



Gli studi di bioequivalenza: cenni di statistica (*)

INTRODUZIONE

La **Statistica** è una scienza i cui principi si basano sulla teoria delle probabilità e che si propone come scopo quello di sintetizzare e descrivere i dati rilevati su un campione (Statistica descrittiva) e di fornire i metodi per generalizzare i risultati forniti da un campione all'intera popolazione (Statistica inferenziale).

Per poter estendere, con ragionevole certezza, i dati ottenuti dal trattamento di un relativamente piccolo numero di soggetti all'intera popolazione di potenziali pazienti, si fa ricorso all'analisi statistica.

Il confronto statistico dell'efficacia terapeutica di due prodotti medicinali contenenti la stessa sostanza attiva è uno strumento critico per valutare la possibilità di utilizzare alternativamente un prodotto medicinale attivo e un qualsiasi prodotto essenzialmente simile.

I dati farmacocinetici possono essere utilizzati, al posto dei risultati terapeutici, per stabilire l'equivalenza fra due prodotti (la bioequivalenza), assumendo che, in uno stesso soggetto, un "uguale" andamento temporale della concentrazione plasmatica di sostanza attiva comporti una "uguale" concentrazione di sostanza nel sito di azione e, pertanto, un "uguale" effetto.

E' noto infatti che per dimostrare l'efficacia e la sicurezza terapeutica di un nuovo farmaco è necessario sperimentarlo su centinaia di soggetti e la sperimentazione richiede mesi, mentre dimostrare la bioequivalenza rispetto ad un farmaco di efficacia e sicurezza note richiede un numero molto inferiore di soggetti e tempi molto più brevi.

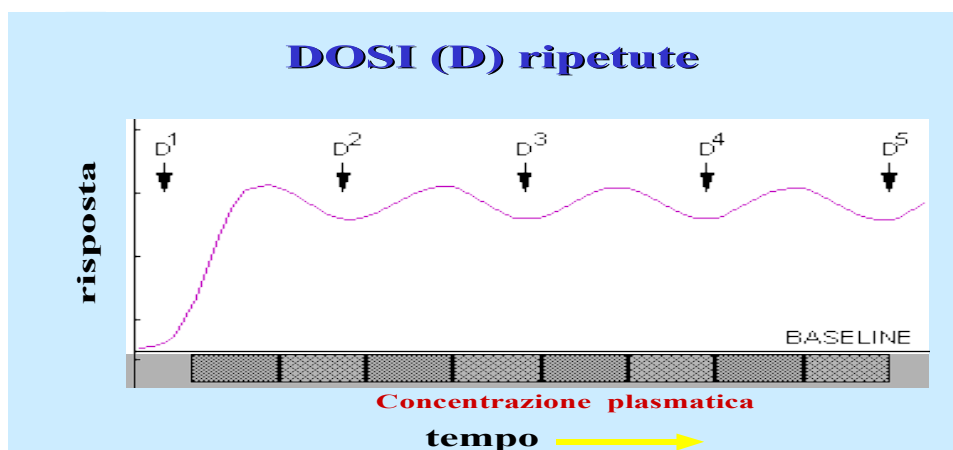
Per i **prodotti a rilascio immediato**, lo studio di bioequivalenza consiste nel trattare in dose singola volontari sani con il prodotto "generico" e con il prodotto "originale", nel misurare i livelli ematici o plasmatici o urinari del prodotto immodificato e degli eventuali metaboliti attivi e nel valutare statisticamente l'equivalenza dei parametri farmacocinetici osservati o calcolati dalle concentrazioni misurate.

(*) = Depositato presso il MinSal in data 01.10.03

Per i **prodotti a rilascio modificato**, oltre allo studio in dose singola, che potrà essere allargato per valutare l'eventuale influenza del cibo, può essere necessario effettuare uno studio in dose ripetuta fino al raggiungimento dello stato stazionario (Fig. 1); anche in tal caso si dovranno misurare i livelli ematici o plasmatici o urinari del prodotto immodificato e degli eventuali metaboliti attivi.

