



Universita' degli Studi di Milano

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche



Tecnologia e Legislazione Farmaceutiche II - 9 CFU

slides Dott. Luca Palugan

Prof. Andrea Gazzaniga

STUDI DI BIOEQUIVALENZA

Bioequivalenza (BE) definita come una sorta di biodisponibilità (BA) relativa

**prodotto
di riferimento**

vs

prodotto test

preparati delle prove cliniche



forma di dosaggio da
mettere in mercato

medicinale di riferimento



medicinale generico

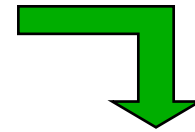
medicinale approvato



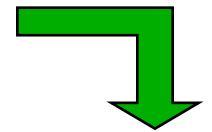
variazioni (formulative o di
processo) intervenute
dopo approvazione

Nello stesso soggetto:

effetti terapeutici simili

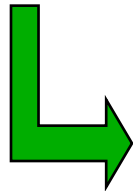


concentrazioni al sito d'azione simili



concentrazioni plasmatiche simili

Caratterizzazione forma di dosaggio



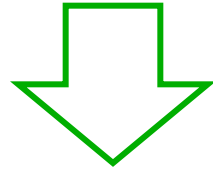
Predizione effetto terapeutico



Biodisponibilità conosciuta e riproducibile

Obiettivo: dimostrare la
bioequivalenza di 2 preparati

Obiettivo: dimostrare la bioequivalenza di 2 preparati



Two medicinal products are bioequivalent if they are pharmaceutically equivalent or pharmaceutical alternatives and **if their bioavailabilities** after administration in the same molar dose **are similar** to such degree that their effects, with respect to both efficacy and safety, will be essentially the same.

EMEA 2001



Obiettivo: dimostrare la bioequivalenza di 2 preparati



Bioequivalence means the **absence of a significant difference** in the rate and extent to which the active ingredient or active moiety in pharmaceutical equivalents or pharmaceutical alternatives becomes available at the site of drug action when administered at the same molar dose under similar conditions in an appropriately designed study.

FDA 2001

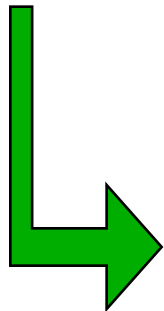


Obiettivo: dimostrare la bioequivalenza di 2 preparati



Bioequivalence means the **absence of a significant difference** in the rate and extent to which the active ingredient or active moiety in pharmaceutical equivalents or pharmaceutical alternatives becomes available at the site of drug action when administered at the same molar dose under similar conditions in an **appropriately designed study**.

FDA 2001



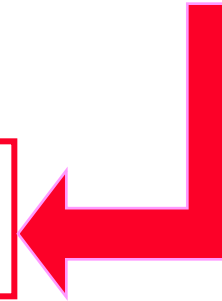
Studio di farmacocinetica

Qualche cenno di statistica

CONFRONTO TRA MEDIE

Ci si chiede se la **differenza tra le due medie non sia significativa**, ossia se si possa affermare che la differenza sia dovuta al '*caso*' e che non esista una reale diversità tra le medie delle due popolazioni da cui i campioni stessi derivano

test statistico adatto



CONFRONTO TRA MEDIE

test statistico adatto

**Confrontare
due medie**

ipotesi zero I_0 :
la differenza
è dovuta al caso

rifiutare o
non rifiutare
l'ipotesi zero?

**Test t
di Student**

... un po' di storia:



William S. Gosset (1876-1937)

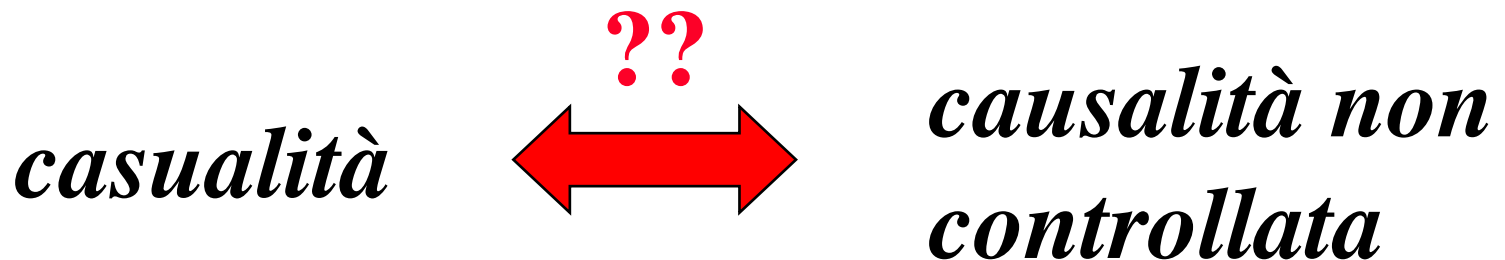
A Student of Statistics

Il test t venne sviluppato per identificare la migliore varietà di orzo da utilizzare per la produzione della "*stout*", la famosa birra scura.

CONFRONTO TRA MEDIE

Ci si chiede se la **differenza tra le due medie non sia significativa**, ossia se si possa affermare che la differenza sia dovuta al **'caso'** e che non esista una reale diversità tra le medie delle due popolazioni da cui i campioni stessi derivano

Una precisazione:



... la formula di calcolo per il valore t :

*differenza tra
le due medie*

$$t = \frac{m_a - m_b}{s / \sqrt{N}}$$

*deviazione
standard media*

*numero di
soggetti*

**il valore t calcolato va confrontato con quelli
tabulati al fine di stabilire se la differenza tra le
due medie sia significativa o meno**

Student's t Table

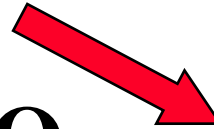
probabilità

*gradi
di
libertà*

df/p	0.40	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0005
1	0.324920	1.000000	3.077684	6.313752	12.70620	31.82052	63.65674	636.6192
2	0.288675	0.816497	1.885618	2.919986	4.30265	6.96456	9.92484	31.5991
3	0.276671	0.764892	1.637744	2.353363	3.18245	4.54070	5.84091	12.9240
4	0.270722	0.740697	1.533206	2.131847	2.77645	3.74695	4.60409	8.6103
5	0.267181	0.726687	1.475884	2.015048	2.57058	3.36493	4.03214	6.8688
6	0.264835	0.717558	1.439756	1.943180	2.44691	3.14267	3.70743	5.9588
7	0.263167	0.711142	1.414924	1.894579	2.36462	2.99795	3.49948	5.4079
8	0.261921	0.706387	1.396815	1.859548	2.30600	2.89646	3.35539	5.0413
9	0.260955	0.702722	1.383029	1.833113	2.26216	2.82144	3.24984	4.7809
10	0.260185	0.699812	1.372184	1.812461	2.22814	2.76377	3.16927	4.5869
11	0.259556	0.697445	1.363430	1.795885	2.20099	2.71808	3.10581	4.4370
12	0.259033	0.695483	1.356217	1.782288	2.17881	2.68100	3.05454	4.3178
13	0.258591	0.693829	1.350171	1.770933	2.16037	2.65031	3.01228	4.2208
14	0.258213	0.692417	1.345030	1.761310	2.14479	2.62449	2.97684	4.1405
15	0.257885	0.691197	1.340606	1.753050	2.13145	2.60248	2.94671	4.0728
16	0.257599	0.690132	1.336757	1.745884	2.11991	2.58349	2.92078	4.0150
17	0.257347	0.689195	1.333379	1.739607	2.10982	2.56693	2.89823	3.9651
18	0.257123	0.688364	1.330391	1.734064	2.10092	2.55238	2.87844	3.9216
19	0.256923	0.687621	1.327728	1.729133	2.09302	2.53948	2.86093	3.8834
20	0.256743	0.686954	1.325341	1.724718	2.08596	2.52798	2.84534	3.8495
25	0.256060	0.684430	1.316345	1.708141	2.05954	2.48511	2.78744	3.7251
30	0.255605	0.682756	1.310415	1.697261	2.04227	2.45726	2.75000	3.6460
inf	0.253347	0.674490	1.281552	1.644854	1.95996	2.32635	2.57583	3.2905

