Guia para validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano.

Guia nº 72/2024 – versão 1

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

2024

Guia para validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano.

VIGENTE A PARTIR DE 03/04/2024

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pelos marcos legislativo e regulatório da Agência.[1]

Trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições aqui dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto. A inobservância ao conteúdo deste documento não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação.

As recomendações contidas neste Guia produzem efeitos a partir da data de sua publicação no Portal da Anvisa.[2]

[1]Portaria nº 162, de 12 de março de 2021, que dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

[2]Este Guia internaliza o guia BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS M10, adotado pelo CONSELHO INTERNACIONAL PARA HARMONIZAÇÃO DOS REQUISITOS TÉCNICOS PARA FÁRMACOS DE USO HUMANO – ICH em 24 de maio de 2022.

A presente tradução e adaptação do documento original não é endossada ou patrocinada pelo ICH.

Textos entres parêntesis marcados com asterisco não estão presentes no guia ICH. Foram inseridos na versão em português para dar clareza ao documento, sem alterar o conteúdo técnico do guia original.

Copyright©2024. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. A reprodução parcial ou total deste documento por qualquer meio é totalmente livre, desde que citada adequadamente a fonte. A reprodução para qualquer finalidade comercial está proibida.

SUMÁRIO

1. **ESCOPO** 4
2. **INTRODUÇÃO** 5
3. **BASE LEGAL** 5
4. **PRINCÍPIOS GERAIS** 6
5. **CROMATOGRAFIA** 9
6. **ENSAIOS DE LIGAÇÃO** 25
7. **REANÁLISE DE AMOSTRA CORRIDA** 36
8. **VALIDAÇÃO PARCIAL E CRUZADA** 38
9. **CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS** 51
10. **DOCUMENTAÇÃO** 50
11. **GLOSSÁRIO** 59
12. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 65

1. ESCOPO

Este guia descreve a validação de métodos bioanalíticos e a análise de amostras de estudo que se destinam a fundamentar decisões regulatórias. O guia é aplicável aos métodos bioanalíticos usados para medir concentrações de substâncias ativas de medicamentos e seus metabólitos em amostras biológicas (por exemplo, sangue, plasma, soro, outros fluidos ou tecidos corporais) obtidos em estudos toxicocinéticos não clínicos conduzidos de acordo com os princípios de Boas Práticas Laboratoriais (BPL), estudos farmacocinéticos não clínicos conduzidos como substitutos para estudos clínicos e todas as fases de ensaios clínicos, incluindo estudos comparativos de biodisponibilidade/bioequivalência (BD/BE), em submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano. A validação completa do método é esperada para a matriz primária destinada a fundamentar as submissões regulatórias. Validações em matrizes adicionais devem ser realizadas conforme necessário.

Para estudos que não são submetidos à aprovação regulatória ou não são considerados em decisões regulatórias relativas à segurança, eficácia ou a informações de bula (por exemplo, investigações exploratórias), os requerentes podem decidir sobre o nível de qualificação adequado para apoiar sua tomada de decisão interna.

As informações contidas neste guia se aplicam à análise quantitativa por métodos cromatográficos, como cromatografia em fase líquida (CLAE) e cromatografia em fase gasosa (CG), que são tipicamente usados em combinação com detecção por espectrometria de massa (MS), e por ensaios de ligação (*Ligand Binding Assays* - LBAs).

Para estudos que estão sujeitos a BPL ou Boas Práticas Clínicas (BPC), a bioanálise das amostras do estudo também deve estar em conformidade com estes requisitos.

A bioanálise de biomarcadores e métodos bioanalíticos utilizados para a avaliação da imunogenicidade não estão no escopo deste guia.

2. INTRODUÇÃO

Objetivo

Este guia destina-se a fornecer recomendações para a validação de métodos bioanalíticos para a quantificação de substâncias ativas de medicamentos e seus metabólitos e sua aplicação na análise de amostras de estudo. A adesão aos princípios apresentados neste guia garantirá a qualidade e a consistência dos dados bioanalíticos que subsidiam o desenvolvimento e aprovação de comercialização de medicamentos.

O objetivo da validação de um método bioanalítico é demonstrar que este é adequado para a finalidade pretendida. Alterações das recomendações deste guia podem ser aceitáveis se uma justificativa científica apropriada for fornecida. Os requerentes são encorajados a consultar a Anvisa em caso de alterações significativas nas abordagens de validação de métodos quando uma abordagem alternativa for proposta ou adotada.

Antecedentes

As quantificações de substâncias ativas e seus metabólitos em matrizes biológicas são um aspecto importante do desenvolvimento de medicamentos. Os resultados de estudos que empregam tais métodos contribuem para decisões regulatórias em relação à segurança e eficácia destes produtos. Por conseguinte, é fundamental que os métodos bioanalíticos utilizados sejam bem caracterizados, devidamente validados e documentados, a fim de garantir dados confiáveis que subsidiem as decisões regulatórias.

Este guia busca facilitar o desenvolvimento de medicamentos de acordo com os princípios dos 3Rs (Reduzir, Reutilizar e Reciclar) para estudos com animais, quando aplicável.

3. BASE LEGAL

Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 e suas atualizações.

4. PRINCÍPIOS GERAIS

4.1 Desenvolvimento de Métodos

O objetivo do desenvolvimento do método bioanalítico é definir o desenho, as condições operacionais, as limitações e a adequação do método para a finalidade pretendida e garantir que o método esteja pronto para a validação.

Antes ou durante o desenvolvimento de um método bioanalítico, o requerente é encorajado a entender o analito de interesse (por exemplo, propriedades físico-químicas da molécula, metabolismo *in vitro* e *in vivo*, distribuição preferencial entre eritrócitos e plasma, e ligação à proteínas) e considerar aspectos de métodos analíticos anteriores que possam ser aplicáveis.

O desenvolvimento do método envolve a identificação dos procedimentos e condições envolvidos na quantificação do analito. O desenvolvimento do método pode incluir a caracterização dos seguintes elementos bioanalíticos: padrão de referência, reagentes críticos, curva de calibração, amostras de Controle de Qualidade (CQs), seletividade, especificidade, sensibilidade, precisão, exatidão, recuperação, estabilidade do analito, Diluição Mínima Requerida (DMR).

O desenvolvimento do método bioanalítico não requer extensa manutenção de registros. Após o desenvolvimento do método, sua subsequente validação deve comprovar que o método é adequado para a análise das amostras do estudo.

Se for encontrado um problema com o método durante a análise de amostras do estudo não clínico ou clínico, que exija interrupção da análise, quaisquer alterações no método e respectivas justificativas devem ser documentadas.

4.2 Validação do Método

4.2.1 Validação Completa

A validação do método bioanalítico é essencial para garantir a aceitabilidade do desempenho do ensaio e a confiabilidade dos resultados analíticos. Um método bioanalítico é definido como um conjunto de procedimentos utilizados para medir as concentrações de analitos em amostras biológicas. Uma validação completa do método bioanalítico deve ser realizada quando o procedimento for estabelecido para a quantificação de um analito em estudos clínicos e não clínicos aplicáveis. A validação completa também deve ser realizada para implementação de um método analítico que é

relatado na literatura e quando um kit comercial é reaproveitado para uso bioanalítico no desenvolvimento de produtos.

Normalmente, apenas um analito é determinado pelo método bioanalítico, mas pode ser apropriado medir mais de um analito, o que pode envolver duas substâncias ativas, uma molécula parental com seus metabólitos ou enantiômeros e isômeros de uma substância ativa. Nestes casos, os princípios de validação e análise aplicam-se a todos os analitos de interesse.

Para métodos cromatográficos, a validação completa deve incluir os seguintes elementos, a menos que sua ausência seja justificada: seletividade, especificidade, efeito matriz, curva de calibração (função de resposta), faixa de trabalho (Limite Inferior de Quantificação (LIQ) até ao Limite Superior de Quantificação (LSQ)), exatidão, precisão, efeito residual, integridade da diluição, estabilidade e reprodutibilidade da reinjeção.

Para LBAs, os seguintes elementos devem ser avaliados, a menos que sua ausência seja justificada: especificidade, seletividade, curva de calibração (função de resposta), faixa de trabalho (LIQ a LSQ), exatidão, precisão, efeito residual, linearidade de diluição e estabilidade. Se necessário, estudo de paralelismo em diluição pode ser conduzido quando amostras de estudo apropriadas estiverem disponíveis.

As avaliações que são realizadas durante a validação devem ser relevantes para o fluxo de trabalho de análise de amostras.

A matriz utilizada para validação do método bioanalítico deve ser a mesma matriz das amostras do estudo, incluindo anticoagulantes e aditivos. Em alguns casos, pode ser difícil obter uma matriz idêntica à das amostras do estudo (por exemplo, matrizes raras como líquido cefalorraquidiano ou bile). Nesses casos, matrizes substitutas podem ser aceitáveis para validação do método bioanalítico, devendo a escolha da matriz substituta ser cientificamente justificada.

As diferenças de matriz entre indivíduos de uma mesma espécie (por exemplo, idade, etnia, gênero) geralmente não são consideradas ao validar um método.

Uma descrição por escrito, específica e detalhada do método bioanalítico e do procedimento de validação deve ser estabelecida *a priori*. Esta descrição pode ser feita no formato de protocolo, plano de estudo, relatório, caderno ou Procedimento Operacional Padrão (POP).

4.2.2 Validação Parcial

As modificações a um método analítico que passou por validação completa podem ser avaliadas por validação parcial. A validação parcial pode ir desde uma simples determinação de precisão e exatidão à até quase uma validação completa (conforme Seção 8.1). Os itens em uma validação parcial devem ser estabelecidos de acordo com a extensão e a natureza das alterações feitas no método.

4.2.3 Validação Cruzada

Quando mais de um método bioanalítico e/ou laboratório bioanalítico estão envolvidos nas análises, a validação cruzada é requerida para demonstrar como os dados relatados estão relacionados (conforme Seção 8.2).

5. CROMATOGRAFIA

5.1 Padrões de Referência

Durante a validação do método e a análise das amostras do estudo, uma matriz biológica branco deve ser enriquecida com o(s) analito(s) de interesse usando soluções-padrão de referência para preparar padrões de calibração e CQs. Os padrões de calibração e os CQs devem ser preparados a partir de soluções estoque independentes. No entanto, os padrões de calibração e os CQs podem ser preparados a partir da mesma solução estoque, desde que a exatidão da preparação e estabilidade da solução estoque tenham sido verificadas.

Um Padrão Interno (PI) adequado deve ser adicionado a todos os padrões de calibração, CQs e amostras do estudo durante o processamento da amostra. A ausência de um PI deve ser justificada.

É importante que o padrão de referência seja bem caracterizado e sua qualidade (por exemplo, pureza e identidade) e adequação com relação ao PI sejam garantidas, pois a qualidade afetará o resultado da análise e, portanto, os dados do estudo. O padrão de referência utilizado durante a validação e análise da amostra do estudo deve ser obtido de uma fonte autêntica e rastreável. O padrão de referência deve ser idêntico ao analito. Se isso não for possível, uma forma alternativa com qualidade conhecida deve ser definida e utilizada (por exemplo, sal ou hidrato).

Os padrões de referência adequados incluem padrões compendiais, padrões comercialmente disponíveis e padrões suficientemente caracterizados preparados internamente ou por uma organização externa. É necessário um certificado de análise (CoA) ou uma alternativa equivalente para garantir a qualidade e fornecer informações sobre a pureza, as condições de armazenamento, a data de reteste/validade e o número do lote do padrão de referência.

Um CoA não é necessário para o PI, desde que a adequação para uso seja demonstrada (por exemplo, demonstração de ausência de interferência analítica causada pelo PI ou suas impurezas).

Quando a detecção por MS é usada, o uso do analito marcado na forma de isótopo estável como PI é recomendado sempre que possível. No entanto, é essencial que o padrão marcado seja de alta pureza de isótopos e que não ocorra nenhuma reação de troca de isótopos. A presença de analito não marcado deve ser verificada e, caso detectada, seu impacto deve ser avaliado durante a validação do método.

As soluções estoque e de trabalho só devem ser preparadas a partir de padrões de referência que estejam dentro do período de estabilidade, conforme documentado no CoA (data de validade ou data de reteste).

5.2 Validação

5.2.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade de um método analítico para diferenciar e medir o analito na presença de substâncias da matriz biológica branco potencialmente interferentes.

A seletividade deve ser avaliada usando amostras branco (amostras de matriz processadas sem adição de analito ou PI) obtidas de pelo menos 6 fontes/lotes independentes (não hemolisadas e não lipêmicas). O uso de menos fontes pode ser aceitável no caso de matrizes raras. A seletividade para o PI também deve ser avaliada.

A avaliação da seletividade deve demonstrar que não se observa qualquer resposta significativa atribuível a componentes interferentes no(s) tempo(s) de retenção do(s) analito(s) ou do PI nas amostras branco. Para cada matriz, as respostas atribuíveis aos componentes interferentes não devem ser superiores a 20% da resposta do analito no LIQ e não superiores a 5% da resposta do PI.

Para a investigação da seletividade em matrizes lipêmicas deve ser utilizada pelo menos uma fonte de matriz com essa característica. Para ser cientificamente significativa, a matriz utilizada deve ser representativa, tanto quanto possível, das amostras esperadas para o estudo. Uma matriz lipêmica natural com níveis anormalmente altos de triglicerídeos deve ser obtida de doadores. Embora seja recomendado o uso de matriz lipemica de doadores, se esta matriz natural for de difícil obtenção, uma matriz pode ser enriquecida com triglicerídeos. No entanto, se o produto em investigação afeta o metabolismo lipídico ou se a população alvo é hiperlipidêmica, o uso de amostras enriquecidas é desencorajado. A avaliação de matrizes lipêmicas não é necessária para estudos não clínicos, a menos que o produto em investigação impacte o metabolismo lipídico ou seja administrado em uma variedade animal específica que seja hiperlipidêmica.

Para a investigação da seletividade em matrizes hemolisadas, deve ser utilizada pelo menos uma fonte de matriz com essa característica. As matrizes hemolisadas devem ser obtidas por meio da adição de sangue total hemolisado (pelo menos 2% V/V) para gerar uma amostra hemolisada visivelmente detectável.

5.2.2 Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método bioanalítico para detectar e diferenciar o analito de outras substâncias, incluindo substâncias relacionadas (por exemplo, substâncias que são estruturalmente semelhantes ao analito, metabólitos, isômeros, impurezas, produtos de degradação formados durante a preparação da amostra ou fármacos concomitantes que se espera que sejam usados no tratamento de pacientes com a indicação pretendida).

Se a presença de substâncias relacionadas for prevista na matriz biológica de interesse, o impacto de tais substâncias deve ser avaliado durante a validação do método ou, alternativamente, nas amostras do estudo coletadas antes da administração do produto em investigação. No caso de métodos baseados em CLAE-MS, o impacto de tais substâncias pode ser analisado por comparação do peso molecular da potencial substância relacionada interferente com o do analito e pela avaliação da separação cromatográfica entre interferente e analito.

