm k \cdot s_{WR}]$ , where U is the upper limit of the acceptance range, L is the lower limit of the acceptance range, k is the regulatory constant set to 0.760 and  $s_{WR}$  is the within-subject standard deviation of the log-transformed values of  $C_{max}$  of the reference product. The table below gives examples of how different levels of variability lead to different acceptance limits using this methodology.

Within-subject CV (%)*	Lower Limit	Upper Limit
30	80.00	125.00
35	77.23	129.48
40	74.62	134.02
45	72.15	138.59
≥50	69.84	143.19

$$* CV(\%) = 100\sqrt{e^{2s_{WR}^2} - 1}$$

The geometric mean ratio (GMR) should lie within the conventional acceptance range 80.00-125.00%.

The possibility to widen the acceptance criteria based on high intra-subject variability does not apply to AUC where the acceptance range should remain at 80.00 – 125.00% regardless of variability.

It is acceptable to apply either a 3-period or a 4-period crossover scheme in the replicate design study.

#### 4.2 *In vitro* dissolution tests

General aspects of *in vitro* dissolution experiments are briefly outlined in Appendix I including basic requirements how to use the similarity factor ( $f_2$ -test).

##### 4.2.1 *In vitro* dissolution tests complementary to bioequivalence studies

The results of *in vitro* dissolution tests at three different buffers (normally pH 1.2, 4.5 and 6.8) and the media intended for drug product release (QC media), obtained with the batches of test and reference products that were used in the bioequivalence study should be reported. Particular dosage forms like ODT (oral dispersible tablets) may require investigations using different experimental conditions. The results should be reported as profiles of percent of labelled amount dissolved versus time displaying mean values and summary statistics.

Unless otherwise justified, the specifications for the *in vitro* dissolution to be used for quality control of the product should be derived from the dissolution profile of the test product batch that was found to be bioequivalent to the reference product (see Appendix I).

In the event that the results of comparative *in vitro* dissolution of the biobatches do not reflect bioequivalence as demonstrated *in vivo* the latter prevails. However, possible reasons for the discrepancy should be addressed and justified.

##### 4.2.2 *In vitro* dissolution tests in support of bio waiver of strengths

Appropriate *in vitro* dissolution should confirm the adequacy of waiving additional *in vivo* bioequivalence testing. Accordingly, dissolution should be investigated at different pH values as

outlined in the previous section (normally pH 1.2, 4.5 and 6.8) unless otherwise justified. Similarity of *in vitro* dissolution (see App. I) should be demonstrated at all conditions within the applied product series, i.e. between additional strengths and the strength(s) (i.e. batch(es)) used for bioequivalence testing.

At pH values where sink conditions may not be achievable for all strengths *in vitro* dissolution may differ between different strengths. However, the comparison with the respective strength of the reference medicinal product should then confirm that this finding is drug substance rather than formulation related. In addition, the applicant could show similar profiles at the same dose (e.g. as a possibility two tablets of 5 mg versus one tablet of 10 mg could be compared).

### 4.3 Study report

#### 4.3.1 Bioequivalence study report

The report of the bioequivalence study should give the complete documentation of its protocol, conduct and evaluation. It should be written in accordance with the ICH E3 guideline and be signed by the investigator in accordance with Annex I of the Directive 2001/83/EC as amended.

Names and affiliations of the responsible investigator(s), the site of the study and the period of its execution should be stated. Audits certificate(s), if available, should be included in the report.

The study report should include evidence that the choice of the reference medicinal product is in accordance with Article 10(1) and Article 10(2) of Directive 2001/83/EC as amended. This should include the reference product name, strength, pharmaceutical form, batch number, manufacturer, expiry date and country of purchase.

The name and composition of the test product(s) used in the study should be provided. The batch size, batch number, manufacturing date and, if possible, the expiry date of the test product should be stated.

Certificates of analysis of reference and test batches used in the study should be included in an appendix to the study report.

Concentrations and pharmacokinetic data and statistical analyses should be presented in the level of detail described above (section 4.1.8 *Presentation of data*).