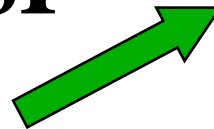
$t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$  differenza statisticamente significativa

NO



Ipotesi 0 (I_0)

SI



$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$  differenza statisticamente **NON** significativa

Come sempre avviene, i risultati di un test statistico non hanno un valore di assoluta e matematica certezza, ma soltanto di probabilità. Pertanto, la decisione di respingere l'ipotesi zero (presa sulla base del test statistico) è **probabilmente** giusta, ma potrebbe essere errata. La misura di questo rischio di cadere in errore si chiama:


LIVELLO DI SIGNIFICATIVITÀ DEL TEST

LIVELLO DI SIGNIFICATIVITÀ DEL TEST

Questa **probabilità** (detta **valore p**) rappresenta una stima quantitativa della probabilità che le differenze osservate siano dovute al caso.

Il livello di significatività di una prova può *‘essere scelto a piacere’* dallo sperimentatore.

LIVELLO DI SIGNIFICATIVITÀ DEL TEST


$$0 < p < 1$$
$$(0\% < p < 100\%)$$

Un valore p che si avvicina a 0 è indice di una bassa probabilità che la differenza osservata possa essere ascritta al caso.

Una precisazione:

**statisticamente
significativo**

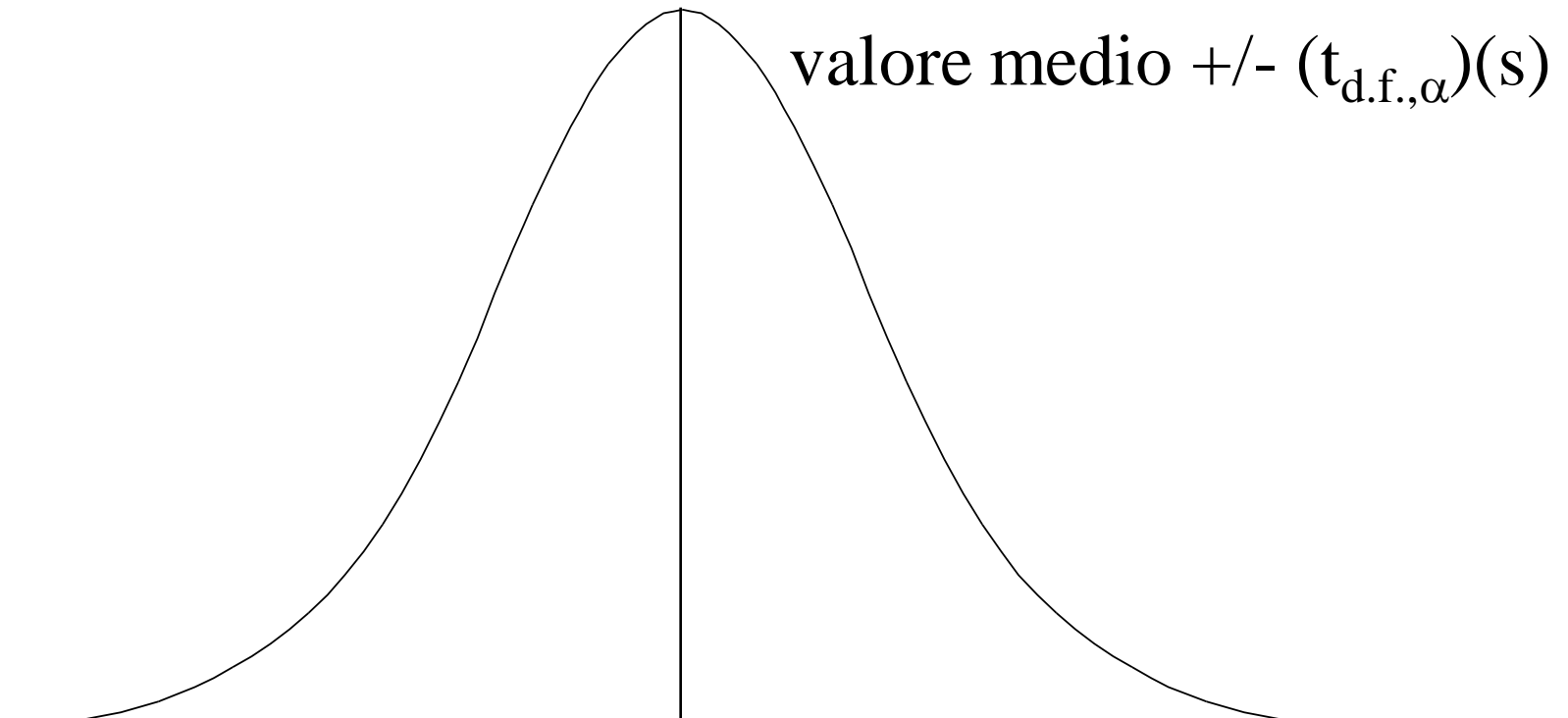


- ~~importante~~
- difficilmente dovuto al 'caso'

INTERVALLO DI CONFIDENZA

E' un intervallo di valori che include, con un certo grado di probabilità, il valore vero.

INTERVALLO DI CONFIDENZA = stima \pm margine di errore
(o intervallo fiduciale)



INTERVALLO DI CONFIDENZA

E' un intervallo di valori che include, con un certo grado di probabilità, il valore vero.

INTERVALLO DI CONFIDENZA = stima \pm margine di errore
(o intervallo fiduciale)

Un basso grado di confidenza é associato a un piccolo intervallo. Più piccolo é l'intervallo, minore é la confidenza/probabilità che il valore vero sia interno all'intervallo indicato.

INTERVALLO DI CONFIDENZA = stima \pm margine di errore
(o intervallo fiduciale)

**L'intervallo fiduciale può essere collocato
al **livello di probabilità (p)** da noi desiderato**

Che cosa significa l'espressione «confidenza 95%» o «intervallo fiduciale 95%» o «intervallo di confidenza 95%»?