As respostas detectadas e atribuíveis a componentes interferentes não devem ser superiores a 20% da resposta do analito no LIQ e não superiores a 5% da resposta do PI.

A possibilidade de retroconversão de um metabolito ao analito de origem durante as etapas da análise (incluindo procedimentos de extração ou na espectrometria de massas) também deve ser avaliada quando relevante (por exemplo, metabólitos potencialmente instáveis, assim como analitos ésteres para metabólitos éster/acídicos, N-óxidos ou metabólitosde glucuronídeo instáveis, e estruturas em anel de lactona). É sabido que essa avaliação não é possível nos estágios iniciais do desenvolvimento de uma nova entidade química (quando seu metabolismo ainda não foi avaliado), entretanto é esperado que essa questão seja investigada e que uma validação parcial seja realizada, se necessária. A extensão da retroconversão, caso ocorra, deve ser conhecida e o impacto nos resultados do estudo deve ser discutido no Relatório Bioanalítico.

5.2.3 Efeito Matriz

O efeito matriz é definido como uma alteração da resposta do analito devida a componente(s) interferente(s) e muitas vezes não identificado(s) na matriz da amostra. Durante a validação do método, o efeito matriz deve ser avaliado a partir de diferentes e independentes fontes/lotes de matriz.

O efeito matriz deve ser avaliado por meio da análise de pelo menos 3 réplicas de CQs baixo (CQB) e alto (CQA), cada uma preparada utilizando uma matriz de pelo menos 6

fontes/lotes distintos. Para cada fonte independente de matriz avaliada, a exatidão deve estar dentro de ±15% da concentração nominal e a precisão expressa como coeficiente de variação percentual (CV) não deve ser superior a 15%. O uso de menos fontes/lotes pode ser aceitável no caso de matrizes raras.

O efeito matriz também deve ser avaliado em populações relevantes de pacientes ou populações especiais (por exemplo, com insuficiência hepática ou renal), quando disponível. É recomendada uma avaliação adicional, caso a caso, do efeito da matriz utilizando amostras de matriz hemolisada ou lipêmica durante a validação do método, especialmente quando se espera que estas condições ocorram no estudo.

5.2.4 Curva e Faixa de Calibração

A curva de calibração demonstra a relação entre a concentração nominal do analito e a resposta da plataforma analítica ao analito. Os padrões de calibração, que são preparados pela adição de uma quantidade conhecida de analito(s) na matriz, cobrem a faixa de calibração e delimitam a curva de calibração. Os padrões de calibração devem ser preparados na mesma matriz biológica das amostras do estudo. A faixa de calibração é delimitada pelo LIQ, que é o padrão de calibração mais baixo, e pelo LSQ, que é o padrão de calibração mais alto.

Deve haver uma curva de calibração para cada analito estudado durante a validação do método e para cada corrida analítica.

Uma curva de calibração deve ser gerada com uma amostra branco, uma amostra zero (amostra branco enriquecida com PI) e pelo menos 6 níveis de concentração de padrões de calibração, incluindo o LIQ e o LSQ.

Deve ser utilizado um modelo de regressão simples que descreva adequadamente a relação concentração-resposta. A seleção do modelo de regressão deve seguir procedimentos escritos. O modelo de regressão, o modelo de ponderação e transformação devem ser determinados durante a validação do método. Amostras branco e zero não devem ser incluídas na determinação da equação de regressão para a curva de calibração. Cada padrão de calibração pode ser analisado em réplicas, devendo os dados de todas as réplicas aceitáveis serem usados na análise de regressão.

Os parâmetros da curva de calibração devem ser relatados (por exemplo, inclinação e intercepto no caso de um modelo linear). As concentrações dos padrões de calibração calculadas a partir da equação da curva obtida (retrocalculadas) devem ser apresentadas juntamente com os valores médios de precisão e exatidão calculados. Todas as curvas

aceitáveis obtidas durante a validação, com base em um mínimo de 3 corridas independentes ao longo de vários dias, devem ser relatadas. A precisão das concentrações retrocalculadas de cada padrão de calibração deve estar dentro de ±20% da concentração nominal no LIQ e dentro de ±15% em todos os outros níveis. Pelo menos 75% dos padrões de calibração incluindo, no mínimo, 6 níveis de concentração de padrões de calibração devem atender aos critérios acima.

No caso de serem utilizadas réplicas, os critérios (dentro de ±15% ou ±20% para LIQ) também devem ser cumpridos para pelo menos 50% dos padrões de calibração testados, em cada nível de concentração. No caso de um padrão de calibração não cumprir estes critérios, esta amostra de padrão de calibração deve ser rejeitada, e a curva de calibração sem este padrão de calibração deve ser reavaliada, incluindo análise de regressão. Para corridas de precisão e exatidão, se todas as réplicas do padrão de calibração LIQ ou LSQ em uma corrida forem rejeitadas, a corrida deve ser rejeitada, a possível fonte da falha deve ser determinada e o método revisado, se necessário. Se a próxima corrida de validação também falhar, o método deve ser revisado antes de reiniciar a validação.

A curva de calibração deve ser preparada utilizando padrões de calibração recém enriquecidos em pelo menos uma avaliação. Posteriormente, os padrões de calibração congelados podem ser usados dentro de seu período definido de estabilidade.

5.2.5 Precisão e exatidão

5.2.5.1 Preparação de Amostras de Controle de Qualidade

Os CQs devem mimetizar as amostras do estudo sendo preparados enriquecendo a matriz com uma quantidade conhecida de analito, armazenados nas condições previstas para as amostras do estudo e analisandos para avaliar a validade do método analítico.

Os padrões de calibração e os CQs devem preferencialmente ser preparados a partir de soluções estoque independentes, a fim de evitar estimativas tendenciosas que não estejam relacionadas com o desempenho analítico do método. Se os padrões de calibração e os CQs forem preparados a partir da mesma solução estoque, a exatidão da preparação e a estabilidade da solução estoque devem ser verificadas. Pode ser utilizada uma única fonte de matriz branco, que deve estar isenta de interferências ou efeitos de matriz, conforme descrito no item 5.2.3.

Durante a validação do método, os CQs para corridas de precisão e exatidão devem ser preparados com um mínimo de 4 níveis de concentração dentro da faixa da curva de

calibração: LIQ, CQB (dentro de três vezes o LIQ), CQ médio (CQM – em torno de 30 a 50% da faixa da curva de calibração), e CQA (pelo menos 75% do LSQ).

Para corridas de validação que não são destinadas a avaliar precisão e exatidão, CQB, CQM e CQA podem ser analisados em duplicata. Esses CQs, juntamente com os padrões de calibração, fornecerão a base para a aceitação ou rejeição da corrida.

5.2.5.2 Avaliação da Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão devem ser determinadas analisando os CQs dentro de cada corrida (intracorrida) e em diferentes corridas (intercorridas). Precisão e exatidão devem ser avaliadas usando as mesmas corridas e dados.

A precisão e a exatidão intracorrida devem ser avaliadas através da análise de, pelo menos, 5 réplicas em cada nível de concentração de CQ em cada ensaio analítico. A precisão e a exatidão intercorridas devem ser avaliadas pela análise de cada nível de concentração de CQ em, pelo menos, três corridas analíticas ao longo de, pelo menos, dois dias. Para permitir a avaliação de tendências ao longo do tempo dentro de uma corrida, é recomendada a demonstração de precisão e exatidão dos CQs em pelo menos uma das corridas com um tamanho equivalente a uma corrida analítica prospectiva das amostras do estudo. Os dados relatados de validação do método e a determinação da precisão e exatidão devem incluir todos os resultados obtidos, incluindo CQs individuais fora dos critérios de aceitação, exceto os casos em que os erros são óbvios e documentados. Os dados de precisão e exatidão intracorrida devem ser relatados para cada corrida. Se os critérios de precisão ou exatidão intracorrida não forem atendidos em todas as corridas, uma estimativa geral da precisão e exatidão intracorrida para cada nível de CQ deve ser calculada. A precisão e a exatidão intercorridas devem ser calculadas combinando os dados de todas as corridas.

As curvas de calibração para essas avaliações devem ser preparadas usando padrões de calibração recém enriquecidos em pelo menos uma corrida. Se padrões de calibração recém enriquecidos não forem usados nas outras corridas, sua estabilidade na condição de congelamento deve ser demonstrada.

A exatidão em cada nível de concentração deve estar dentro de ±15% da concentração nominal, exceto no LIQ, onde deve estar dentro de ±20%. A precisão (%CV) das concentrações determinadas em cada nível não deve exceder 15%, exceto no LIQ, onde não deve exceder 20%. Para corridas de validação que não se destinam à avaliação de precisão e exatidão, pelo menos 2/3 de todos os CQs e pelo menos 50% em cada nível de concentração devem estar dentro de ±15% dos valores nominais.

5.2.6 Efeito residual

Efeito residual é a alteração de uma concentração medida causada por analito residual de uma amostra anterior que permanece no instrumento analítico.

O efeito residual deve ser avaliado e minimizado durante o desenvolvimento do método. Durante a validação, o efeito residual deve ser avaliado analisando amostras branco após o padrão de calibração no LSQ. O efeito residual nas amostras branco injetadas após o padrão de calibração mais alto não deve ser superior a 20% da resposta do analito no LIQ e 5% da resposta para o PI. Se for verificado que o efeito residual é inevitável, as amostras do estudo não devem ser aleatorizadas. Medidas específicas devem ser consideradas, validadas e aplicadas durante a análise das amostras do estudo para que o efeito residual não afete a precisão e a exatidão. Isso pode incluir a injeção de amostra(s) branco logo após amostras com uma alta concentração esperada e antes da próxima amostra do estudo.

5.2.7 Integridade da Diluição

Quando a diluição for necessária no procedimento de análise, a integridade da diluição deve ser estudada para confirmar que procedimento de diluição da amostra não afeta a precisão e a exatidão da concentração medida do analito. A mesma matriz da mesma espécie usada para a preparação dos CQs deve ser utilizada para diluição.

Os CQs de diluição devem ser preparados com concentrações de analito na matriz que são maiores que o LSQ e depois diluídos com a matriz branco. Pelo menos 5 repetições por fator de diluição devem ser testadas em uma corrida para determinar se as concentrações são medidas com precisão e exatidão dentro da faixa de calibração. O(s) fator(es) de diluição e as concentrações aplicadas durante a análise das amostras do estudo devem estar dentro da faixa dos fatores de diluição e concentrações avaliadas durante a validação. A precisão média dos CQs de diluição deve estar dentro de ±15% da concentração nominal e a precisão (%CV) não deve exceder 15%.

No caso de matrizes raras, o uso de uma matriz substituta para diluição pode ser aceitável. Deve ser demonstrado que essa alternativa não afeta a precisão e exatidão.

5.2.8 Estabilidade

As avaliações de estabilidade devem ser realizadas para garantir que cada etapa da preparação, processamento e análise da amostra, bem como as condições de armazenamento aplicadas, não afetem a concentração do analito.

As condições de armazenamento e analíticas aplicadas aos testes de estabilidade, como os tempos e temperaturas de armazenamento das amostras, matriz das amostras, anticoagulantes e materiais dos recipientes, devem refletir as condições utilizadas para as amostras do estudo. A referência a dados publicados na literatura não é considerada suficiente. A validação dos períodos de armazenamento deve ser realizada em CQs que foram armazenados por um tempo igual ou maior que os períodos de armazenamento das amostras do estudo.

A estabilidade do analito na matriz é avaliada usando concentrações de CQB e CQA. As alíquotas destes CQs são analisadas no tempo zero e após as condições em que a estabilidade está sendo estudada. Uma preparação única de CQ (*bulk*) deve ser feita em cada nível de concentração. O *bulk* de cada concentração testada deve ser dividido em um mínimo de 3 alíquotas que serão armazenadas, submetidas às condições de estabilidade aplicáveis e analisadas.

Os CQs devem ser analisados frente a uma curva de calibração gerada com padrões de calibração recém-preparados, em uma corrida com CQs correspondentes recém-preparados ou para os quais a estabilidade esteja comprovada. A concentração média em cada nível de CQ deve estar dentro de ±15% da concentração nominal. Se as concentrações das amostras do estudo forem consistentemente superiores ao LSQ da faixa de calibração, a concentração do CQA do estudo de estabilidade deve ser ajustada para refletir essas concentrações mais altas. É reconhecido que isso pode não ser possível em estudos não clínicos devido a limitações de solubilidade.

Para produtos de combinação de dose fixa e regimes de coadministração especificamente previstos na bula, os testes de congelamento-descongelamento, bancada e estabilidade a longo prazo de um analito na matriz devem ser conduzidos com a matriz enriquecida com todos os compostos administrados.

Os seguintes testes de estabilidade devem ser avaliados:

1) Estabilidade do Analito na Matriz

Estabilidade de Congelamento e Descongelamento na Matriz

Para avaliar o impacto da retirada repetida das amostras do armazenamento sob congelamento, a estabilidade do analito deve ser avaliada após múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento. Os CQB e CQA devem ser descongelados e analisados de acordo com os mesmos procedimentos das amostras do estudo. Os CQs devem ser mantidos congelados por pelo menos 12 horas entre os ciclos de

descongelamento. Estes CQs devem ser avaliados usando padrões de calibração e CQs recém-preparados, ou CQs para os quais a estabilidade foi comprovada. No mínimo três ciclos de congelamento e descongelamento devem ser validados, devendo o número de ciclos ser igual ou superior ao número de ciclos aplicados às amostras do estudo.

Estabilidade de Bancada na Matriz (curta duração)

Os experimentos de estabilidade de bancada na matriz devem ser projetados e conduzidos para cobrir as condições laboratoriais de tratamento das amostras do estudo.

Os CQB e CQA devem ser descongelados da mesma maneira que as amostras do estudo e mantidos na bancada à mesma temperatura e durante pelo menos o mesmo tempo que as amostras do estudo.

O tempo total no teste de bancada deve ser contínuo. Não é aceitável considerar a exposição aditiva às condições do teste de bancada (ou seja, a soma do tempo de bancada de cada avaliação de congelamento-descongelamento).

Estabilidade de Longa Duração em Matriz

A estabilidade de longa duração do analito na matriz armazenada em congelador deve ser estabelecida. Os CQB e CQA devem ser armazenados no congelador nas mesmas condições de armazenamento e durante pelo menos o mesmo tempo que as amostras do estudo.

Para moléculas pequenas a estabilidade a uma temperatura pode ser extrapolada para temperaturas mais baixas (por exemplo, de -20°C para -70/-80°C).

Para macromoléculas uma abordagem de agrupamento pode ser aplicada, ou seja, no caso de a estabilidade ter sido demonstrada a -70/-80°C e a -20°C, então não é necessário investigar a estabilidade em temperaturas entre esses dois pontos em que amostras do estudo sejam armazenadas.

2) Estabilidade do Analito em Amostras Processadas

A estabilidade das amostras processadas, incluindo o tempo até a conclusão da análise (no amostrador automático/instrumento), deve ser determinada. Por exemplo:

- estabilidade da amostra processada nas condições de armazenamento a serem utilizadas durante a análise das amostras do estudo (extrato seco ou na fase de injeção);

- estabilidade da amostra processada no instrumento/amostrador automático à temperatura do injetor ou amostrador automático.