Figura 1: rappresentazione dei livelli ematici allo steady state

DEFINIZIONI



Equivalenza farmaceutica: prodotti medicinali sono farmaceuticamente equivalenti se contengono la stessa quantità della stessa sostanza attiva nel medesimo dosaggio. Equivalenza farmaceutica non significa necessariamente bioequivalenza poiché differenze negli eccipienti e/o nel processo di preparazione possono portare ad un più veloce o più lento assorbimento.

Biodisponibilità: con tale termine si intende l'entità e la velocità con le quali il principio attivo è rilasciato da una forma farmaceutica ed è reso disponibile nella circolazione sistemica.

Bioequivalenza: due prodotti medicinali si dicono bioequivalenti se le loro biodisponibilità sono sostanzialmente "equivalenti"

Equivalenza terapeutica: un prodotto medicinale è terapeuticamente equivalente ad un altro se contiene lo stesso principio attivo e mostra la stessa efficacia e sicurezza d'impiego di quel prodotto, la cui efficacia e sicurezza sono già state dimostrate.

DISEGNO DI STUDI DI BIOEQUIVALENZA

Uno studio di bioequivalenza è uno studio di confronto di biodisponibilità, disegnato per verificare l'equivalenza fra un prodotto "generico" (Test) e un prodotto "originale" (Reference).

Lo studio dovrebbe essere disegnato in modo tale da permettere di poter distinguere l'effetto della formulazione da altri effetti (come ad esempio la variabilità individuale nell'assorbimento di un farmaco, con conseguente variabilità dei livelli plasmatici risultanti). Per ovviare alla grande variabilità di risposta tra un soggetto e l'altro nei livelli plasmatici, il disegno sperimentale suggerito per gli studi di bioequivalenza è il disegno **cross-over**.

Con tale disegno sperimentale i soggetti, che rappresentano un campione casuale della popolazione di interesse, ricevono le due formulazioni in periodi successivi.

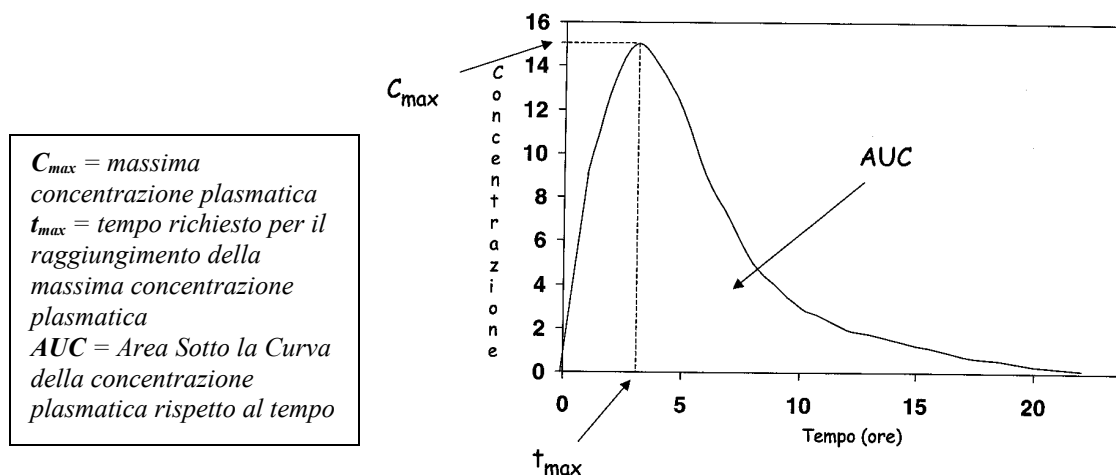
I soggetti vengono assegnati, in modo casuale (**randomizzazione**), a una delle sequenze di trattamento. Nel caso, per esempio, di due formulazioni, nel primo periodo di trattamento un gruppo di soggetti (in genere la metà dei soggetti in studio) riceve la formulazione "Test" mentre l'altro gruppo riceve la formulazione "Reference"; nel secondo periodo tutti i soggetti ricevono la formulazione che non hanno ricevuto nel primo periodo.