In parole povere, anche se non del tutto esatte, si può dire che «confidenza 95%» indica che vi è una **probabilità del 95%** che l'intervallo trovato **includa la vera caratteristica** della popolazione.

INTERVALLO DI CONFIDENZA = stima \pm margine di errore
(o intervallo fiduciale)

Questa definizione non è del tutto corretta, e certamente uno statistico «puro» potrebbe storcere il naso... ma in questa sede è giustificata dal «Teorema di Saki» che recita:

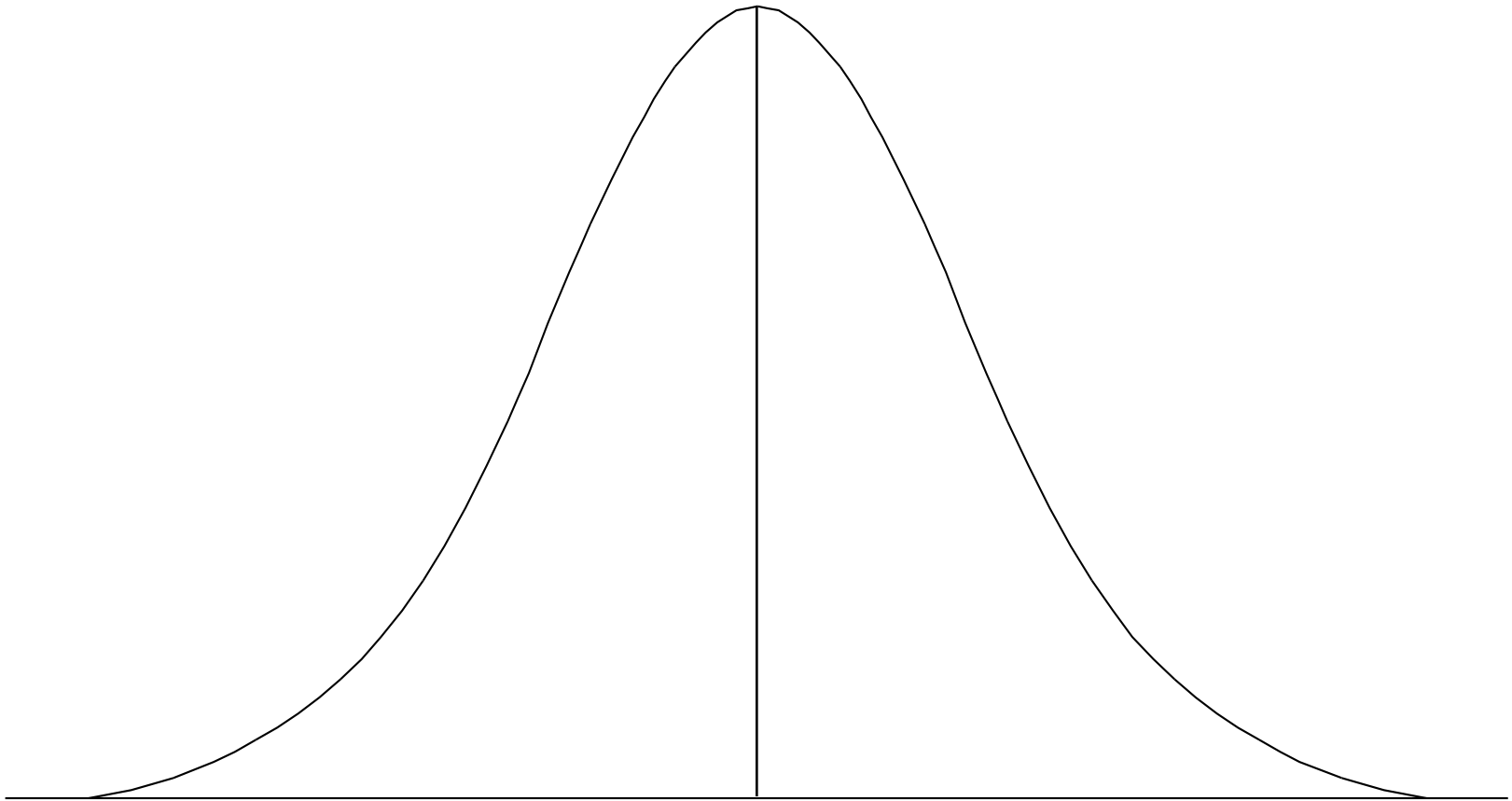
una piccola inesattezza a volte risparmia tonnellate di spiegazioni!

INTERVALLO DI CONFIDENZA = stima \pm margine di errore
(o intervallo fiduciale)

Ecco una definizione migliore (ma anche un po' più difficile da assimilare): **«confidenza 95%» significa che se ripetessimo la stessa indagine per 100 volte con gli stessi metodi** (ma su 100 campioni diversi), probabilmente otterremmo ogni volta una stima diversa; tuttavia, **il vero valore della popolazione sarebbe all'interno del nostro intervallo di confidenza 95 volte su 100**. In altre parole, l'intervallo di confidenza è stato ottenuto con un metodo che fornisce un risultato corretto nel 95% dei casi.

