

PERGUNTAS & RESPOSTAS

Validação de Ensaio de Ligação para Estudos de Bioequivalência e Comparabilidade Farmacocinética

1ª edição

Brasília, 3 de março de 2017

Coordenação de Equivalência Terapêutica

Gustavo Mendes Lima Santos

Gerência de Segurança e Eficácia

Claudiosvam Martins Alves Sousa

Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos

Patricia Ferrari Andreotti

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. ESCOPO	2
3. PERGUNTAS E RESPOSTAS	2
3.1. SUBTEMAS	2
4. NORMAS RELACIONADAS E REFERÊNCIAS	4
5. HISTÓRICO DE EDIÇÕES	4

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de proteínas como medicamentos tem avançado significativamente, gerando um rápido crescimento do mercado biofarmacêutico. De maneira eficiente, com a elevada necessidade de estudos farmacocinéticos, os ensaios de ligação, conhecidos no inglês como *Ligand Binding Assays* (LBA), são amplamente utilizados para a bioanálise de moléculas (Ramagiri, 2016). Assim, esses ensaios são usualmente empregados na análise de biomoléculas, entretanto, podem ser utilizados para moléculas sintéticas, como foi feito em um estudo de levotiroxina que utilizou, além da cromatografia, o radioimunoensaio (Seng Yue, 2015).

Os ensaios de ligação são métodos analíticos de quantificação de alta afinidade e seletivos para interações macromoleculares entre reagentes (anticorpos, receptores ou ligantes) e o produto. Desta feita, fica clara a diferença entre ensaios de ligação e os métodos cromatográficos, pois a resposta medida em ensaios de ligação (reação antígeno-anticorpo) é indireta e resulta em uma medida de resposta geralmente não-linear. Assim, torna-se imprescindível estabelecer limites de variação diferenciados para esse tipo de ensaio (EMA, 2011), que, além da resposta não linear, apresenta limitações de sensibilidade e seletividade (Ramagiri, 2016 e Yang, 2014).

2. ESCOPO

Este documento tem o objetivo de expor o entendimento da Agência sobre os critérios de aceitação que serão considerados para a validação de ensaios de ligação (*Ligand Binding Assays*) e esclarecer sobre alguns pontos frequentemente questionados.

Neste documento estão incluídos questionamentos relacionados a: 1. Para quais ensaios de validação realizados para ensaios de ligação serão aceitos valores diferentes dos expressos na RDC 27/2012. 2. Qual o critério de aceitação que será considerado para esses ensaios. 3. Quais são os requisitos para que esses critérios de aceitação sejam considerados.

3. PERGUNTAS E RESPOSTAS

3.1. SUBTEMAS

3.1.1. Para quais ensaios de validação será considerado um critério de aceitação maior que 15% e de quanto será esse critério?

Será considerado um critério de aceitação de 20% para os controles de qualidade empregados no ensaio de ligação e de 25% para o limite superior de quantificação (LSQ) e para o limite inferior de quantificação (LIQ). Este critério de 20% e 25% para LIQ e LSQ, respectivamente, será aplicável aos ensaios de precisão,

exatidão e estabilidade no caso de estudos que utilizem ensaios de ligação. O ensaio de seletividade terá seu limite de aceitação considerado a 25%.

O critério de aceitação de 20% em relação ao valor nominal para padrões de calibração e de 25% para LIQ também será considerado para a aprovação de padrões na curva de calibração.

Segue abaixo uma tabela descritiva que resume os critérios que serão aceitos para os ensaios de ligação, comparando-os com os critérios estabelecidos na RDC 27/2012:

Ensaio de validação	RDC 27/2012	No caso de ensaios de ligação (LBA)
Seletividade	As respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ	As respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 25% da resposta do analito nas amostras do LIQ
Precisão	A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento),	A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 20% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 25% (vinte por cento),
Exatidão	A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal,	A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 25\%$ (vinte por cento) do valor nominal,
Estabilidade	A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.	A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 20% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.
Curva de Calibração	Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios: I - desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e II - desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.	Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios: I - desvio menor ou igual a 25% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e II - desvio menor ou igual a 20% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

3.1.2. O que é necessário para que um critério diferenciado seja aceito, além de estar nas condições acima descritas?

É necessário que esse critério de aceitação esteja previsto, caracterizado e adequadamente justificado em Procedimento Operacional Padrão (POP) elaborado pelo centro anteriormente à condução do estudo. Esse POP deverá ser encaminhado juntamente com o relatório do estudo, quando da submissão à ANVISA.

4. NORMAS RELACIONADAS E REFERÊNCIAS

[European Medicines Agency \(EMA\)](#) - Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

[Pharmaceuticals and Medical Devices Agency \(PMDA\)](#) Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development. 2014.

Ramagiri S, Moore I. [Hybridizing LBA with LC-MS/MS: the new norm for biologics quantification](#). Bioanalysis. 2016 Mar;8(6):483-6.

[Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012](#). Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

Seng Yue C, Benvenga S, Scarsi C, Loprete L, Ducharme MP. [When Bioequivalence in Healthy Volunteers May not Translate to Bioequivalence in Patients: Differential Effects of Increased Gastric pH on the Pharmacokinetics of Levothyroxine Capsules and Tablets](#). J Pharm Pharm Sci. 2015;18(5):844-55.

Yang TY, Uhlinger DJ, Ayers SA, O'Hara DM, Joyce AP. [Challenges in selectivity, specificity and quantitation range of ligand-binding assays: case studies using a microfluidics platform](#). Bioanalysis. 2014 Apr;6(8):1049-57.

5. HISTÓRICO DE EDIÇÕES

Edição	Data	Alteração
1 ^a	01/03/2017	Emissão inicial

