

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Bioensayos en hemoderivados: aspectos legislativos, estadísticos y analíticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Victoria Collazo López

Directores

Gloria Frutos Cabanillas
Concepción Alonso Verduras

Madrid, 2015



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS
Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS)

MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

TESIS DOCTORAL

Bioensayos en Hemoderivados: Aspectos legislativos, estadísticos y analíticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

M^a VICTORIA COLLAZO LÓPEZ

Directoras:

Dra. GLORIA FRUTOS CABANILLAS

Dra. CONCEPCIÓN ALONSO VERDURAS



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

 agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS
Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS)
MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

TESIS DOCTORAL

**BIOENSAYOS EN HEMODERIVADOS:
ASPECTOS LEGISLATIVOS,
ESTADÍSTICOS Y ANALÍTICOS**

M^a VICTORIA COLLAZO LÓPEZ

DIRECTORAS:

Dra. GLORIA FRUTOS CABANILLAS
Dra. CONCEPCIÓN ALONSO VERDURAS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar las gracias a las directoras de esta tesis doctoral, las doctoras Gloria Frutos Cabanillas y Concepción Alonso Verduras, con las que he pasado muchas horas trabajando hasta conseguir que este proyecto saliese adelante. Les agradezco, sobre todo, su confianza en mí y todo lo que he aprendido a lo largo de estos años.

También me gustaría agradecer a todos aquellos que me han ayudado a abordar determinados aspectos, hasta ese momento, desconocidos para mí y, entre ellos, a la Dra. Carmen de la Morena Criado, Jefa de Servicio de la División de Química y Tecnología Farmacéutica de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y a la Dra. Presentación Fernández Herrero, Jefa de Servicio de Asuntos Jurídicos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Son tantos los compañeros de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios a los que tendría que agradecer su apoyo a lo largo de esta tesis que sería imposible mencionarlos uno a uno. Gracias a todos por vuestro apoyo y, sobre todo, gracias porque siempre habéis tenido una frase de ánimo para mí.

Particularmente, no quiero olvidarme de mis dos compañeras de laboratorio, Elena y Susana: Gracias por todo vuestro cariño, especialmente en los momentos en que el trabajo parecía demasiado.

Asimismo, quiero agradecer a mi compañera de laboratorio Esther su confianza en que esta tesis saldría adelante.

Me gustaría mencionar a mi familia, que siempre ha estado a mi lado, sin dejar de animarme y apoyarme en todas mis decisiones, acertadas o no.

A mis amigos, porque siempre me han aceptado y querido tal y como soy.

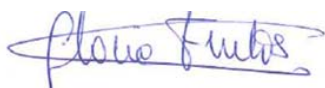
Por último, mi especial agradecimiento a Faustino: Gracias por tu infinita paciencia y por tu ayuda constante.

CERTIFICADOS DIRECTORAS

Las Doctoras en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, Doña Gloria Frutos Cabanillas y Doña Concepción Alonso Verduras

CERTIFICAN: Que la presente memoria que tiene por título: “**BIOENSAYOS EN HEMODERIVADOS: ASPECTOS LEGISLATIVOS, ESTADÍSTICOS Y ANALÍTICOS**”, ha sido realizada por María Victoria Collazo López bajo nuestra dirección, en la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), en Madrid, y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por dicho doctorando.

Madrid, Octubre de 2014



Dra. Gloria Frutos Cabanillas



Dr. Concepción Alonso Verduras

A Faustino

(“Andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos”).

Rayuela. Julio Cortázar)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hemostasia. Fisiología de la coagulación	3
1.1.1. Endotelio y sistema vascular	4
1.1.2. El papel de las plaquetas	4
1.1.3. Coagulación sanguínea	7
1.2 Hemoderivados	8
1.3 Factor VIII de coagulación	12
1.4 Factor von Willebrand	18
1.5 Bibliografía	22

2. OBJETIVO

31

3. NORMATIVA REGULATORIA

3.1 Regulación europea	35
3.2 EMA y Directrices	49
3.3 Regulación española	49
3.4 Liberación de lote europeo	51
3.5 Aspectos de calidad	56
3.6 Bibliografía	59

4. METODOLOGÍA

4.1 Conceptos estadísticos	63
4.2 Herramientas estadísticas	67
4.3 Software	74
4.3.1. Combistats [®]	75
4.3.2. Hoja de cálculo Excel [®]	79
4.3.3. Software estadístico R	85
4.4 Validación de métodos	89
4.4.1. Especificidad	89
4.4.2. Exactitud	89

4.4.3. Precisión	90
4.4.4. Linealidad	90
4.4.5. Rango	90
4.5 Gráficos de control	90
4.6 Bibliografía	95

5. BIOENSAYOS DE FVIII Y FvW

5.1 Instrumentación analítica para FVIII y FvW	101
5.2 Bioensayo de Factor VIII	102
5.2.1. Fundamentos del método de análisis cromogénico	103
5.2.2. Puesta a punto del ensayo de FVIII	105
5.2.3. Determinación de potencia de concentrados de FVIII	109
5.2.4. Análisis estadístico de datos	110
5.2.4.1. Análisis con Combistats®	111
5.2.4.2. Análisis con Excel®	112
5.2.4.3. Análisis con el paquete estadístico R	114
5.2.4.4. Comparación de los resultados obtenidos mediante los tres software	116
5.2.5. Validación del ensayo de FVIII	118
5.2.5.1. Calibración del ACL®: recta de calibración	118
5.2.5.2. Parámetros de validación del método: Especificidad	124
5.2.5.3. Parámetros de validación del método: Exactitud	124
5.2.5.4. Parámetros de Validación del método: Precisión	126
5.2.6. Estudio de calidad	128
5.2.6.1. Calidad de un ensayo	128
5.2.6.2. Gráficos individuales para errores residuales	128
5.3 Bioensayo de Factor von Willebrand	135
5.3.1. Fundamentos del método de análisis	135
5.3.2. Puesta a punto del ensayo de FvW	135
5.3.2.1. Diluciones de trabajo	136
5.3.2.2. Velocidad de centrifugación	137
5.3.2.3. Tiempo de lectura	137

5.3.2.4. Concentración de ristocetina	138
5.3.3. Determinación de potencia de concentrados de FVIII con FvW	141
5.3.4. Análisis estadístico de datos	141
5.2.4.1. Análisis con Combistats®	142
5.2.4.2. Análisis con Excel®	143
5.2.4.3. Análisis con el paquete estadístico R	146
5.2.4.4. Comparación de los resultados obtenidos mediante los tres software	148
5.3.5 Validación del ensayo de FvW	150
5.3.5.1. Calibración del ACL®: recta de calibración	150
5.3.5.2. Parámetros de validación del método: Especificidad	154
5.3.5.3. Parámetros de validación del método: Exactitud	154
5.3.5.4. Parámetros de Validación del método: Precisión	155
5.3.6. Estudio de calidad	157
5.3.6.1. Calidad de un ensayo	157
5.3.6.2. Gráficos individuales para errores residuales	157
5.4 Bibliografía	162
6. CONCLUSIONES	169
ANEXOS	
Anexo I. Abreviaturas	175
Anexo II. Figuras	177
Anexo III. Tablas	180
SUMMARY	185

1. INTRODUCCIÓN

“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para temer menos”.