#### 4.3.2 Other data to be included in an application

The applicant should submit a signed statement confirming that the test product has the same quantitative composition and is manufactured by the same process as the one submitted for authorisation. A confirmation whether the test product is already scaled-up for production should be submitted. Comparative dissolution profiles (see section 4.2) should be provided.

The validation report of the bioanalytical method should be included in Module 5 of the application.

Data sufficiently detailed to enable the pharmacokinetics and the statistical analysis to be repeated, e.g. data on actual times of blood sampling, drug concentrations, the values of the pharmacokinetic parameters for each subject in each period and the randomisation scheme, should be available in a suitable electronic format (e.g. as comma separated and space delimited text files or Excel format) to be provided upon request.

### 4.4 Variation applications

If a product has been reformulated from the formulation initially approved or the manufacturing method has been modified in ways that may impact on the bioavailability, an *in vivo* bioequivalence study is required, unless otherwise justified. Any justification presented should be based upon general considerations, e.g. as per APPENDIX III, or on whether an acceptable level A *in vitro* / *in vivo* correlation has been established (see CPMP/QWP/ 604/96).

In cases where the bioavailability of the product undergoing change has been investigated and an acceptable level A correlation between *in vivo* performance and *in vitro* dissolution has been established, the requirements for *in vivo* demonstration of bioequivalence can be waived if the dissolution profile *in vitro* of the new product is similar to that of the already approved medicinal product under the same test conditions as used to establish the correlation (see APPENDIX I).



For variations of products approved under Art. 8 (3), 10a, 10b or 10c of Directive 2001/83/EC as amended, the comparative medicinal product for use in bioequivalence and dissolution studies is usually that authorised under the currently registered formulation, manufacturing process, packaging etc.

When variations to a generic or hybrid product are made, the comparative medicinal product for the bioequivalence study should normally be a current batch of the reference medicinal product. If a valid reference medicinal product is not available on the market, comparison to the previous formulation (of the generic or hybrid product) could be accepted, if justified. For variations that do not require a bioequivalence study, the advice and requirements stated in other published regulatory guidance should be followed.

## DEFINITIONS

### Pharmaceutical equivalence

Medicinal products are pharmaceutically equivalent if they contain the same amount of the same active substance(s) in the same dosage forms that meet the same or comparable standards.

Pharmaceutical equivalence does not necessarily imply bioequivalence as differences in the excipients and/or the manufacturing process can lead to faster or slower dissolution and/or absorption.

### Pharmaceutical alternatives

Pharmaceutical alternatives are medicinal products with different salts, esters, ethers, isomers, mixtures of isomers, complexes or derivatives of an active moiety, or which differ in dosage form or strength.

### Pharmacokinetic parameters

$Ae_{(0-t)}$	Cumulative urinary excretion of unchanged drug from administration until time t;
$AUC_{(0-t)}$	Area under the plasma concentration curve from administration to last observed concentration at time t;
$AUC_{(0-\infty)}$	Area under the plasma concentration curve extrapolated to infinite time;
$AUC_{(0-t)}$	AUC during a dosage interval at steady state;
$AUC_{(0-72h)}$	Area under the plasma concentration curve from administration to 72h;
$C_{max}$	Maximum plasma concentration;
$C_{max,ss}$	Maximum plasma concentration at steady state;
residual area	Extrapolated area $(AUC_{(0-\infty)} - AUC_{(0-t)}) / AUC_{(0-\infty)}$ ;
$R_{max}$	Maximal rate of urinary excretion;
$t_{max}$	Time until $C_{max}$ is reached;
$t_{max,ss}$	Time until $C_{max,ss}$ is reached;
$t_{1/2}$	Plasma concentration half-life;
$\lambda_z$	Terminal rate constant;
SmPC	Summary of Product Characteristics

