

INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN N° 182, DE 5 DE SETEMBRO DE 2022

Dispõe sobre a validação e ensaios de permeabilidade com células Caco-2.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 15, III e IV, aliado ao art. 7º, III da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 187, VII, § 1º do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve adotar a seguinte Instrução Normativa, conforme deliberado em reunião realizada em 31 de agosto e 1º de setembro de 2022, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

CAPÍTULO I

DISPOSIÇÕES INICIAIS

Seção I

Objetivo

Art. 1º Esta Instrução Normativa dispõe sobre os ensaios de permeabilidade usando células Caco-2 e sua validação, em conformidade com a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 749, de 5 de setembro de 2022, que dispõe sobre isenção de estudos de bioequivalência /biodisponibilidade relativa, ou outra que vier a substituí-la.

Parágrafo único. Quando forem a única prova da determinação de classificação como alta permeabilidade para fins de classificação pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), os ensaios com células Caco-2 ficam limitados a fármacos de transporte passivo.

Seção II

Definições

Art. 2º Para efeito desta Instrução Normativa são adotadas as seguintes definições:

I - Células Caco-2: células isoladas e cultivadas in vitro, originárias de adenocarcinoma de cólon humano, que se diferenciam em estruturas similares a de enterócitos, formando monocamada de células cilíndricas polarizadas com microvilosidades na borda apical;

II - Extensão de absorção: quantidade total de fármaco absorvido pelo organismo. Medida pelo parâmetro farmacocinético de área sob a curva (ASC);

III - Fármaco marcador: fármaco com valor de permeabilidade conhecido usado como controle para demonstrar consistência do método;

VI - Fármaco substrato de transportadores de efluxo: fármaco com capacidade de realizar transporte bidirecional na membrana intestinal e demonstrar a expressão funcional dos transportadores de efluxo;

V - Fármaco teste: fármaco que é o objeto da análise;

VI - Padrões internos: fármacos marcadores de alta e de moderada permeabilidade, definidos durante a validação do método, que devem ser incluídos no fluido doador juntamente com o fármaco teste no ensaio de permeabilidade para demonstrar consistência do método;

VII - Permeabilidade intestinal: propriedade da membrana do epitélio intestinal em permitir o trânsito de moléculas através desta barreira biológica;

VIII - Resistência elétrica transepitelial (RET): medida de resistência elétrica da monocamada celular usada como método de determinação da integridade e permeabilidade na monocamada;

IX - Transporte passivo: transporte de moléculas através da membrana plasmática por difusão passiva ao longo de um gradiente de concentração determinado por suas solubilidades na bicamada lipídica.

CAPÍTULO II

DA VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE PERMEABILIDADE

Art. 3º A validação do ensaio com células Caco-2 para determinação da permeabilidade para classificação pelo SCB deve ser demonstrada por uma relação ranqueada entre os valores experimentais de permeabilidade e a extensão de absorção em humanos usando fármacos marcadores de permeabilidade zero, baixa (< 50%), moderada (50-84%) e alta (≥ 85%).

§ 1º Devem ser utilizados no mínimo cinco fármacos marcadores para cada uma das categorias de alta, moderada e baixa permeabilidade, conforme exemplos do Anexo I desta Instrução Normativa.

Edição nº 203.2022 | São Paulo, 08 de setembro de 2022

§ 2º Deve ser incluído um marcador de permeabilidade zero e devem ser realizados no mínimo três replicatas do ensaio com células para fornecer uma estimativa confiável de permeabilidade de cada fármaco.

§ 3º Os ensaios devem permitir diferenciar entre fármacos com baixa, moderada e alta permeabilidade.

§ 4º O método deve ser devidamente validado.

Art. 4º A integridade da monocamada de células Caco-2 também deve ser confirmada comparando as medidas de resistência elétrica transepitelial (RET), e outros indicadores adequados, antes e após a condução do experimento.

Parágrafo único. Adicionalmente, a integridade da monocamada celular deve ser demonstrada usando fármacos de permeabilidade zero, conforme exemplos do Anexo I desta Resolução.

Art. 5º O relatório de validação do método deve incluir:

I - lista de fármacos marcadores com dados de extensão da absorção em humanos (média, desvio padrão e coeficiente de variação) selecionados para estabelecer a adequação do método;

II - valores de permeabilidade para cada fármaco marcador (média, desvio padrão e coeficiente de variação);

III - classe de permeabilidade de cada fármaco marcador;

IV - gráfico de extensão da absorção em função da permeabilidade (média \pm desvio padrão ou intervalo de confiança de 95%) com identificação do limite para classificação de alta permeabilidade e do fármaco marcador de alta permeabilidade selecionado para classificar o fármaco teste;

V - descrição do método do estudo;

VI - concentração dos fármacos (marcadores e teste) no fluido doador;

VII - descrição do método analítico;

VIII - equação usada para cálculo de permeabilidade;

IX - informações sobre potencial efluxo (dados sobre transporte bidirecional para substrato conhecido);

X - certificado das células Caco-2; e

XI - informações sobre manutenção do banco celular de Caco-2.

