

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN EL ANÁLISIS DE NIVELES DE FÁRMACOS Y SUS METABOLITOS EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

DOCUMENTO Nº 5

2ª Versión

SUMARIO

1.- Introducción

2.- Aspectos referidos al estudio

2.1. Protocolo

2.2. Obtención, envío, recepción y almacenamiento de los especímenes

2.3. Producto de ensayo

2.4. Equipos

2.5. Método de análisis y validación

2.6. Proceso de análisis: controles de calidad y repetición de muestras

2.7. Registro y archivo de datos primarios

2.8. Informe final

3.- Bibliografía

Glosario de términos.

1.- INTRODUCCIÓN

Los estudios no clínicos (fármaco-toxicológicos), que formen parte de un expediente de registro, cuyo objetivo sea el análisis de niveles de sustancias activas en especímenes biológicos para su cuantificación, deben hacerse cumpliendo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Ejemplo de estos estudios serían estudios de toxicocinética, estudios de farmacocinética y estudios de niveles de residuos.

La validación de los métodos analíticos utilizados en estos estudios también debe realizarse siguiendo los principios de BPL. Si la validación no se realizara conforme a BPL, se debería mencionar en el informe del estudio y valorar su impacto sobre la validez de los resultados.

En lo relativo a la parte bioanalítica de los estudios clínicos de bioequivalencia, que se realicen de acuerdo a los principios de BPL, se ha de considerar que de acuerdo al documento de la EMA *Guideline on the investigation of bioequivalence (rev1)*, que entró en vigor el 1 de agosto de 2010, no sería necesario que los centros de ensayo estén incluidos en un programa de monitorización nacional de cumplimiento de BPL.

Si un laboratorio aplicara voluntariamente los principios de BPL para el análisis de muestras clínicas, debe tener en cuenta aspectos adicionales a las BPL, sobre seguridad y derechos de los sujetos de un ensayo clínico, contemplados en el *"Reflection paper for laboratories that perform the analysis or evaluation of clinical trial samples"* y la normativa específica de estudios clínicos.

El presente documento tiene por objeto dar una serie de recomendaciones para realizar estudios de análisis de niveles de fármacos y sus metabolitos en especímenes biológicos que se realizan conforme a los principios BPL, y no se tiene en cuenta la fase

de obtención de especímenes. Sólo se hará un desarrollo expreso de aquellos apartados de las BPL que requieran un tratamiento específico para dichos tipos de estudios, mientras que el resto de los apartados de las buenas prácticas de laboratorio tales como: organización, personal, garantía de calidad, instalaciones, reactivos, procedimientos normalizados de trabajo (PNT), etc., deberán cumplir las exigencias indicadas en los principios BPL.

2.- ASPECTOS REFERIDOS AL ESTUDIO

2.1. Protocolo

Como en todo estudio a realizar bajo normas BPL, es necesario que exista un protocolo, que debe seguir los criterios establecidos en los principios de BPL en aquellos aspectos que le sean de aplicación en función del tipo de estudio de que se trate.

Si los especímenes proceden de otro estudio, el protocolo del estudio debe hacer referencia inequívoca a dicho origen, y el laboratorio debe tener información de la caracterización del producto de ensayo y de referencia administrado, posología, vía de administración, medicación concomitante, especímenes obtenidos y condiciones de conservación de los especímenes hasta su llegada al laboratorio.

2.2. Recepción y almacenamiento de los especímenes

Deberán existir procedimientos normalizados de trabajo y registros adecuados para las siguientes actividades, como mínimo:

- La identificación del espécimen deberá incluir: código del estudio, identificación del individuo o animal del cual procede el espécimen, tipo de espécimen y si procede tratamiento, tiempo cinético y día de su obtención.
- Instrucciones de recepción en el caso de especímenes de procedencia externa.
- Condiciones de recepción de los especímenes en el laboratorio de análisis.
- Condiciones de almacenamiento y custodia de las muestras.