## APPENDIX I

### Dissolution testing and Similarity of Dissolution Profiles

#### 1. General aspects of dissolution testing as related to bioavailability

During the development of a medicinal product a dissolution test is used as a tool to identify formulation factors that are influencing and may have a crucial effect on the bioavailability of the drug. As soon as the composition and the manufacturing process are defined a dissolution test is used in the quality control of scale-up and of production batches to ensure both batch-to-batch consistency and that the dissolution profiles remain similar to those of pivotal clinical trial batches. Furthermore, in certain instances a dissolution test can be used to waive a bioequivalence study. Therefore, dissolution studies can serve several purposes:

##### i – Testing on product quality

- To get information on the test batches used in bioavailability/bioequivalence studies and pivotal clinical studies to support specifications for quality control
- To be used as a tool in quality control to demonstrate consistency in manufacture
- To get information on the reference product used in bioavailability/bioequivalence studies and pivotal clinical studies.

##### ii - Bioequivalence surrogate inference

- To demonstrate in certain cases similarity between different formulations of an active substance and the reference medicinal product (biowaivers e.g., variations, formulation changes during development and generic medicinal products; see section 4.2 and App. III)
- To investigate batch to batch consistency of the products (test and reference) to be used as basis for the selection of appropriate batches for the *in vivo* study.

Test methods should be developed product related based on general and/or specific pharmacopoeial requirements. In case those requirements are shown to be unsatisfactory and/or do not reflect the *in vivo* dissolution (i.e. biorelevance) alternative methods can be considered when justified that these are discriminatory and able to differentiate between batches with acceptable and non-acceptable performance of the product *in vivo*. Current state-of-the-art information including the interplay of characteristics derived from the BCS classification and the dosage form must always be considered.

Sampling time points should be sufficient to obtain meaningful dissolution profiles, and at least every 15 minutes. More frequent sampling during the period of greatest change in the dissolution profile is recommended. For rapidly dissolving products, where complete dissolution is within 30 minutes, generation of an adequate profile by sampling at 5- or 10-minute intervals may be necessary.

If an active substance is considered highly soluble, it is reasonable to expect that it will not cause any bioavailability problems if, in addition, the dosage system is rapidly dissolved in the physiological pH-range and the excipients are known not to affect bioavailability. In contrast, if an active substance is considered to have a limited or low solubility, the rate limiting step for absorption may be dosage form dissolution. This is also the case when excipients are controlling the release and subsequent dissolution of the active substance. In those cases a variety of test conditions is recommended and adequate sampling should be performed.

#### 2. Similarity of dissolution profiles

Dissolution profile similarity testing and any conclusions drawn from the results (e.g. justification for a biowaiver) can be considered valid only if the dissolution profile has been satisfactorily characterised using a sufficient number of time points.

For immediate release formulations, further to the guidance given in section 1 above, comparison at 15 min is essential to know if complete dissolution is reached before gastric emptying.

Where more than 85% of the drug is dissolved within 15 minutes, dissolution profiles may be accepted as similar without further mathematical evaluation.

In case more than 85% is not dissolved at 15 minutes but within 30 minutes, at least three time points are required: the first time point before 15 minutes, the second one at 15 minutes and the third time point when the release is close to 85%.

For modified release products, the advice given in the relevant guidance should be followed.

Dissolution similarity may be determined using the  $f_2$  statistic as follows:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right]$$

In this equation  $f_2$  is the similarity factor,  $n$  is the number of time points,  $R(t)$  is the mean percent reference drug dissolved at time  $t$  after initiation of the study;  $T(t)$  is the mean percent test drug dissolved at time  $t$  after initiation of the study. For both the reference and test formulations, percent dissolution should be determined.

The evaluation of the similarity factor is based on the following conditions:

- A minimum of three time points (zero excluded)
- The time points should be the same for the two formulations
- Twelve individual values for every time point for each formulation
- Not more than one mean value of > 85% dissolved for any of the formulations.
- The relative standard deviation or coefficient of variation of any product should be less than 20% for the first point and less than 10% from second to last time point.

An  $f_2$  value between 50 and 100 suggests that the two dissolution profiles are similar.