Marie Curie (1867 - 1934)

1. INTRODUCCIÓN

Los concentrados de factores de coagulación son fármacos que contienen proteínas de la cascada de la coagulación y que se utilizan principalmente como tratamiento sustitutivo en las coagulopatías congénitas. De los medicamentos disponibles, el factor VIII (FVIII), indicado en la hemofilia A, es el cuantitativamente más significativo por la prevalencia de esta coagulopatía así como por su semivida plasmática [Stonebraker et al., 2010] [Aznar et al., 2009]. En el plasma, este factor está unido al factor von Willebrand (FvW), que prolonga su vida media. En la actualidad, según su fuente de obtención, existen concentrados de origen recombinante y de origen plasmático. Los de origen recombinante se obtienen por técnicas de ingeniería genética en células de mamífero en cultivo. Los de origen plasmático, también denominados hemoderivados, se producen a escala industrial a partir de grandes volúmenes de plasma humano mediante diversos procedimientos de separación y purificación. En éstos últimos, pueden encontrarse ambas proteínas, Factor VIII y FvW, como principio activo.

Como productos biológicos y debido a su proceso de obtención, existe una gran variabilidad en las características interlote en cuanto al principio activo, que tendrá que ser considerada al utilizarse terapéuticamente [Jódar et al., 1995]. Los métodos para su valoración son establecidos por la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) y las monografías correspondientes [European Pharmacopoeia, 2010, 2014], que marcan los criterios de aceptación de su contenido [Batlle, 2006].

1.1 Hemostasia. Fisiología de la coagulación.

La hemostasia se define como todos aquellos procesos destinados a evitar o disminuir las pérdidas de sangre por lesiones en las paredes vasculares. El sistema hemostático consta de vasos sanguíneos, plaquetas y sistemas de coagulación (con los factores fibrinolíticos y sus inhibidores).

Si se produce una herida en un vaso, existen cuatro mecanismos que aparecen localmente en el lugar de la herida para controlar la hemorragia [Yardumian et al., 1986] [García-Conde et al., 2003]: contracción de la pared del vaso, adhesión y

agregación plaquetaria, formación y consolidación del coágulo de fibrina (coagulación sanguínea) y, por último, eliminación del coágulo.

La hemostasia comprende dos etapas: primaria y secundaria. La hemostasia primaria consiste en la formación instantánea de un tapón en la pared del vaso, mediante la vasoconstricción, adhesión y agregación plaquetaria. Sin embargo, es efectiva sólo temporalmente. La hemorragia puede comenzar de nuevo si la hemostasia secundaria no refuerza el tapón plaquetario mediante la formación de un coágulo estable de fibrina. Finalmente, los mecanismos producidos dentro del sistema fibrinolítico conducen a la disolución del coágulo de fibrina y a la restauración del flujo sanguíneo normal.

1.1.1. Endotelio y sistema vascular.

El endotelio intacto no inicia ni mantiene la adhesión plaquetaria ni la coagulación. La tromboresistencia endotelial está producida por un número de sustancias antiplaquetarias y anticoagulantes sintetizadas por las células endoteliales.

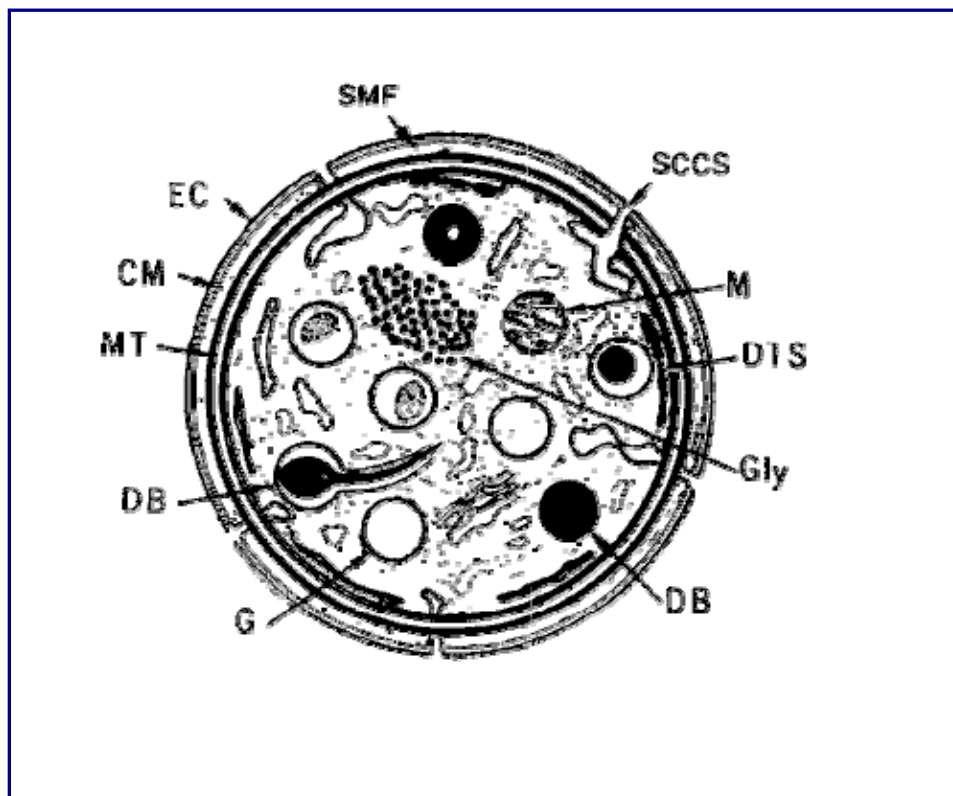
Las células endoteliales también sintetizan y secretan el TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), que inhibe la vía extrínseca de coagulación. Además, tanto el t-PA (Tissue Plasminogen Activator) como el PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor), su inhibidor, que modula la fibrinólisis, son secretados por las células endoteliales. También poseen algunas propiedades procoagulantes mediante la síntesis y secreción del FvW y el PAI-1. [Munker et al., 2007]. Tras una herida, son inducidos estos factores procoagulantes así como la actividad del factor tisular (TF), lo que conlleva la adhesión y activación de las plaquetas y la generación de trombina [Camerer, 1996]. Los vasos sanguíneos pequeños comprenden las arteriolas y capilares sanguíneos pero sólo las primeras tienen paredes musculares que les permiten cambios en el calibre arteriolar. La secreción plaquetaria de tromboxano A_2 (TxA_2), serotonina y epinefrina promueve la vasoconstricción durante la hemostasia.