La fecha de inicio de la fase experimental del estudio es la fecha de recepción de especímenes en el laboratorio de análisis, ya que las condiciones de los especímenes a su recepción constituyen datos primarios del estudio.

2.3. Productos de ensayo y de referencia

Los estudios de análisis de niveles de fármacos van precedidos de una fase o de un estudio de administración del producto de ensayo y de referencia al sistema experimental.

Los productos que se utilizan en la preparación de patrones para la cuantificación de niveles de fármacos y de sus metabolitos deben ser considerados como productos de referencia en la fase de bioanálisis.

Debe conocerse el número de lote, la fecha de caducidad o reanálisis, la pureza, la composición y la concentración de todos los productos de ensayo y de referencia utilizados en estudios BPL. El laboratorio de bioanálisis debe disponer de la información de los productos de ensayo y de referencia administrados a los sistemas experimentales.

En los casos en que el producto de ensayo sea suministrado por el promotor, deberá existir un mecanismo desarrollado en colaboración entre el promotor y el laboratorio, para verificar la identidad del producto de ensayo y facilitar la información necesaria.

2.4. Equipos

Los equipos utilizados en estos estudios deberán ser controlados siguiendo los criterios establecidos en las buenas prácticas de laboratorio, es decir, el laboratorio tendrá que disponer de los correspondientes PNT y registros de uso, mantenimiento y calibración. Entre estos equipos se tendrán que incluir los frigoríficos y congeladores utilizados para la conservación de los especímenes.

Tal como se establece en la Guía de la OCDE número 17 (*“Application of GLP Principles to computerised systems”*), se debe disponer de un inventario actualizado de todos los sistemas informatizados relevantes en los estudios BPL. El inventario debe contener una breve descripción funcional del sistema, el estado de validación, la marca, el modelo o la versión según corresponda, así como el responsable y el administrador del sistema.

Los sistemas informatizados que participan en los estudios BPL tienen que estar debidamente validados para su uso previsto. La infraestructura informática debe estar cualificada.

2.5. Método de análisis y su validación

El método de análisis puede presentarse de forma detallada en el protocolo del estudio, o bien de forma resumida, en cuyo caso deberá completarse con la referencia a los correspondientes PNT del laboratorio.

El método de análisis utilizado en estos estudios deberá de estar validado en las condiciones de trabajo del laboratorio donde se lleva a cabo el análisis del espécimen, así como para cada sustancia y matriz biológica, y teniendo en cuenta las guías internacionales que les sean de aplicación. El informe de validación deberá incluir como mínimo los siguientes parámetros:

- Especificidad/selectividad
 - Incluyendo la medicación concomitante, si procede.
- Precisión.
- Exactitud.
- Función de respuesta o curva de calibrado.
- Límite de cuantificación.
- *Carry-over* o efecto arrastre.
- Estabilidades:
 - De las soluciones stock y de trabajo del analito y estándar interno.
 - En las condiciones de conservación de las muestras en el congelador a corto y largo plazo.
 - En el inyector.
 - De los ciclos de congelación-descongelación que puedan producirse.

Cada laboratorio deberá establecer mediante PNT, la metodología y criterios de aceptación de los parámetros de validación.

Existe la posibilidad de realizar una validación en paralelo al análisis de los especímenes de un determinado estudio; en todo caso el laboratorio deberá haber aprobado el informe final de validación del método de análisis previamente a la aprobación del informe final del estudio en que se haya utilizado dicho método.

2.6. Proceso de análisis: controles de calidad y repetición de muestras

Deberán existir como mínimo PNT para:

- Validación del método analítico.
- Preparación de muestras.
- Preparación de estándares o calibradores.
- Preparación de controles de calidad.
- Descripción y composición de las series analíticas.
- Descripción del método analítico.
- Criterios de aceptación de las series analíticas.
- Causas y criterios de repetición de análisis de las muestras.
- Adquisición, procesamiento y gestión de datos primarios en técnicas cromatográficas. Integración.
- Reproducibilidad del análisis de muestras reales ("*incurred samples*").

