

Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos

Biowaiver studies (in vitro) to establish equivalence of drugs

Iván Saavedra S.¹ / Victor Iturriaga V.²

Luz Ávila M.³ / Luis Quiñones S.⁴

Resumen

En el presente trabajo se hace un análisis de los conceptos, normativas y propuestas sobre la equivalencia terapéutica de medicamentos similares con respecto a los innovadores, desde una perspectiva internacional y nacional, explicando las bases científicas de los estudios de bioexención *in vitro* para determinar la intercambiabilidad de aquellos medicamentos similares provenientes de diferentes fuentes que se han liberado de los estudios de bioequivalencia (*in vivo*). Además, se presentan algunos resultados de estudios de test de disolución para dar a conocer la metodología usada en la bioexención y se detallan los requisitos para aprobar un Centro de Bioequivalencia *in vitro*.

Palabras clave: bioequivalencia, intercambiabilidad de medicamentos, bioexención.

Abstract

In this review, the concepts, guidelines and proposals regarding the determination of therapeutic equivalence of similar drug products are analyzed from a national and international point of view. The scientific background of the *in vitro* biowaiver studies that may result in the interchangeability of multisource drug product that have been waived from the demonstration of *in vivo* bioequivalence studies is also explained. In order to explain the methods in biowaiver studies, results of dissolution kinetics are shown as well as the requirements to approve an *in vitro* biopharmaceutic center

Key words: bioequivalence, drugs interchangeability, biowaiver.

Recibido el 25 de mayo de 2011. Aceptado el 30 de junio de 2011.

- 1 Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Programa de farmacología Molecular y Clínica, ICBM y Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. Correspondencia a: isaavedr@med.uchile.cl
- 2 Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Programa de farmacología Molecular y Clínica, ICBM y Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- 3 Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Programa de farmacología Molecular y Clínica, ICBM y Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- 4 Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Programa de farmacología Molecular y Clínica, ICBM y Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

INTRODUCCIÓN

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) el acceso a los medicamentos se ha convertido actualmente en una parte del derecho de salud fundamental para el ser humano, ya que éstos desempeñan un papel crucial en muchos aspectos de la atención de salud¹; sin embargo, millones de pacientes del mundo no tienen acceso a ellos, ya sea por su alto costo, por la falta de profesionales o servicios capacitados para su prescripción, falta de dispensación, o por vivir en lugares apartados¹.

Para mejorar el acceso en términos económicos, ha surgido el "medicamento genérico" que corresponde a aquel medicamento similar que ha demostrado a través de estudios de bioequivalencia, poseer la misma calidad en términos tanto de seguridad, como de eficacia respecto al medicamento innovador y que su dispensación es autorizada una vez caducada la patente de este último (*Enmienda Hatch-Waxman, Estados Unidos de Norteamérica, 1984; Declaración relativa al Acuerdo sobre los ADPIC y la Salud Pública, adoptada por la Conferencia Ministerial de la Organización Mundial del Comercio, Doha-Qatar, 2001*)^{2,3}.

Desde el año 2004, nuestro país se encuentra en un proceso de implementación y aplicación de una "política de genéricos bioequivalentes" (*Política Nacional de Medicamentos, Resolución N° 515, Ministerio de salud, Diario Oficial, 2 de Abril, 2004*). Esta política obliga a la realización de estudios de bioequivalencia *in vivo* o de bioexención *in vitro* a alrededor de 80 principios activos dosificados en formas farmacéuticas orales sólidas de liberación convencional (*Resolución Exenta N° 5937, Ministerio de Salud, 2009*)^{4,6}. Este listado ha sido acordado sobre la base del riesgo sanitario, entre otros aspectos. En el presente trabajo se aborda la bioexención a los estudios de bioequivalencia de medicamentos *in vitro*, desde la perspectiva de su definición, fundamento científico, objetivos, normativa nacional y procedimientos experimentales. Además se muestran los resultados de 2 trabajos específicos de bioexención y la forma de obtener la certificación para instalar un laboratorio de evaluación de equivalencia terapéutica *in vitro*, de acuerdo a la norma Chilena⁵.

En las tres últimas décadas, la prueba de control de calidad de medicamentos sólidos denominada test de disolución, se convirtió en una poderosa herramienta para la caracterización de la calidad de productos farmacéuticos de administración oral⁷⁻¹⁰. Actualmente se usa además, con ciertas modificaciones, como subrogado de una prueba de equivalencia terapéutica para ciertas categorías de productos farmacéuticos de administración oral provenientes de múltiples fuentes de fabricación^{9,10}. Para estos productos (similares) se utilizan perfiles comparativos de disolución y los perfiles del producto farmacéutico innovador, a diferencia de los estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y clínicos comparativos los cuales se realizan *in vivo*, con el motivo de documentar la equivalencia terapéutica entre el producto farmacéutico similar y el producto farmacéutico innovador, monofuente, que posee estudios clínicos y farmacéuticos, tomado como patrón de comparación⁷⁻¹⁰.

EL CONCEPTO DE LA BIOEXENCIÓN

Un estudio de bioexención es la alternativa al estudio de bioequivalencia *in vivo* por medio de la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro* para un grupo de fármacos que cumplen los requisitos señalados por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB o BCS en inglés), propuesto por el Profesor Gordon Amidon y Col., en 1995¹¹. La prueba consiste en el estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre el producto farmacéutico similar y el producto farmacéutico innovador pudiendo además, utilizar la correlación *in vitro/in vivo* para indicar el desempeño de productos farmacéuticos similares en situaciones particulares¹². En la práctica este método presenta ventajas sobre los estudios *in vivo*, como su menor variabilidad, facilidad de control y mayores probabilidades de detectar diferencias entre dos productos farmacéuticos, si es que existen¹². Además, no utiliza humanos para el estudio, hecho que elimina la posibilidad de efectos tóxicos en los voluntarios por reacciones adversas a medicamentos (RAM). También es más rápido y barato.

CORRELACIÓN *IN VITRO/IN VIVO*

Existen dos definiciones principales para la correlación *in vitro/in vivo* (CIVIV). La primera de ellas es aportada por la Administración Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA en inglés) y la define como un modelo matemático predictivo que describe la relación entre las propiedades *in vitro* de una forma farmacéutica de dosificación oral (por lo general la velocidad y el grado de disolución del fármaco o su liberación) y la respuesta *in vivo* correspondiente (por ejemplo, las concentraciones plasmáticas del fármaco o la cantidad del fármaco absorbido)¹³. La segunda definición, aportada por la Farmacopea de Estados Unidos (U. S. Farmacopeia o USP en inglés) que la define como el establecimiento cuantitativo de una relación entre una propiedad biológica o parámetro derivado de esta, producido por la forma de dosificación del producto farmacéutico y una propiedad fisicoquímica o característica de la misma forma de dosificación¹³. Las propiedades biológicas más comúnmente usadas son los parámetros C_{max} y/o el ABC (área bajo la curva, en inglés AUC) y la propiedad fisicoquímica más comúnmente usada es el perfil de disolución *in vitro*¹³. El tipo de análisis se realiza preferentemente en formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata (FFSO-LI)¹³.