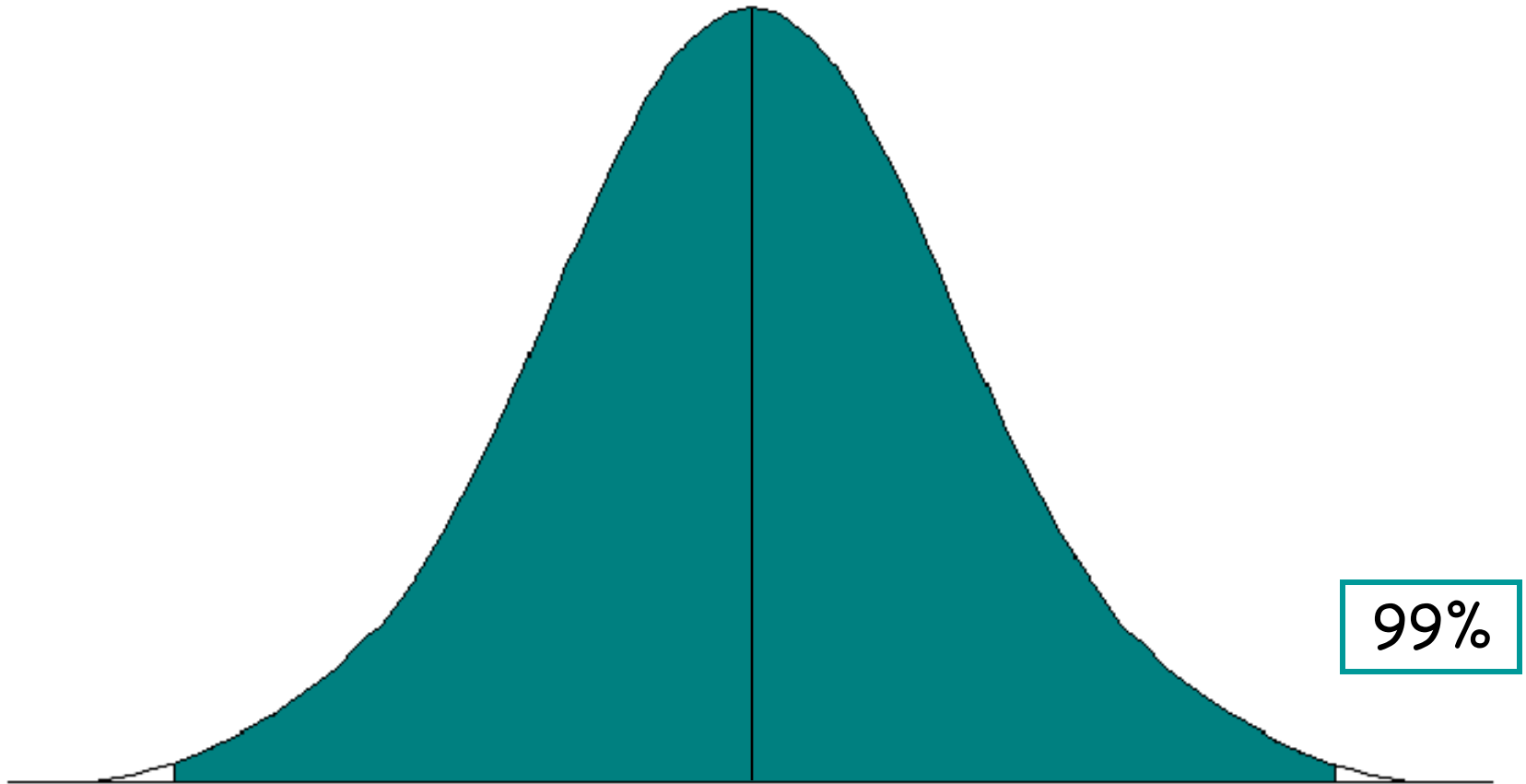
INTERVALLO DI CONFIDENZA

valore medio $\pm (t_{d.f.,\alpha})(s)$



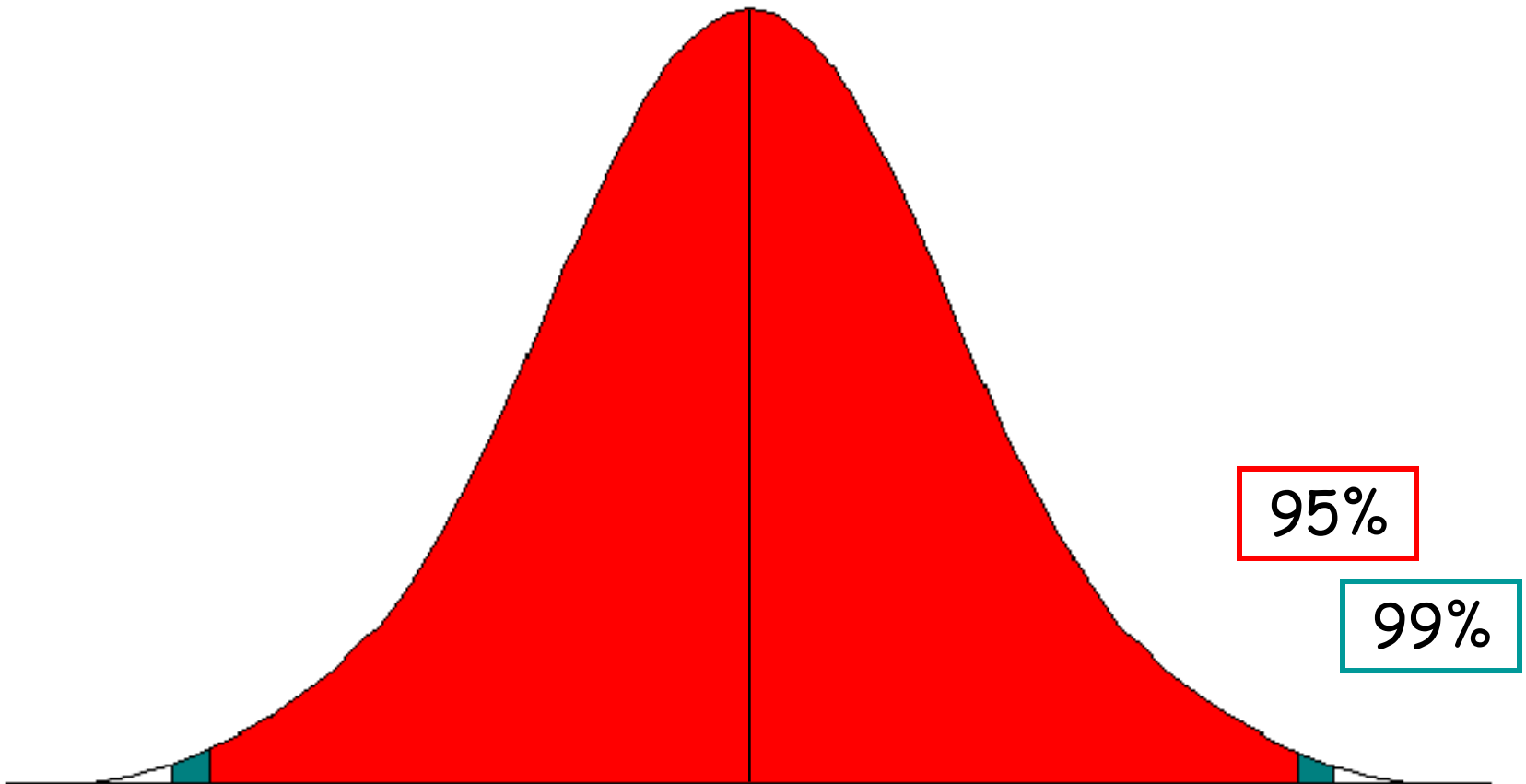
INTERVALLO DI CONFIDENZA

valore medio $\pm (t_{d.f.,\alpha})(s)$



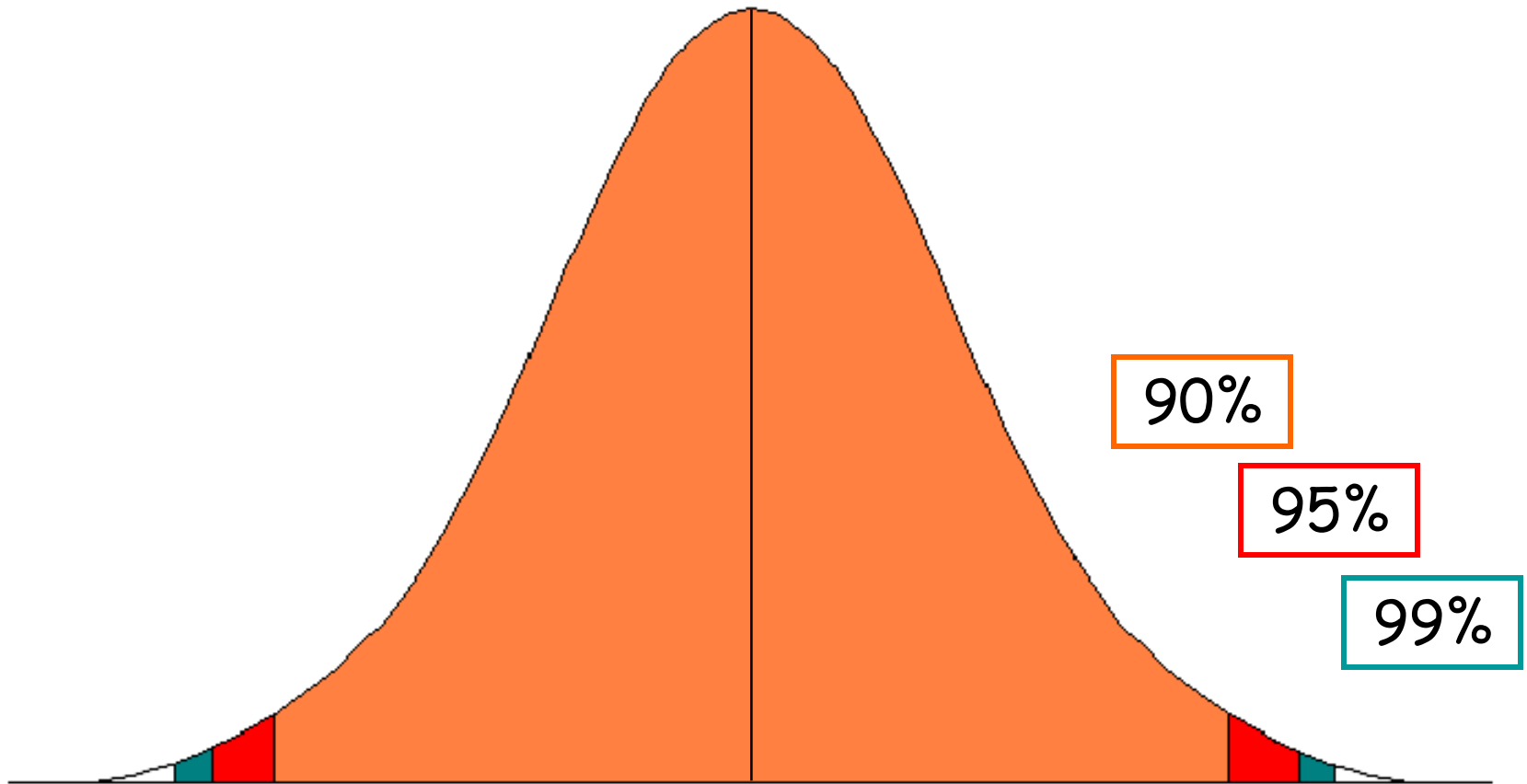
INTERVALLO DI CONFIDENZA

valore medio $\pm (t_{d.f.,\alpha})(s)$



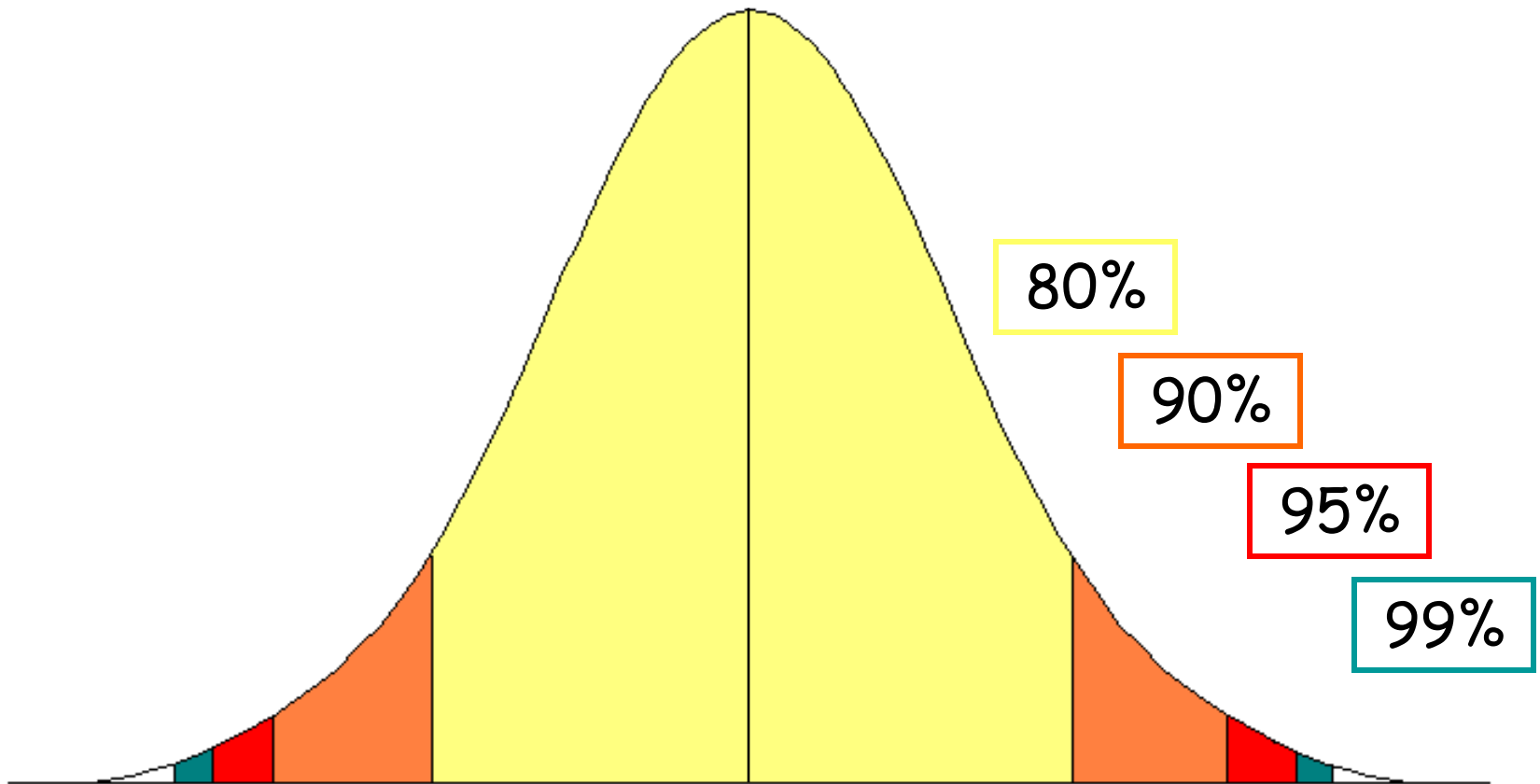
INTERVALLO DI CONFIDENZA

valore medio $\pm (t_{d.f.,\alpha})(s)$



INTERVALLO DI CONFIDENZA

valore medio $\pm (t_{d.f.,\alpha})(s)$



Le prove di bioequivalenza

Studio di farmacocinetica ben progettato

controllo dei fattori implicati

- Somministrazione dei preparati a volontari sani (o pazienti)
- Prelievo e analisi di campioni
- Calcolo dei parametri farmacocinetici: AUC, C_{\max} , t_{\max} , ...