1.1.2. El papel de las plaquetas.

Las plaquetas son fragmentos anucleados circulantes, liberados desde los megacariocitos de la médula ósea. Su vida media es, aproximadamente, de 9 días. Su recuento oscila entre 150.000 y 400.000 plaquetas por microlitro de sangre. Contribuyen a la hemostasia primaria al formar un tapón hemostático en el lugar del daño vascular.

Su cubierta exterior está comprendida por varias glicoproteínas, entre las que se encuentran la integrina, $\alpha_{IIb}\beta_3$, y glicoproteínas ricas en leucina, que median en los receptores de adhesión y agregación plaquetaria para agonistas como el ADP (adenosín difosfato), el ácido araquidónico y otras moléculas. Presentan muchos cuerpos citoplasmáticos como α -gránulos y cuerpos densos [Yardumian, 1986] [Smyth, 2009].

Los α -gránulos son el lugar de almacenamiento de la β -tromboglobulina (β TG), el factor plaquetario 4 (PF4), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el FvW, fibrinógeno, factor V (FV), PAI-1 y trombospondina. Los cuerpos densos contienen ADP, ATP, calcio y serotonina. También contienen filamentos de actina y una banda circunferencial de microtúbulos (Figura 1), implicados en el mantenimiento de la forma de las plaquetas.



SCCS: Open Canalicular System; MT: Microtubules; DB: Dense Bodies; G: α -Granules

Figura 1. Representación esquemática de la plaqueta (Triplett, 2000).

El sistema canalicular abierto juega un papel en el intercambio de sustancias desde el plasma a las plaquetas y viceversa. Mientras que las plaquetas normales circulan por la sangre y no se adhieren al sistema vascular normal, su activación provoca un número de

cambios que resultan en la promoción de la hemostasia por dos mecanismos: formación del tapón hemostático en el lugar de la herida y aportación de fosfolípidos como superficie procoagulante para la coagulación sanguínea.

La formación del tapón plaquetario inicial puede dividirse en pasos separados pero interrelacionados estrechamente in vivo: adhesión plaquetaria, cambio en la forma, reacción de liberación y agregación plaquetaria [Savage, 2001].

A los pocos segundos de producirse una herida, las plaquetas se pegan a las proteínas adhesivas tales como el colágeno, vía los receptores de superficie de glicoproteínas específicas (adhesión plaquetaria). En este contexto, el FvW sirve de puente que se adhiere primero a las fibras de colágeno y entonces, cambia su conformación, seguido por la unión de las plaquetas al FvW [Huizinga, 2002] [Heemskerk, 2002] [Sadler, 2002] [Ruggeri, 2007].

Tras la adhesión, las plaquetas experimentan un cambio desde su forma de disco a una forma esférica, formando pseudópodos. Casi simultáneamente, se produce una reacción de liberación en la que un número de compuestos biológicamente activos almacenados en los gránulos de las plaquetas son excretados al exterior. Estas sustancias, que incluyen ADP, serotonina, TxA₂, βTG, PF4 y FvW aceleran la reacción de formación del tapón y también inician la agregación plaquetaria.

Como resultado de la agregación plaquetaria, el tapón plaquetario se hace más grande y se produce la liberación de más contenidos granulares con el fin de inducir a más plaquetas a agregarse. Las prostaglandinas juegan un papel adicional en la mediación de la reacción de liberación, agregando las plaquetas.

El TxA₂ es un inductor muy potente de la secreción y agregación plaquetaria. Se forma a partir del ácido araquidónico por acción del enzima ciclooxigenasa y es liberado desde la membrana de la plaqueta mediante las fosfolipasas, tras su activación por colágeno y epinefrina.

Al final del proceso de agregación, el tapón hemostático consiste en plaquetas desgranuladas estrechamente empaquetadas. El fibrinógeno es necesario para la agregación plaquetaria mediante su unión a los receptores de la integrina α_{IIb}β₃ [Marder et al., 2013].

1.1.3. Coagulación sanguínea.

La rotura de un vaso sanguíneo implica una pérdida de sangre que debe ser evitada rápidamente. Para ello, la hemostasia primaria da lugar a un tapón plaquetario que resulta insuficiente. En consecuencia, es la hemostasia secundaria la que se pone en funcionamiento posteriormente para formar un coágulo de fibrina. La hemostasia secundaria comprende la coagulación sanguínea y la fibrinólisis.

El sistema de coagulación está formado por proteínas, en su mayoría enzimas inactivadas, que se activan unas a otras de manera secuencial, dando lugar a una cascada de reacciones enzimáticas (Figura 2). Estas reacciones se producen sobre una superficie fosfolipídica, bien sea ésta la de plaquetas activadas o membranas de células endoteliales activadas de la pared del vaso y requiere la presencia de un cofactor no enzimático (factores de coagulación V y VIII).

En estas reacciones, el enzima es un factor de coagulación activado y el sustrato es el precursor inactivo de otro factor, que se activa cuando se rompe y separa de la molécula una pequeña parte denominada péptido de activación. Puede ser necesaria más de una rotura para la activación del factor y puede que el péptido de activación quede unido a la molécula mediante puentes disulfuro o enlaces no covalentes.