When the  $f_2$  statistic is not suitable, then the similarity may be compared using model-dependent or model-independent methods e.g. by statistical multivariate comparison of the parameters of the Weibull function or the percentage dissolved at different time points.

Alternative methods to the  $f_2$  statistic to demonstrate dissolution similarity are considered acceptable, if statistically valid and satisfactorily justified.

The similarity acceptance limits should be pre-defined and justified and not be greater than a 10% difference. In addition, the dissolution variability of the test and reference product data should also be similar, however, a lower variability of the test product may be acceptable.

Evidence that the statistical software has been validated should also be provided.

A clear description and explanation of the steps taken in the application of the procedure should be provided, with appropriate summary tables.

## APPENDIX II

### Bioequivalence study requirements for different dosage forms

Although this guideline concerns immediate release formulations, Appendix II provides some general guidance on the bioequivalence data requirements for other types of formulations and for specific types of immediate release formulations.

When the test product contains a different salt, ester, ether, isomer, mixture of isomers, complex or derivative of an active substance than the reference medicinal product, bioequivalence should be demonstrated in *in vivo* bioequivalence studies. However, when the active substance in both test and reference products is identical (or contain salts with similar properties as defined in Appendix III, section III), *in vivo* bioequivalence studies may in some situations not be required as described below and in Appendix III.

#### Oral immediate release dosage forms with systemic action

For dosage forms such as tablets, capsules and oral suspensions, bioequivalence studies are required unless a biowaiver is applicable (see APPENDIX III). For orodispersible tablets and oral solutions specific recommendations apply, as detailed below.

##### *Orodispersible tablets*

An orodispersible tablet (ODT) is formulated to quickly disperse in the mouth. Placement in the mouth and time of contact may be critical in cases where the active substance also is dissolved in the mouth and can be absorbed directly via the buccal mucosa. Depending on the formulation, swallowing of the e.g. coated substance and subsequent absorption from the gastrointestinal tract also will occur. If it can be demonstrated that the active substance is not absorbed in the oral cavity, but rather must be swallowed and absorbed through the gastrointestinal tract, then the product might be considered for a BCS based biowaiver (see Appendix III). If this cannot be demonstrated, bioequivalence must be evaluated in human studies.

If the ODT test product is an extension to another oral formulation, a 3-period study is recommended in order to evaluate administration of the orodispersible tablet both with and without concomitant fluid intake. However, if bioequivalence between ODT taken without water and reference formulation with water is demonstrated in a 2-period study, bioequivalence of ODT taken with water can be assumed.

If the ODT is a generic/hybrid to an approved ODT reference medicinal product, the following recommendations regarding study design apply:

- if the reference medicinal product can be taken with or without water, bioequivalence should be demonstrated without water as this condition best resembles the intended use of the formulation. This is especially important if the substance may be dissolved and partly absorbed in the oral cavity. If bioequivalence is demonstrated when taken without water, bioequivalence when taken with water can be assumed.
- if the reference medicinal product is taken only in one way (e.g. only with water), bioequivalence should be shown in this condition (in a conventional two-way crossover design).
- if the reference medicinal product is taken only in one way (e.g. only with water), and the test product is intended for additional ways of administration (e.g. without water), the conventional and the new method should be compared with the reference in the conventional way of administration (3 treatment, 3 period, 6 sequence design).

In studies evaluating ODTs without water, it is recommended to wet the mouth by swallowing 20 ml of water directly before applying the ODT on the tongue. It is recommended not to allow fluid intake earlier than 1 hour after administration.

Other oral formulations such as orodispersible films, buccal tablets or films, sublingual tablets and chewable tablets may be handled in a similar way as for ODTs. Bioequivalence studies should be conducted according to the recommended use of the product.



**Oral solutions**

If the test product is an aqueous oral solution at time of administration and contains an active substance in the same concentration as an approved oral solution, bioequivalence studies may be waived. However if the excipients may affect gastrointestinal transit (e.g. sorbitol, mannitol, etc.), absorption (e.g. surfactants or excipients that may affect transport proteins), *in vivo* solubility (e.g. co-solvents) or *in vivo* stability of the active substance, a bioequivalence study should be conducted, unless the differences in the amounts of these excipients can be adequately justified by reference to other data. The same requirements for similarity in excipients apply for oral solutions as for Biowaivers (see Appendix III, Section IV.2 Excipients).