O tempo total que uma amostra processada é armazenada deve ser contínuo (ou seja, o amostrador automático e outros tempos de armazenamento não devem ser somados).

3) Estabilidade do Analito e PI em Soluções Estoque e de Trabalho

A estabilidade das soluções estoque e de trabalho do analito e IS deve ser determinada sob as condições de armazenamento utilizadas durante a análise das amostras em estudo, com base na menor e a maior concentração dessas soluções. Elas devem ser avaliadas usando a resposta do detector. A estabilidade das soluções estoque e de trabalho deve ser testada com uma diluição apropriada, levando em consideração a linearidade e a faixa de medição do detector. Se a estabilidade variar com a concentração, é necessário avaliar a estabilidade de todas as concentrações das soluções estoque e de trabalho. Se não ocorrer troca isotópica para o PI marcado como isotópicamente estável nas condições de armazenamento para as quais a estabilidade do analito foi demonstrada, então não são necessárias determinações de estabilidade adicionais para o PI. Caso o padrão de referência expire ou sua data de reteste seja ultrapassada, a validade das soluções que já haviam sido preparadas a partir deste lote de padrão é definida pela data de vencimento ou reteste estabelecida para a própria solução. Contudo, a prática de fazer soluções estoque e de trabalho a partir de padrões de referência apenas para estender uso do padrão de referência além de sua validade não é aceitável.

Além disso, o seguinte teste deve ser realizado, se aplicável:

4) Estabilidade do Analito em Sangue Total

Deve ser prestada devida atenção à estabilidade do analito na matriz coletada (sangue) logo após a coleta dos voluntários e antes da preparação para armazenamento para garantir que as concentrações obtidas pelo método analítico reflitam as concentrações do analito no sangue do indivíduo no momento da coleta.

Se a matriz usada para a análise for plasma, a estabilidade do analito no sangue deve ser avaliada durante o desenvolvimento do método (por exemplo, usando um método exploratório no sangue) ou durante a validação do método. Os resultados devem ser fornecidos no Relatório de Validação.

5.2.9 Reprodutibilidade da Reinjeção

A reprodutibilidade do método é avaliada por meio de análises replicadas dos CQs e é normalmente incluída na avaliação da precisão e exatidão. No entanto, se as amostras puderem ser reinjetadas (por exemplo, no caso de interrupções do instrumento ou outras razões, como falha do equipamento), a reprodutibilidade da reinjeção deve ser avaliada

para estabelecer a viabilidade das amostras processadas e embasar seu armazenamento antes da reinjeção.

A reprodutibilidade da reinjeção é avaliada reinjetando uma corrida composta por padrões de calibração e um mínimo de 5 réplicas dos CQB, CQM e CQA após o armazenamento. A precisão e exatidão dos CQs reinjetados estabelecem a viabilidade das amostras processadas.

Os resultados devem ser incluídos no Relatório de Validação ou fornecidos no Relatório Bioanalítico do estudo em que a reinjeção tenha sido conduzida.

5.3 Análise das Amostras do Estudo

A análise das amostras do estudo deve ser realizada após a validação ter sido concluída, no entanto, alguns parâmetros podem ser concluídos em um estágio posterior (por exemplo, estabilidade de longa duração). No momento em que os dados são submetidos a uma autoridade reguladora, a validação do método bioanalítico deve ter sido concluída. As amostras do estudo, os CQs e os padrões de calibração devem ser processados de acordo com o método analítico validado. Se um teste de adequação do sistema for aplicado, este deve estar predefinido em um plano de estudo, protocolo ou POP. A adequação do sistema, incluindo o condicionamento do aparelho e o desempenho do instrumento, deve ser determinada usando amostras independentes dos padrões de calibração e CQs para a corrida. Amostras de sujeitos do estudo não devem ser usadas para testes de adequação do sistema. As respostas do PI das amostras do estudo devem ser monitoradas para determinar se há variabilidade sistêmica de PI. As expectativas em relação à documentação estão indicadas na Tabela 1.

5.3.1 Corrida Analítica

Uma corrida analítica consiste em uma amostra branco (amostra de matriz processada sem analito e sem PI); uma amostra zero (matriz processada com PI); padrões de calibração em no mínimo 6 níveis de concentração; pelo menos 3 níveis de CQs (baixo, médio e alto) em duplicata ou pelo menos 5% do número de amostras do estudo, o que for maior; e as amostras do estudo a serem analisadas. Os CQs devem ser distribuidos na corrida de tal forma que a precisão e a exatidão de toda a corrida sejam asseguradas. As amostras do estudo devem ser sempre delimitadas por CQs.

Os padrões de calibração e os CQs devem ser enriquecidos independentemente usando soluções estoque preparadas separadamente, a menos que a exatidão e a estabilidade das soluções estoque tenham sido verificadas. Todas as amostras (padrões de calibração,

CQs e amostras de estudo) devem ser processadas e extraídas como um único lote de amostras na ordem em que se destinam a ser analisadas. A análise de amostras de vários lotes de processamento em uma única corrida analítica é desencorajada. Se tal abordagem não puder ser evitada, por exemplo, devido a limitações de estabilidade no teste de bancada, cada lote de amostras deve incluir CQB, CQM e CQA.

Para estudos comparativos de BD/BE, é aconselhável analisar todas as amostras de um indivíduo em uma única corrida analítica para reduzir a variabilidade.

O impacto de qualquer efeito residual que ocorra durante a análise das amostras do estudo deve ser avaliado e relatado (conforme Seção 5.2.6). Se for detectado um efeito residual, o seu impacto nas concentrações medidas deve ser atenuado (por exemplo, não aleatorizando as amostras do estudo, injetando amostras branco após amostras com esperada concentração elevada) ou a legitimidade das concentrações reportadas deve ser justificada no relatório bioanalítico.

5.3.2 Critérios de Aceitação para uma Corrida Analítica

Os critérios para a aceitação ou rejeição de uma corrida analítica devem ser definidos no protocolo, no plano de estudo ou em um POP. No caso de uma corrida conter vários lotes, os critérios de aceitação devem ser aplicados a toda a corrida e aos lotes individuais. É possível que uma corrida atenda aos critérios de aceitação, mesmo que um lote dentro dessa corrida seja rejeitado por não atender aos critérios de aceitação do lote. Os padrões de calibração em um lote reprovado não podem ser usados para fundamentar a aceitação de outros lotes dentro da corrida analítica.

As concentrações retrocalculadas dos padrões de calibração devem estar dentro de ±15% do valor nominal, exceto para o LIQ, que deve estar dentro de ±20%. Pelo menos 75% dos padrões de calibração, incluindo no mínimo seis níveis de concentração, devem satisfazer estes critérios. Se forem utilizados mais de seis níveis de concentração (ou se forem utilizados seis níveis de concentração com padrões de calibração replicados*) e um dos padrões de calibração não atender aos critérios de aceitação, este padrão de calibração deve ser rejeitado e a curva de calibração sem este padrão de calibração deve ser reavaliada e uma nova análise de regressão realizada.

Se o nível de concentração rejeitado for o LIQ, o novo limite inferior para esta corrida analítica é o próximo nível de concentração mais baixo da curva de calibração com resultados aprovados. Este novo limite inferior de quantificação manterá seus critérios de aceitação originais (ou seja, ±15%). Se o nível de concentração mais alto for rejeitado, o LSQ para esta corrida analítica deve ser o nível anterior de concentração mais alta da

curva de calibração com resultados aprovados. A faixa de calibração revisada deve abranger pelo menos 3 níveis de concentração de CQ (baixo, médio e alto). As amostras do estudo fora da faixa revisada devem ser reanalisadas. Se forem usados padrões de calibração replicados e apenas um dos padrões de calibração nos níveis do LIQ ou LSQ falhar, a faixa de calibração permanece inalterada.

Pelo menos 2/3 dos CQs totais e pelo menos 50% em cada nível de concentração devem estar dentro de ±15% dos valores nominais. Se estes critérios não forem atendidos, a corrida analítica deve ser rejeitada. Um novo lote analítico deve ser preparado para todas as amostras do estudo da corrida analítica reprovada para análise subsequente. Nos casos em que a falha é devida a uma causa técnica identificada, as amostras podem ser reinjetadas.

As corridas analíticas contendo amostras que são reanalisadas após diluição devem incluir CQs de diluição para verificar a precisão e exatidão do método de diluição durante a análise da amostra do estudo. A concentração dos CQs de diluição deve exceder a concentração das amostras do estudo que estão sendo diluídas ou exceder a concentração do LSQ. Os CQs e as amostras do estudo devem ser diluídos usando o mesmo fator de diluição. Se forem utilizados múltiplos fatores de diluição numa única corrida analítica, os CQs de diluição precisam apenas ser diluídos pelos fatores de diluição mais altos e mais baixos. Os critérios de aceitação intracorrida dos CQs de diluição afetam apenas a aceitação das amostras do estudo diluídas e não o resultado da corrida analítica.

Quando vários analitos são quantificados simultaneamente, deve haver uma curva de calibração para cada analito estudado. Se uma corrida analítica for aceita para um analito, mas for rejeitada para outro analito, devem ser utilizados os dados relativos ao analito aceito. A determinação do analito rejeitado requer nova extração e análise apenas para o analito que é rejeitado. Para este analito reanalisado, apenas os novos resultados devem ser utilizados.

As concentrações retrocalculadas dos padrões de calibração e CQs de corridas aprovadas e aceitas devem ser relatadas. A precisão e a exatidão geral (intercorridas) dos CQs de todas as corridas aceitas devem ser calculadas em cada nível de concentração e relatadas no relatório analítico (conforme Seção 10 e Tabela 1). Se a exatidão média geral e/ou precisão falhar no critério de 15%, uma investigação para determinar a causa do desvio deve ser conduzida. No caso de estudos comparativos de BD/BE, a falha pode resultar na rejeição dos dados.

5.3.3 Faixa de Calibração

Se for prevista uma faixa estreita de concentrações do analito nas amostras do estudo antes do início da análise, é recomendável estreitar a faixa de calibração, adaptar as concentrações dos CQs ou adicionar novos CQs em diferentes níveis de concentração, conforme apropriado, para refletir adequadamente as concentrações das amostras do estudo.

Na dose terapêutica pretendida, se for encontrado um agrupamento imprevisto de resultados de amostras do estudo em uma extremidade da curva de calibração após o início das análises, a análise deve ser interrompida e, ou a faixa de calibração estreitada (incluindo a respectiva validação parcial) e as concentrações de CQ revisadas, ou CQs em concentrações adicionais acrescentados à curva original dentro do intervalo observado antes de continuar com a análise da amostra do estudo. Não é necessário reanalisar as amostras analisadas antes de otimizar a faixa de calibração ou as concentrações de CQs.

O ajuste também se aplica se muitos resultados das amostras do estudo estiverem acima do LSQ. A faixa da curva de calibração deve ser alterada, se possível, e o(s) CQ(s) adicionado(s) ou suas concentrações modificadas. Caso não seja possível alterar a faixa de calibração ou o número de amostras com concentração acima do LSQ não seja considerado excessivo, as amostras devem ser diluídas de acordo com o método de diluição validado.

Pelo menos 2 níveis de CQ devem estar dentro da faixa de concentrações medidas nas amostras do estudo. Se a faixa da curva de calibração for alterada, o método bioanalítico deve ser revalidado (validação parcial) para verificar a função de resposta e garantir precisão e exatidão.

5.3.4 Reanálise de Amostras de Estudo

As possíveis razões para a reanálise das amostras do estudo, o número de réplicas e os critérios de decisão para selecionar o valor a ser relatado devem ser predefinidos no protocolo, plano de estudo ou POP, antes do início da análise das amostras do estudo. Para as amostras de estudo em que estão sendo analisados múltiplos analitos, um resultado válido para um analito não deve ser rejeitado se o outro analito não cumprir os critérios de aceitação.

O número de amostras (e a porcentagem do número total de amostras) que foram reanalisadas deve ser relatado e discutido no Relatório Bioanalítico. Para estudos comparativos de BD/BE, uma tabela separada deve relatar valores de corridas rejeitadas.

Alguns exemplos de razões para a reanálise de amostras do estudo são:

- rejeição de uma corrida analítica porque a corrida falhou nos critérios de aceitação para exatidão dos padrões de calibração e/ou à precisão e exatidão dos CQs;
- resposta do PI nas amostras do estudo significativamente diferente da resposta do PI nos padrões de calibração e CQs (conforme pré-definido em um POP);
- concentração obtida acima do LSQ;
- concentração obtida abaixo do LIQ revisado em corridas em que o nível de concentração mais baixo foi rejeitado na curva de calibração, resultando em um LIQ mais alto em comparação com outras corridas;
- injeção inadequada de amostra ou mal funcionamento do equipamento;
- resultado abaixo do LIQ para amostra do estudo diluída;
- identificação de níveis quantificáveis de analitos em amostras pré-administração, amostras de controle ou placebo;
- cromatografia insuficiente (conforme pré-definido em um POP).

Para estudos comparativos de BD/BE, a reanálise de amostras de estudo por razão farmacocinética (PK) (por exemplo, uma concentração de amostra não se encaixa no perfil esperado) não é aceitável, pois pode enviesar o resultado do estudo.

Todas as amostras reanalisadas devem ser identificadas no Relatório Bioanalítico e o valor inicial, o motivo da reanálise, os valores obtidos nas reanálises, o valor final aceito e uma justificativa para a aceitação devem ser fornecidos. Além disso, deve ser fornecida uma tabela com o resumo do número total de amostras que foram reanalisadas por cada motivo. Nos casos em que a primeira análise produz um resultado não reportável, uma única reanálise é considerada suficiente (por exemplo, concentração acima do LSQ ou mal funcionamento do equipamento). Nos casos em que o valor precisa ser confirmado (por exemplo, amostra pré-administração com concentrações mensuráveis), são necessárias determinações replicadas quando o volume disponível de amostra permitir.

A segurança dos participantes no estudo deve prevalecer sobre qualquer outro aspecto do estudo. Consequentemente, pode haver outras circunstâncias em que seja necessário reanalisar específicas amostras do estudo para fins de investigação de segurança.

5.3.5 Reinjeção de Amostras de Estudo

A reinjeção de amostras processadas pode ser feita em caso de falha do equipamento se a reprodutibilidade da reinjeção tiver sido demonstrada durante a validação ou fornecida no relatório do estudo bioanalítico em que a reinjeção ocorreu. A reinjeção de uma corrida analítica completa ou de padrões de calibração individuais ou CQs apenas porque os padrões de calibração ou CQs falharam, sem qualquer causa analítica identificada, não é aceitável.

5.3.6 Integração de Cromatogramas

O procedimento de integração e reintegração de cromatogramas deve estar descrito em um plano de estudo, protocolo ou POP. Qualquer desvio dos procedimentos descritos *a priori* deve ser discutido no Relatório Bioanalítico. A lista de cromatogramas que necessitaram reintegração, incluindo quaisquer integrações manuais, e os motivos da reintegração devem ser incluídos no Relatório Bioanalítico. Cromatogramas originais e reintegrados e resultados iniciais e após reintegração devem ser mantidos para referência futura e apresentados no Relatório Bioanalítico no caso de estudos comparativos de BD/BE.