I due periodi sono, in genere, separati da un intervallo di "**wash out**", in cui si attende che la concentrazione plasmatica del farmaco assunto con il primo trattamento scenda a zero. La durata del periodo di wash out varia a seconda dell'emivita del farmaco.

I principali parametri di farmacocinetica, derivati dalla curva della concentrazione plasmatica nel tempo, che forniscono informazioni su entità e velocità di assorbimento e che quindi permettono di decidere circa la bioequivalenza delle formulazioni sono: **AUC**, **C_{max}** e, se ritenuto necessario per motivi di efficacia e sicurezza, **T_{max}**.

In Figura 2 è riportata una classica rappresentazione della curva delle concentrazioni plasmatiche in funzione del tempo, in cui sono indicati i principali parametri precedentemente citati, **AUC**, **C_{max}** e **T_{max}**.

Fig. 2: Curva concentrazione-tempo



Il piano di campionamento (tempi di prelievo ematico) dovrebbe essere studiato in modo tale da fornire una adeguata stima di C_{max} e T_{max} e, inoltre, dovrebbe essere tale da permettere di determinare almeno l'80% dell'AUC estrapolata all'infinito, per fornire una stima attendibile dell'entità dell'assorbimento.

Per le formulazioni a rilascio modificato, oltre ai parametri citati, occorrerebbe confrontare la fluttuazione delle concentrazioni in condizioni di stato stazionario (steady state)

Nota sulle discrepanze osservate tra i parametri Cmax e Tmax riportati in tabella e gli stessi ricavabili dal grafico:

Quasi sempre, negli studi di bioequivalenza, i valori tabulati di Cmax e Tmax sono superiori (a volte in modo rilevante) rispetto ai valori riportati sul grafico.

La ragione risiede nel fatto che il grafico viene ottenuto facendo la media dei valori misurati nei singoli soggetti a ciascun tempo (corrispondente a tutti i valori riportati su una riga di Tab. 1) mentre la tabella riassuntiva dei parametri farmacocinetici è ottenuta dalla media dei massimi valori per ciascun soggetto, quale che sia il tempo di rilevamento (corrisponde alla media di tutti i Cmax misurati nei diversi soggetti, i quali raggiungono il picco ematico in tempi che possono essere anche molto diversi).

Tabella 1: Valori ematici riscontrati in 7 successivi prelievi da 6 soggetti

tempi	Sogg. 1	Sogg. 2	Sogg. 3	Sogg. 4	Sogg. 5	Sogg. 6
1	X	X	X	X	X	X
2	X	Cmax	X	X	X	X
3	Cmax	X	X	X	Cmax	X
4	X	X	Cmax	X	X	Cmax
5	X	X	X	Cmax	X	X
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X

Quindi i valori riportati sul grafico sono sempre inferiori a quelli della tabella o, al massimo, possono essere uguali nel caso di una distribuzione molto uniforme, in cui tutti i soggetti raggiungano Cmax nello stesso tempo (ovvero tutti i valori Cmax si trovino allineati sulla stessa riga).

In presenza di dati molto variabili (ampio Coefficiente di Variazione) la discrepanza tra i due valori aumenta.

Lo stesso fenomeno si può evidenziare, per le stesse ragioni, con il parametro Tmax.

CALCOLO DELLA DIMENSIONE DEL CAMPIONE

Il quesito fondamentale che i ricercatori di qualsiasi ricerca clinica si devono porre al momento della pianificazione di uno studio è “Di quanti soggetti abbiamo bisogno per raggiungere l’obiettivo stabilito?”

Questo vale sia per le sperimentazioni cliniche destinate a dimostrare l'efficacia e la sicurezza di un nuovo farmaco sia per le prove di bioequivalenza perché, in entrambi i casi, si cerca di impiegare il minor numero possibile di soggetti, sia per motivi etici sia per contenere i costi della sperimentazione.