In those cases where the test product is an oral solution which is intended to be bioequivalent to another immediate release oral dosage form, bioequivalence studies are required.

**Fixed combination dosage forms**

Bioequivalence requirements are covered in the “Guideline on Clinical Development of Fixed Combination Medicinal Products”. The possibility for a biowaiver of Fixed Combination Medicinal Products is addressed in Appendix III section V.

**Non-oral immediate release dosage forms with systemic action**

This section applies to e.g. rectal formulations. In general, bioequivalence studies are required. A biowaiver can be considered in the case of a solution which contains an active substance in the same concentration as an approved solution and with the same qualitative and similar quantitative composition in excipients (conditions under oral solutions may apply in this case).

**Parenteral solutions**

Bioequivalence studies are generally not required if the test product is to be administered as an aqueous intravenous solution containing the same active substance as the currently approved product. However, if any excipients interact with the drug substance (e.g. complex formation), or otherwise affect the disposition of the drug substance, a bioequivalence study is required unless both products contain the same excipients in very similar quantity and it can be adequately justified that any difference in quantity does not affect the pharmacokinetics of the active substance.

In the case of other parenteral routes, e.g. intramuscular or subcutaneous, and when the test product is of the same type of solution (aqueous or oily), contains the same concentration of the same active substance and the same excipients in similar amounts as the medicinal product currently approved, bioequivalence studies are not required. Moreover, a bioequivalence study is not required for an aqueous parenteral solution with comparable excipients in similar amounts, if it can be demonstrated that the excipients have no impact on the viscosity.

**Liposomal, micellar and emulsion dosage forms for intravenous use**

- **Liposomal formulations:** Pharmacokinetic issues related to liposomal formulations for iv administration require special considerations which are not covered by the present guideline.
- **Emulsions:** emulsions normally do not qualify for a biowaiver. However, emulsion formulations may be considered eligible for a biowaiver where:
  - (a) the drug product is not designed to control release or disposition
  - (b) the method and rate of administration is the same as the currently approved product

In these cases, the composition should be qualitatively and quantitatively the same as the currently approved emulsion and satisfactory data should be provided to demonstrate very similar physicochemical characteristics, including size distribution of the dispersed lipid phase, and supported by other emulsion characteristics considered relevant e.g. surface properties, such as Zeta potential and rheological properties.

- **Lipids for intravenous parenteral nutrition** may be considered eligible for a biowaiver if satisfactory data are provided to demonstrate comparable physicochemical characteristics. Differences in composition may be justified taking into consideration the nature and the therapeutic purposes of such dosage forms.



- **Micelle forming formulations:** micelle solutions for intravenous administration may be regarded as ‘complex’ solutions and therefore normally do not qualify for a biowaiver. However, micelle formulations may be considered eligible for a biowaiver where:
  - (a) rapid disassembly of the micelle on dilution occurs and the drug product is not designed to control release or disposition
  - (b) the method and rate of administration is the same as the currently approved product
  - (c) the excipients do not affect the disposition of the drug substance.

In these cases, the composition of the micelle infusion, immediately before administration, should be qualitatively and quantitatively the same as that currently approved and satisfactory data should be provided to demonstrate similar physicochemical characteristics. For example, the critical micelle concentration, the solubilisation capacity of the formulation (such as Maximum Additive Concentration), free and bound active substance and micelle size.

This also applies in case of minor changes to the composition quantitatively or qualitatively, provided this does not include any change of amount or type of surfactants.

#### **Modified release dosage forms with systemic action**

##### ***Modified release oral and transdermal dosage forms***

Bioequivalence studies are required in accordance with the guideline on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation) (CPMP/EWP/280/96).