El exitoso desarrollo y aplicación de la correlación *in vitro/in vivo*, requiere que la disolución o liberación del fármaco desde su forma farmacéutica sea el paso limitante en la secuencia que conduce a la absorción del fármaco en la circulación sistémica¹³. Una correcta aplicación de la correlación *in vitro/in vivo* puede lograr sustituir un estudio de bioequivalencia *in vivo* por un estudio de bioexención *in vitro*¹³.

NIVELES DE CORRELACIÓN

Según lo descrito por la FDA existen 4 niveles de correlación *in vitro/in vivo*, siendo estos los niveles A, B, C y el nivel C múltiple¹³.

1) Nivel A:

Es el nivel más alto de correlación y representa punto a punto la correlación directa entre la velocidad de entrada *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo*¹³. Para llevar a cabo este tipo de correlación, se hace una comparación de la fracción de fármaco absorbida *in vivo*, respecto a la fracción de fármaco disuelta *in vitro*, pudiendo relatar por completo el perfil de disolución *in vitro*, a partir de los datos del perfil de concentración *in vivo* y así mismo, la disolución *in vitro* puede servir como sustituto del comportamiento *in vivo*¹³. (Figura N° 1, A).

2) Nivel B:

Este nivel de correlación utiliza herramientas estadísticas para comparar los parámetros referentes a la velocidad de disolución *in vitro* y los parámetros referentes a los datos *in vivo*, pero los datos son utilizados en forma resumida al derivarlos por medio de una integración sencilla, no dando correlaciones punto a punto¹³. Por esta razón, este nivel de correlación, tan solo sirve para fines regulatorios y no refleja el comportamiento *in vivo*¹³. (Figura N° 1, B).

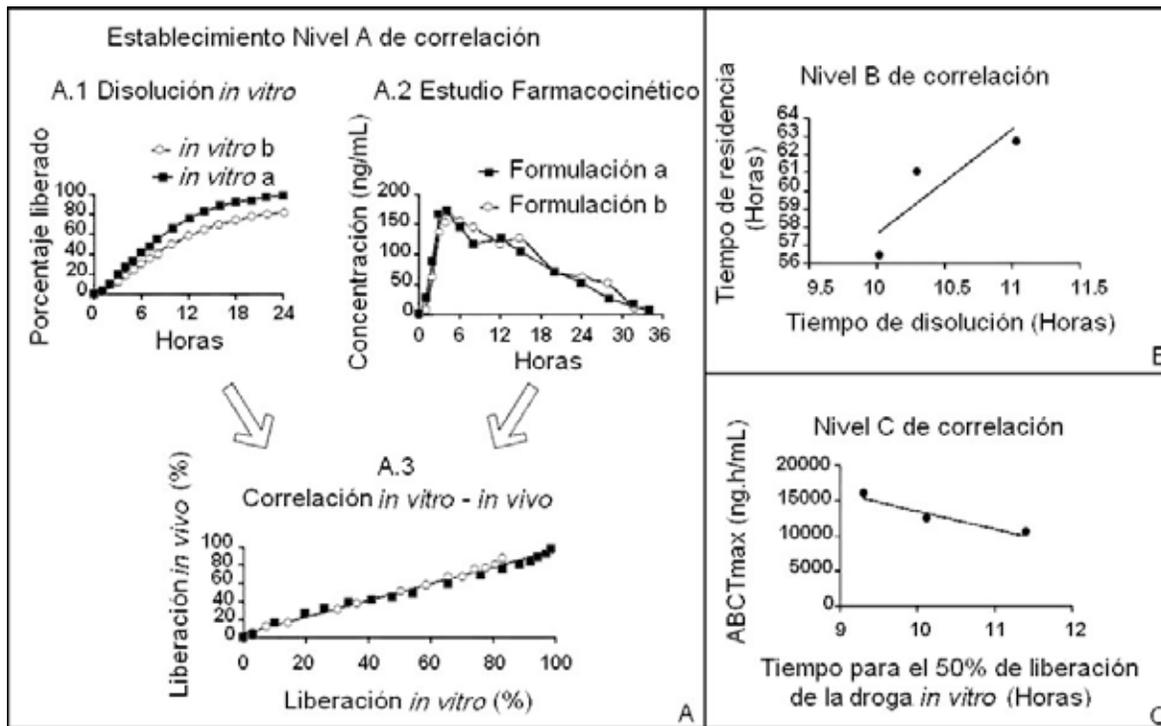
3) Nivel C:

El nivel de correlación C establece un solo punto de correlación entre el parámetro de disolución *in vitro* y el parámetro *in vivo*, por lo cual no refleja el comportamiento *in vivo*¹³. (Figura N° 1, C).

4) Nivel C múltiple:

Sin embargo, múltiples niveles de correlación C extienden el punto de nivel de correlación C solitario, a varios parámetros tanto *in vivo*, como *in vitro*, relacionados al tiempo de liberación del principio activo y los puntos del perfil de disolución¹³. Debido a esto, puede servir de la misma manera que el nivel de correlación A, para reflejar el comportamiento *in vivo* de un medicamento¹³.

FIGURA N°1:
Niveles de correlación *in vitro/in vivo*



A.- Esquema del desarrollo de una correlación *in vitro/in vivo* para el fármaco oxprenolol (Oros®) por inyección en bolus intravenoso y comprimidos de liberación inmediata en un estudio cruzado [A.1.- Perfil acumulativo de disolución *in vitro*; A.2.- Perfil de concentración/tiempo *in vivo* de un estudio farmacocinético; A.3.- Correlación *in vitro/in vivo*]¹³. B.- Desarrollo de nivel B de correlación *in vitro/in vivo* de un fármaco antiepiléptico¹³. C.- Desarrollo de nivel C de correlación *in vitro/in vivo* de un fármaco antiepiléptico¹³.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICO Y CORRELACIÓN *IN VITRO/IN VIVO*

El sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), es un marco para clasificar los fármacos según su solubilidad acuosa en diferentes pH y permeabilidad intestinal¹³. Aquí, una correlación *in vitro/in vivo* es probable cuando la disolución de la forma farmacéutica es el paso limitante y el principio activo posee alta permeabilidad¹³. Existen 4 grupos o clases de fármacos, siendo estos los de clase I, II, III y IV. Los fármacos del sistema de clasificación biofarmacéutico clase I poseen una alta solubilidad y una alta permeabilidad, pudiendo, en base a la consideración de ser contenidos en una forma farmacéutica de liberación inmediata, ser liberados en el estómago¹³. Para esta situación, la absorción gástrica puede ser alterada por el vaciamiento gástrico, en cuyo caso, este

es considerado el paso limitante, debido a que este proceso no se considera en la prueba *in vitro*¹³. Cuando la tasa de disolución *in vivo* es rápida en relación al vaciamiento gástrico y el principio activo posee una alta absorción intestinal, es probable que la disolución *in vitro* no refleje adecuadamente la absorción, por lo que no se puede establecer una correlación *in vitro/in vivo* para compuestos de clase I¹³.