Existen dos vías para iniciar la cascada de coagulación: en la llamada vía extrínseca, el TF actúa como cofactor del factor de coagulación VII activado (FVIIa), presente en la circulación sanguínea, para activar al factor X de coagulación (FX). En la segunda vía, denominada intrínseca, es el factor XII (FXII) el que se autoactiva al unirse a superficies cargadas negativamente, iniciando la serie de reacciones que conducen a la activación del FX, dando lugar a un final común a ambas vías. El FX activado (FXa) activa, a su vez, al factor II (FII), llamado protrombina, mediante la formación de un complejo ternario entre el enzima, FXa, el sustrato, FII y el cofactor FV activado (FVa), en una superficie fosfolipídica mediante puentes de iones calcio, para dar lugar a la trombina (FIIa). Esta actúa convirtiendo el fibrinógeno (proteína soluble) en fibrina, que polimeriza dando lugar a fibrina insoluble mediante la acción del factor de coagulación XIII activado (FXIIIa). El FXIIIa, además, une la fibrina a otras moléculas, como la α_2 -antiplasmina o el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), con el fin de prevenir una disolución demasiado rápida del coágulo de fibrina. Este coágulo es más estable hasta que comience el proceso fibrinolítico, que elimina la

fibrina y disuelve el coágulo formado una vez reparado el vaso sanguíneo [García-Conde et al., 2003].

1.2 Hemoderivados.

Las deficiencias o anomalías de las distintas proteínas de la cascada de coagulación se traducen en un fallo para generar trombina en respuesta al daño de un vaso sanguíneo. El problema hemorrágico puede ser de mayor o menor gravedad dependiendo del nivel de factor residual del paciente. Hay trastornos hemorrágicos hereditarios de todos los factores que intervienen en la cascada de la coagulación, con distinta prevalencia y distribución variable en el mundo. La corrección del defecto se realiza por infusión intravenosa del factor relevante deficitario hasta normalizar la formación de trombina.

Las proteínas obtenidas del plasma de donaciones y purificadas a nivel industrial constituyen los hemoderivados, un grupo muy particular dentro del conjunto de los medicamentos y con características muy bien definidas [Jódar et al., 1995]:

- Su principal indicación es el tratamiento de pacientes con deficiencias congénitas o adquiridas de una proteína plasmática concreta.
- Debido a su corta semivida plasmática, el tratamiento implica un suministro periódico.
- Al tratarse de proteínas obtenidas de plasma humano, por su potencial transmisión de infecciones, se someten a inactivaciones virales para eliminar virus de la hepatitis (VHA, VHB y VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH 1 y 2), parpovirus B₁₉, etc. [European Medicines Agency, 2011] [Klamroth et al, 2014].
- Poseen un alto contenido en proteínas, - bien por su propia naturaleza, o como impureza de su purificación o añadida como estabilizante - algunas de las cuales pueden alterar su estructura y producir reacciones anafilácticas.
- Su mantenimiento debe realizarse a temperaturas entre 2°C – 8°C aunque, en el momento de su uso, deben atemperarse a 20°C – 24°C. Nunca deben congelarse las muestras y se recomienda su filtración antes de su administración, mediante filtros de 0'22 µm de diámetro.

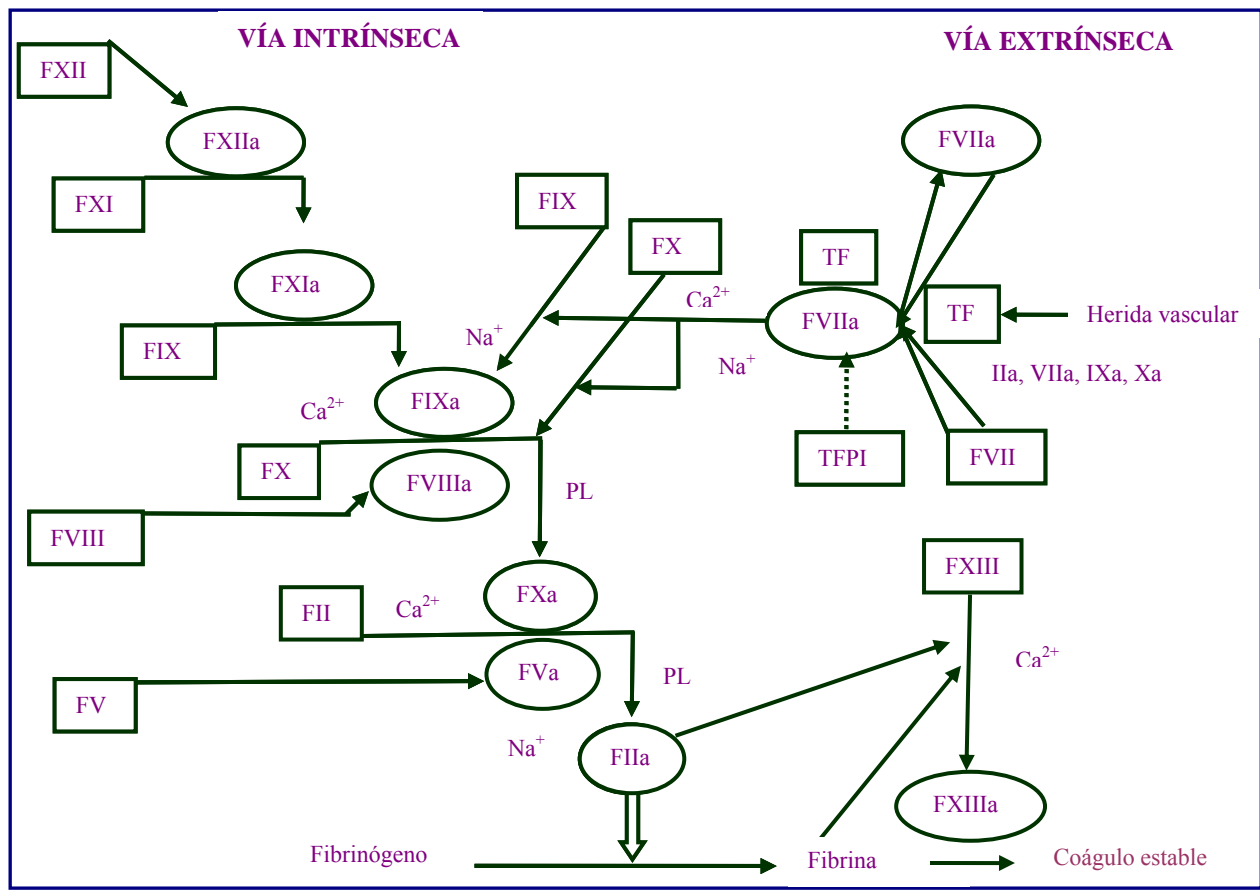


Figura 2. Cascada de coagulación.