##### ***Modified release intramuscular or subcutaneous dosage forms***

For suspensions or complexes or any kind of matrix intended to delay or prolong the release of the active substance for im or sc administration, demonstration of bioequivalence follows the rules for extra vascular modified release formulations, e.g. transdermal dosage forms as per corresponding guideline.

#### **Locally acting locally applied products**

For products for local use (after oral, nasal, pulmonary, ocular, dermal, rectal, vaginal etc. administration) intended to act at the site of application, recommendations can be found in other guidelines (CPMP/EWP/4151/00 rev 1, CPMP/EWP/239/95).

A waiver of the need to provide equivalence data may be acceptable in the case of solutions, e.g. eye drops, nasal sprays or cutaneous solutions, if the test product is of the same type of solution (aqueous or oily), and contains the same concentration of the same active substance as the medicinal product currently approved. Minor differences in the excipient composition may be acceptable if the relevant pharmaceutical properties of the test product and reference product are identical or essentially similar. Any qualitative or quantitative differences in excipients must be satisfactorily justified in relation to their influence on therapeutic equivalence. The method and means of administration should also be the same as the medicinal product currently approved, unless otherwise justified.

Whenever systemic exposure resulting from locally applied, locally acting medicinal products entails a risk of systemic adverse reactions, systemic exposure should be measured. It should be demonstrated that the systemic exposure is not higher for the test product than for the reference product, i.e. the upper limit of the 90% confidence interval should not exceed the upper bioequivalence acceptance limit 125.00.

#### **Gases**

If the product is a gas for inhalation, bioequivalence studies are not required.

## APPENDIX III

### BCS-based Biowaiver

#### I. Introduction

The BCS (Biopharmaceutics Classification System)-based biowaiver approach is meant to reduce *in vivo* bioequivalence studies, *i.e.*, it may represent a surrogate for *in vivo* bioequivalence. *In vivo* bioequivalence studies may be exempted if an assumption of equivalence in *in vivo* performance can be justified by satisfactory *in vitro* data.

Applying for a BCS-based biowaiver is restricted to highly soluble drug substances with known human absorption and considered not to have a narrow therapeutic index (see section 4.1.9). The concept is applicable to immediate release, solid pharmaceutical products for oral administration and systemic action having the same pharmaceutical form. However, it is not applicable for sublingual, buccal, and modified release formulations. For orodispersible formulations the BCS-based biowaiver approach may only be applicable when absorption in the oral cavity can be excluded.

BCS-based biowaivers are intended to address the question of bioequivalence between specific test and reference products. The principles may be used to establish bioequivalence in applications for generic medicinal products, extensions of innovator products, variations that require bioequivalence testing, and between early clinical trial products and to-be-marketed products.

#### II. Summary Requirements

BCS-based biowaiver are applicable for an immediate release drug product if

- the drug substance has been proven to exhibit high solubility and complete absorption (BCS-class I; for details see section III) and
- either very rapid (> 85 % within 15 min) or similarly rapid (85 % within 30 min ) *in vitro* dissolution characteristics of the test and reference product has been demonstrated considering specific requirements (see section IV.1) and
- excipients that might affect bioavailability are qualitatively and quantitatively the same. In general, the use of the same excipients in similar amounts is preferred (see section IV.2).

BCS-based biowaiver are also applicable for an immediate release drug product if

- the drug substance has been proven to exhibit high solubility and limited absorption (BCS-class III; for details see section III) and
- very rapid (> 85 % within 15 min) *in vitro* dissolution of the test and reference product has been demonstrated considering specific requirements (see section IV.1) and
- excipients that might affect bioavailability are qualitatively and quantitatively the same and other excipients are qualitatively the same and quantitatively very similar (see section IV.2).

Generally the risks of an inappropriate biowaiver decision should be more critically reviewed (e.g. site-specific absorption, risk for transport protein interactions at the absorption site, excipient composition and therapeutic risks) for products containing BCS class III than for BCS class I drug substances.