Per stabilire il numero di soggetti necessario a soddisfare i principali obiettivi scientifici di una ricerca ci si avvale di opportuni metodi statistici.

Il numero di soggetti richiesto per condurre uno studio dipende da:

- la **variabilità** associata alla principale caratteristica che deve essere studiata (per esempio l'AUC) stimata da uno studio pilota o da studi precedenti o da dati pubblicati, cioè la variabilità con cui la molecola del farmaco in studio viene assorbita, da soggetti umani diversi, anche quando rilasciata dalla medesima formulazione.

Maggiore è la variabilità, maggiore sarà il numero di soggetti da studiare.

- il **livello di significatività** desiderato (α -level; in genere 5%), ovvero, in questo caso, il rischio di sbagliare dichiarando erroneamente una bioequivalenza fra le due formulazioni non bioequivalenti.

- la **differenza attesa** fra le due formulazioni compatibile con una bioequivalenza (delta), di cui parleremo nel paragrafo successivo.

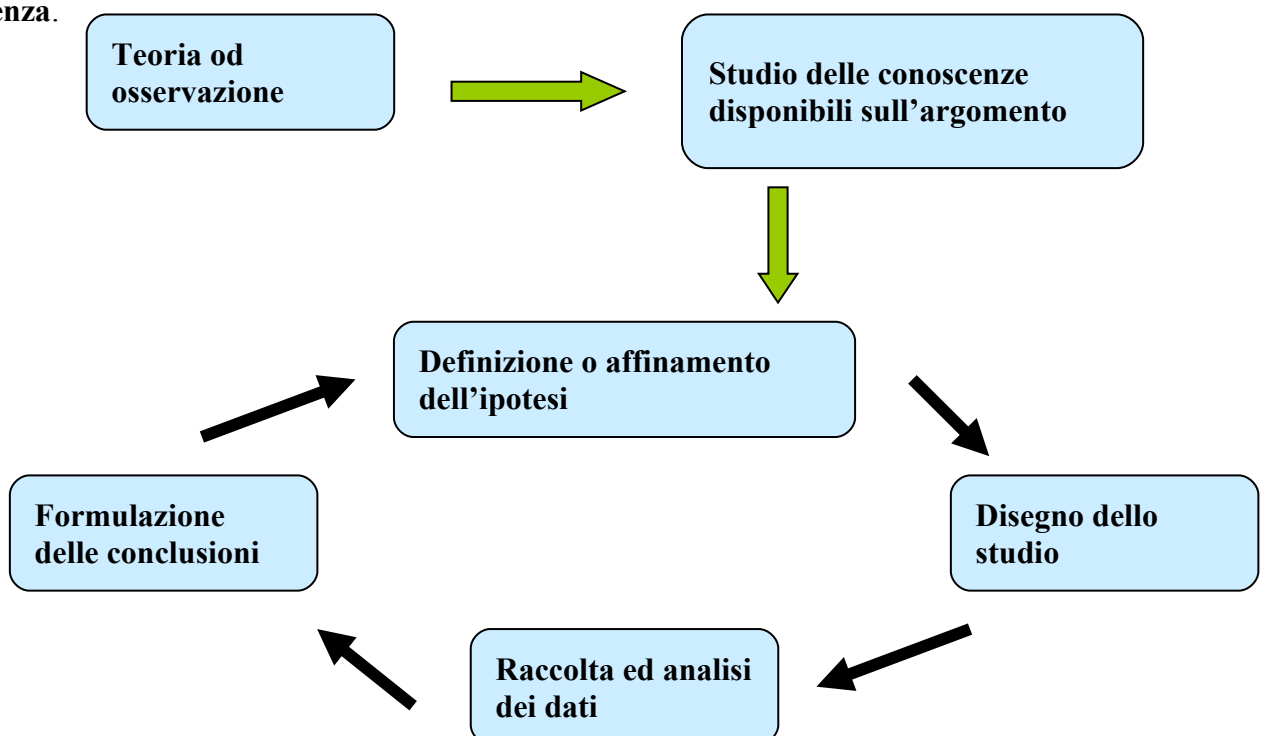
- il **potere** richiesto ($1-\beta$), ovvero la capacità del test statistico di scoprire (in questo caso) una bioequivalenza, se effettivamente presente (in genere 80%)

Inoltre, la dimensione del campione è direttamente correlata al tipo di analisi che s'intende condurre sui parametri farmacocinetici.