6. ENSAIOS DE LIGAÇÃO (*LIGAND BINDING ASSAYS* – LBA)

6.1 Reagentes-chave

6.1.1 Padrão de Referência

O padrão de referência deve ser adequadamente caracterizado e documentado (por exemplo, CoA e origem). As moléculas biológicas geralmente têm uma estrutura altamente complexa e sua reatividade com reagentes de ligação para bioanálise pode ser influenciada por alterações no processo de fabricação do Produto Biológico. É recomendado que o lote de fabricação do padrão de referência usado para a preparação de padrões de calibração e CQs seja derivado do mesmo lote administrado nos estudos não-clínicos e clínicos, sempre que possível. Se o lote do padrão de referência utilizado para a bioanálise for alterado, uma avaliação bioanalítica deve ser realizada com CQs do material original e do novo material antes do uso para garantir que as características de desempenho do método estejam dentro dos critérios de aceitação.

6.1.2 Reagentes Críticos

Reagentes críticos, incluindo reagentes de ligação (por exemplo, proteínas de ligação, aptâmeros, anticorpos ou anticorpos conjugados) e aqueles contendo porções enzimáticas, têm impacto direto nos resultados do ensaio e, portanto, sua qualidade deve ser assegurada. Os reagentes críticos se ligam ao analito e, após a interação, levam a um sinal no instrumento analítico que corresponde à concentração do analito. Os reagentes críticos devem ser identificados e definidos no método de ensaio.

A obtenção confiável de reagentes críticos, fabricados internamente ou comprados, deve ser considerada no início do desenvolvimento do método. A ficha técnica para o reagente crítico deve incluir, no mínimo, identidade, origem, número do lote, pureza (se aplicável), concentração (se aplicável), estabilidade/data do reteste, e condições de armazenamento (conforme Tabela 1). O controle de características adicionais pode ser necessário.

Um procedimento de gerenciamento do ciclo de vida do reagente crítico é necessário para garantir a consistência entre os lotes originais e novos de reagentes críticos. O desempenho do reagente deve ser avaliado usando o método bioanalítico. Não é esperado que pequenas mudanças nos reagentes críticos influenciem o desempenho do método. Por outro lado, grandes mudanças podem afetar significativamente o desempenho. Se a alteração for menor (por exemplo, a fonte de um reagente é alterada), uma única avaliação comparativa de precisão e exatidão é suficiente para a caracterização. Se a mudança for grande, então experimentos de validação adicionais são necessários. Idealmente, a

avaliação das alterações deve comparar diretamente o método com os novos reagentes ao método com os reagentes antigos. As principais alterações incluem, mas não estão limitadas a: alteração no método de produção de anticorpos; coleta de sangue adicional de animais para anticorpos policlonais; e novos clones ou novo fornecedor para produção de anticorpos monoclonais.

As datas de reteste e os parâmetros de validação devem ser documentados para fundamentar a extensão ou substituição do reagente crítico. O teste de estabilidade dos reagentes deve ser baseado no desempenho do método bioanalítico e nas orientações gerais para as condições de armazenamento do reagente. A validade do reagente crítico pode ser estendida além da data informada pelo fornecedor. Os parâmetros de desempenho devem ser documentados para subsidiar a extensão de uso ou substituição do reagente crítico.

6.2 Validação

Na maioria das vezes, placas de microtitulação são usadas para LBAs e as amostras do estudo podem ser analisadas usando um formato de ensaio de 1 ou mais poços por amostra. O formato do ensaio deve ser especificado no protocolo, plano de estudo ou POP. A análise das amostras do estudo deve ser realizada usando o mesmo número de poços por amostra aplicado no desenvolvimento e validação do método. Se forem utilizados múltiplos poços por amostra, a concentração reportada da amostra deve ser determinada seja calculando a média das respostas dos poços replicados, ou calculando a média das concentrações calculadas a partir de cada resposta. A avaliação dos dados deve ser realizada em concentrações reportáveis.

6.2.1 Especificidade

Em LBAs a especificidade está relacionada ao conceito de reatividade cruzada. É importante que o reagente de ligação se ligue especificamente ao analito alvo, e não reaja de forma cruzada com interferentes estruturalmente relacionados coexistentes (por exemplo, compostos endógenos, isoformas indesejadas ou medicação concomitante estruturalmente relacionada). A especificidade é avaliada pelo enriquecimento de amostras de matriz branco com possíveis interferentes estruturalmente relacionados na(s) concentração(ões) máxima(s) previstas para estas moléculas nas amostras do estudo.

A exatidão do analito alvo no LIQ e no LSQ deve ser investigada na presença de possíveis interferentes estruturalmente relacionados na(s) concentração(ões) máxima(s) prevista(s) nas amostras do estudo. A resposta das amostras branco enriquecidas com estes

possíveis interferentes deve estar abaixo do LIQ. A precisão do analito alvo na presença destes interferentes deve estar dentro de ±25% dos valores nominais.

Em caso de não especificidade, o impacto no método deve ser avaliado aumentando as concentrações de moléculas interferentes na matriz branco e medindo a precisão do analito alvo no LIQ e no LSQ. É essencial determinar a concentração mínima do interferente relacionado onde ocorre interferência. A mitigação apropriada durante a análise da amostra deve ser empregada, por exemplo, pode ser necessário ajustar o LIQ/LSQ adequadamente ou considerar um novo método.

Durante o desenvolvimento do método e a validação inicial do método, esses "interferentes relacionados" frequentemente não estão disponíveis. Uma avaliação adicional da especificidade pode ser realizada após a conclusão da validação original.

6.2.2 Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de detectar e diferenciar o analito de interesse na presença de componentes de matriz não específicos. A matriz pode conter componentes não específicos, tal como enzimas degradantes, anticorpos heterófilos ou fator reumatóide que podem interferir com o analito de interesse.

A seletividade deve ser avaliada na parte inferior da faixa de trabalho de um ensaio, onde ocorrem os problemas na maioria dos casos, mas é recomendado que a seletividade também seja avaliada em concentrações mais altas do analito. Portanto, a seletividade é avaliada usando amostras branco obtidas de pelo menos 10 fontes independentes e enriquecendo as matrizes branco independentes no LIQ e no CQA. O uso de menos fontes pode ser aceitável no caso de matrizes raras. A resposta das amostras branco deve estar abaixo do LIQ em pelo menos 80% das fontes individuais.

A exatidão com relação à concentração nominal deve estar dentro de ±25% no LIQ e dentro de ±20% do CQA em pelo menos 80% das fontes individuais avaliadas.

A seletividade deve ser avaliada em amostras lipêmicas e em amostras hemolisadas (conforme Seção 5.2.1). Para amostras lipêmicas e hemolisadas, os testes podem ser avaliados uma vez usando uma única fonte de matriz. A seletividade deve ser avaliada em amostras de populações relevantes (por exemplo, pacientes com insuficiência renal ou hepática, pacientes inflamatórios ou imuno-oncológicos, se aplicável). No caso de populações de pacientes relevantes, devem ser avaliadas amostras de pelo menos cinco indivíduos.

6.2.3 Curva e Faixa de Calibração

A curva de calibração demonstra a relação entre a concentração nominal do analito e a resposta da plataforma analítica ao analito. A curva de calibração é composta pelos padrões de calibração, que são preparados pela adição de uma quantidade conhecida de analito(s) na matriz. Os padrões de calibração devem ser preparados na mesma matriz biológica das amostras do estudo. Se necessário, o uso de matriz substituta deve ser cientificamente justificado.

A faixa de calibração é a faixa de concentrações abrangida pelos padrões de calibração, sendo delimitada pelo LIQ, que é o padrão de calibração mais baixo, e pelo LSQ, que é o padrão de calibração mais alto.

Deve haver uma curva de calibração para cada analito estudado durante a validação do método e para cada corrida analítica.

A curva de calibração deve ser gerada com pelo menos 6 níveis de concentração de padrões de calibração, incluindo padrões LIQ e LSQ, mais uma amostra branco. A amostra branco não deve ser incluída no cálculo dos parâmetros da curva de calibração. Amostras de Padrões Âncora, em concentrações abaixo do LIQ e acima do LSQ da curva de calibração também podem ser usadas para melhorar o ajuste da curva. A relação entre resposta e concentração para uma curva de calibração é mais frequentemente ajustada por um modelo logístico de 4 ou 5 parâmetros se houver pontos de dados perto das assíntotas inferior e superior. Outros modelos devem ser devidamente justificados.

Um mínimo de 6 corridas independentes deve ser avaliado ao longo de vários dias, considerando os fatores que podem contribuir para a variabilidade entre as corridas.

A precisão e exatidão das concentrações retrocalculadas de cada padrão de calibração deve estar dentro de ±25% da concentração nominal no LIQ e LSQ, e dentro de ±20% em todos os outros níveis. Pelo menos 75% dos padrões de calibração excluindo pontos de ancoragem, e um mínimo de 6 níveis de concentração de padrões de calibração, incluindo o LIQ e LSQ, devem atender aos critérios acima. Os pontos de ancoragem não requerem critérios de aceitação, uma vez que estão além da faixa quantificável da curva.

A curva de calibração deve ser preparada preferencialmente usando padrões de calibração recém enriquecidos. Se os padrões de calibração recém enriquecidos não forem usados, os padrões de calibração congelados podem ser usados dentro de seu período definido de estabilidade.

6.2.4 Precisão e Exatidão

6.2.4.1 Preparação de Amostras de Controle de Qualidade

Os CQs devem mimetizar as amostras do estudo sendo preparados pelo enriquecimento da matriz com uma quantidade conhecida de analito, armazenados nas condições previstas para as amostras do estudo e analisados para avaliar a validade do método analítico.

A série de diluições para a preparação dos CQs deve ser completamente independente da série de diluições para a preparação dos padrões de calibração. Eles podem ser preparados a partir da mesma solução estoque (ou estoque de trabalho), desde que a exatidão da preparação e a estabilidade tenham sido verificadas. Os CQs devem ser preparados com um mínimo de 5 níveis de concentração dentro da faixa da curva de calibração: LIQ, CQB (dentro de três vezes o LIQ), CQM (em torno da média geométrica da faixa da curva de calibração); CQA (pelo menos em 75% do LSQ); e LSQ.

Para corridas de validação que não são destinadas a avaliar precisão e exatidão, os CQs baixos, médios e altos podem ser analisados em duplicata. Esses CQs, juntamente com os padrões de calibração, fornecerão a base para a aceitação ou rejeição da corrida.

6.2.4.2 Avaliação da Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão devem ser determinadas analisando os CQs intracorrida e intercorridas. Precisão e exatidão devem ser avaliadas usando as mesmas corridas e dados.

A precisão e a exatidão devem ser determinadas por meio da análise de, pelo menos, 3 réplicas em cada nível de concentração de CQ (LIQ, baixo, médio, alto, LSQ) por corrida em, pelo menos, 6 corridas ao longo de 2 ou mais dias. Os dados relatados de validação do método e a determinação da precisão e exatidão devem incluir todos os resultados obtidos, exceto os casos em que os erros são óbvios e documentados. Os dados de precisão e exatidão intercorrida devem ser relatados para cada corrida. Se os critérios de precisão ou exatidão intercorrida não forem atendidos em todas as corridas, uma estimativa geral da precisão intracorrida e precisão para cada nível de CQ deve ser calculada. A precisão e a exatidão intercorridas devem ser calculadas combinando os dados de todas as corridas.

A exatidão geral intracorrida e intercorridas em cada nível de concentração deve estar dentro de ±20% dos valores nominais, exceto para o LIQ e LSQ, onde deve estar dentro de ±25% do valor nominal. A precisão intracorrida e intercorridas das concentrações

determinadas em cada nível de CQ não deve exceder 20%, exceto no LIQ e no LSQ, onde não deve exceder 25%.

Para corridas de validação que não se destinam à avaliação de precisão e exatidão, pelo menos 2/3 dos CQs totais e pelo menos 50% em cada nível de concentração devem estar dentro de ±20% dos valores nominais.

Além disso, o erro total (ou seja, a soma dos valores absolutos dos erros de precisão (%) e exatidão (%)) deve ser avaliado. O erro total não deve exceder 30% (40% em LIQ e LSQ).

6.2.5 Efeito residual

O efeito residual geralmente não é um problema para as análises de LBA. No entanto, se a plataforma analítica for propensa a efeito residual, o potencial de efeito residual deve ser investigado colocando amostras branco após o padrão de calibração no LSQ. A resposta das amostras branco deve estar abaixo do LIQ.

6.2.6 Linearidade de Diluição e Efeito Gancho

Devido à estreita faixa de ensaio em muitos LBAs, as amostras do estudo podem exigir diluição para atingir concentrações de analito dentro da faixa e ensaio. A linearidade da diluição deve ser avaliada para confirmar: (i) que as concentrações medidas não são afetadas pela diluição para atingir concentrações dentro da faixa de calibração e (ii) que as concentrações da amostra acima do LSQ de uma curva de calibração não são impactadas pelo efeito gancho (ou seja, uma supressão de sinal causada por altas concentrações do analito), produzindo um resultado incorreto.

A mesma matriz da amostra do estudo deve ser usada para a preparação dos CQs de diluição.

A linearidade da diluição deve ser demonstrada gerando um CQ de diluição (matriz com uma concentração de analito acima do LSQ), e analisando este CQ de forma não diluída (para avaliar o efeito gancho) e diluindo esta amostra (por pelo menos 3 fatores de diluição diferentes) com matriz branco para atingir uma concentração dentro da faixa de calibração. Para cada fator de diluição testado, pelo menos 3 séries de diluição preparadas independentemente devem ser realizadas usando o número de réplicas que serão usadas na análise da amostra. A ausência ou a presença de redução da resposta (efeito gancho) é verificada nos CQs de diluição e, se o efeito for observado e não puder ser eliminado com medidas razoáveis, devem ser tomadas medidas para mitigar esse efeito durante a análise das amostras do estudo.

A concentração média calculada para cada diluição deve estar dentro de ±20% da concentração nominal após correção pelo fator de diluição e a precisão não deve exceder 20%.

Os fatores de diluição aplicados durante a análise das amostras do estudo devem estar dentro da faixa de fatores de diluição avaliados durante a validação.

6.2.7 Estabilidade

As avaliações de estabilidade devem ser realizadas para garantir que cada etapa da preparação, processamento e análise da amostra, bem como as condições de armazenamento usadas, não afetem a concentração do analito.

As condições analíticas e de armazenamento aplicadas aos testes de estabilidade, como os tempos e temperaturas de armazenamento da amostra, matriz da amostra, anticoagulantes e materiais dos recipientes devem refletir os usados para as amostras do estudo. A referência a dados publicados na literatura não é considerada suficiente. A validação dos períodos de armazenamento deve ser realizada em CQs que foram armazenados por um tempo igual ou maior que os períodos de armazenamento das amostras do estudo.