- Son medicamentos caros, por su material de partida y por los procedimientos complejos de fabricación.
- Los márgenes de aceptación de su contenido son amplios: en el caso de FVIII y de FvW, del 80% - 120%. Ello obedece a una gran variabilidad de su contenido tanto por los niveles variables en la población de donantes, como por su complejo proceso de producción y del propio ensayo.

Obtención.

Para la fabricación de hemoderivados, un importante excedente de plasma humano de uso transfusional se destina a la industria farmacéutica que, mediante su fraccionamiento, permite obtener las diferentes proteínas plasmáticas.

Los principales métodos de fraccionamiento son: la crioprecipitación (precipitación en frío) que, en una etapa inicial, permite la obtención de FVIII y de FvW, y la precipitación con etanol (método clásico de Cohn), por el que se obtienen la albúmina y las inmunoglobulinas. También se eliminan contaminantes infecciosos por las propiedades bactericidas y fungicidas del etanol.

La utilización de cromatografía de intercambio iónico y en gel incrementan la actividad específica de los concentrados de FVIII de coagulación, hasta conseguir una concentración de alrededor de 1000 unidades por miligramo (mg) de proteína. La precipitación con polietilenglicol, seguida por la cromatografía de afinidad del complejo FVIII/FvW, mediante la utilización de columnas de agarosa y heparina, permiten obtener concentraciones de pureza relativamente alta de las proteínas de FVIII y FvW.

Otros fabricantes utilizan anticuerpos monoclonales frente a la molécula de FVIII para producir un producto de este factor de coagulación con más de 3000 unidades por mg de proteína. También están comercializados factores de coagulación de origen recombinante para el tratamiento de la hemofilia A. [Marder et al., 2013].

Los hemoderivados que se han utilizado en esta tesis se obtienen a partir del crioprecipitado, una vez descongelado el plasma, y contienen FVIII de coagulación y FvW.

La Ph. Eur. tiene monografías específicas de los medicamentos de FVIII, tanto de origen plasmático como recombinante, y de FvW. En ellas se describen la producción de estos fármacos y se indican las especificaciones de calidad que deben cumplir en cada uno de los ensayos que deben realizarse para cada lote de producto terminado.

Además, hay monografías específicas de los ensayos de actividad de FVIII y FvW, en los que se describen con detalle los propios procedimientos y condiciones de ensayo con los estándares y reactivos a utilizar. Continuamente se actualizan las ediciones de la Farmacopea para introducir mejoras y tanto los laboratorios farmacéuticos fabricantes como los oficiales de control deben adecuarse a la edición en vigor [Ph. Eur., 2010, 2014].

La valoración del contenido en factores se realiza mediante ensayos de potencia o actividad, en los que se utilizan estándares internacionales como el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el de la Ph. Eur., disponibles para la calibración de estándares comerciales, nacionales, internos, secundarios, etc. Estos estándares se usan tanto para la valoración de los concentrados terapéuticos como para evaluar los niveles plasmáticos en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados [Barrowcliffe et al., 2012] [Raut et al., 2012]. Estas valoraciones se efectúan en unidades internacionales (UI). Como los primeros estándares internacionales se calibraron frente a una mezcla de plasma fresco obtenido de un gran número de donantes, se define una UI como la cantidad de FVIII existente en 1 mililitro de plasma normal promedio [Batlle et al., 2006].

En el caso de FVIII y FvW, en la actualidad existe un estándar internacional obtenido de plasma humano que se utiliza para la estimación de la actividad y del antígeno de FVIII y FvW en muestras de plasma.

Hay dos estándares internacionales para concentrados de FVIII y FvW, respectivamente. Se utilizan principalmente para calibrar los estándares de trabajo internos o los estándares de concentrados, como ocurre en el caso del concentrado estándar de Ph. Eur., denominado Biological Reference Preparation (BRP).

Para disminuir la variabilidad de los ensayos, es conveniente que se utilicen estándares de igual procedencia que las muestras que se analicen (“like vs. like”) [Barrowcliffe, 2003, 2013].

Los medicamentos de FVIII para el tratamiento de la hemofilia se encuentran dosificados a 250, 500, 1000 y 1200 UI por vial de producto, muy superior a la concentración de la preparación de referencia por lo que el ensayo se realizará mediante series de diluciones preparadas con anterioridad, utilizando el estándar correspondiente.

1.3. Factor FVIII de coagulación.

El FVIII de coagulación es una proteína plasmática implicada en la vía intrínseca de la cascada de coagulación que permite la formación de las moléculas de fibrina y, con ello, la coagulación sanguínea (Figura 3) [Díaz, 2001].

Inicialmente, se estableció que el FVIII actuaba como cofactor del factor IX activado (FIXa) en la reacción de activación del FX y fue sólo a partir de la década de 1980 cuando la proteína fue purificada y su ADN clonado.