In generale, il numero di soggetti da valutare non dovrebbe essere inferiore a 12; in caso contrario, il numero di soggetti proposto dovrebbe essere adeguatamente giustificato.

ANALISI DEI DATI

Alla base di ogni elaborazione statistica si trova un'ipotesi che deve essere verificata. L'ipotesi di partenza è chiamata "ipotesi nulla" e indicata con H_0 . **Ogni analisi statistica viene impostata per verificare la validità dell'ipotesi nulla ovvero dell'ipotesi di partenza.**



Negli studi clinici in cui si è alla ricerca della differenza fra due trattamenti, si definisce una ipotesi nulla di non differenza fra due trattamenti, ovvero $H_0 : \mu_T = \mu_R$, dove μ_T è il valore medio del parametro considerato per il farmaco in esame, mentre μ_R è il valore medio dello stesso parametro per il farmaco di confronto e il test statistico ci indicherà la probabilità di sbagliare nel respingere l'ipotesi nulla (α -error ; rischio del consumatore). Esiste inoltre un errore opposto a quello di respingere l'ipotesi nulla, ovvero di accettarla come vera quando è falsa (β -error; rischio del produttore).

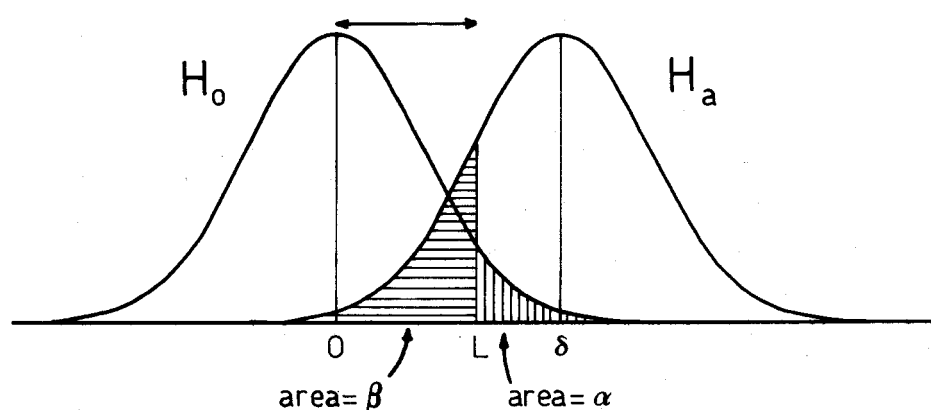


Fig. 3 : Ipotesi nulla (H_0) e alternativa (H_1)

Per gli studi di bioequivalenza, non è appropriato saggiare l'ipotesi nulla convenzionale di uguaglianza dei parametri ($H_0 : \mu_T = \mu_R$), cioè non è appropriato partire dal presupposto che il valore medio considerato per il farmaco in esame sia uguale al valore medio dello stesso parametro per il farmaco di riferimento poichè, da un punto di vista regolatorio, il rischio del produttore di rigettare erroneamente l'ipotesi nulla di bioequivalenza, cioè di non riuscire a dimostrare che i due farmaci sono bioequivalenti quando invece lo sono, è di interesse secondario.