Le prove di bioequivalenza

Il metodo usato é quello degli **intervalli di confidenza**:

si assume (*normativa vigente*) che l'analisi statistica effettuata si baserà su un intervallo di confidenza del 90% per la differenza o il rapporto (se su scala logaritmica) tra i parametri analizzati dei 2 preparati.

Le prove di bioequivalenza

Per accettare la bioequivalenza é necessario che l'intervallo di confidenza 90% del rapporto tra i parametri sia compreso all'interno dei limiti/intervallo stabiliti dalla normativa (intervallo di bioequivalenza):



FDA



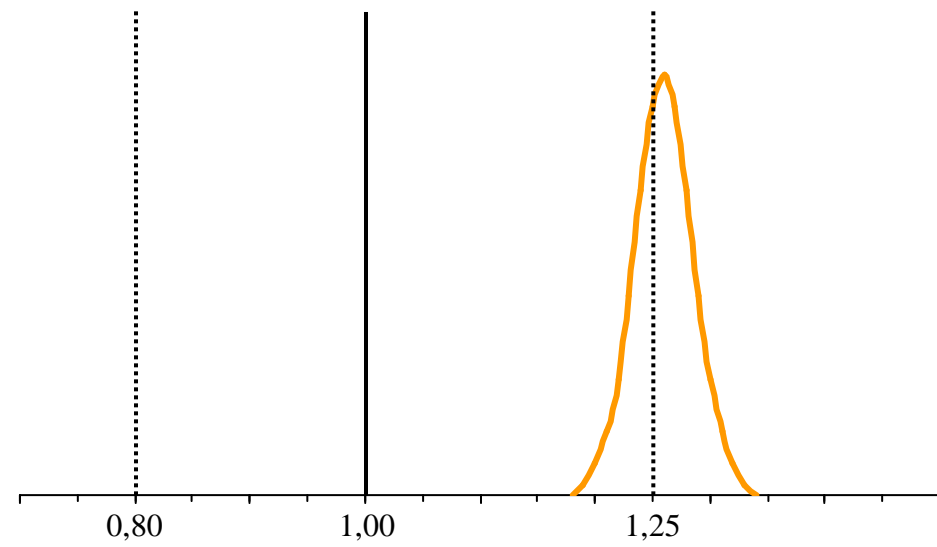
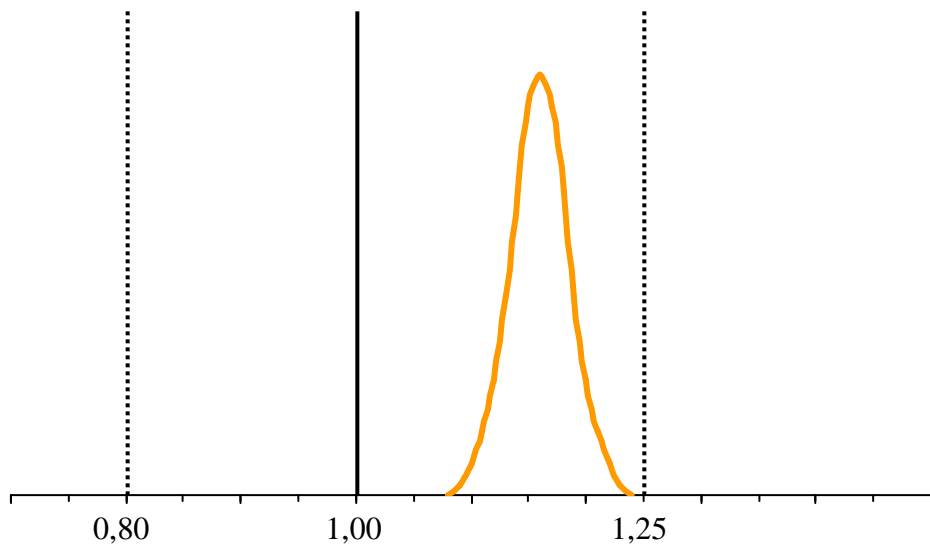
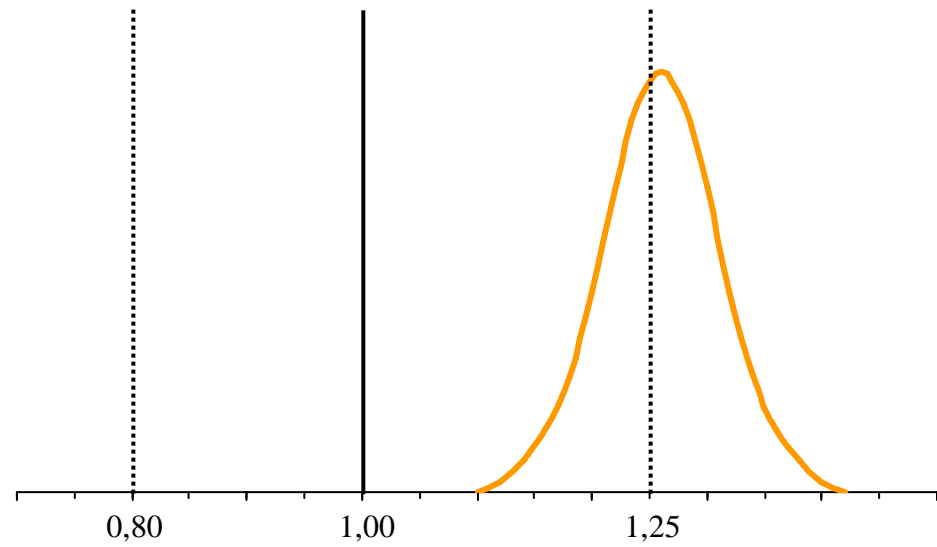
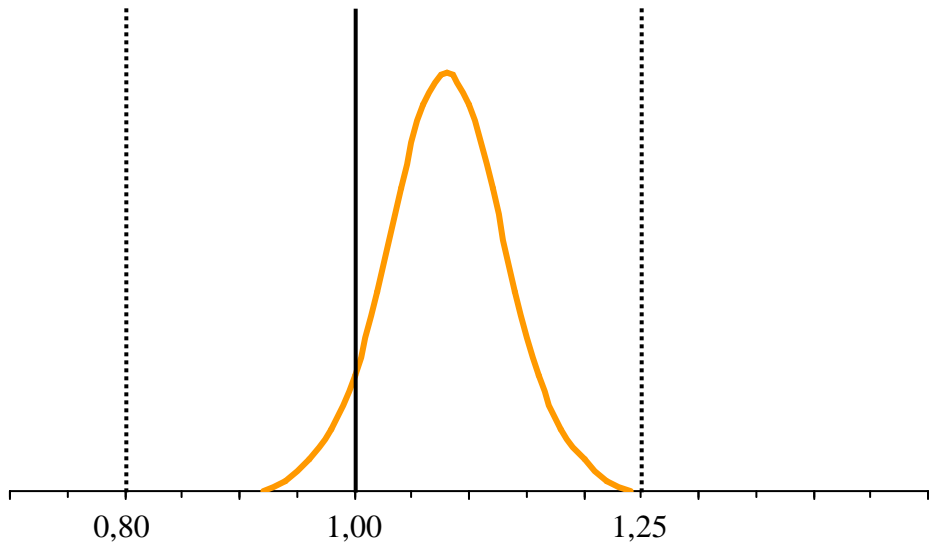
EMEA

AUC 0,8-1,25

0,8-1,25

C_{\max} 0,8-1,25

0,8-1,25



2 preparati:

R = riferimento

T = da testare

Si considerano **N** soggetti a cui somministrare i due preparati seguendo un **disegno statistico cross-over** (allo scopo di ovviare alla grande variabilità di risposta tra un soggetto e l'altro).