2.7. Registro y archivo de datos primarios.

El laboratorio deberá disponer de un PNT que defina el sistema de archivo de los datos primarios.

El laboratorio debe definir su política de integridad de datos. Asimismo, en relación a los sistemas informatizados deberán existir como mínimo PNT para:

- Funcionamiento y mantenimiento.
- Seguridad física y lógica.
- Revisiones periódicas.
- Copias de seguridad y recuperación de desastres de la infraestructura informática.
- Control de cambios.

2.8. Informe final

El informe final debe contener los puntos establecidos en las normas BPL, aunque sería posible no incluir el apartado de conclusiones, si el estudio se limitara a la presentación de los resultados sin incluir la interpretación farmacocinética de los mismos.

El informe final debe incluir, entre otros, los siguientes puntos:

- Si el estudio de bioanálisis no incluye la fase de administración del producto de ensayo al sistema experimental, debe incluirse la referencia inequívoca al estudio del que proceden los especímenes.
- Referencia al informe de validación del método analítico.
- Descripción del método analítico o referencia al PNT.
- Identificación y descripción de los productos de ensayo y de referencia (de la administración y del bioanálisis).
- Descripción de los estándares de calibración y de los controles de calidad.
- Criterios de aceptación de las series analíticas.
- Información de los especímenes (recepción, origen, listado, conservación y localización).
- Resultado del análisis:
 - Identificación de las series del estudio: muestras analizadas, fechas y resultados.
 - Curvas de calibración válidas.
 - Controles de calidad de las series válidas con identificación de los valores fuera del criterio de aceptación.
- Listado de las series analíticas no válidas. Fechas de análisis y motivo del rechazo.
- Descripción de las desviaciones al protocolo del estudio o PNT y su impacto en el estudio.
- Documentación de los reanálisis, excluyendo los debidos a series no válidas por razones analíticas: identificación de las muestras repetidas, motivo del reanálisis, el valor original y el valor repetido.

- En estudios de bioequivalencia deben incluirse todos los cromatogramas del 20% de los individuos, incluyendo las curvas de calibrado y controles de calidad. En otros estudios se deben incluir cromatogramas representativos.
- Resultados de las “*incurred samples*”, si procede.
- Tablas de reproducibilidad del estándar interno, si procede.

3.- BIBLIOGRAFÍA

- ICH: *International Conference on Harmonisation process. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures*. 1994.

- EMA: *Guideline on the investigation of bioequivalence*. Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev-1. 2010/Corr (agosto 2010).

-EMA: *Guideline on bioanalytical method validation*. Doc ref: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (febrero 2012).

- EMA: *Reflection paper for laboratories that perform the analysis or evaluation of clinical trial samples*. Doc. Ref.: EMA/INS/GCP/532137/2010 (febrero 2012).

- FDA: *Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM)*. Mayo 2018.

- OCDE: Guías de la OCDE vigentes relacionadas con los principios de BPL.

- VICH GL1: *Guideline on validation of analytical procedures: definition and terminology*. Doc. Ref.: CVMP/VICH/590/98 (diciembre 1998).

- VICH GL2: *Guideline on validation of analytical procedures: methodology*. Doc. Ref.: CVMP/VICH/591/98 (diciembre 1998).

- VICH GL46: *Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: metabolism study to determine the quantity and identify the nature of residues*. Doc. Ref.: EMA/CVMP/VICH/463072/2009 (marzo 2011).

- VICH GL47: *Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: laboratory animal comparative metabolism studies*. Doc. Ref.: EMA/CVMP/VICH/463104/2009 (marzo 2011).

- VICH GL48: *Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods*. Doc. Ref.: EMA/CVMP/VICH/463199/2009 (febrero 2015).