Los compuestos del sistema de clasificación biofarmacéutico clase II poseen una baja solubilidad y una alta permeabilidad, pudiendo ser que en este caso, la absorción esté limitada por la velocidad de disolución. Por lo tanto, para esta clase de principios activos, es probable que se pueda establecer una correlación *in vitro/in vivo*¹³.

Los compuestos del sistema de clasificación biofarmacéutico clase III, poseen una alta solubilidad y

una baja permeabilidad, siendo, en este caso, similares a los compuestos de clase I, donde la liberación del principio activo no se encuentra limitada por la tasa de disolución, por lo cual una correlación *in vitro/in vivo* puede no ser requerida, a menos que la disolución de la forma farmacéutica del medicamento sea un proceso mas lento que la permeabilidad intestinal del principio activo contenido¹³.

Los compuestos del sistema de clasificación biofarmacéutico de clase IV, poseen una baja solubilidad y una baja permeabilidad, por lo cual una correlación *in vitro/in vivo* es improbable¹³.

SOLUBILIDAD, PERMEABILIDAD Y CINÉTICA DE LIBERACIÓN-DISOLUCIÓN DE ACUERDO A LA NORMA CHILENA

Las clasificaciones según solubilidad, permeabilidad y cinética de liberación-disolución son importantes a la hora de establecer los criterios de bioexención según el SCB y deben manejarse adecuadamente ya que éstas fundamentan la metodología a aplicar. Según la guía técnica Chilena, la clasificación de los principios activos de acuerdo a su solubilidad considera la mayor concentración posológica del producto de liberación inmediata como objeto de la solicitud de una bioexención¹⁴⁻¹⁶. Ejemplo de esto sería, si un principio activo se encuentra en forma de comprimidos de 500 mg, 850 mg y 1.000 mg en una FFSO-LI, ese principio activo se considera altamente soluble cuando la mayor concentración posológica (1.000 mg) es soluble en 250 mL o menos, en un medio acuoso con valores de pH comprendidos entre 1 y 6,8¹⁴⁻¹⁶.

La clasificación de los principios activos de acuerdo a su permeabilidad considera indirectamente la medida de la absorción (fracción de la dosis absorbida, no la biodisponibilidad sistémica) de un principio activo en el ser humano y directamente las mediciones de la velocidad de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana¹⁶. En este sentido, ya que lo buscado es una técnica *in vitro*, se propone como alternativa la utilización de sistemas no humanos capaces de predecir la medida de absorción de un fármaco en el ser humano (por ejemplo, cultivo de células epiteliales *in vitro*)¹⁶. Al haber ausencia de

evidencia que sugiera inestabilidad en el sistema gastrointestinal, se considera que el principio activo es altamente permeable cuando se establece que la fracción absorbida de la dosis administrada en seres humanos es del 90% o más, basándose en una determinación del balance de masa o en la comparación con una dosis de referencia intravenosa¹⁶.

Finalmente, en relación a la cinética de liberación-disolución de las FFSO, los medicamentos se clasifican según sean de liberación-disolución rápida o lenta¹⁶. Como se ha citado anteriormente, si la liberación-disolución *in vivo* es rápida respecto al vaciamiento gástrico y el principio activo posee alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y cantidad de fármaco absorbido dependan de la liberación-disolución y/o el tiempo de tránsito gastrointestinal del principio activo¹⁶. Bajo estas circunstancias la demostración de equivalencia terapéutica *in vivo* puede no ser necesaria para los principios activos pertenecientes al SCB clase I, siempre considerando que los excipientes de la forma farmacéutica o bien el proceso de fabricación no afecten significativamente la absorción de los principios activos¹⁶.

REGLAMENTACIÓN CHILENA

En Chile, para realizar un estudio de bioexención en un medicamento contenido en una forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata, este medicamento debe estar con su registro sanitario vigente en el Instituto de Salud Pública (ISP) y contener principios activos altamente solubles y altamente permeables. Además se debe avalar que la fabricación del producto farmacéutico similar se ha realizado siguiendo en forma estricta las Buenas Prácticas de Manufactura y el cumplimiento de las especificaciones de calidad del producto en estudio en 3 lotes del producto. Se debe describir brevemente el proceso de manufactura utilizado para fabricar el producto farmacéutico en estudio. También, se debe proporcionar un listado de los excipientes utilizados, explicando la cantidad utilizada y sus funciones en la formulación. El producto farmacéutico innovador utilizado para la comparación debe ser de muy rápida o de rápida liberación-disolución y el producto en estudio debe ser de similares características, debiendo ser ambos específicamente equivalentes farmacéuticos¹⁶. Tanto el producto farmacéutico similar como el innovador

deben ser analizados de acuerdo a la técnica ya sea Aparato I o Aparato II^{16, 17}. También, pueden solicitarse bioexenciones para cambios significativos posteriores a la aprobación del registro de un producto FFSO-LI, pero en consideración de que el producto anterior y posterior al cambio sean equivalentes farmacéuticos¹⁶.

En el caso de productos farmacéuticos cuyas formulaciones sean proporcionalmente similares a otro producto, cuya equivalencia terapéutica haya sido demostrada mediante un estudio *in vivo*, se consideran formulaciones proporcionalmente similares en base a la potencia de la forma farmacéutica¹⁶. Dentro de estas se pueden definir a las siguientes formulaciones:

- a) Productos farmacéuticos, en que el principio activo y los excipientes se encuentran en las mismas proporciones, en las diferentes potencias (por ejemplo, un comprimido de potencia de 50 mg, contiene todos los ingredientes activos e inactivos exactamente en un 50% con respecto a un comprimido de 100 mg de potencia y el doble de un comprimido de 25 mg de potencia)¹⁶.
- b) Productos farmacéuticos que contengan principios activos muy activos farmacológicamente, cuya cantidad en la forma farmacéutica es relativamente baja (hasta 10 mg por unidad de dosificación), el peso total de la forma farmacéutica permanece prácticamente inalterado para todas las potencias (dentro de \pm el 10% del peso total), empleándose los mismos excipientes para todas las potencias y el cambio en la potencia se obtiene esencialmente cambiando la cantidad del fármaco¹⁶.