A estabilidade do analito na matriz é avaliada usando concentrações de CQB e CQA. As alíquotas destes CQs são analisadas no tempo zero e após as condições em que a estabilidade está sendo estudada. Uma preparação única de CQ (*bulk*) deve ser feita em cada nível de concentração. O *bulk* de cada concentração testada deve ser dividido em um mínimo de 3 alíquotas que serão armazenadas, submetidas às condições de estabilidade aplicáveis e analisadas.

Os CQs devem ser analisados frente a uma curva de calibração gerada com padrões de calibração recém-preparados, em uma corrida com CQs recém-preparados ou para os quais a estabilidade esteja comprovada. Embora o uso de padrões de calibração e CQs recém-preparados seja a abordagem preferida, em alguns casos, para macromoléculas, pode ser necessário congelamento durante a noite. Nesses casos, uma justificativa válida deve ser fornecida e a estabilidade de congelamento e descongelamento deve ser demonstrada. Os CQs devem ser mantidos congelados por pelo menos 12 horas entre os ciclos de descongelamento. A concentração média em cada nível de CQ deve estar dentro de ±20% da concentração nominal.

Uma vez que a diluição da amostra pode ser necessária para muitos métodos de LBA devido a uma faixa de calibração estreita, as concentrações das amostras do estudo

podem ser consistentemente maiores do que o LSQ da curva de calibração. Se for este o caso, a concentração dos CQs deve ser ajustada, considerando a diluição da amostra aplicada, para representar a faixa real de concentração das amostras.

Para produtos de combinação de dose fixa e regimes de coadministração especificamente previstos na bula, os testes de estabilidade de congelamento e descongelamento, de bancada e de longa duração de um analito na matriz devem ser conduzidos com a matriz enriquecida com todos os compostos administrados.

Conforme mencionado na Seção 5.2.8, a investigação da estabilidade deve abranger a estabilidade de bancada (curta duração) à temperatura ambiente ou na temperatura de preparação da amostra e a estabilidade de congelamento e descongelamento. Além disso, a estabilidade de longa duração deve ser estudada.

Para moléculas pequenas a estabilidade a uma temperatura pode ser extrapolada para temperaturas mais baixas (por exemplo, de -20°C para -70/-80°C).

Para macromoléculas uma abordagem de agrupamento pode ser aplicada, ou seja, no caso de a estabilidade ter sido demonstrada a -70/-80°C e a -20°C, então não é necessário investigar a estabilidade em temperaturas entre esses dois pontos em que amostras do estudo sejam armazenadas.

6.3 Análise das Amostras do Estudo

A análise das amostras do estudo deve ser realizada após a conclusão da validação, no entanto, alguns parâmetros podem ser concluídos em um estágio posterior (por exemplo, estabilidade de longa duração). No momento em que os dados são submetidos a uma autoridade reguladora, a validação do método bioanalítico deve ter sido concluída. As amostras do estudo, os CQs e os padrões de calibração devem ser processados de acordo com o método analítico validado. As expectativas em relação à documentação estão indicadas na Tabela 1.

6.3.1 Corrida Analítica

Uma corrida analítica consiste em uma amostra branco; padrões de calibração em no mínimo 6 níveis de concentração; pelo menos 3 níveis de CQs (baixo, médio e alto) em duplicata ou pelo menos 5% do número de amostras do estudo, o que for maior; e as amostras do estudo a serem analisadas. A amostra branco não deve ser incluída no cálculo dos parâmetros da curva de calibração. Os CQs devem ser distribuídos na corrida de tal forma que a precisão e a exatidão de toda a corrida sejam asseguradas, levando em consideração que as amostras do estudo devem sempre estar delimitadas por CQs.

Na maioria das vezes, placas de microtitulação são usadas para LBAs. Uma corrida analítica pode compreender uma ou mais placas. Normalmente, cada placa contém um conjunto individual de padrões de calibração e CQs. Se cada placa contiver seus próprios padrões de calibração e CQs, então cada placa deve ser avaliada de forma independente. No entanto, para algumas plataformas, a capacidade de amostras pode ser limitada. Neste caso, conjuntos de padrões de calibração podem ser colocados na primeira e na última placa, mas os CQs devem ser colocados em todas as placas. Os CQs devem ser colocados pelo menos no início (antes) e no final (depois) das amostras do estudo de cada placa. Os CQs em cada placa e cada curva de calibração devem cumprir os critérios de aceitação para uma corrida analítica (conforme Seção 6.3.2). Para o cálculo das concentrações, os padrões de calibração devem ser combinados para realização de uma análise de regressão. Se a curva de calibração combinada não passar nos critérios de aceitação, toda a corrida deve ser rejeitada.

6.3.2 Critérios de Aceitação para uma Corrida Analítica

Os critérios para a aceitação ou rejeição de uma corrida analítica devem ser definidos no protocolo, no plano de estudo ou em um POP. No caso de uma corrida conter vários lotes, os critérios de aceitação devem ser aplicados a toda a corrida e aos lotes individuais. É possível que a corrida atenda aos critérios de aceitação, mesmo que um lote dentro dessa corrida seja rejeitado por não atender aos critérios de aceitação do lote. Os padrões de calibração em um lote reprovado não podem ser usados para fundamentar a aceitação de outros lotes dentro da corrida analítica.

As concentrações retrocalculadas dos padrões de calibração devem estar dentro de ±20% do valor nominal em cada nível de concentração, exceto para o LIQ e o LSQ, para os quais deve estar dentro de ±25%. Pelo menos 75% dos padrões de calibração, incluindo no mínimo seis níveis de concentração, devem cumprir este critério. Este requisito não se aplica aos Padrões Âncora. Se forem utilizados mais de seis níveis de concentração (ou se forem utilizados seis níveis de concentração com padrões de calibração em replicata*) e um dos padrões de calibração não atender aos critérios de aceitação, este padrão de calibração deve ser rejeitado e a curva de calibração sem este padrão deve ser reavaliada e uma nova análise de regressão realizada.

Se o nível de concentração rejeitado for o LIQ, o novo limite inferior para esta corrida analítica é o próximo nível de concentração mais baixo da curva de calibração com resultados aprovados. Se o nível de concentração mais alto for rejeitado, o LSQ para esta corrida analítica deve ser o nível anterior de concentração mais alta da curva de calibração

com resultados aprovados. Os novos LIQ e LSQ manterão seus critérios de aceitação originais (ou seja, ±20%). A faixa de calibração revisada deve abranger todos os CQs (baixo, médio e alto). As amostras do estudo fora da faixa de ensaio revisada devem ser reanalisadas.

Cada corrida deve conter pelo menos 3 níveis de CQs (baixo, médio e alto). Durante a análise das amostras do estudo, os padrões de calibração e os CQs devem mimetizar a análise da amostra do estudo em relação ao número de poços usados por amostra do estudo. Pelo menos 2/3 dos CQs e 50% em cada nível de concentração devem estar dentro de ±20% do valor nominal em cada nível de concentração. Exceções a esses critérios devem ser justificadas e predefinidas no POP ou protocolo.

A precisão e exatidão global dos CQs de todas as corridas aceitas devem ser calculadas para cada nível de concentração e indicadas no relatório analítico. Caso a exatidão média geral e/ou precisão exceda 20%, investigações adicionais devem ser conduzidas para determinar as causas desse desvio. No caso de estudos comparativos de BD/BE, a falha pode resultar na rejeição dos dados.

6.3.3 Faixa de Calibração

Pelo menos 2 níveis de CQs devem estar dentro da faixa de concentrações medidas nas amostras do estudo. Na dose terapêutica pretendida, se for encontrado um agrupamento imprevisto de resultados de amostras do estudo em uma extremidade da curva de calibração após o início das análises, a análise deve ser interrompida e, ou a faixa de calibração estreitada (incluindo a respectiva validação parcial) e as concentrações de CQ revisadas, ou CQs em concentrações adicionais acrescentados à curva original dentro do intervalo observado antes de continuar com a análise da amostra do estudo. Não é necessário reanalisar as amostras analisadas antes de otimizar a faixa de calibração ou as concentrações de CQs.

6.3.4 Reanálise de Amostras de Estudo

As possíveis razões para a reanálise das amostras do estudo, o número de reanálises e os critérios de decisão para selecionar o valor a ser relatado devem ser predefinidos no protocolo, plano de estudo ou POP, antes do início da análise das amostras do estudo.

O número de amostras (e a porcentagem do número total de amostras) que foram reanalisadas deve ser relatado e discutido no Relatório Bioanalítico. Para estudos comparativos de BD/BE, uma tabela separada deve relatar valores de corridas rejeitadas.

Alguns exemplos de razões para a reanálise da amostra do estudo são:

- rejeição de uma corrida analítica porque a corrida não cumpriu os critérios de aceitação no que diz respeito à exatidão dos padrões de calibração e/ou à precisão e exatidão dos CQs;
- concentração obtida acima do LSQ;
- concentração obtida abaixo do LIQ em corridas em que o nível de concentração mais baixo foi rejeitado na curva de calibração, resultando em um LIQ mais alto em comparação com outras corridas;
- mal funcionamento do equipamento;
- resultado abaixo do LIQ para amostra do estudo diluída;
- identificação de níveis quantificáveis de analitos em amostras pré-administração, amostras de controle ou placebo;
- quando as amostras são analisadas em mais de um poço e os valores obtidos não são reportáveis devido a não atendimento de critérios de aceitação pré-definidos (por exemplo, variabilidade excessiva entre poços, uma réplica estando acima do LSQ ou abaixo do LIQ).

Para estudos comparativos de BD/BE, a reanálise de amostras do estudo por uma razão PK (por exemplo, uma concentração de amostra não se encaixa no perfil esperado) não é aceitável, pois pode influenciar o resultado do estudo.

As amostras reanalisadas devem ser identificadas no Relatório Bioanalítico e deve ser fornecido o valor inicial, o motivo da reanálise, os valores obtidos nas reanálises, o valor final aceito e uma justificativa para a aceitação. Além disso, deve ser fornecida uma tabela com resumo do número total de amostras que foram reanalisadas devido a cada motivo. Nos casos em que a primeira análise produz um resultado não reportável, uma única reanálise é considerada suficiente (por exemplo, concentração acima do LSQ ou variabilidade excessiva entre poços). A reanálise das amostras deve ser baseada no mesmo número de poços por amostra que foi utilizado na análise inicial. Nos casos em que o valor precisa ser confirmado, (por exemplo, amostra pré-administração com concentrações mensuráveis) são necessárias determinações replicadas quando o volume disponível de amostra permitir.

A segurança dos participantes no estudo deve prevalecer sobre qualquer outro aspecto do estudo. Consequentemente, pode haver outras circunstâncias em que seja necessário reanalisar específicas amostras do estudo para fins de investigação de segurança.

7. REANÁLISE DE AMOSTRA CORRIDA

É possível que o comportamento das amostras do estudo seja diferente do comportamento dos padrões de calibração e CQs usados durante a validação do método, que são preparados pelo enriquecimento da matriz branco. Diferenças na ligação de proteínas, retroconversão de metabólitos conhecidos e desconhecidos, falta de homogeneidade da amostra, fármacos concomitantes ou componentes biológicos exclusivos das amostras do estudo podem afetar as concentrações medidas do analito nas amostras do estudo. A reanálise de amostras corridas (*Incurred Sample Reanalysis* - ISR) destina-se a verificar a confiabilidade das concentrações de analito de amostra relatadas.

A ISR deve ser realizada pelo menos nas seguintes situações:

- para estudos não clínicos dentro do escopo desde guia, pelo menos uma vez por espécie;
- todos os estudos comparativos pivotais de BD/BE;
- primeiro estudo em indivíduos;
- ensaios pivotais iniciais em pacientes, uma vez em cada população de pacientes;
- primeiro estudo ou estudo pivotal em pacientes com função hepática e/ou renal comprometida.

A ISR é conduzida repetindo a análise de um subconjunto de amostras de um determinado estudo em corridas separadas (ou seja, diferentes da original) em dias diferentes usando o mesmo método bioanalítico.

A extensão da ISR depende do analito e das amostras do estudo e deve ser baseada em uma profunda compreensão do método analítico e do analito. No entanto, como uma extensão mínima, se o número total de amostras do estudo for inferior ou igual a 1000, então 10% das amostras devem ser reanalisadas; se o número total de amostras for superior a 1000, então 10% das primeiras 1000 amostras (100) mais 5% do número de amostras que excedem 1000 amostras devem ser avaliados. Critérios objetivos para a escolha do subconjunto de amostras do estudo para ISR devem ser predefinidos no protocolo, plano de estudo ou um POP. Embora os sujeitos/animais devam ser selecionados o mais aleatoriamente possível na população do estudo que recebeu a administração, é importante a cobertura adequada do perfil de concentrações. Portanto, é recomendado que as amostras para ISR sejam escolhidas em torno da concentração máxima (Cmax) e algumas na fase de eliminação. Além disso, as amostras escolhidas devem ser representativas de todo o estudo.

As amostras não devem ser combinadas/misturadas entre si, pois a junção em um volume único pode limitar a descoberta de anomalias. As amostras ISR e os CQs devem ser processados e analisados da mesma forma que na análise original. A ISR deve ser realizada dentro da janela de estabilidade do analito, mas não no mesmo dia da análise original.

A diferença percentual entre a concentração inicial e a concentração medida durante a análise repetida deve ser calculada em relação ao seu valor médio utilizando a seguinte equação:

% de diferença = (valor da repetição – valor inicial) ÷ (valor médio) X 100

Para métodos cromatográficos, a diferença percentual deve estar dentro de ±20% para pelo menos 2/3 das repetições. Para LBAs, a diferença percentual deve estar dentro de ± 30% para pelo menos 2/3 das repetições.

Se os resultados gerais da ISR falharem nos critérios de aceitação, uma investigação deve ser conduzida e as causas remediadas. Deve haver um POP que direcione como as investigações são acionadas e conduzidas. Se a investigação não identificar a causa da falha, a avaliação do impacto potencial da falha na ISR na validade do estudo também deve ser fornecida no Relatório Bioanalítico. Se a ISR atender aos critérios de aceitação e ainda mostrar diferenças grandes ou sistemáticas entre os resultados para várias amostras, isso pode indicar problemas analíticos e é aconselhável investigar mais profundamente.

Exemplos de ocorrências preocupantes podem incluir:

- todas as amostras ISR de um indivíduo falharem;
- todas as amostras ISR de uma corrida falharem.

Todos os aspectos das avaliações da ISR devem ser documentados para permitir a reconstrução do estudo e quaisquer investigações. As amostras individuais com resultados bastante diferentes do valor original (por exemplo, > 50% e "*flyers*") não devem desencadear a reanálise da amostra original e não precisam ser investigadas. Os dados da amostra ISR não devem substituir os dados originais da amostra do estudo.

8. VALIDAÇÃO PARCIAL E CRUZADA

8.1 Validação Parcial

Validações parciais avaliam modificações em métodos bioanalíticos que já passaram por validação completa. A validação parcial pode variar de apenas uma determinação de precisão e exatidão intracorrida, até uma validação quase completa. Se a estabilidade for estabelecida em uma instalação, ela não precisa necessariamente ser repetida em outra instalação.