Obiettivo primario è limitare il rischio del consumatore di assumere un farmaco ritenuto erroneamente bioequivalente ad un altro. Perciò, negli studi di bioequivalenza, l'ipotesi nulla (H_0) diventa :

$$H_0 : \mu_T/\mu_R \leq \theta_l \quad ; \quad \mu_T/\mu_R \geq \theta_u$$

L'ipotesi di partenza (ipotesi nulla) in uno studio di bioequivalenza è, quindi, che i due farmaci non siano bioequivalenti, cioè che il rapporto tra i valori medi dei parametri considerati sia al di fuori di un certo intervallo di valori (compresi fra θ_l , valore minimo, e θ_u , valore massimo).

Il valore di questo intervallo è stabilito dalle Agenzie Regolatorie nel modo che vedremo di seguito.

Introduciamo a questo scopo il concetto di **intervallo di confidenza** (Fig. 4).

L'intervallo di confidenza fornisce una stima attendibile dell'entità di una differenza, ovvero indica un intervallo di valori entro cui confidiamo (per esempio al 90%) cadrà la vera differenza fra i valori medi dei due prodotti a confronto. Ovviamente l'intervallo di confidenza rappresenta un parametro di fondamentale importanza soprattutto negli studi in cui la variabilità campionaria, derivante dall'osservazione di un piccolo numero di casi, può giocare un ruolo importante nell'interpretazione dei risultati.

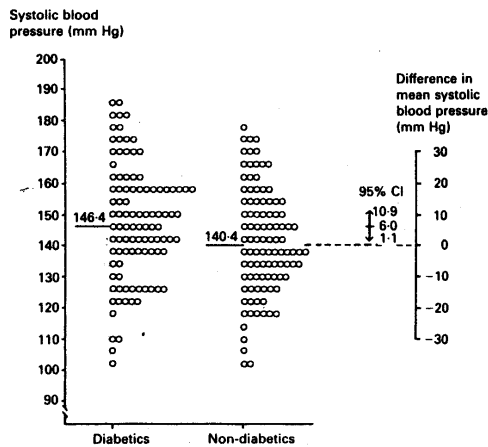


FIG 2.1—Systolic blood pressures in 100 diabetics and 100 non-diabetics with mean levels of 146.4 and 140.4 mm Hg respectively. The difference between the sample means of 6.0 mm Hg is shown to the right together with the 95% confidence interval from 1.1 to 10.9 mm Hg.

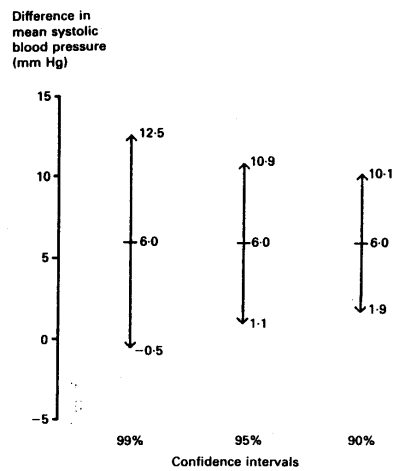


FIG 2.3—Confidence intervals associated with differing degrees of "confidence" using the same data as in fig 2.1.

Fig. 4: rappresentazione grafica dell'intervallo di confidenza 90%.

Il metodo statistico appropriato per valutare la bioequivalenza fra due prodotti è basato sull'intervallo di confidenza 90% per il rapporto delle medie (Test/Reference), per i parametri considerati.

Per costruire l'intervallo di confidenza 90%, i parametri farmacocinetici derivanti dalle misure di concentrazione (AUC e C_{max}) devono essere analizzati mediante Analisi della Varianza o ANOVA (ANalysis Of VAriance).

L'analisi statistica dovrebbe prendere in considerazione tutte le sorgenti di variazione che è ragionevole assumere avere un effetto sulla variabile analizzata (in genere: soggetti, periodi e trattamenti). Particolare attenzione dovrebbe essere prestata ad un eventuale effetto sequenza, ovvero all'eventualità che il primo periodo di trattamento abbia effetti sui risultati ottenuti nel secondo periodo. Questo in genere viene evitato grazie al periodo di wash out.