#### III. Drug Substance

Generally, sound peer-reviewed literature may be acceptable for known compounds to describe the drug substance characteristics of importance for the biowaiver concept.

Biowaiver may be applicable when the active substance(s) in test and reference products are identical. Biowaiver may also be applicable if test and reference contain different salts provided that both belong to BCS-class I (high solubility and complete absorption; see sections III.1 and III.2). Biowaiver is not applicable when the test product contains a different ester, ether, isomer, mixture of isomers, complex or derivative of an active substance from that of the reference product, since these differences may lead to different bioavailabilities not deducible by means of experiments used in the BCS-based biowaiver concept.

The drug substance should not belong to the group of 'narrow therapeutic index' drugs (see section 4.1.9 on narrow therapeutic index drugs).

### III.1 Solubility

The pH-solubility profile of the drug substance should be determined and discussed. The drug substance is considered highly soluble if the highest single dose administered as immediate release formulation(s) is completely dissolved in 250 ml of buffers within the range of pH 1 – 6.8 at 37±1 °C. This demonstration requires the investigation in at least three buffers within this range (preferably at pH 1.2, 4.5 and 6.8) and in addition at the pKa, if it is within the specified pH range. Replicate determinations at each pH condition may be necessary to achieve an unequivocal solubility classification (e.g. shake-flask method or other justified method). Solution pH should be verified prior and after addition of the drug substance to a buffer.

### III.2 Absorption

The demonstration of complete absorption in humans is preferred for BCS-based biowaiver applications. For this purpose complete absorption is considered to be established where measured extent of absorption is ≥ 85 %. Complete absorption is generally related to high permeability.

Complete drug absorption should be justified based on reliable investigations in human. Data from

- absolute bioavailability or
- mass-balance

studies could be used to support this claim.

When data from mass balance studies are used to support complete absorption, it must be ensured that the metabolites taken into account in determination of fraction absorbed are formed after absorption. Hence, when referring to total radioactivity excreted in urine, it should be ensured that there is no degradation or metabolism of the unchanged drug substance in the gastric or intestinal fluid. Phase 1 oxidative and Phase 2 conjugative metabolism can only occur after absorption (i.e. cannot occur in the gastric or intestinal fluid). Hence, data from mass balance studies support complete absorption if the sum of urinary recovery of parent compound and urinary and faecal recovery of Phase 1 oxidative and Phase 2 conjugative drug metabolites account for ≥ 85 % of the dose.

In addition highly soluble drug substances with incomplete absorption, i.e. BCS-class III compounds, could be eligible for a biowaiver provided certain prerequisites are fulfilled regarding product composition and *in vitro* dissolution (see also sect. IV.2 Excipients). The more restrictive requirements will also apply for compounds proposed to be BCS class I but where complete absorption could not convincingly be demonstrated.

Reported bioequivalence between aqueous and solid formulations of a particular compound administered via the oral route may be supportive as it indicates that absorption limitations due to (immediate release) formulation characteristics may be considered negligible. Well performed *in vitro* permeability investigations including reference standards may also be considered supportive to *in vivo* data.

## IV. Drug Product

### IV.1 *In vitro* Dissolution

#### IV.1.1 General aspects

Investigations related to the medicinal product should ensure immediate release properties and prove similarity between the investigative products, i.e. test and reference show similar *in vitro* dissolution under physiologically relevant experimental pH conditions. However, this does not establish an *in vitro/in vivo* correlation. *In vitro* dissolution should be investigated within the range of pH 1 – 6.8 (at least pH 1.2, 4.5, and 6.8). Additional investigations may be required at pH values in which the drug substance has minimum solubility. The use of any surfactant is not acceptable.

Test and reference products should meet requirements as outlined in section 4.1.2 of the main guideline text. In line with these requirements it is advisable to investigate more than one single batch of the test and reference products.