Para métodos cromatográficos, modificações típicas do método bioanalítico ou alterações que se enquadram nesta categoria incluem, mas não estão limitadas a:

- alteração do local de análises mantendo o método analítico (ou seja, transferências de método bioanalítico entre laboratórios);
- mudança no método analítico (por exemplo, mudança nos sistemas de detecção, plataforma);
- mudança nos procedimentos de processamento de amostras;
- mudança no volume da amostra (por exemplo, menor volume em amostras pediátricas);
- alteração na faixa de concentrações de calibração;
- alteração do anticoagulante em fluidos biológicos, como substituição de heparina por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (não se aplica quando apenas o contra-íon for alterado);
- mudança do tipo de matriz dentro de uma mesma espécie (por exemplo, de plasma para soro ou líquido cefalorraquidiano) ou mudanças de espécie mantendo o tipo de matriz (por exemplo, de plasma de rato para plasma de camundongo);
- mudança nas condições de armazenamento.

Para LBAs, modificações típicas do método bioanalítico ou alterações que se enquadram nesta categoria incluem, mas não estão limitadas a:

- mudanças nos reagentes críticos (por exemplo, mudanças de lote);
- mudanças na DMR;
- mudança nas condições de armazenamento;
- alteração na faixa de concentrações de calibração;

- mudança no método analítico (por exemplo, mudança nos sistemas de detecção, plataforma);

- alteração do local de análises mantendo método analítico (ou seja, transferências de método bioanalítico entre laboratórios);

- mudança na preparação da amostra;

- alteração do anticoagulante em fluidos biológicos, como substituição de heparina por EDTA (não se aplica quando apenas o contra-íon for alterado).

Os parâmetros das validações parciais devem atender aos critérios da validação completa. Se estes critérios não forem atendidos, são necessárias investigação e validação adicionais.

8.2 Validação Cruzada

A validação cruzada é necessária para demonstrar como os dados relatados estão relacionados quando mais de um método bioanalítico ou mais de um laboratório bioanalítico estão envolvidos nas análises.

A validação cruzada é necessária nas seguintes situações:

- os dados dentro de um único estudo são obtidos por diferentes métodos que possuem validação completa;

- os dados dentro de um único estudo são obtidos por diferentes laboratórios com o mesmo método bioanalítico;

- os dados são obtidos a partir de diferentes métodos que possuem validação completa em estudos que serão combinados ou comparados para apoiar regimes especiais de administração ou decisões regulatórias sobre segurança, eficácia e dizeres de bula.

Se os dados forem obtidos a partir de diferentes métodos que possuam validação completa, mas esses dados não forem combinados entre estudos, a validação cruzada geralmente não é necessária.

A validação cruzada deve ser realizada antes da análise das amostras do(s) estudo(s), se possível.

A validação cruzada deve ser avaliada testando o mesmo conjunto de CQs (baixo, médio e alto) pelo menos em triplicatas e amostras do estudo (se disponíveis, $n \geq 30$, abrangendo a faixa de concentração das amostras do estudo) com os diferentes métodos, ou pelos diferentes laboratórios.

O viés pode ser avaliado por gráficos de Bland-Altman ou regressão de Deming. Outros métodos apropriados para avaliar a concordância entre dois métodos (por exemplo, coeficiente de correlação de concordância) também podem ser usados. Alternativamente, as curvas de concentração *versus* tempo para amostras do estudo podem ser traçadas com resultados obtidos por cada método para avaliar o viés.

O uso de múltiplos métodos bioanalíticos para a medição do mesmo analito na condução de um estudo comparativo de BD/BE é fortemente desencorajado.

9. CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

9.1 Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

Para analitos que também são moléculas endógenas (por exemplo, terapias de reposição), a exatidão da medição dos analitos representa um desafio quando o método não consegue distinguir entre o agente terapêutico e a molécula endógena. Além disso, os níveis endógenos do analito podem variar devido à idade, sexo, raça, variações circadianas, doença ou como efeito colateral do tratamento farmacológico. Esta seção descreve algumas das abordagens que podem ser usadas para avaliar as concentrações de analitos que também são moléculas endógenas, com a ressalva de que os biomarcadores estão fora do escopo deste guia.

Se disponível, a matriz biológica para preparar padrões de calibração e CQs deve ser a mesma que a das amostras do estudo (ou seja, matriz biológica autêntica) e deve estar livre de efeito e interferência da matriz, conforme descrito nas Seções 5 e 6. A concentração endógena na matriz biológica escolhida deve ser baixa o suficiente para proporcionar uma razão sinal-ruído adequada (por exemplo, <20% do LIQ).

Nos casos em que as matrizes sem interferência não estão disponíveis, as seguintes abordagens podem ser usadas para calcular a concentração do analito nas amostras do estudo: (1) a abordagem de matriz substituta, (2) a abordagem de analito substituto, (3) a abordagem de subtração de fundo e (4) a abordagem de adição de padrão.

1) Abordagem de Matriz Substituta:

A matriz para os padrões de calibração é substituída por uma matriz substituta. Matrizes substitutas podem variar amplamente em complexidade, de simples tampões e matrizes artificiais que tentam imitar a matriz autêntica, a matrizes subtraídas ou matrizes de outras espécies.

2) Abordagem de Analito Substituto:

Analitos marcados com isótopo estável são usados como padrões substitutos em métodos espectrométricos de massa para construir a curva de calibração para a quantificação de analitos endógenos. Nesta abordagem, é assumido que as propriedades físico-químicas dos analitos autênticos e substitutos são as mesmas, com exceção do peso molecular. No entanto, os padrões de isótopos podem diferir no tempo de retenção e na sensibilidade de MS, portanto, antes da aplicação desta abordagem, a razão das respostas de MS (isto é, o fator de resposta) do analito marcado para não marcado deve estar próxima da unidade

e permanecer constante em toda a faixa de calibração. Se o fator de resposta não cumprir estes requisitos, deve ser incorporado na equação de regressão da curva de calibração.

3) Abordagem de Subtração de Fundo:

A concentração do analito endógeno observada em uma matriz combinada/misturada representativa é subtraída da concentração observada nos padrões enriquecidos, e subsequentemente as diferenças resultantes são usadas para construir a curva de calibração.

Quando as concentrações de fundo são reduzidas pela diluição das matrizes branco antes da adição dos padrões (por exemplo, se um LIQ menor for necessário), a composição das matrizes nas amostras do estudo e os padrões de calibração serão diferentes, o que pode causar diferentes recuperações e efeitos matriz. Essas diferenças devem ser consideradas ao validar o método.

4) Abordagem de Adição de Padrão:

A abordagem de adição de padrão é apenas aplicável para plataformas analíticas com respostas lineares. Tipicamente, o método de adição de padrão é usado para determinar a concentração do analito endógeno na matriz autêntica a ser usada para a preparação de padrões e CQs. No entanto, essa abordagem também pode ser empregada para a determinação de amostras de estudo. Nessa abordagem, cada amostra de estudo é dividida em alíquotas de igual volume. Todas as alíquotas, exceto uma, são separadamente enriquecidas com quantidades conhecidas e variáveis dos padrões de analito para construir uma curva de calibração para a matriz branco autêntica ou para cada amostra de estudo (por exemplo, com 3 a 5 pontos). A concentração endógena ou a concentração da amostra do estudo é então determinada como a intercepção negativa na abcissa (eixo x) da curva de calibração padrão preparada nessa amostra de estudo específica.

A validação de um método analítico para um analito que também é um composto endógeno requer as seguintes considerações, além da validação indicada nas Seções 5 e 6.

9.1.1 Amostras de Controle de Qualidade para Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

As concentrações endógenas do analito na matriz biológica devem ser avaliadas antes da preparação do CQ. Devem ser utilizadas as matrizes com o nível mais baixo possível do analito endógeno interferente. As concentrações dos CQs devem levar em conta as

concentrações endógenas na matriz autêntica e ser representativa das concentrações esperadas da amostra em estudo.

Os CQs devem se assemelhar às amostras do estudo e devem ser preparados na mesma matriz. Em princípio, os CQs utilizados para validação devem ser alíquotas da matriz biológica autêntica não contaminada (CQ endógeno com uma concentração entre LIQ e CQB, se possível) e contaminada com quantidades conhecidas do analito autêntico (CQB, CQM e CQA). Em amostras enriquecidas (por exemplo, LIQ, CQB), a quantidade adicionada deve ser suficiente para fornecer concentrações três vezes maiores ou estatisticamente diferentes da concentração endógena. Se opções de matrizes (diferentes lotes, fornecedores alternativos e matrizes de populações especiais) que poderiam conter uma concentração mais baixa do analito ainda produzirem matrizes nas quais os níveis endógenos são tão altos que não é possível preparar o CQB na matriz autêntica, a matriz diluída pode ser usada como matriz substituta.

9.1.2 Seletividade, Recuperação e Efeito Matriz para Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

A avaliação da seletividade é dificultada pela ausência de matriz livre de interferência. Para a cromatografia, a pureza de pico deve ser investigada como parte da validação do método através da análise de matrizes obtidas de vários doadores (pelo menos seis amostras branco normais, uma amostra branco hemolisada e uma amostra branco lipêmica) usando um sistema de detecção discriminativo (por exemplo, espectrometria de massa em tandem (MS/MS)). Outras abordagens, se justificadas por princípios científicos, também podem ser consideradas.

Para as abordagens de Adição de Padrão e Subtração de Fundo, como a mesma matriz biológica e analito são usados para amostras de estudo e padrões de calibração, os mesmos efeitos de recuperação e efeito matriz ocorrem nas amostras de estudo e nos padrões de calibração. No entanto, se o componente endógeno não for completamente idêntico (por exemplo, proteínas recombinantes), a diferença potencial na recuperação deve ser avaliada em um teste de paralelismo. Para as abordagens de Matriz Substituta e Analito Substituto, o efeito matriz e a recuperação da extração podem diferir entre os padrões de calibração e as amostras do estudo. O efeito da matriz deve ser avaliado para garantir que não impacte a precisão e a exatidão, principalmente no nível LIQ.

- Se a Abordagem de Matriz Substituta for usada, o impacto dos diferentes efeito matriz e recuperação na matriz substituta e matriz autêntica devem ser avaliados. Isso deve ser investigado em um experimento que testa frente à curva de calibração substituta (i) CQs

de matriz enriquecida com analito, (ii) apenas matriz endógena e (iii) apenas matriz substituta.

- Se for utilizada a Abordagem de Analito Substituto em métodos cromatográficos de espectrometria de massa, deve ser avaliado o impacto dos diferentes efeitos matriz e recuperação entre os analitos substitutos e os analitos endógenos autênticos. Isso deve ser investigado em um experimento que testa frente à curva de calibração substituta (i) CQs de matriz enriquecida com analito autêntico, (ii) apenas matriz endógena e (iii) matriz enriquecida com analito substituto.

- Em certos casos, a diluição dos CQs com matriz substituta pode ser necessária (por exemplo, para métodos de subtração de fundo), onde o nível endógeno é alto e o LIQ precisa ser reduzido. Nestes casos, os experimentos de recuperação e efeito matriz devem ser repetidos com matrizes biológicas autênticas com concentrações endógenas entre LIQ e CQB, se disponível.

Os critérios de aceitação para cromatografia e LBAs estão indicados nas Seções 5 e 6, respectivamente.

Como a composição da matriz biológica pode afetar o desempenho do método, é necessário investigar matrizes de pelo menos seis doadores diferentes no caso de métodos cromatográficos, e dez doadores diferentes no caso de LBA, exceto na Abordagem de Adição Padrão, onde cada amostra é analisada com sua própria curva de calibração.

9.1.3 Paralelismo para Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

O paralelismo garante que as variações observadas na resposta em função de variações nas concentrações do analito sejam equivalentes para a matriz substituta e a matriz autêntica (e analito substituto e analito autêntico*), em toda a faixa de trabalho do método. O paralelismo deve ser avaliado nas abordagens da matriz substituta e do analito substituto, levando em conta que o paralelismo é avaliado de forma diferente nos métodos de LBA e cromatográficos.

9.1.4 Precisão e Exatidão para Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

Precisão e exatidão devem atender aos critérios especificados nas Seções 5 e 6 para cromatografia e LBAs, respectivamente.

No caso da utilização das abordagens de Matriz Substituta ou de Analito Substituto, a avaliação da precisão e da exatidão deve ser efetuada através da análise dos CQs em relação à curva de calibração substituta.

A concentração da molécula endógena na matriz branco pode ser determinada e subtraída das concentrações totais observadas nas amostras enriquecidas. Quando os CQs são enriquecidos com o analito autêntico na matriz que contém níveis endógenos do analito, é recomendado que a exatidão seja calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\textit{Exatidão (\%)} = \frac{\textit{(concentração medida na amostra enriquecida – concentração endógena)}}{\textit{Concentração adicionada}} \times 100$$

Somente a precisão pode ser determinada a partir da análise de cada CQ não enriquecido (CQ endógeno).

9.1.5 Estabilidade para Métodos para Analitos que também são Moléculas Endógenas

Para mimetizar tanto quanto possível as amostras do estudo, os experimentos de estabilidade devem ser conduzidos com o analito autêntico na matriz biológica autêntica e com CQs endógenos (matriz branco contendo a molécula endógena), bem como CQB e CQA, conforme definido na Seção 9.1.1. No entanto, se uma matriz substituta for usada para padrões de calibração, a estabilidade também deve ser demonstrada para o analito na matriz substituta, pois pode diferir da estabilidade na matriz biológica autêntica.

9.2 Paralelismo em Diluição

O Paralelismo em Diluição é definido como uma relação paralela entre a curva de calibração e as amostras de estudo diluídas em série para detectar qualquer influência da diluição na medição do analito. Embora a falta de paralelismo seja uma ocorrência rara em métodos bioanalíticos para avaliação PK, o paralelismo em LBA deve ser avaliado caso a caso, por exemplo, quando há suspeita de interferência causada por componentes da matriz (como presença de proteínas de ligação endógenas) durante a análise das amostras do estudo. As investigações de paralelismo, ou a justificativa para sua ausência, devem ser incluídas no Relatório Bioanalítico. Alguns métodos podem demonstrar paralelismo para uma população de pacientes, mas não para outra população. Geralmente, esses experimentos devem ser conduzidos durante a análise das amostras do estudo devido à indisponibilidade destas amostras no momento do desenvolvimento ou validação do método. Uma amostra do estudo com uma concentração elevada (de preferência próxima da Cmax) deve ser diluída para pelo menos três concentrações com matriz branco. A consistência entre as amostras das concentrações retrocalculadas em uma série de

diluição não deve exceder 30% de CV. No entanto, ao aplicar o critério de 30%, os dados devem ser cuidadosamente monitorados, pois os resultados que passam por esse critério ainda podem revelar tendências de não paralelismo. No caso de a amostra não se diluir linearmente (ou seja, de forma não paralela), deve ser definido *a priori* um procedimento para relatar o resultado.

9.3 Recuperação

Para métodos que empregam extração de amostras, a recuperação (eficiência de extração) deve ser avaliada. A recuperação é relatada como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito conduzida através das etapas de extração e processamento de amostra do método. A recuperação é determinada comparando a resposta do analito em uma amostra biológica que é enriquecida com o analito e processada, com a resposta em uma amostra branco biológica que é processada e depois enriquecida com o analito. A recuperação do analito não precisa ser 100%, mas a extensão da recuperação de um analito e do PI (se usado) deve ser consistente. Recomenda-se a realização de experimentos de recuperação comparando os resultados analíticos para amostras extraídas em múltiplas concentrações, tipicamente três concentrações (baixa, média e alta).