Es por esto, que en base a la proporcionalidad se deben cumplir requisitos extras para optar a la bioexención, siendo el primero de estos, que el producto similar a una potencia determinada debe haber demostrado ser bioequivalente a través de estudios *in vivo*, a la correspondiente potencia del producto de referencia¹⁶. El segundo requisito es que las otras potencias del producto similar deben ser proporcionalmente similares a la de la formulación que demostró ser bioequivalente con el respectivo producto de referencia¹⁶. Por último, el tercer requisito, es que los perfiles cinéticos de liberación-disolución de las potencias adicionales deben ser similares a la de la potencia que demostró

su bioequivalencia mediante un estudio *in vivo* (empleando factor de similitud f_2)¹⁶.

SITUACIONES EN LAS QUE NO SE APLICA LA BIOEXENCIÓN

Por todo lo analizado anteriormente, se puede entender que para la bioexención de un producto farmacéutico se deben cumplir una serie de requisitos los cuales ayudan a certificar la calidad del análisis realizado. Es por esto, que también existen situaciones específicas, en que no se puede aplicar una bioexención¹⁶. La primera de estas situaciones, es en el caso de medicamentos con ventanas terapéuticas estrechas¹⁶. Estos medicamentos, son aquellos que contienen principios activos sujetos a control de la concentración plasmática del fármaco (monitoreo terapéutico) o a monitoreo farmacodinámico y/o donde la información científico farmacológica disponible del principio activo, indica que presenta una ventana terapéutica estrecha¹⁶. En el segundo caso, tenemos los medicamentos de absorción en la cavidad oral, como los comprimidos sublinguales o bucales, entre otros¹⁶.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN ESTUDIOS DE BIOEXENCIÓN

Los procedimientos experimentales a realizarse resumen en la guía técnica G-BIOF 02¹⁶, publicada por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en base a normativas internacionales aportadas principalmente por la FDA y OMS, entre otras. Como se ha citado anteriormente, para demostrar la equivalencia terapéutica de un producto farmacéutico similar respecto a uno innovador (contenidos en una FFSO-LI) a través de un estudio de bioexención, se realizan estudios cinéticos de liberación-disolución, estudios de solubilidad y estudios de permeabilidad¹⁶. En el caso de la realización de la cinética de liberación-disolución, la metodología se aplica de acuerdo con los requisitos establecidos en farmacopeas oficiales como la USP (*Capítulos <711> y <1092> de USP 30, 2007*)¹⁶. Los estudios se realizan en un equipo "disolutor", pudiendo utilizar el Aparato USP I (canastillo), a 100 rpm o el Aparato USP II (paleta), a 75 rpm (dependiendo de la forma farmacéutica a analizar), a $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ ¹⁶. Cada muestra a analizar se lleva a un vaso del disolutor, el cual debe ser llenado previamente con

900 mL o menos del medio de disolución preparado y desaireado, a la temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{16}$. Se utilizan 3 medios diferentes de disolución, por lo cual el total de muestras requeridas para el estudio alcanza el número de 108 unidades individuales, tanto del producto farmacéutico similar, como del innovador (12 unidades individuales, de 3 lotes de fabricación diferentes, para cada uno de los 3 medios de disolución), necesitando un total de 216 unidades individuales entre el producto farmacéutico similar y el innovador¹⁶. La norma Chilena solo considera candidatos a bioexención a medicamentos con fármacos del SCB clase I y también algunos de clase II y clase III, pero el medio y tiempo de disolución puede presentar algunas diferencias mínimas dependiendo del tipo de fármaco¹⁶.

Para productos farmacéuticos en cuya formulación contengan principios activos de clase I y sean FFSO-LI, los medios de disolución establecidos son, HCl 0,1 N (pH 1,2) o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas; tampón pH 4,5 (acetato) y tampón pH 6,8 (fosfato) o Fluido Intestinal Simulado USP sin enzimas¹⁶. Aquí debe disolverse rápidamente no menos del 85% de la dosis del principio activo dentro de 15 minutos o menos (proceso de muy rápida disolución)¹⁶.

Para productos farmacéuticos en cuya formulación contengan principios activos de clase II, existe la exigencia que estos fármacos sean moléculas ácidos débiles con alta solubilidad a pH 6,8 y proceso de rápida disolución en los 3 medios de disolución ($\geq 85\%$ disuelto en 30 minutos), siempre que el principio activo tenga una razón dosis/solubilidad de 250 mL o menor a pH 6,8¹⁶. Los medios de disolución son los mismos que para los fármacos del SCB clase I, pero no necesariamente a pH 1,2 y pH 4,5, además el producto farmacéutico similar debe disolverse rápidamente a pH 6,8 y su perfil de disolución debe ser similar al del producto de referencia a pH 1,2; 4,5 y 6,8 bajo las condiciones ya descritas¹⁶. Adicionalmente, para este caso deben evaluarse los excipientes de acuerdo a su tipo y cantidad, debido a las posibles interferencias que podrían existir en la liberación del fármaco¹⁶.

Para productos farmacéuticos en cuya formulación contengan principios activos de clase III y sean de muy rápida disolución ($\geq 85\%$ disuelto en 15 minutos) en los 3 medios de disolución establecidos, no existe diferencia

significativa respecto a los de fármacos clase I y el criterio de análisis es similar, salvo la evaluación de los excipientes de acuerdo a su tipo y cantidad, debido a su posible interferencia en el proceso de liberación del fármaco¹⁶.

Luego de establecido el medio de disolución y adicionada la FFSO-LI a los vasos del disolutor, se lleva a cabo la toma de muestras, pero teniendo en cuenta que debe hacerse en un número suficiente de intervalos para caracterizar completamente el perfil de liberación-disolución del producto farmacéutico (por ejemplo, a los 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos de iniciado el proceso de disolución) y tratando en lo posible, que en cada toma de muestra se reponga el volumen del medio de disolución extraído, para así hacer más fácil el cálculo del porcentaje de fármaco disuelto¹⁶.

Finalmente, una vez tomadas las muestras, estas se filtran y se preparan para el análisis respectivo, que varía dependiendo del tipo de equipo instrumental utilizado para ello y luego, se comunica el porcentaje de fármaco disuelto a través de tabulaciones y representaciones gráficas de los perfiles de liberación-disolución¹⁶. En general, los datos obtenidos a partir de los estudios cinéticos, deberán adaptarse al ordenamiento que se muestra en las tablas del "Anexo II, F-BIOF 06, perteneciente al formulario F-BIOF 06¹⁶. Cabe considerar, que en el caso de requerir la utilización de agua para cualquier situación dada (por ejemplo, llenado del disolutor, preparación de fase móvil, medios de disolución, etcétera), esta debe ser siempre filtrada antes utilizando un sistema de filtración del tipo Milli-Q, evitando así alteración de los resultados por efecto de interferentes¹⁸.