Comparative *in vitro* dissolution experiments should follow current compendial standards. Hence, thorough description of experimental settings and analytical methods including validation data should be provided. It is recommended to use 12 units of the product for each experiment to enable statistical evaluation. Usual experimental conditions are e.g.:

- Apparatus: paddle or basket
- Volume of dissolution medium: 900 ml or less
- Temperature of the dissolution medium: 37±1 °C
- Agitation: paddle apparatus - usually 50 rpm  
basket apparatus - usually 100 rpm
- Sampling schedule: e.g. 10, 15, 20, 30 and 45 min
- Buffer: pH 1.0 – 1.2 (usually 0.1 N HCl or SGF without enzymes), pH 4.5, and pH 6.8 (or SIF without enzymes); (pH should be ensured throughout the experiment; Ph.Eur. buffers recommended)
- Other conditions: no surfactant; in case of gelatin capsules or tablets with gelatin coatings the use of enzymes may be acceptable.

Complete documentation of *in vitro* dissolution experiments is required including a study protocol, batch information on test and reference batches, detailed experimental conditions, validation of experimental methods, individual and mean results and respective summary statistics.

#### IV.1.2 Evaluation of *in vitro* dissolution results

Drug products are considered 'very rapidly' dissolving when more than 85 % of the labelled amount is dissolved within 15 min. In cases where this is ensured for the test and reference product the similarity of dissolution profiles may be accepted as demonstrated without any mathematical calculation.

Absence of relevant differences (similarity) should be demonstrated in cases where it takes more than 15 min but not more than 30 min to achieve almost complete (at least 85 % of labelled amount) dissolution.  $F_2$ -testing (see App. I) or other suitable tests should be used to demonstrate profile similarity of test and reference. However, discussion of dissolution profile differences in terms of their clinical/therapeutical relevance is considered inappropriate since the investigations do not reflect any *in vitro/in vivo* correlation.

#### IV.2 Excipients

Although the impact of excipients in immediate release dosage forms on bioavailability of highly soluble and completely absorbable drug substances (i.e., BCS-class I) is considered rather unlikely it can not be completely excluded. Therefore, even in the case of class I drugs it is advisable to use similar amounts of the same excipients in the composition of test like in the reference product.

If a biowaiver is applied for a BCS-class III drug substance excipients have to be qualitatively the same and quantitatively very similar in order to exclude different effects on membrane transporters.

As a general rule, for both BCS-class I and III drug substances well-established excipients in usual amounts should be employed and possible interactions affecting drug bioavailability and/or solubility characteristics should be considered and discussed. A description of the function of the excipients is required with a justification whether the amount of each excipient is within the normal range. Excipients that might affect bioavailability, like e.g. sorbitol, mannitol, sodium lauryl sulfate or other surfactants, should be identified as well as their possible impact on

- gastrointestinal motility
- susceptibility of interactions with the drug substance (e.g. complexation)
- drug permeability
- interaction with membrane transporters

Excipients that might affect bioavailability should be qualitatively and quantitatively the same in the test product and the reference product.

#### V. Fixed Combinations (FCs)

BCS-based biowaiver are applicable for immediate release FC products if all active substances in the FC belong to BCS-class I or III and the excipients fulfil the requirements outlined in section IV.2. Otherwise *in vivo* bioequivalence testing is required.

## Anexo II: Publicaciones

1. Moreno I, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T and Abad-Santos F. Utility of Pilot Studies for Predicting Ratios and Intra-subject Variability in High Variability Drugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016 Jan 25. doi: 10.1111/bcpt.12558. [Epub ahead of print]. PMID: 26806812
2. Moreno I, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T and Abad-Santos F. Effect of Truncating AUC at 12, 24 and 48 hr When Evaluating the Bioequivalence of Drugs with a Long Half-Life. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016 Jan;118(1):53-7. doi: 10.1111/bcpt.12432. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26086613
3. Cabaleiro T, Ochoa D, Román M, Moreno I, López-Rodríguez R, Novalbos J and Abad-Santos F. Polymorphisms in CYP2D6 have a greater effect on variability of risperidone pharmacokinetics than gender. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015 Feb;116(2):124-8. doi: 10.1111/bcpt.12286. Epub 2014 Jul 25. PMID: 24975366