9.4 Diluição Mínima Requerida

A DMR é um fator de diluição empregado em amostras que são diluídas com solução tampão para reduzir o sinal de fundo ou a interferência da matriz na análise usando LBA. A DMR deve ser idêntica para todas as amostras, incluindo padrões de calibração e os CQs, e deve ser determinada durante o desenvolvimento do método. Se a DMR for alterada após o estabelecimento do método, é necessária a validação parcial. A DMR deve ser definida no Relatório de Validação do método analítico.

9.5 Kits Comerciais e de Diagnóstico

Os kits comerciais ou de diagnóstico (referidos como kits) às vezes são co-desenvolvidos com novos fármacos para o diagnóstico do paciente no ponto de atendimento. As recomendações nesta seção do guia não se aplicam ao desenvolvimento de kits destinados ao diagnóstico do paciente no ponto de atendimento (por exemplo, kits de diagnóstico complementar ou de acompanhamento). Documentos de orientação apropriados sobre as expectativas regulatórias para o desenvolvimento desses kits devem ser consultados.

Se um requerente reaproveitar um kit (em vez de desenvolver um novo método) ou utilizar kits de "uso exclusivo de pesquisa" para medir as concentrações de fármacos durante o

desenvolvimento de um novo produto, o requerente deve avaliar a validação do kit para garantir que ele esteja em conformidade com os padrões de desenvolvimento de medicamentos descritos neste guia.

Considerações de validação para ensaios com kits incluem, mas não estão limitadas a:

- Se o padrão de referência no kit diferir do padrão de referência das amostras do estudo, os testes devem avaliar as diferenças no desempenho do ensaio dos reagentes do kit. A especificidade, precisão, exatidão e estabilidade do ensaio com kit devem ser demonstradas em condições reais de uso na instalação que realiza a análise da amostra. As modificações das instruções de processamento do kit devem ser completamente validadas.

- Os kits que usam padrões de calibração esparsos (por exemplo, curvas de calibração com um ou dois pontos) devem incluir experimentos de validação internos (*in house*) para estabelecer a curva de calibração com um número suficiente de padrões em toda a faixa de calibração.

- As concentrações reais de CQs devem ser conhecidas. Concentrações de CQs expressas em intervalos não são suficientes para aplicações quantitativas. Nesses casos, os CQs com concentrações conhecidas devem ser preparados e usados, independentemente dos CQs fornecidos com o kit.

- Os padrões de calibração e os CQs devem ser preparados na mesma matriz das amostras do estudo. Os kits com padrões de calibração e CQs preparados em uma matriz diferente das amostras do estudo devem ser justificados e experimentos apropriados devem ser realizados.

- Se forem utilizados vários lotes de kits de ensaio dentro de um estudo, a variabilidade e a comparabilidade lote a lote devem ser avaliadas para quaisquer reagentes críticos incluídos nos kits.

- Se um kit que utiliza várias placas de ensaio for empregado, suficientes CQs replicados devem ser usados em cada placa para monitorar a exatidão do ensaio. Os critérios de aceitação devem ser estabelecidos para as placas individuais e para a corrida analítica geral.

9.6 Tecnologias Novas ou Alternativas

Quando uma tecnologia nova ou alternativa é usada como a única tecnologia bioanalítica desde o início do desenvolvimento do produto, a validação cruzada com uma tecnologia existente não é necessária.

O uso de diferentes tecnologias bioanalíticas para o desenvolvimento de um produto pode gerar dados difíceis de interpretar para este produto. Isto pode ocorrer quando uma plataforma gera concentrações que diferem daquelas obtidas com outra plataforma. Portanto, quando uma plataforma analítica nova ou alternativa está substituindo uma plataforma anterior usada no desenvolvimento de um medicamento, é importante que as diferenças potenciais sejam bem compreendidas. Os dados gerados a partir da plataforma/tecnologia anterior devem ser validados de forma cruzada com os da plataforma/tecnologia nova ou alternativa. É recomendada a busca por orientação da Anvisa no início do desenvolvimento do produto. O uso de dois métodos ou tecnologias dentro de um estudo comparativo de BD/BE é fortemente desencorajado.

O uso de novas tecnologias em bioanálises sujeitas à avaliação regulatória deve ser embasado em critérios de aceitação estabelecidos *a priori* com base no desenvolvimento do método e verificados na validação.

9.6.1 Métodos de Matriz Seca

Os métodos de matriz seca (*Dried matrix methods* - DMM) são sistemas de coleta de amostra por microamostragem, que oferecem benefícios como a coleta de volumes reduzidos de amostras de sangue, facilitando a coleta, armazenamento e transporte. Além da típica validação de métodos para LC-MS ou LBA, o uso de DMM requer validação adicional da abordagem de coleta de amostras antes de seu uso em estudos que subsidiam uma submissão regulatória, como:

- Hematócrito, especialmente para gotas de sangue total (*whole-blood spotting*) em cartões.
- Homogeneidade da amostra, especialmente para coleta de fração (*sub-punch*) da amostra no cartão/dispositivo.
- Extração da amostra a partir da matriz seca.
- Coleta de amostra em DMM para ISR:
  - cuidado deve ser tomado para garantir que suficientes volumes de amostra ou números de réplicas sejam retidos para ISR;
  - devem ser realizadas punções múltiplas da amostra ou as amostras devem ser colhidas em duplicata.

Quando o DMM é usado para estudos clínicos ou não clínicos, além de abordagens líquidas típicas (por exemplo, amostras de plasma líquido) nos mesmos estudos, os dois métodos devem ser validados de forma cruzada (conforme Seção 8.2). Para estudos toxicocinéticos não clínicos, a Seção 4.1 do ICH S3A Q&A deve ser consultada. É recomendada a busca por orientação da Anvisa no início do desenvolvimento do produto.

10. DOCUMENTAÇÃO

POPs gerais e específicos e boa manutenção de registros são essenciais para um método analítico devidamente validado. Os dados gerados para validação do método bioanalítico devem ser documentados e disponibilizados para auditoria e inspeção dos dados. A Tabela 1 descreve a documentação recomendada para apresentação à autoridade reguladora e a documentação que deve estar disponível no local analítico no momento da inspeção. Esta documentação pode ser armazenada no local analítico ou em outro local seguro. Nesse caso, a documentação deve estar prontamente disponível quando solicitada.

Toda a documentação relevante necessária para reconstruir o estudo, da forma como foi conduzido e relatado, deve ser mantida em um ambiente seguro. A documentação relevante inclui, mas não está limitada a dados fonte, protocolos e relatórios, registros do embasamento de questões procedimentais, operacionais e ambientais e registros de correspondências entre todas as partes envolvidas.

Independentemente do formato da documentação (ou seja, em papel ou eletrônico), os registros devem ser contemporâneos ao evento e as alterações subsequentes não devem impedir o acesso aos dados originais. O embasamento para alterar ou reprocessar dados deve ser documentado com detalhes suficientes e o registro original deve ser mantido.

10.1 Informações Resumidas

As informações resumidas devem incluir os seguintes itens na Seção 2.6.4/2.7.1 do Documento Técnico Comum (*Common Technical Document* – CTD) ou relatórios:

- Deve ser incluído um resumo dos métodos utilizados para cada estudo. Cada resumo deve fornecer o título do método, o código de identificação do método, o tipo de ensaio, o código do Relatório Bioanalítico, a data efetiva do método e os códigos do Relatório de Validação associados.

- Deve ser fornecida uma tabela de resumo de todos os Relatórios de Validação relevantes para cada analito, incluindo Relatórios de Validação Parcial e Validação Cruzada. A tabela deve incluir o código de identificação do método, o tipo de método, o motivo do novo método ou validação adicional (por exemplo, para reduzir o LIQ). As alterações introduzidas no método devem ser claramente identificadas.

- Deve ser fornecida uma tabela de resumo cruzando vários códigos de identificação quando um método tiver códigos diferentes para o método, os Relatórios de Validação e os Relatórios Bioanalíticos.

- Discussão de mudanças de método (por exemplo, evolução de métodos, razões para revisões, aspectos especiais).

- Para estudos comparativos de BD/BE, uma lista de inspeções regulatórias do local, incluindo datas e resultados para cada local analítico, se realizadas nos últimos três anos e um ano após a conclusão do estudo.

10.2 Documentação para Relatórios de Validação e Bioanalíticos

A Tabela 1 descreve a documentação recomendada para os Relatórios de Validação e Bioanalíticos.

Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de Validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Teste de Adequação do Sistema Cromatográfico	• Datas, horários e amostras usadas para testes de adequação.	• Não aplicável.	• Não aplicável.
Sinopse **Visão Geral da Evolução do Método**	• Histórico/evolução de métodos (por exemplo, para explicar revisões, aspectos únicos com dados de apoio, se disponíveis).	• Não aplicável.	• Não aplicável.
Padrões de Referência	• Certificado de análise ou alternativa equivalente para garantir a qualidade (incluindo pureza), estabilidade/data de validade/reteste, número do lote e fabricante ou fonte. • Registros de recebimento, uso e condições de armazenamento. • Se expirado, Certificado de análise recertificado ou reteste de qualidade e identidade com datas de reteste.	• Uma cópia do Certificado de análise ou alternativa equivalente, incluindo número do lote, fonte, qualidade (incluindo pureza), condições de armazenamento e data de validade/ reteste ou tabela com essas informações. • Se expirado, qualidade e estabilidade no momento do uso e datas de reteste e valores retestados.	• Uma cópia do Certificado de análise ou alternativa equivalente, incluindo número do lote, fonte, qualidade (incluindo pureza), condições de armazenamento e data de validade/reteste ou tabela com essas informações. • Se expirado, qualidade e estabilidade no momento do uso e datas de reteste e valores retestados.
Padrão Interno (PI)	• Qualidade do PI ou demonstração de adequação. • Registros de recebimento, uso e condições de armazenamento.	• Nome do reagente ou padrão. • Origem.	• Nome do reagente ou padrão. • Origem.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Reagentes Críticos	• Nome do reagente. • Número do lote. • Fonte/Origem. • Concentração, se aplicável. • Data de reteste (data de validade). • Condições de armazenamento.	• Nome do reagente. • Número do lote. • Fonte/Origem. • Concentração, se aplicável. • Data de reteste (data de validade). • Condições de armazenamento.	• Nome do reagente. • Número do lote. • Fonte/Origem. • Concentração, se aplicável. • Data de reteste (data de validade). • Condições de armazenamento.
Soluções estoque/ trabalho	• Registro de preparação e uso de soluções estoque/trabalho. • Local e condição de armazenamento.	• Registro de que as soluções foram usadas dentro do período de estabilidade. • Estabilidade da solução estoque/ trabalho. • Condições de armazenamento.	• Registro de que as soluções foram usadas dentro do período de estabilidade. • Estabilidade da solução estoque/trabalho †. • Condições de armazenamento†.
Matriz Branco	• Registros de descrições de matrizes, números de lotes, datas de recebimento, condições de armazenamento e fonte/fornecedor.	• Descrição, número do lote, datas de recebimento.	• Descrição, número do lote, datas de recebimento††.
Padrões de Calibração e CQs	• Registros e data de preparação. • Registro da temperatura de armazenamento (por exemplo, registro de datas de entrada/saída, analista, temperaturas e congelador(es)).	• Descrição da preparação incluindo matriz. • Número do lote, datas de preparação e período de estabilidade. • Condições de armazenamento (por exemplo, temperaturas, datas e duração).	• Descrição da preparação†. • Datas de preparação e período de estabilidade. • Condições de armazenamento†.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de Validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Procedimentos Operacionais Padrão (POPs; Procedimentos)	Procedimentos para todos os aspectos da análise, como: • Procedimento Analítico e Validação do Método. • Critérios de aceitação (por exemplo, corrida, curva de calibração, CQs). • Instrumentação. • Reanálise. • ISR. • Registro de alterações no POP (por exemplo, alteração, data, motivo).	• Descrição detalhada dos procedimentos do método.	• Lista de procedimentos/protocolos analíticos usados para o método.
Rastreabilidade da Amostra	• Recebimento da amostra do estudo e condição no recebimento. • Registros que indicam como as amostras foram transportadas e recebidas. Inventário de amostras e motivos para amostras ausentes. • Local de armazenamento (por exemplo, unidade de congelador). • Registros de rastreamento de CQs, padrões de calibração e amostras de estudo. • Registros do congelador para CQs, padrões de calibração e entrada e saída de amostras do estudo.	• Não aplicável.	**Para todos os estudos** • Datas de recebimento das remessas, número de amostras. • Condição da amostra no recebimento. • Condição e localização de armazenamento no local de análise. • Armazenamento: duração total da coleta da amostra até a análise. • Lista de quaisquer desvios das condições de armazenamento planejadas e impacto potencial. **Além disso, para Estudos Comparativos de BD/BE, também incluir:** • Identificação do sujeito.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]