Per poter essere elaborati mediante ANOVA, i dati devono essere trasformati, nei corrispondenti valori logaritmici. Tale trasformazione risponde ad un rationale sia clinico che farmacocinetico che statistico, ovvero:

dal punto di vista **clinico**, lo scopo è conoscere il rapporto dei valori medi dei parametri dei prodotti “Test” e “Reference” μ_T/μ_R . Con la trasformazione logaritmica, gli intervalli di confidenza (costruiti in base all’ANOVA) si basano su rapporti anzichè su differenze fra i valori medi (infatti il logaritmo di un rapporto è uguale alla differenza fra i logaritmi).

Dal punto di vista **farmacocinetico**, occorre osservare che le equazioni che definiscono AUC e Cmax implicano termini che si introducono nel modello in modo moltiplicativo e sono funzioni del soggetto. La trasformazione logaritmica porta questi termini nell’equazione in modo additivo consentendo l’analisi mediante ANOVA, con l’ipotesi statistica che l’osservazione sia una funzione di effetti additivi dovuti al soggetto, al periodo e al trattamento.

Infine, dal punto di vista **statistico**, i dati di concentrazione, di AUC e Cmax, tendono ad essere asimmetrici (skewed) ovvero la curva che rappresenta la concentrazione plasmatica rispetto al tempo non è simmetrica, come la gaussiana riportata in Fig. 3, ma ha le caratteristiche della figura 1, e la loro varianza (variabilità) tende a crescere con il valore delle medie. La trasformazione rende le varianze indipendenti dal valore della media e la distribuzione di frequenza più simmetrica.

Al termine della valutazione statistica, per poter esprimere il giudizio finale relativamente all’equivalenza di Cmax e AUC, si effettua l’operazione inversa alla trasformazione logaritmica, ovvero si calcola l’antilogaritmo dei limiti di confidenza ottenuti per la differenza delle medie dei dati trasformati in logaritmo. Il valore viene utilizzato come indicato nel successivo paragrafo.

Per quanto riguarda i dati di Tmax, per i quali, al contrario dei valori di AUC e Cmax, è corretta l’assunzione di un modello additivo, non è richiesta la trasformazione logaritmica e l’analisi statistica dovrebbe essere eseguita mediante tecniche non parametriche.

CRITERI DI ACCETTABILITA’ ADOTTATI PER STABILIRE LA BIOEQUIVALENZA

Il criterio per stabilire se due formulazioni farmaceutiche possono essere considerate bioequivalenti è stabilito dalle Agenzie Regolatorie.

Inizialmente, era stato stabilito che due formulazioni (“generico”/Test e “originale”/Reference) potevano essere considerate bioequivalenti se la loro risposta media differiva non più di $\pm 20\%$ dalla risposta media della formulazione di riferimento, ovvero

$$0.80 < \mu_T/\mu_R < 1.20$$

dove μ_T e μ_R rappresentano i valori medi in scala originale delle due formulazioni (Test e Reference).

Come abbiamo visto una fluttuazione nei valori è comunque attesa, anche per un’identica formulazione, in funzione della variabilità biologica dei soggetti.



L'intervallo 0.8 – 1.20 garantisce che la formulazione “Test” non sia differente più del 20% rispetto alla formulazione “Reference” (ne' più, ne' meno), ma questo presuppone che una delle due formulazioni a confronto sia chiaramente identificata come “Reference” (denominatore del rapporto μ_T/μ_R). Questo punto è importante poiché il cambiare formulazione di riferimento (denominatore), potrebbe cambiare le conclusioni circa la bioequivalenza delle due formulazioni .