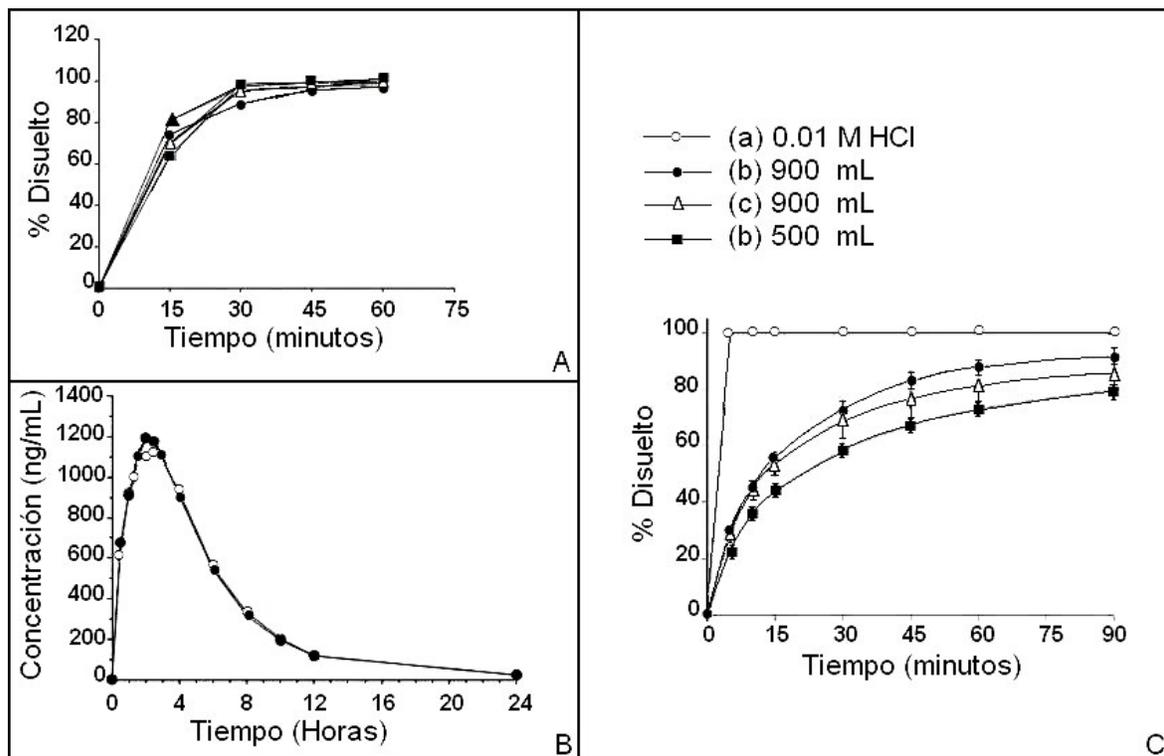
Debe tomarse en cuenta, que cuando se comparen los productos en estudio (similar e innovador), se deberá confrontar los perfiles cinéticos de liberación-disolución usando el factor de similitud f_2 (*Shah y col. 1998; Costa y Col. 2001*)¹⁶. El factor de similitud corresponde a la transformación logarítmica de la raíz cuadrada recíproca de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en el porcentaje de disolución entre las dos curvas obtenidas a partir de los datos del estudio¹⁶. Aquí, los dos perfiles se consideran similares o equivalentes, cuando el valor de f_2 es ≥ 50 ¹⁶. Para permitir el uso de datos promedio, el coeficiente de variación no deberá ser más del 20% en los puntos temporales más tempranos del perfil de liberación-disolución (por ejemplo, 10 minutos)

y no más del 10% en los demás puntos temporales del perfil¹⁶. Para el cálculo de f_2 se requiere un mínimo de tres puntos temporales, excluyendo el cero¹⁶. Un valor de f_2 de 50 o mayor (50-100) refleja la equivalencia de las dos curvas y por lo tanto, *expresaría un comportamiento in vivo similar*¹⁶. *Es importante destacar que cuando el principio activo contenido tanto en el producto farmacéutico similar, como en el innovador, se disuelve en un porcentaje del 85% o más de la cantidad declarada del fármaco a los 15 minutos o menos, utilizando los 3 medios de disolución recomendados, no es necesaria la comparación de perfiles con esta prueba, pero no exime de presentar los perfiles de disolución de los productos en estudio y comparador (Norma de EQT de Chile, 2005; WHO, 2006)*¹⁶.

C.-L. Cheng et al¹⁸, nos muestra un estudio de bioexención realizado en comprimidos de clorhidrato de metformina 500 mg (Glucofit®), utilizando comprimidos de Glucophage® 500 mg como producto referencia¹⁸. Aquí, se utilizó un equipo de espectrofotometría UV a 233 nm, para medir las concentraciones de principio activo disuelto en cada una de las muestras obtenidas luego de

la cinética de liberación-disolución¹⁸. Además, realizó de manera independiente un estudio de bioequivalencia *in vivo*, con los mismos productos farmacéuticos, generando mayor interés en sus resultados, ya que metformina está clasificada según el SCB como clase III, dándonos la posibilidad de comparar datos y realizar incluso una correlación *in vitro/in vivo*¹⁸. El estudio *in vitro*, arrojó que las dos formulaciones son bioequivalentes, ya que ambos perfiles de disolución coincidieron casi en su totalidad (Figura N°2, A), el producto farmacéutico similar liberó más del 89% del principio activo antes de los 30 minutos, con una variación de menos del 10% en cada punto medido y además el cálculo de f_2 entregó un valor mayor a 50¹⁸. El estudio de bioequivalencia *in vivo*, arrojó resultados que indican también, que ambas formulaciones son bioequivalentes, dando perfiles de concentración-tiempo marcadamente similares y superponibles casi en su totalidad, además de similares efectos clínicos (Figura N°2, B)¹⁸. Por lo cual el estudio demostró la capacidad de la bioexención como una herramienta necesaria y fiable, para certificar la bioequivalencia en medicamentos similares que contengan fármacos del SCB clase III.

FIGURA N°2:
Estudios de bioexención realizados por distintos investigadores



A.- Perfiles de disolución *in vitro*, para comprimidos (FFSO-LI) de metformina 500 mg de tipo innovadora y de tipo genérica, en HCl 0.1 N (○,●) y soluciones buffer pH 4.6 (□,■) y pH 6.8 (△,▲)¹⁸. **B.-** Perfiles de concentración/tiempo en plasma (*in vivo*) para metformina, en 12 voluntarios sanos, luego de la administración oral de 500 mg de una FFSO-LI de metformina innovadora (○) y metformina similar (●)¹⁸. **C.-** Comparación de perfiles de disolución usando el aparato 2 de la USP a 75 rpm¹⁹.