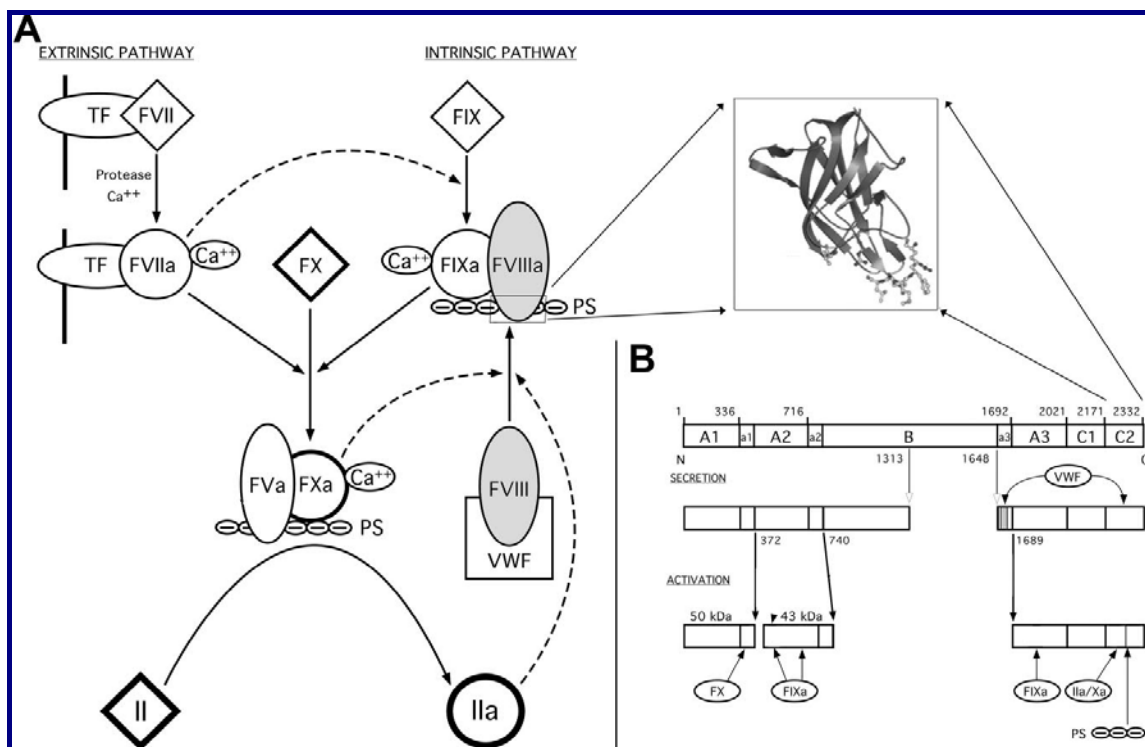


Figura 3. FVIII y cascada de coagulación (Shen, 2008).

El gen del FVIII está localizado en el brazo largo del cromosoma X y tiene 186 Kb. Comprende 26 axones que codifican una cadena polipeptídica de 2351 aminoácidos, con un péptido señal de 19 aminoácidos y una proteína madura de 2332 aminoácidos (Figura 4) [Wang, 2003] [Bhopale, 2003] [Lenting et al., .2010].

Se trata de una proteína con una estructura de dominios, que sigue el siguiente orden: A1 – a1 – A2 – a2 – B – a3 – A3- C1 – C2, donde los dominios A muestran un 30% de homología entre ellos. Los “espaciadores” que se encuentran entre los 3 dominios A (a1,

a2 y a3) son grupos de residuos de aminoácidos glutámico y aspártico, denominados secuencias ácidas. Los dominios C están relacionados estructuralmente con los dominios C del FV de coagulación. Sin embargo, el dominio B no tiene homología significativa con ninguna otra proteína [Fang, 2007] [Ngo, 2008] [Pipe, 2009].

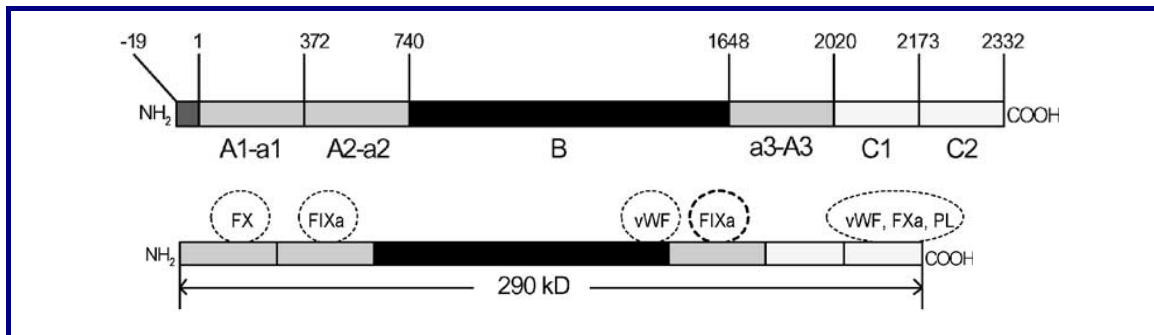


Figura 4. Estructuras del FVIII: molécula precursora y FVIII maduro (Wang, 2003).

Las células endoteliales sinusoidales y los hepatocitos del hígado sintetizan la mayor parte del FVIII aunque se ha demostrado la presencia de mRNA de FVIII en otros tejidos, como bazo, nódulos linfáticos y riñón [Lenting, 1998].

La secreción inicial del FVIII implica la translocación del polipéptido maduro de 2332 aminoácidos en el retículo endoplasmático (RE), produciéndose glicosilaciones de la molécula. Su interacción con proteínas chaperonas retiene gran parte de las moléculas en el RE, limitando así su transporte al aparato de Golgi. Las moléculas que llegan hasta el aparato de Golgi sufren muchas modificaciones que dan lugar, finalmente, a la molécula heterodímera que circula en el plasma sanguíneo: las cadenas pesada y ligera del FVIII permanecen unidas mediante uniones no covalentes en los dominios A1 y A3, dependientes de ión metálico (Figura 5) [Mikaelsson, 1983] [Shen, 2008].

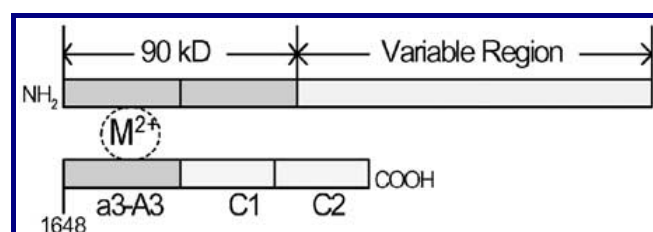


Figura 5. Heterodímero circulante de FVIII en plasma (Wang, 2003).

Una vez liberado en el plasma, el FVIII interactúa con su proteína transportadora, denominada FvW, formando un complejo no covalente. En condiciones fisiológicas, el 94% de las moléculas de FVIII se encuentran unidas al FvW, circulando en forma libre sólo el 6% restante (Figura 6) [Hoyer, 1981] [Lillicrap, 2008] [Liras, 2008].

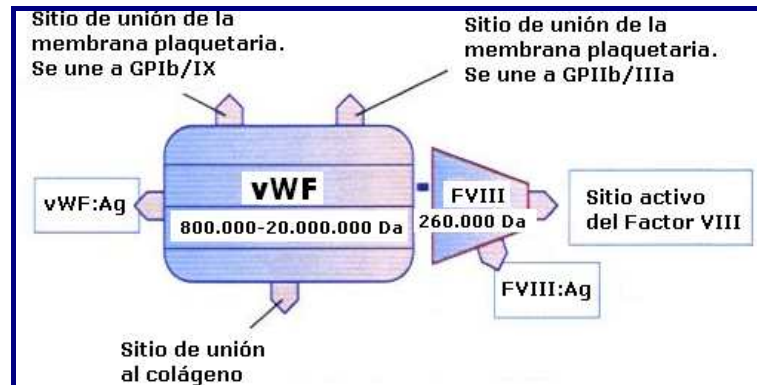


Figura 6. Complejo FVIII/FvW (Liras, 2008)

El FvW impide que el FVIII se una a la superficie de membranas, necesario para que algunas proteínas, como la proteína C activada y el FXa, participen en su proteolisis [Wise et al., 1991] [Vlot et al., 1995] [Koppelman et al., 1996]. Además, el FvW dirige al FVIII al lugar en el que se produce el sangrado donde, gracias a la acción de la trombina, con una acción proteolítica independiente de superficies de membranas, se rompe la molécula de FVIII, que pasa a su forma activa o FVIII activado (FVIIIa), impidiendo que pueda unirse de nuevo con el FvW y permitiendo, por el contrario, que se integre en la cascada de coagulación, para participar en la activación del FX (Figura 7) [Lenting, 1998] [Ngo, 2008].