CAPÍTULO III

DO ENSAIO DE PERMEABILIDADE

Art. 6º O transporte passivo do fármaco teste deve ser demonstrado por meio de um sistema apropriado que expresse transportadores de efluxo demonstrando a independência da permeabilidade mensurada in vitro em crescentes concentrações do fármaco (1%, 10% e 100% da maior dose dissolvida em 250 mL), ou pela direção do transporte com medição de razão de efluxo menor do que 2 (dois) para as concentrações selecionadas, conforme fórmula constante do Anexo II desta Resolução.

Parágrafo único. A expressão funcional dos transportadores de efluxo deve ser verificada usando estudos de transporte bidirecional demonstrando a permeabilidade assimétrica de substratos de transportadores de efluxo, conforme exemplos do Anexo I desta Resolução, selecionados em concentrações em que não ocorra saturação.

Art. 7º A concentração do fármaco teste selecionada para os ensaios de permeabilidade deve ser justificada.

Art. 8º Deve-se empregar as condições de ensaio definidas durante a validação do método e incluir um fármaco marcador de alta e um de moderada permeabilidade no fluido doador, juntamente com o fármaco teste, como padrão interno para demonstrar consistência do método.

Art. 9º A escolha dos fármacos como padrões internos deve ser baseada na compatibilidade com o fármaco teste, ou seja, não devem apresentar nenhuma interação física, química ou de permeação.

Art. 10. A permeabilidade dos padrões internos pode ser determinada seguindo a avaliação do fármaco teste na mesma monocamada ou em outras monocamadas na mesma placa, quando não for possível incluir o padrão interno na mesma cultura de células da avaliação de permeabilidade do fármaco teste.

Art. 11. Os valores de permeabilidade do padrão interno devem ser consistentes entre os diferentes testes, incluindo aqueles conduzidos durante a validação do método.

Art. 12. Devem ser definidos critérios de aceitação para os padrões internos e fármacos substrato de transportadores de efluxo.

Art. 13. A média de recuperação do fármaco teste e dos padrões internos deve ser definida no final do teste.

Art. 14. Para recuperação menor do que 80% (oitenta por cento), uma avaliação por balanço de massas deve ser conduzida incluindo medição de residual do fármaco na monocamada de células e no aparato do teste.

Edição nº 203.2022 | São Paulo, 08 de setembro de 2022

Art. 15. A avaliação da permeabilidade para fins de classificação pelo SCB pode ser facilitada pela seleção de padrão interno de alta permeabilidade com permeabilidade próxima do limite entre as classes de moderada e alta permeabilidade.

Parágrafo único. O fármaco teste é considerado altamente permeável quando a permeabilidade é igual ou maior do que a do padrão interno de alta permeabilidade.

Art. 16. Os dados apresentados para a avaliação da alta permeabilidade do fármaco teste (média, desvio padrão, coeficiente de variação) devem incluir dados de permeabilidade do fármaco teste e dos padrões internos, informações de estabilidade gastrointestinal obtidos in vitro e informações sobre mecanismo de transporte passivo.

CAPÍTULO IV

DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 17. O descumprimento das disposições contidas nesta Instrução Normativa constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil e penal cabíveis.

Art. 18. Esta Instrução Normativa entra em vigor em 3 de outubro de 2022.

ANTONIO BARRA TORRES

Diretor-Presidente

ANEXO I

Fármacos/substâncias marcadores para validação do método do ensaio de permeabilidade

Alta permeabilidade ($f_a \geq 85\%$)	Antipirina Cafeína Cetoprofeno Naproxeno Teofilina Metoprolol Propranolol Carbamazepina Fenitoína Disopiramida Minoxidil
Moderada permeabilidade ($f_a = 50-84\%$)	Clorfeniramina Creatinina Terbutalina Hidroclorotiazida Enalapril Furosemida Metformina Amilorida Atenolol Ranitidina
Baixa permeabilidade ($f_a < 50\%$)	Famotidina Nadolol Sulpirida Lisinopril Aciclovir Foscarnete Manitol Clorotiazida Macrogol 400 (Polietilenoglicol 400) Enalaprilato
Permeabilidade zero	FITC-Dextrano Macrogol 4000 (Polietilenoglicol 4000) Amarelo de Lucifer (Lucifer yellow - LY) Inulina Lactulose
Substratos de efluxo	Digoxina Paclitaxel Quinidina Vimblastina

ANEXO II

Fórmula de razão de efluxo

$$\text{Razão de efluxo} = P_{\text{appBL} \rightarrow \text{AP}} / P_{\text{appAP} \rightarrow \text{BL}}$$

em que $P_{\text{appBL} \rightarrow \text{AP}}$ é a permeabilidade aparente na direção basolateral-apical e $P_{\text{appAP} \rightarrow \text{BL}}$ é a permeabilidade aparente na direção apical-basolateral.