Análise	• Documentação e dados para verificações de adequação do sistema para cromatografia.
	• Registro de uso do instrumento, incluindo datas de análise para cada corrida.
	• Registros de extração de amostras, incluindo documentação de processamento de padrões de calibração, CQs e amostras de estudo para cada corrida, incluindo datas de extração.
	• Identidade de CQs e lotes dos padrões de calibração e amostras de estudo em cada corrida.
	• Documentação das configurações e manutenção do instrumento.
	• Sistema de gerenciamento de informações laboratoriais (LIMS).
	• Informações de validação, incluindo documentação e dados para:
	  • Seletividade, especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão, efeito residual, diluição, recuperação, efeito de matriz.
	  • Estabilidade de bancada, de congelamento-descongelamento, de longo prazo, do extrato e da solução estoque.
	  • Validações parciais/cruzadas, se aplicável.
		Para todos os estudos:
		• Tabela de todas as corridas (incluindo corridas que falharam) e datas de análise.
		• Tabela de resultados da concentração do padrão de calibração e das funções de resposta (parâmetros da curva de calibração) de todas as corridas aceitas com precisão e exatidão.
		• Tabela de resultados de CQ intracorrida e intercorridas e padrões de calibração (de corridas de precisão e exatidão). Os valores fora dos critérios de aceitação devem ser claramente sinalizados.
		• Incluir erro total para métodos LBA.
		• Dados sobre seletividade, especificidade, linearidade de diluição e sensibilidade (LIQ), efeito residual, recuperação. Estabilidade de bancada, de congelamento-descongelamento, de longo prazo, do extrato e da solução estoque.
		• Validação parcial/cruzada, se aplicável.
		• Anexar relatório separado para validação adicional, se houver.
		Além disso, para Estudos Comparativos de BD/BE também incluir:
		• Identidade do instrumento para cada corrida em estudos comparativos de BD/BE †.
		• 100% da tabela de resumo das corridas, de corridas aceitas e que falharam.
			Para todos os estudos:
			• Tabela de todas as corridas, *status* (aprovada e reprovada), motivo da reprovação e datas de análise.
			• Tabela de concentração do padrão de calibração e resultados da função de resposta (parâmetros da curva de calibração) de todas as corridas aceitas com precisão e exatidão.
			• Tabela de resultados de CQs de todas as corridas aceitas com resultados da precisão e exatidão intracorrida e intercorrida.
			• Tabela de corridas reinjetadas com resultados das corridas reinjetadas e motivo(s) para reinjeção.
			• Gráficos de análise de tendências de CQs são recomendáveis.
			• Tabela de resultados de concentração do estudo.
			Além disso, para Estudos Comparativos de BD/BE também incluir:
			• Identidade do instrumento para cada corrida em estudos comparativos de BD/BE†.
			• Gráficos de resposta do PI para cada corrida analítica, incluindo corridas que falharam.
			• 100% da tabela de resumo das corridas aceitas e que falharam.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Cromatogramas e Reintegração	• Trilha de auditoria eletrônica. • 100% dos cromatogramas eletrônicos, originais e reintegrados, de corridas aceitas e rejeitadas. • Motivo da reintegração. • Tabelas resumo do modo de integração de 100% das corridas aceitas e rejeitadas, incluindo curva de calibração, regressão, ponderação, resposta do analito e do PI e tempo de retenção, taxa de resposta, tipo de integração.	**Para todos os estudos:** • Cromatogramas representativos (original e reintegração). • Motivo da reintegração. • Os cromatogramas podem ser enviados como suplemento. **Além disso, para estudos comparativos de BD/BE também incluir:** • Cromatogramas de 100% das corridas, original e reintegrados, de corridas aceitas e rejeitadas. • Tabela resumo com 100% das corridas aceitas e rejeitadas.	**Para todos os estudos:** • Os cromatogramas podem ser enviados como suplemento. • Para estudos que não sejam comparativos de BD/BE, cromatogramas selecionados aleatoriamente de 5% das amostras contidas em dossiês submetidos. • Motivo da reintegração. • Identificação e discussão de cromatogramas com reintegração manual. • POP para reintegração, conforme aplicável. **Além disso, para estudos comparativos de BD/BE, também incluir:** • 100% dos cromatogramas. • Cromatogramas originais e reintegrados e resultados de integração inicial e reintegração. • 100% das tabelas resumo de corridas aceitas e rejeitadas.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Desvios de Procedimentos	• Documentação contemporânea de desvios/ eventos inesperados. • Investigação de eventos inesperados. • Avaliação do impacto.	• Descrição dos desvios. • Impacto nos resultados do estudo. • Descrição e dados de suporte de investigações relevantes.	• Descrição dos desvios. • Impacto nos resultados do estudo. • Descrição e dados de suporte de investigações relevantes.
Reanálise/ Repetir Análise	• Procedimentos para realizar reanálise/repetição (por exemplo, definir razões para reanálise). • Reter 100% dos dados repetidos/reanalisados. • Registros contemporâneos de motivo para repetições.	• Não aplicável.	**Para todos os estudos:** • Tabela de identificação de amostra, motivo para análise repetida, valores de análise original e de repetição, motivo para valores relatados, identidade das corridas. **Além disso, para Estudos Comparativos de BD/BE, também incluir:** • Para estudos comparativos de BD/BE, os valores das corridas rejeitadas devem ser incluídos em uma tabela separada.
ISR	• Procedimento para ISR. • Dados da ISR: identidade das corridas, folhas de resumo da corrida, cromatogramas ou outros arquivos de dados eletrônicos de instrumentos. • Documentação de investigações de falha da ISR, se houver.	• Não aplicável.	• Tabela de dados da ISR (valores originais e de reanálise e identidade da corrida, diferença percentual, percentual aprovado). • Investigações de falha da ISR, se houver††.

Continuação Tabela 1: Documentação e Relatórios

Itens	Documentação no Local de Análise	Relatório de Validação[1]	Relatório Bioanalítico[1]
Comunicação	• Entre as partes envolvidas (Solicitante, organizações de pesquisa contratadas e consultores) relacionadas ao estudo/método.	• Não aplicável.	• Não aplicável.
Auditorias e Inspeções	• Evidências de auditoria e inspeções.	• Não aplicável.	• Não aplicável.

[1] Espera-se que o solicitante mantenha dados no local de análise para corroborar os dados resumidos apresentados nos Relatórios de Validação e Bioanalítico. Os Relatórios de Validação e Bioanalítico devem ser apresentados no requerimento.

† Pode anexar ou incluir o *link* do Relatório de Validação.

†† Enviar no Relatório de Validação ou no Relatório Bioanalítico

11. GLOSSÁRIO

Amostra Branco: amostra de uma matriz biológica à qual nenhum analito, nenhum PI e nenhuma matriz ou tampão adicional alternativo foi adicionado.

Amostra Corrida: amostra obtida de sujeitos do estudo ou animais analisada no estudo.

Amostra de Controle de Qualidade (CQ): amostra de matriz biológica enriquecida com uma quantidade conhecida de analito que é usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e avaliar a integridade e a validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas em um lote ou corrida individual.

Amostras do estudo: amostras de animais incluídos em estudos não-clínicos ou de indivíduos incluídos em estudos clínicos.

Amostra Processada: amostra final, pronta para análise, após ter sido submetida a todos os procedimentos de preparo de amostra (por exemplo, extração, diluição, concentração).

Amostra Zero: amostra branco enriquecida com PI.

Análise: série de procedimentos analíticos, desde o processamento/diluição da amostra até sua medição num instrumento analítico.

Analito: substância química específica que está sendo medida em uma matriz biológica, incluindo um fármaco intacto, uma biomolécula e moléculas relacionadas, seus derivados e metabólitos.

Concentração Nominal: concentração teórica ou esperada.

Corrida Analítica (também referida como "Corrida"): conjunto completo de amostras analíticas e de estudo com número apropriado de padrões de calibração e CQs para sua validação. Várias corridas podem ser concluídas em um dia ou uma corrida pode levar vários dias para ser concluída.

Curva de Calibração: relação entre a resposta do instrumento (por exemplo, área do pico, altura ou sinal) e a concentração (quantidade) do analito nos padrões de calibração dentro de uma determinada faixa. Também referida como Curva Padrão.

Curva Padrão: relação entre a resposta do instrumento (por exemplo, área do pico, altura ou sinal) e a concentração (quantidade) do analito nos padrões de calibração dentro de uma determinada faixa. Também referida como Curva de Calibração.

Diluição Mínima Requerida (DMR): fator de diluição inicial pelo qual as amostras biológicas são diluídas com solução tampão para análise por LBAs. O DMR pode não ser

necessariamente a diluição final, mas deve ser idêntico para todas as amostras, incluindo padrões de calibração e CQs. No entanto, as amostras podem exigir diluição adicional.

Efeito Gancho: supressão da resposta devida a concentrações muito altas de um analito específico. Um efeito gancho pode ocorrer em LBAs que usam uma etapa de reação em fase líquida para incubar os reagentes de ligação com o analito. Também conhecido como efeito prozona.

Efeito Matriz: alteração ou interferência direta ou indireta na resposta devida à presença de analitos não intencionais ou outras substâncias interferentes na amostra.

Efeito Residual: aparecimento ou aumento do sinal do analito em uma amostra, causado por resíduos provenientes de uma amostra anterior.

Ensaio de Ligação (*Ligand Binding Assay* - LBA): método para analisar um analito de interesse usando reagentes que se ligam especificamente ao analito. O analito é detectado usando reagentes marcados com, por exemplo, uma enzima, radioisótopo, fluoróforo ou cromóforo. As reações podem ser realizadas em placas de microtitulação, tubos de ensaio ou outros sistemas semelhantes.

Erro Total: soma do valor absoluto dos erros de precisão (%) e exatidão (%). O erro total é relatado como erro percentual (%).

Especificidade: capacidade de um método analítico para detectar e diferenciar o analito de outras substâncias, incluindo suas substâncias relacionadas (por exemplo, substâncias que são estruturalmente semelhantes ao analito, metabólitos, isômeros, impurezas ou fármacos concomitantes).

Estabilidade: medida da integridade de um analito (resistência à degradação) em uma determinada matriz sob condições específicas de armazenamento e uso em relação ao material de partida em determinados intervalos de tempo.

Exatidão: o grau de proximidade do valor medido em relação ao valor nominal ou o valor verdadeiro conhecido sob condições prescritas (ou como medido por um método particular). Neste documento, a exatidão é expressa como porcentagem do valor nominal.

Faixa de Calibração: intervalo entre as concentrações (quantidades) maior e menor do analito nos padrões de calibração (incluindo essas concentrações).

Fator de Diluição: magnitude pela qual uma amostra é diluída.

Fármacos Sintéticos: fármacos sintetizados quimicamente.

Função de Resposta: expressão matemática que descreve adequadamente a relação entre a resposta do instrumento (por exemplo, área de pico ou razão de altura ou sinal) e a concentração (quantidade) do analito nos padrões de calibração. A função de resposta é definida dentro de um determinado intervalo.

Integridade da Diluição: avaliação do procedimento de diluição da amostra para confirmar que o procedimento não afeta a concentração medida do analito.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ): menor quantidade de um analito em uma amostra processada que pode ser determinada quantitativamente usando um método com precisão e exatidão predefinidas.

Limite Superior de Quantificação (LSQ): maior quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão pré-definidas.

Linearidade de Diluição: parâmetro que demonstra que o método pode analisar adequadamente amostras com concentração superior ao LSQ da curva de calibração sem influência do efeito gancho (prozona) e que as concentrações medidas não são afetadas pela diluição para atingir concentrações dentro da faixa de calibração em LBAs.

Lote (para Bioanálises): conjunto composto por controles de qualidade e amostras de estudo, e possivelmente amostras branco, amostras zero e padrões de calibração, que são manuseados durante um período fixo e pelo mesmo grupo de analistas com os mesmos reagentes em condições homogêneas.

Lote (para Padrões de Referência e Reagentes): quantidade específica de material produzido em um processo ou série de processos de modo que seja homogêneo dentro dos limites especificados.

Matriz Biológica: material biológico incluindo, mas não limitado a sangue, soro, plasma e urina.

Matriz Substituta: material alternativo a uma matriz de estudo com disponibilidade limitada (por exemplo, líquido cefalorraquidiano, bile) ou alternativo a uma matriz que contém um elemento endógeno interferente.

Método Bioanalítico: método analítico utilizado na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas.

Padrão de Calibração: matriz enriquecida com quantidade conhecida de analito, utilizada para construção da curva de calibração.

Padrão de Referência: substância química bem caracterizada, de pureza e identidade conhecidas, utilizada para preparar amostras de calibração e de controle de qualidade.

Padrão Interno (PI): substância química análoga ao analito alvo, estruturalmente semelhante ou marcada com isótopo estável, adicionada aos padrões de calibração, CQs, amostras zero (quando utilizadas) e amostras de estudo em uma concentração conhecida e constante para facilitar a quantificação do analito alvo.

Padrões Âncora (pontos de ancoragem): amostras com concentrações definidas e abaixo do LIQ ou acima do LSQ da curva de calibração, analisadas para melhorar o ajuste da curva de calibração em LBAs.

Paralelismo em Diluição: demonstração de que a curva resposta da diluição em série da amostra é paralela à curva de calibração. O paralelismo é uma característica de desempenho que pode detectar potenciais efeitos de matriz.

Precisão: proximidade de concordância (ou seja, grau de dispersão) entre uma série de medições. A precisão é expressa como o coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (RSD) em porcentagem, pela seguinte equação:

CV% = (Desvio padrão ÷ média) x 100

Produtos Biológicos: produtos farmacêuticos cuja substância ativa é composta por macromoléculas biológicas, tais como proteínas, polipeptídeos e ácidos nucléicos.

Procedimento Operacional Padrão (POP): instruções escritas e detalhadas que têm o objetivo de prover uniformidade na execução de funções ou processos específicos.

Reagente Crítico: reagentes utilizados em LBAs que têm impacto direto nos resultados do ensaio. Incluem reagentes de ligação (por exemplo, anticorpos, proteínas de ligação, e peptídios) e reagentes contendo frações enzimáticas.

Reagente de Ligação: Reagente que se liga ao analito em métodos bioanalíticos baseados em LBAs.

Reanálise: avaliação adicional de uma amostra previamente testada. Também referida como Análise de Repetição.

Reanálise de Amostra Corrida (*Incurred Sample Reanalysis* – ISR): reanálise de uma porção das amostras corridas em uma outra corrida analítica, em um dia diferente, para determinar se os resultados analíticos originais são reprodutíveis.

Recuperação: a eficiência de extração de um processo analítico, relatada como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito recuperada após as etapas de extração e processamento de amostras do método.

Reintegração: alteração da integração original de um pico cromatográfico.

Réplica: uma das várias determinações ou medições de uma amostra, padrões de calibração ou CQ.

Reprodutibilidade: extensão em que resultados consistentes são gerados quando um experimento é repetido.

Seletividade: capacidade de um método analítico para diferenciar e medir o analito na presença de substâncias interferentes na matriz biológica (interferência não específica).

Sensibilidade: menor concentração de analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis (ou seja, LIQ).

Solução de Trabalho: solução isenta de matriz preparada por diluição da solução estoque no solvente adequado. É adicionada principalmente à matriz para preparar padrões de calibração e CQs.

Solução Estoque: solução do analito em concentração conhecida, em um solvente ou mistura de solventes, utilizada para preparar soluções de trabalho, padrões de calibração e CQs.

Substância Interferente: substância presente na matriz que pode afetar a quantificação de um analito.

Tabela Resumo da Corrida: extrato tabular de todos os dados de amostras individuais, CQs e padrões de calibração dentro da corrida analítica (por exemplo, para cromatografia: tempos de retenção, respostas de analito e PI, concentrações e fatores de diluição, se houver; para LBAs: concentrações de respostas de analito, fatores de diluição).

Teste de Adequação do Sistema: determinação do desempenho do instrumento conduzida antes da corrida analítica por meio de análise de amostra preparada ou enriquecida, que não faz parte das amostras do estudo (por exemplo, razão sinal-ruído, forma de pico, tempo de retenção).

Validação: demonstração de que um método bioanalítico é adequado para o fim a que se destina.

Validação Completa: validação de todos os parâmetros que garantam a integridade do método quando aplicado à análise da amostra.

Validação Cruzada: avaliação de potencial viés de resultados entre diferentes métodos bioanalíticos ou diferentes laboratórios bioanalíticos utilizando o mesmo método bioanalítico, determinando se os dados relatados são comparáveis.

Validação Parcial: validação baseada na avaliação dos parâmetros selecionados da validação completa. Aplicável a métodos que foram alterados após validação completa.

Viés: tendência de um processo de medição para superestimar ou subestimar o valor de um parâmetro populacional.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. *ICH HARMONISED GUIDELINE: BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS - M10*. *Final version.* Adotado em 24 de maio de 2022. https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200

CEP: 71205-050

Brasília – DF

www.anvisa.gov.br

www.twitter.com/anvisa_oficial

Anvisa Atende: 0800-642-9782

ouvidoria@anvisa.gov.br