A. Okumu et al¹⁹, realizó un estudio de bioexención para una FFSO-LI que contenía el fármaco etoricoxib, usando medios computacionales (GastroPlus™) para luego justificar dicha bioexención¹⁹. Los resultados mostraron alta solubilidad en los distintos rangos de pH utilizados (medio ácido y solución amortiguadora de pH) y perfiles de disolución similares entre el producto farmacéutico similar e innovador (Figura N°2, C), además de una perfecta correlación entre el método computacional y los resultados reales, concluyendo que el programa computacional GastroPlus™ es un muy buen aporte científico para justificar las bioexenciones de algunos productos farmacéuticos¹⁹ y demostrando alternativamente al caso anterior la capacidad del estudio de bioexención para certificar bioequivalencia en productos farmacéuticos que contengan fármacos del SCB clase II.

Otro punto importante es la evaluación de la solubilidad del fármaco, pero en este caso la metodología aún se encuentra en revisión por parte del ISP, por lo cual no puede establecerse un método específico. Para determinar la solubilidad, se recomienda basar la selección de las condiciones de pH en las características de ionización del principio activo en estudio, en medio acuoso y a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, además debe utilizarse la mayor concentración posológica del producto farmacéutico y esta debe disolverse en un volumen \leq o igual a 250 mL del medio acuoso¹⁶. Por ejemplo, cuando el pKa de un fármaco se encuentra entre los valores 3 - 5, se deberá determinar la solubilidad a $\text{pH} = \text{pKa}$; $\text{pH} = \text{pKa} + 1$; $\text{pH} = \text{pKa} - 1$; $\text{pH} = 1$ y $\text{pH} = 6,8$ ¹⁶. Se recomienda un mínimo de tres mediciones de solubilidad en cada condición de pH¹⁶. Según la variabilidad del estudio es posible que sea necesario un mayor número de determinaciones para proveer un cálculo de solubilidad confiable¹⁶. En el caso de principios activos neutros, se recomienda

determinar la solubilidad a pH 6,8 y no realizar el perfil (por ejemplo, prednisona).

Para ser utilizadas en los estudios de solubilidad, se consideran apropiadas las soluciones amortiguadoras estándares descritas en el capítulo *Reactivos, Indicadores y Soluciones de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP, 2007)*¹⁶. Si estos tampones no resultaran apropiados por razones físicas o químicas, se tendría que utilizar otras soluciones tampones¹⁶. Se deberá verificar el pH de la solución después de agregar el principio activo al tampón¹⁶. El método a utilizar, es la tradicional agitación en un matraz (método Shake Flask), pudiéndose utilizar además, otros métodos con la justificación respectiva¹⁶. En el caso del método del matraz, se recomienda un mínimo de 12 horas de agitación para alcanzar la completa solubilización del principio activo¹⁶. Además, se debe incluir información pertinente a los métodos de prueba, respecto al principio activo (estructura química, peso molecular, naturaleza química, constantes de disociación, coeficientes de partición y distribución del fármaco)¹⁶. Los resultados deben presentarse de la misma manera que en el caso anterior, por medio de tablas y gráficas, siendo en este último caso, en la forma de un perfil de solubilidad *versus* pH.

Finalmente, en el caso de la evaluación de la permeabilidad del principio activo, la metodología también se encuentra en revisión por parte del ISP, por lo que se deben presentar resultados propios o bien antecedentes científicos válidos que respalden la alta permeabilidad del principio activo utilizado en la elaboración del producto farmacéutico en estudio¹⁶. En este sentido, se pueden utilizar dos tipos de métodos para documentar la permeabilidad. El primero de estos métodos, es por medio de estudios farmacocinéticos en seres humanos¹⁶. El segundo, es por medio de la evaluación de la permeabilidad directa, en la cual existen varios tipos de metodologías y en este sentido en función del método seleccionado, se debe entregar información que respalde la aptitud de dicho método¹⁶. Se debe entregar un listado de fármacos-modelo seleccionados junto con los resultados experimentales respecto de la cuantía de absorción en el ser humano, los valores de permeabilidad para cada fármaco-modelo, la clase de permeabilidad de cada fármaco-modelo y un trazado de la cuantía de la absorción como función

de la permeabilidad¹⁶. La información para respaldar la alta permeabilidad del principio activo en estudio debe incluir datos de la permeabilidad del principio activo específico del cual se solicita su bioexención, de los patrones internos utilizados, información sobre la estabilidad del fármaco en el fluido de perfusión, resultados experimentales que respalden el mecanismo de transporte pasivo donde sea pertinente y los métodos utilizados para establecer la permeabilidad del principio activo en estudio¹⁶. Es destacable el hecho de que el principio activo deba tener un mecanismo de transporte pasivo a través de las membranas biológicas. Esto es importante, ya que si recordamos el sistema de clasificación biofarmacéutico, dependiendo del tipo de clase de principio activo, el análisis podría arrojar resultados poco reales en relación a una prueba *in vivo*. Por ejemplo, en consideración de los compuestos de clase I, la absorción del fármaco es normal y no se afecta por aspectos biológicos como transportadores, interacción con alimentos o metabolismo, por lo cual no se presentarían problemas al momento de analizar principios activos de clase I y no habría variabilidad respecto a una prueba *in vivo*²⁰. En el caso de los principios activos de clase II, III y IV, si podría haber variabilidad por influencia de factores biológicos, haciendo que la prueba no fuera idónea²⁰. Por lo tanto, se hace evidente que para impedir que esto suceda y pueda ampliarse la prueba a una mayor cantidad de clases de principios activos, se cumpla el requerimiento del mecanismo de transporte pasivo.

REQUERIMIENTOS FUNDAMENTALES PARA LA CERTIFICACIÓN DE LABORATORIOS DE BIOEXENCIÓN EN CHILE

Para realizar pruebas de bioexención en Chile, el ISP debe certificar y autorizar el laboratorio¹⁶. El trámite consiste en completar una serie de formularios, anexos a dichos formularios y obtener las actas de inspección¹⁶. Los estudios deben realizarse en base a la guía técnica G-BIOF 02¹⁶ en la cual se establecen los requisitos de trabajo; espacio físico/instalaciones y equipamiento y trabajar dentro del marco de las buenas prácticas de laboratorio (BPL)¹⁶.