- VICH GL49: *Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies*. Doc. Ref.: EMA/CVMP/VICH/463202/2009 (febrero 2015).

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Analito: Compuesto químico o biológico específico que se quiere determinar, que puede ser el fármaco intacto, una biomolécula o su derivado, metabolito y/o productos de degradación, en la matriz biológica.

Carry-over (efecto arrastre): Aparición de una señal de analito en una muestra blanco después del análisis de una muestra con una alta concentración de analito.

Especificidad/Selectividad: Capacidad de un método bioanalítico de medir y diferenciar los analitos en presencia de otros componentes que puedan estar presentes en la muestra. Ello puede incluir metabolitos, impurezas o componentes de la matriz.

Estándar de calibración o calibrador: Muestra de matriz biológica a la que se le ha añadido una cantidad conocida de analito. Los estándares de calibración se utilizan para construir la curva de calibrado.

Estándar interno: Producto de referencia añadido a los estándares de calibración, controles de calidad y muestras del estudio a una concentración conocida y constante para corregir la variabilidad experimental durante la preparación de las muestras y el análisis.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado de una medición (valor medido) y el valor nominal de referencia aceptado (patrón de uso interno o patrón internacional).

Función de respuesta o curva de calibrado: Función que describe adecuadamente la relación entre la respuesta del instrumento (por ejemplo, área de pico o relación de altura) y la concentración (cantidad) de analito en la muestra. La función de respuesta se define dentro de un rango limitado por los límites inferior y superior de cuantificación.

Límite inferior de cuantificación: La menor concentración de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente en las condiciones experimentales descritas, con exactitud y precisión definidas.

Límite superior de cuantificación: La mayor concentración de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente en las condiciones experimentales descritas con exactitud y precisión definidas.

Matriz biológica: Material biológico que puede muestrearse y procesarse de forma reproducible. Ejemplos: sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, esputos, tejidos, etc.

Método o procedimiento de ensayo: Conjunto de todos los procedimientos involucrados en la obtención, tratamiento, almacenamiento y análisis de muestras (especímenes) biológicas para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica determinada.

Muestra de control de calidad (QC): Muestra, preparada a partir de la matriz biológica, a la que se le añade una cantidad conocida de analito para monitorizar la ejecución del método bioanalítico y evaluar la integridad y validez de los resultados de las muestras desconocidas y analizadas en una secuencia analítica.

Muestra problema: Muestras del estudio de la que se quiere determinar la concentración del analito.

Precisión: Grado de concordancia (o de dispersión) entre resultados de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de la misma muestra y en las condiciones establecidas. La precisión puede ser subdividida en precisión intradía o intraensayo y precisión interdía o interensayo.

Rango de calibración: Zona comprendida entre los niveles inferior y superior de cuantificación (ambos inclusive) para la cual se ha demostrado que el procedimiento analítico es adecuado, por lo que respecta a su precisión, exactitud y linealidad.

Repetibilidad: Precisión de los resultados de una medición obtenidos con el mismo método y bajo las mismas condiciones (laboratorios, analistas, días, diferentes equipos de medida, etc.).

Reproducibilidad: Precisión de los resultados de una medición obtenidos con el mismo método, pero bajo condiciones diferentes (laboratorios, analistas, días, equipos de medida, etc.).

Secuencia analítica (lote analítico): Grupo completo de muestras formado por las muestras problema del estudio, con un número apropiado de calibradores y controles de calidad, que son analizadas conjuntamente. Varias secuencias pueden ser procesadas en un día, o una secuencia puede durar varios días.

Sensibilidad: Capacidad del método de ensayo para registrar ligeras variaciones de la concentración de analito.

Validación: Confirmación mediante el examen y la obtención de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista.

Validación de un método analítico: Confirmación, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de un método analítico, cumplen las especificaciones relativas al uso previsto.