I soggetti vengono suddivisi in due gruppi in modo casuale. Nel periodo 1 si somministra ai soggetti del gruppo 1 il preparato T, mentre a quelli del gruppo 2 il preparato R. Nel periodo 2 (wash-out) ad ognuno verrà somministrata la preparazione non ricevuta precedentemente.

Selezione del campione dei soggetti

«I confronti che, in realtà, sono confronti fra due ceti con differenti standard di nutrizione ed educazione vengono fatti passare come confronti fra i risultati di un certo trattamento medico e la sua assenza. Così, è facile dimostrare che sfoggiare un cilindro e un ombrello allarga il torace, prolunga la vita e conferisce immunità dalle malattie; infatti, la statistica dimostra che i ceti che usano questi articoli sono più robusti, più sani e vivono più a lungo dei ceti che non hanno mai neppure sognato di possedere quegli oggetti.»

da Shaw, G.B. (1911). The Doctor's Dilemma, with a Preface on Doctors

Selezione del campione dei soggetti

La popolazione soggetta agli studi di bioequivalenza dev'essere selezionata in modo da minimizzare la variabilità e permettere la messa in evidenza delle differenze tra i prodotti farmaceutici. Quindi, gli studi sono normalmente eseguiti con volontari sani.

Numero di soggetti: minimo 12.

Compromesso tra desiderato potere statistico del test e costi.

Problema eventuali dropouts

Selezione del campione dei soggetti

Tra le caratteristiche richieste:

- appartenenza a entrambi i sessi
- età compresa tra 18-55 anni
- peso compreso nei range accettati per il Body Mass Index
- conoscenza della storia medica e approfonditi esami medici
- soggetti non fumatori e senza storia di abuso di alcol e/o droga

Standardizzazione dello studio

Le condizioni del test devono essere standardizzate allo scopo di minimizzare la variabilità di tutti i fattori coinvolti ad eccezione dei fattori prodotti che sono testati.

Tra i fattori standardizzati:

- dieta (preferibilmente a digiuno dal giorno precedente)
- assunzione di fluidi (minimo 150ml - costante)
- esercizio fisico

- Valutare i vari parametri per ogni soggetto (AUC, C_{\max} , T_{\max}) tenendo in considerazione il periodo

Sogg	AUC _T	AUC _R	$C_{\max T}$	$C_{\max R}$
1				
2				
...				
N				

- Trasformare i dati in logaritmi (in genere naturali) e eseguire l'analisi della varianza (ANOVA).
(In questo modo il modello statistico passa da moltiplicativo ad additivo)

- Calcolare l'intervallo di confidenza al 90% per la differenza delle medie dei logaritmi dei dati, considerando la stima della varianza intra-soggetto (da ANOVA)

$$\overline{\ln\text{AUC}_T} - \overline{\ln\text{AUC}_R} \pm t_{1-\alpha(v)} \sqrt{2s^2/N}$$

con

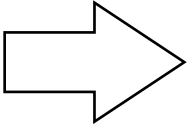
↑
0,05

$\overline{\ln\text{AUC}_T} - \overline{\ln\text{AUC}_R}$ = differenza tra le medie dei ln

s^2 = stima della varianza intra-soggetto ricavata dall'ANOVA

é l'errore sperimentale che si compie non avendo tenuto in considerazione altri fattori a esclusione della variabilità entro periodo, entro soggetto ed entro trattamenti

- Calcolare l'antilogaritmo degli estremi dell'intervallo di confidenza della differenza delle medie dei logaritmi delle AUC individuali (e^{\dots}). In questo modo si ricava il CI 90% dei rapporti dei valori medi

Se l'intervallo é compreso tra 0,80 e 1,25  **le due formulazioni sono bioequivalenti**

ESEMPIO 1

Calcium channel blocker - ER

	AUC	AUC
soggetti	Reference	Test
1	2194,6	2052,72
2	1038,73	879,40
3	1213,00	1130,78
4	2525,43	2534,83
5	865,43	980,31
6	1164,36	1070,43
7	660,75	417,03
8	569,33	562,61
9	2919,61	3069,13
10	582,22	435,48
11	1037,14	910,18
12	775,52	579,48
13	885,21	772,59
14	877,45	441,05
15	919,45	721,24
16	2048,90	1724,79
17	464,11	539,03
18	1020,85	252,65
19	305,87	1039,93
20	1068,27	1712,04
21	2031,97	2344,80
22	897,80	1105,30
23	1196,63	1047,60
24	1138,85	293,49

Dalla formula per il calcolo
dell'intervallo di confidenza:

$$\overline{\ln\text{AUC}_T} - \overline{\ln\text{AUC}_R} \pm t_{1-\alpha(v)} \sqrt{2s^2/N}$$

	AUC	AUC	In AUC	In AUC
soggetti	Reference	Test	Reference	Test
1	2194,6	2052,72	7,63	7,69
2	1038,73	879,40	6,78	6,95
3	1213,00	1130,78	7,03	7,10
4	2525,43	2534,83	7,84	7,83
5	865,43	980,31	6,89	6,76
6	1164,36	1070,43	6,98	7,06
7	660,75	417,03	6,03	6,49
8	569,33	562,61	6,33	6,34
9	2919,61	3069,13	8,03	7,98
10	582,22	435,48	6,08	6,37
11	1037,14	910,18	6,81	6,94
12	775,52	579,48	6,36	6,65
13	885,21	772,59	6,65	6,79
14	877,45	441,05	6,09	6,78
15	919,45	721,24	6,58	6,82
16	2048,90	1724,79	7,45	7,63
17	464,11	539,03	6,29	6,14
18	1020,85	252,65	5,53	6,93
19	305,87	1039,93	6,95	5,72
20	1068,27	1712,04	7,45	6,97
21	2031,97	2344,80	7,76	7,62
22	897,80	1105,30	7,01	6,80
23	1196,63	1047,60	6,95	7,09
24	1138,85	293,49	5,68	7,04

	$\ln\text{AUC}_R$	$\ln\text{AUC}_T$
Media	6,799	6,937
Dev. Std.	0,674	0,538

Calcolo del rapporto tra le AUC:

$$\begin{aligned} \text{AUC ratio} &= e^{\overline{\ln \text{AUC}_T} - \overline{\ln \text{AUC}_R}} = \\ &= e^{(6,937 - 6,799)} = e^{(+0,138)} = 1,148 \end{aligned}$$