Para lograr la certificación, se debe completar el formulario F-BIOF 04, donde se hace referencia a

distintos requerimientos relacionados principalmente a la documentación sobre la capacidad operacional, espacio físico, equipamiento y de otros de tipo legal²¹. Además, deben estar presentes otros documentos de carácter específico, como son los Manuales de Aseguramiento de la Calidad y los Procedimientos Operativos Estándares (POEs), por área o etapa, según corresponda²¹. Posterior a esto, la documentación debe ser entregada al ISP, para la realización de una auditoría de parte de la entidad fiscalizadora al laboratorio solicitante, con el objetivo de verificar la información entregada. Esta auditoría se realiza utilizando el acta I-BIOF 02²² con el objetivo de verificar lo informado en el formulario F-BIOF 04²² y en base a esta auditoría el laboratorio puede o no certificarse.

Una vez certificado, se procede a crear por parte del laboratorio, un protocolo de estudio, el cual debe ser autorizado por el ISP¹⁶. Para esto se debe de completar la solicitud de protocolo del estudio denominada formulario F-BIOF 05 y una vez incorporada la información y documentación necesaria se debe presentar en el ISP¹⁶.

Si el protocolo es aprobado, se procede a realizar el estudio de bioexención y al finalizar, se presentan los resultados a través del formulario F-BIOF 06, el cual debe ser entregado en el ISP junto con la solicitud de revisión y todos los antecedentes anexos en los formatos preestablecidos (ANEXO II F-BIOF 06)¹⁶. Existe además la posibilidad de realizar estudios de bioexención en base a la proporcionalidad de la dosis, pudiendo para esto, presentar en el ISP el formulario F-BIOF 07²³. El ISP puede o no, aprobar un estudio de bioexención, que demuestre que el producto farmacéutico similar analizado sea equivalente o inequivalente terapéutico respecto al producto innovador, pudiendo el patrocinador, en caso de que su producto farmacéutico similar sea equivalente, solicitar al ISP la certificación correspondiente a *Producto genérico Intercambiable*¹⁶. Es importante destacar, que tanto la guía técnica, los formularios/anexos y actas requeridos pueden obtenerse directamente en las oficinas del ISP, como también pueden ser descargados desde la página web de dicha entidad, www.ispch.cl, en el link denominado "agencia reguladora/bioequivalencia", sección Estudios Biofarmacéuticos *In Vitro* para optar a bioexención. El listado de productos de referencia para los análisis

requeridos también puede obtenerse directamente en las oficinas del ISP, o bien en el mismo link de la página web nombrada.

REQUERIMIENTOS ESPECÍFICOS

Además de la documentación citada, existen algunos requerimientos específicos para realizar el estudio de bioexención, que no se encuentran detallados dentro de la certificación, pero a los que es importante hacer referencia⁵. El primer requerimiento hace énfasis en el equipamiento, limitándose a la cromatografía líquida de alta resolución (high-performance liquid chromatography, HPLC), cromatografía gaseosa (CG) o radioinmunoanálisis (RIA), pudiéndose emplear otras técnicas con estándar interno, pero explicando las razones de su utilización⁵. Todos los equipos a utilizar deben poseer certificaciones de instalación (IQ) y de funcionamiento (OQ) al día¹⁶.

Otros requerimientos de importancia son respecto del transporte de las muestras, usando contenedores adecuados para soportar temperatura y humedad; el almacenamiento en instalaciones adecuadas que indique tiempo e identificación de la muestra. Cabe resaltar que deben mantenerse muestras de reserva del producto en estudio y del producto de referencia, por al menos 5 años después de la fecha de aprobación del estudio o 5 años después de la fecha en que se completó el estudio (contra-muestra), además del registro de datos y documentación del estudio derivada, para cualquier análisis o requerimiento legal que corresponda⁵.

El último requerimiento es respecto a la aplicación de las de buenas prácticas de laboratorio (BPL) por un tema de seguridad que puede verse relacionado en parte al uso de sustancias químicas o biológicas y sus peligrosas propiedades para la salud humana, además de la explícita exigencia legal que constituye a las BPL como un set de reglas universales, las cuales no varían entre países²⁴. Las BPL se aplican mediante el diseño e implementación del Manual de Aseguramiento de la Calidad, el cual asegura el cuidado y la exactitud de la documentación, cubriendo todos los aspectos del estudio y del medio en que se desarrollan estos estudios, siendo la calidad e integridad los aspectos de

mayor importancia²⁴. Este manual nos ayuda a definir la estructura organizativa, las responsabilidades, los procedimientos, los procesos y los recursos necesarios que permitan cumplir con objetivos tan importantes como la prevención de riesgos, detección de desviaciones, corrección de fallas, mejora de eficiencia y reducción de costos, presentando de manera formal, resumida y sistemática los principios generales que deben orientar la administración de un laboratorio de bioexención, para garantizar la calidad e integridad de los resultados de los análisis, así como la confiabilidad asociada²⁵.

DISCUSIÓN

En nuestro país el acceso a los medicamentos es un problema de Salud Pública relacionado directamente a la dificultad en la adquisición de productos farmacéuticos de calidad, seguridad y eficacia certificada como son los medicamentos innovadores y algunos similares con estudios. De acuerdo a esto, se hace indispensable contar con medicamentos genéricos bioequivalentes y una política de intercambiabilidad basada en la evidencia científica experimental. El medicamento genérico bioequivalente mantiene las cualidades del medicamento innovador, en la mayoría de las veces con un precio menor, lo cual es óptimo para un paciente con recursos limitados o para los sistemas públicos de abastecimiento²⁶. En Chile existe hasta el momento tres centros certificado por el ISP para realizar estudios *in vivo* por lo que circulan pocos medicamentos con estudios de Bioequivalencia *in vivo*. Algunos de estos estudios se hicieron con anterioridad a la norma y otros son posteriores a ella; los últimos poseen certificación ISP, los anteriores no; pero los estudios son todos válidos ya que han sido realizados en el mismo Centro, con la misma calidad y con los mismos métodos y en muchos casos, publicados en revistas de categoría internacional. Los estudios *in vitro*, recién comienzan y son sólo 29 los principios activos que incorporados a medicamentos están en el listado del ISP para la bioexención. En general la mayoría de los medicamentos que se venden (80%) son similares sin estudios que los avalen y su eficacia y seguridad es criticable y dudosa^{6,27}. Chile se encuentra en un proceso de implementación y aplicación de una política de medicamentos genéricos bioequivalentes, proceso

que avanza lentamente hasta la fecha⁵. Esta política ha impuesto a los laboratorios farmacéuticos nacionales la obligatoriedad de los estudios de bioequivalencia y en caso de no cumplimiento, la aplicación de Sanciones que determine la reglamentación vigente. Por otro lado, también propone la posibilidad de la realización de estudios de bioexención a ciertos medicamentos que cumplan con los requerimientos necesarios y así eximirse de los estudios *in vivo*⁵.