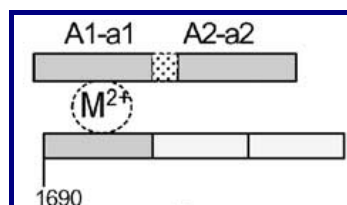


Figura 7. Molécula de FVIIIa (Wang, 2003).

Por último, la inactivación de la molécula de FVIII se produce de dos formas: por degradación proteolítica o por disociación espontánea (Figura 8).

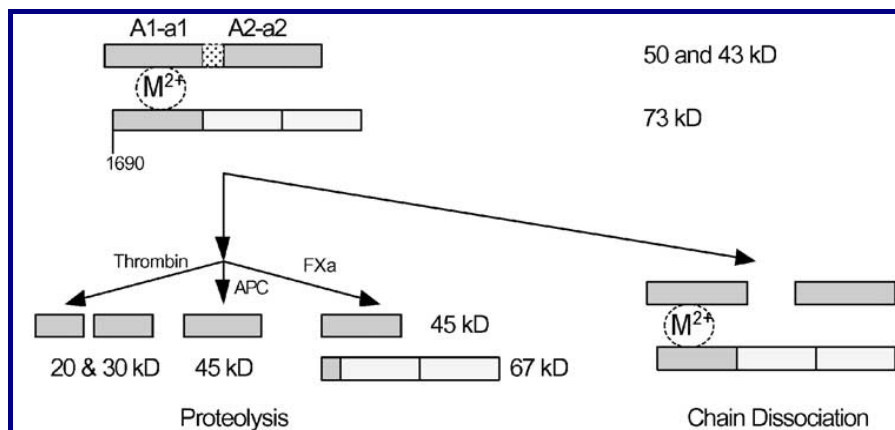


Figura 8. Inactivación de la molécula de FVIII (Wang, 2003).

La mutación del locus del FVIII, situado en el brazo largo del cromosoma X, produce una síntesis deficiente de FVIII de coagulación, conocida como hemofilia A, que afecta en el nacimiento, aproximadamente, a 1 de cada 5000 hombres. La hemofilia B se debe a la deficiencia del FIX, también situado en el cromosoma X y que afecta a 1 de cada 25000 hombres. Siguiendo el tratamiento adecuado, los pacientes con hemofilia tienen la misma calidad de vida que una persona sana. La ausencia de tratamiento implica una muerte prematura por hemorragias no controladas, en general, intracraneales mientras que, en el caso de supervivencia, los pacientes sufren muchos daños articulares que conducen a discapacidades físicas permanentes [Skinner et al., 2013]. Antes de que existiera un tratamiento con factores de coagulación, la esperanza de vida de los pacientes más afectados era de 20 años. El suministro adecuado de FVIII a partir de la década de 1970 normalizó su esperanza de vida, gracias a la fabricación de estos productos a partir de grandes mezclas de plasma. [Kruse-Jarres, 2012] [Peyvandi et al., 2012]. Sin embargo, las complicaciones derivadas que surgieron con las infecciones por VIH y hepatitis B y C constituyeron una nueva tragedia hasta que se desarrollaron nuevos productos seguros en los años 90, como la producción de factores de coagulación por tecnología recombinante y los progresos en los métodos de inactivación viral que condujeron a disponer de factores plasmáticos libres de patógenos y mucho más seguros [Brooker, 2012] [Mahony et al., 2013] [Mannucci, 2012, 2013].

La severidad de la enfermedad está relacionada con la cantidad de UI de FVIII presente en el plasma. Así, podemos hablar de 4 niveles de hemofilia A, de acuerdo con la Federación Mundial de Hemofilia (Tabla 1):

Tabla 1: Niveles de severidad para la hemofilia A (FMH, 2012).

NIVEL	% DE ACTIVIDAD NORMAL	UI/ml
NORMAL	50% - 150%	0'5 – 1'5 UI
LEVE	5% - 40%	0'05 – 0'40 UI
MODERADA	1% - 5%	0'01 – 0'05 UI
SEVERA	Menos del 1%	Menos de 0'01 UI

La corrección del defecto de un factor de coagulación mediante su infusión intravenosa normaliza la generación de trombina puesto que el resto de los factores que participan en la hemostasia se encuentran en concentraciones normales. Un problema adicional es la vida media tan corta del factor infundido en la circulación sanguínea (de 8 a 12 horas, en el caso del FVIII).

La hemostasia normal, es decir, un nivel de FVIII mantenido al $100\% \pm 5\%$, se alcanza mediante la infusión continua de dicho factor. La dosis adecuada se inyecta a una tasa de 1UI/kg/h, tras la inyección de una dosis bolo que permite alcanzar rápidamente un nivel del 100% del factor [Marder et al., 2013]. La fórmula utilizada para el cálculo de la dosis bolo es:

$$Dosis\ FVIII\ (UI) = Peso\ del\ paciente\ (kg) \times \% \text{ necesario para alcanzar el } 100\% \times 0'5$$

Además de la vida media tan corta de los factores de coagulación, la complicación más seria en la hemofilia congénita, asociada a la terapia de reemplazo, está relacionada con la respuesta inmune frente a la proteína infundida, que genera anticuerpos inhibidores (aloanticuerpos). Se denominan así porque inhiben la participación del factor contra el que se dirigen en la cascada de coagulación, aumentando la morbilidad y mortalidad de los pacientes que los desarrollan. En el caso del FVIII, se unen a los dominios A2 y A3-C1 de la molécula, interfiriendo en la formación del complejo FVIII-FIX e inhibiendo, por tanto, la generación de trombina [Green, 2011]. Los factores que influyen en su desarrollo pueden ser genéticos, relacionados con el tratamiento o bien, factores ambientales. En el tratamiento de la hemofilia A no existen datos concluyentes que relacionen su desarrollo con la fuente y la estructura del FVIII utilizado pero hasta un 50% de pacientes adultos tienen niveles detectables de estos anticuerpos [Butenas et al.,