ANOVA Table				
Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F
Between formulations	0,2299	1	0,2299	1,6333
Between periods	0,0000	1	0,0000	0,0000
Among subjects	13,9841	23	0,6080	4,3196
Residuals	3,0966	22	0,1408	
Total	17,3106	47		

$$s^2 = 0,1408$$

Student's t Table

probabilità

*gradi
di
libertà*

confidenza 90%
quindi $\alpha=0,05$;
22 gradi di libertà)

$$t_{1-\alpha(v)} = 1,717$$

df\p	0.40	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0005
1	0.324920	1.000000	3.077684	6.313752	12.70620	31.82052	63.65674	636.6192
2	0.288675	0.816497	1.885618	2.919986	4.30265	6.96456	9.92484	31.5991
3	0.276671	0.764892	1.637744	2.353363	3.18245	4.54070	5.84091	12.9240
4	0.270722	0.740697	1.533206	2.131847	2.77645	3.74695	4.60409	8.6103
5	0.267181	0.726687	1.475884	2.015048	2.57058	3.36493	4.03214	6.8688
6	0.264835	0.717558	1.439756	1.943180	2.44691	3.14267	3.70743	5.9588
7	0.263167	0.711142	1.414924	1.894579	2.36462	2.99795	3.49948	5.4079
8	0.261921	0.706387	1.396815	1.859548	2.30600	2.89646	3.35539	5.0413
9	0.260955	0.702722	1.383029	1.833113	2.26216	2.82144	3.24984	4.7809
10	0.260185	0.699812	1.372184	1.812461	2.22814	2.76377	3.16927	4.5869
11	0.259556	0.697445	1.363430	1.795885	2.20099	2.71808	3.10581	4.4370
12	0.259033	0.695483	1.356217	1.782288	2.17881	2.68100	3.05454	4.3178
13	0.258591	0.693829	1.350171	1.770933	2.16037	2.65031	3.01228	4.2208
14	0.258213	0.692417	1.345030	1.761310	2.14479	2.62449	2.97684	4.1405
15	0.257885	0.691197	1.340606	1.753050	2.13145	2.60248	2.94671	4.0728
16	0.257599	0.690132	1.336757	1.745884	2.11991	2.58349	2.92078	4.0150
17	0.257347	0.689195	1.333379	1.739607	2.10982	2.56693	2.89823	3.9651
18	0.257123	0.688364	1.330391	1.734064	2.10092	2.55238	2.87844	3.9216
19	0.256923	0.687621	1.327728	1.729133	2.09302	2.53948	2.86093	3.8834
20	0.256743	0.686954	1.325341	1.724718	2.08596	2.52798	2.84534	3.8495
25	0.256060	0.684430	1.316345	1.708141	2.05954	2.48511	2.78744	3.7251
30	0.255605	0.682756	1.310415	1.697261	2.04227	2.45726	2.75000	3.6460
inf	0.253347	0.674490	1.281552	1.644854	1.95996	2.32635	2.57583	3.2905

Calcolo dell'intervallo di confidenza:

$$(\overline{\ln AUC_T} - \overline{\ln AUC_R}) \pm t_{1-\alpha(v)} \sqrt{2s^2/N}$$

sostituendo i dati:

$$(6,937 - 6,799) \pm 1,717 \sqrt{2*0,1408/24} =$$

$$= -0,0474; 0,3234$$

Calcolo dell'intervallo di confidenza:

$$(\overline{\ln AUC_T} - \overline{\ln AUC_R}) \pm t_{1-\alpha(v)} \sqrt{2s^2/N}$$

sostituendo i dati:

$$(6,937 - 6,799) \pm 1,717 \sqrt{2*0,1408/24} =$$
$$= -0,0474; 0,3234$$

Calcolando l'antilogaritmo:

$$e^{-0,0474} = \mathbf{0,954} \quad e \quad e^{0,3234} = \mathbf{1,382}$$

ESEMPIO 2

Anti-inflammatory - IR

soggetti	Cmax Reference	Cmax Test	In Cmax Reference	In Cmax Test
1	37,113	16,144	3,614	2,782
2	31,309	41,934	3,444	3,736
3	43,582	35,888	3,775	3,580
4	21,475	20,096	3,067	3,001
5	49,278	44,458	3,897	3,795
6	13,954	27,755	2,636	3,323
7	41,523	33,843	3,726	3,522
8	35,554	43,076	3,571	3,763
9	32,862	25,799	3,492	3,250
10	34,982	35,172	3,560	3,560
11	17,568	6,520	2,866	1,875
12	18,366	17,168	2,911	2,843
13	31,518	41,793	3,451	3,733
14	36,241	27,32	3,590	3,308
15	38,996	51,569	3,663	3,943
16	23,848	17,924	3,172	2,886
17	54,932	45,597	4,006	3,820
18	15,612	36,009	2,748	3,584
19	54,016	43,450	3,989	3,772
20	26,431	19,567	3,275	2,974
21	8,605	15,101	2,152	2,715
22	9,511	28,959	2,252	3,366

	$\ln C_{\max R}$	$\ln C_{\max T}$
Media	3,312	3,324
Dev. Std.	0,527	0,499

ANOVA Table				
Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F
Between formulations	0,0376	1	0,0376	0,2957
Between periods	0,0055	1	0,0055	0,0433
Among subjects	8,4863	21	0,4041	3,1770
Residuals	2,5440	20	0,1272	
Total	11,0735	43		

Calcolo del rapporto tra le C_{\max} :

$$\begin{aligned} C_{\max} \text{ ratio} &= e^{(\overline{\ln C_{\max}} - \overline{\ln C_{\max}})} = \\ &= e^{(3,324 - 3,312)} = e^{(+0,012)} = 1,012 \end{aligned}$$

Calcolo dell'intervallo di confidenza:

$$(\overline{\ln AUC_T} - \overline{\ln AUC_R}) \pm t_{1-\alpha(v)} \sqrt{2s^2/N}$$

sostituendo i dati:

$$(3,324 - 3,312) \pm 1,725 \sqrt{2 * 0,1272 / 22} =$$
$$= -0,174; 0,198$$

Calcolando l'antilogaritmo:

$$e^{-0,174} = \mathbf{0,840} \quad e \quad e^{0,198} = \mathbf{1,219}$$

Center of Drug Evaluation and Research (CDER)
Guidance for Industry

**Statistical Approaches to Establishing
Bioequivalence**

<http://www.fda.gov/cder/guidance/3616fn1.pdf>

Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP)

**Note for Guidance on the Investigation of
Bioavailability and Bioequivalence**

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>

Minister of Health - Canada

Health Products and Food Branch

Guidance for Industry

**Conduct and Analysis of Bioavailability and
Bioequivalence Studies – Part A: Oral Dosage
Formulations Used for Systemic Effects**

http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demandede/guide-ld/bio/bio-a_e.html