Un estudio de bioexención, es un estudio de equivalencia *in vitro* y muchas veces puede servir como indicador del desempeño de algunos productos farmacéuticos similares, debiéndose sus mayores ventajas respecto al estudio *in vivo*, a la poca variabilidad que presenta en sus pruebas y análisis, lo cual lo hace idóneo a la hora de asegurar la equivalencia terapéutica bajo ciertas condiciones específicas. Además no es necesario el uso de voluntarios, eliminando así la exposición innecesaria a fármacos y el potencial riesgo asociado, es más barato y más rápido^{12, 13}. Las desventajas radican en el hecho de que no todos los principios activos innovadores han sido sometidos a estudios de correlación *in vitro/in vivo* y existe una gran cantidad de ellos, muy eficaces, en que sólo se puede establecer bioequivalencia mediante estudios *in vivo*^{12, 13}.

Como hemos señalado anteriormente, hasta el año 2010 la Autoridad Sanitaria ha certificado 1 sólo laboratorio para estudios de bioequivalencia *in vivo* y el país requiere por lo menos 8; ha certificado sólo 11 laboratorios de bioexención, los que lamentablemente en su mayoría pertenecen a las industrias farmacéuticas que realizarán estudios para sus propios productos sin la comprobación por parte de un externo. Además, la propaganda de estas industrias establece que están certificados para realizar estudios de "bioequivalencia", debiendo decir "bioequivalencia *in vitro*", lo cual confunde al cuerpo médico y farmacéutico. Es necesario por lo tanto certificar más laboratorios para estos estudios, especialmente aquellos como los que se encuentran en las Universidades, de modo que sirvan a un vasto campo de empresas más pequeñas que no tienen la capacidad para realizar sus estudios de bioequivalencia *in vitro* del listado de principios activos a quienes son exigibles estos estudios²⁸.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. *Como Desarrollar y Aplicar una Política Farmacéutica Nacional*. Organización Mundial de la Salud Ginebra; p.1-11. 2002.
2. Organización Mundial de la Salud. *Salud Pública, Innovación y Derechos de Propiedad Intelectual*. Comisión de Derechos de Propiedad Intelectual y Salud Pública, Organización Mundial de la Salud; p.1-188. 2006.
3. C. Correa. *Repercusiones de la Declaración de Doha relativa al Acuerdo sobre los ADPIC y la Salud Pública*. Organización Mundial de la Salud, Departamento de Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica; p.1-54. 2002.
4. República de Chile, Ministerio de Salud. *Norma que Establece los Productos de Referencia para los Estudios de Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos Monodroga de Liberación Inmediata*, Resolución Exenta N° 5937. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud; p.1-9. 2009.
5. República de Chile, Ministerio de Salud. *Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile*. Resolución Exenta n° 727/05. Unidad de Asuntos Farmacéuticos; p.2-45. 2005.
6. República de Chile, Ministerio de Salud. *Lista de principios activos contenidos en productos farmacéuticos que deben establecer equivalencia terapéutica mediante estudios *in vivo* o *in vitro**. Resolución Exenta n° 726/05. Unidad de Asuntos Farmacéuticos; p.2-6. 2005.
7. I. Saavedra, A. Saldaña, C. Ruminot. *Medicamentos Genéricos*. Cuad Méd Soc Chile; 46 (3): 205-211. 2006.
8. I. Saavedra. *Estudios de biodisponibilidad para establecer bioequivalencia de medicamentos*. Cuad Méd Soc Chile; 50 (1): 11-23. 2010.

9. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series, No. 937. World Health Organization Geneva; Annex 7: p.347-390, annex 8: p.391-435. 2006.
10. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations. Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services; p.1-23. 2003.
11. G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, J. R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*; 12: 413-420. 1995.
12. S. Chow, J. Liu. Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies. Chapman & Hall, Third Edition; 4 (14): p.451- 482, (15): p.483- 503. 2008.
13. D. M. Chilukuri, G. Sunkara, D. Young. (2007) Pharmaceutical Product Development: In Vitro-In Vivo Correlation. New York: Informa Health Care, 107-138.
14. Organización Panamericana de la Salud. Criterios científicos para los ensayos de bioequivalencia (in vivo e in vitro), las bioexenciones y las estrategias para su implementación. IV Conferencia Panamericana para la Armonización de la Reglamentación Farmacéutica; p.5-17. 2005.
15. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services; p.1-13. 2000.
16. República de Chile, Instituto de Salud Pública. Guía técnica G- BIOF 02: Bioexención de los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Departamento de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.4-53. 2007.
17. The United States Pharmacopeial Convention. USP30-NF25, The Official Compendia of Standards, vol. 1. U.S. Pharmacopeia. 1088: p.532-537, 1092: p.579-583. 2007.
18. C.-L. Cheng, L. X. Yu, H.-L. Lee, C.-Y. Yang, C.-S. Lue, C.-H. Chou. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility- low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *Eur J Pharm Sci*. 22: 297-304. 2004.
19. A. Okumu, M. DiMaso, R. Löbenberg. Computer Simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *Eur J Pharm Biopharm Sci*. 72: 91-98. 2009.
20. Chi-Yuan Wu, L. Z. Benet. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res*. 22 (1): 11-23. 2005.
21. República de Chile, Instituto de Salud Pública. Formulario F-BIOF04: Solicitud de autorización de centros biofarmacéuticos para realizar estudios in vitro para optar a una bioexención. Departamento de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.1-6. 2007.
22. República de Chile, Instituto de Salud Pública. I-BIOF 02: Acta de visita de inspección para la autorización de centros que realizan estudios para demostrar equivalencia terapéutica. Departamento de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.1-16. 2007.
23. República de Chile, Instituto de Salud Pública. Formulario F-BIOF 07: Presentación de resultados de estudios de bioexención en base a la proporcionalidad de la dosis. Departamento

- de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.1-5. 2007.*
24. Jürg P. Seiler. *Good Laboratory Practice, the Why and the How.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, European Union; p.1-7. 2005.
25. Organización Mundial de la Salud. *Guía para un Manual de Sistemas de Calidad de un Laboratorio de Prueba. Unidad de Suministro y Calidad de las Vacunas, Programa Mundial de Vacunas e Inmunización, Organización Mundial de la Salud Ginebra; p.5-29. 1999.*
26. Y. Carvajal. *Patentes farmacéuticas y acuerdos comerciales.* Cuad Méd Soc Chile; 49 (2): 111-122. 2009.
27. República de Chile, Instituto de Salud Pública. *Listado de productos equivalentes terapéuticos.* Departamento de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.1, 2. 2010.
28. República de Chile, Instituto de Salud Pública. *Listado de Centros en Chile autorizados por el ISP para la realización de estudios in vitro para optar a bioexención.* Departamento de Control Nacional/ Sub-departamento de seguridad/ Sección Biofarmacia; p.1- 4. 2010.