In contesti diversi dall'approvazione di farmaci generici, in cui non sia possibile identificare chiaramente quale sia la formulazione “Reference” (per esempio, in studi di interazione con il cibo in cui la stessa formulazione viene somministrata in condizioni di “digiuno” e “non digiuno” e quindi risulta arbitraria la scelta della formulazione “Reference”), è stato stabilito che l'intervallo corretto da utilizzare sia 0.80-1.25, ovvero:

$$0.80 < \mu_T/\mu_R < 1.25$$

Questo intervallo risulta **simmetrico**, nel senso che $(0.8)^{-1}$ (o $1/0.8$) = 1.25, per cui $\log(0.8) = -\log(1.25)$. In questo modo la conclusione relativa all'esistenza o meno di una bioequivalenza non dipende dalla scelta della formulazione posta al denominatore del rapporto.

Per motivi di “armonizzazione” e' stato deciso che anche per gli studi su farmaci generici venga accettato l'intervallo 0.80-1.25.

Negli studi di bioequivalenza quindi, gli intervalli di accettabilità per i principali parametri farmacocinetici sono:

AUC-ratio (rapporto tra AUC): l'intervallo di confidenza 90% del rapporto dei valori medi di AUC dovrebbe essere contenuto entro l'intervallo 0.80-1.25.

In casi specifici, potrebbe essere accettabile un intervallo più stretto, ma solo in casi rari, e solo in presenza di valida giustificazione clinica, potrebbe essere accettabile un intervallo più largo.

C_{max}-ratio (rapporto tra C_{max}): l'intervallo di confidenza 90% del rapporto dei valori medi di C_{max} dovrebbe essere contenuto entro l'intervallo 0.80-1.25.

Anche per questo parametro, in casi particolari, l'intervallo accettabile potrebbe essere più largo (es. 0.70-1.43) in considerazione del fatto che singoli valori di concentrazione, specie se estremi come il C_{max}, hanno una variabilità maggiore rispetto a quella dell'AUC.

Altri: la valutazione statistica del T_{max} ha senso se vi è una richiesta rilevante dal punto di vista clinico per un rilascio rapido o per una rapida azione, in relazione al timore di eventi avversi. L'intervallo di confidenza non parametrico 90%, della differenza dei T_{max}, dovrebbe essere contenuto entro un range definito in relazione alle esigenze cliniche.

Per eventuali altri parametri, valgono le considerazioni fatte in precedenza.



QUANDO NON E' NECESSARIO DIMOSTRARE LA BIOEQUIVALENZA

La dimostrazione della bioequivalenza non è richiesta dalle Autorità Regolatorie nei casi in cui sia certo che la formulazione non influenza l'assorbimento del principio attivo o nei casi in cui l'assorbimento sistemico non costituisca il presupposto per l'attività farmacologica (uso topico). In particolare:

- forme farmaceutiche orali a rilascio immediato contenenti un principio attivo molto solubile in acqua e con elevato margine di sicurezza
- prodotti da somministrare per via parenterale costituiti da soluzioni con la stessa concentrazione di principio attivo nel medesimo solvente
- soluzioni per uso orale (sciroppi etc...)
- polveri da ricostituire e somministrare come soluzioni
- gas
- prodotti topici non destinati all'assorbimento sistemico
- prodotti che differiscono soltanto per la quantità di principio attivo contenuto, quando la farmacocinetica del principio attivo sia lineare, ovvero l'assorbimento aumenti proporzionalmente alla dose.

Note sull'Autore

Il dr Antonio COLANTONI è nato a Trezzo sull'Adda (MI) nel 1957.

Si è laureato in Fisica con indirizzo Applicativo-Nucleare presso l'Università degli studi di Milano nel 1982 e ha frequentato fino al 1990 la Scuola di Specializzazione in Statistica Medica della Facoltà di Medicina dell'Università degli Studi di Milano.

Negli anni successivi ha partecipato a corsi e seminari di statistica medica con particolare riferimento all'elaborazione statistica dei dati clinici e ha ricoperto l'incarico di "Biostatistics Manager" nel Dipartimento di Biostatistica/Data Management di un'Azienda Farmaceutica multinazionale. Attualmente è libero professionista

e svolge attività di consulente nell'ambito dell'industria farmaceutica, per gli aspetti riguardanti l'Analisi Statistica e la Gestione Dati di Studi clinici e non.