2013] [Astermark, 2006]. También pueden aparecer espontáneamente en individuos sin ningún defecto coagulativo previo (hemofilia adquirida), denominándose entonces autoanticuerpos [Pio et al., 2012]. En este último caso, suelen ser inmunoglobulinas G, que funcionan como anticoagulantes cuando se dirigen contra un factor de coagulación específico. En el caso concreto del FVIII, reconocen epitopos de los dominios C2 y, menos frecuentemente, A2. La unión al dominio C2 afecta a la unión del FVIII con fosfolípidos y con FvW, así como al aclaramiento del FVIII por el FXa y la trombina [Green, 2011]. Su eliminación se realiza mediante la inducción de la tolerancia inmune (ITI), en el caso de los aloanticuerpos, que requiere infusiones diarias de altas dosis de concentrados de factores de coagulación, durante periodos de hasta 18 meses, consiguiendo la eliminación de un 60% - 80% de aloanticuerpos frente a hemofilia A y hasta de un 15%, en el caso de aloanticuerpos frente a hemofilia B [Batorova, 2010], a menos que éstos tengan un título bajo y sean transitorios [Marder et al., 2013]. En el caso de los autoanticuerpos (hemofilia adquirida), el tratamiento consiste en una dosis bolo que neutraliza los autoanticuerpos y permite alcanzar un nivel hemostático del factor de coagulación, seguido de dosis posteriores dadas como dosis bolo o mediante la infusión continua para el mantenimiento del factor. Si no se produce una respuesta satisfactoria en 24 ó 48 horas, se realiza un tratamiento “*by-pass*” que evita al inhibidor y favorece la formación de trombina [Baudo, 2010].

Actualmente hay nuevos tratamientos en desarrollo que incluyen FVIII recombinantes (rFVIII) derivados de líneas celulares humanas, así como variantes donde se ha deleccionado el dominio B, que no es necesario para la actividad funcional del FVIII. Este tipo de variantes son seguras y no se ha detectado la aparición de anticuerpos 72 horas después de una dosis única.

Por lo que respecta al aumento de la vida media del FVIII, se están realizando conjugaciones de esta molécula con polietilenglicol (PEG), que bloquean transitoriamente la interacción del FVIII con los receptores de las células hepáticas encargados de su aclaramiento. También se están haciendo estudios con rFVIII incorporado en lisosomas pegilados [Escobar, 2013].

1.4 Factor von Willebrand.

El médico Erik von Willebrand describió, en 1926, una enfermedad que cursaba con hemorragias pero que era diferente a la hemofilia A y a la que se denominó enfermedad de von Willebrand (EvW). No fue hasta 30 años después cuando se identificó la proteína plasmática relacionada con esta enfermedad y que corresponde a una gran proteína multimérica, esencial para la movilización de las plaquetas en las heridas vasculares. Además de provocar la adhesión plaquetaria, el FvW tiene una segunda función fundamental, explicada previamente, que consiste en la protección y el transporte del FVIII de coagulación [Saenko, 1999]. De hecho, el FVIII que no se encuentra unido al FvW tiene una vida media que oscila entre 1 y 2 horas, en lugar de las 8 a 12 horas correspondientes a la vida media del FVIII unido a FvW [Terraube et al., 2010].

La biosíntesis del FvW está limitada a las células endoteliales y a los megacariocitos. El FvW sintetizado en los megacariocitos se almacena dentro de los gránulos α de las plaquetas. Por el contrario, el FvW sintetizado en las células endoteliales se libera directamente al plasma sanguíneo o se almacena en unos orgánulos denominados cuerpos de Weibel-Palade, desde donde es secretado en respuesta a distintas moléculas como trombina, fibrina e histidina. La multimerización de la molécula de FvW se realiza en el aparato de Golgi de forma que el FvW circulante en el plasma es una molécula con un número variable de subunidades.

La estructura de multidominios del FvW y que corresponde a: D1 – D2 – D' – D3 – A1 – A2 – A3 – D4– B1 – B2 – B3 – C1 – C2 – CK, es crítica para las funciones que realiza (Figura 9) [McGrath et al., 2010] [Kanaji et al., 2012] [Fisher et al., 1998].

En aquellos puntos en que se producen heridas vasculares, el FvW es capaz de unirse al colágeno que queda al descubierto, vía su dominio A3. Esta unión, junto con el estrés ejercido en el FvW inmovilizado, induce a la exposición del dominio A1 debido a la falta de protección de los dominios A2 y/o D'D3. Estos cambios conformacionales permiten la adhesión de las plaquetas circulante mediante la interacción del FvW con el complejo GPIIb de las plaquetas, formado por cuatro glicoproteínas, denominadas GPIIb $_{\alpha}$, GPIIb $_{\beta}$, GPIIX y GPV. Tras la adhesión, las plaquetas se activan y se produce su agregación utilizando al fibrinógeno, mediante su unión a la glicoproteína IIb/IIIa

(denominada integrina, $\alpha_{IIb}\beta_3$) de las plaquetas [Marder et al., 2013]. El FvW también puede participar en la agregación plaquetaria pero esto sucede cuando la concentración de fibrinógeno es baja o la concentración de FvW es alta [De Meyer et al., 2009] [Sadler, 2009] [Federici, 2009]. El FvW también sirve como transportador del FVIII, protegiéndolo de la degradación proteolítica en el plasma [Lenting et al., 2012]. El papel del FvW en pacientes con hemofilia A que desarrollan aloinhibidores ha sido objeto de una gran investigación. Actualmente, se propone que el FvW presente en los concentrados de FVIII derivado del plasma (pdFVIII) reduce la capacidad de los aloanticuerpos para interactuar con el FVIII, modulando, por tanto, la inmunogenicidad de este factor. Sin embargo, en el caso de rFVIII, donde no está presente el FvW, existe una mayor prevalencia de aloanticuerpos, contribuyendo a una mayor inmunogenicidad de este tipo de concentrados. También le protege de la endocitosis por células dendríticas y de la proteólisis mediante el FXa y otras proteasas que participan en este proceso [Ofosu et al., 2012] [Delignat et al., 2012].

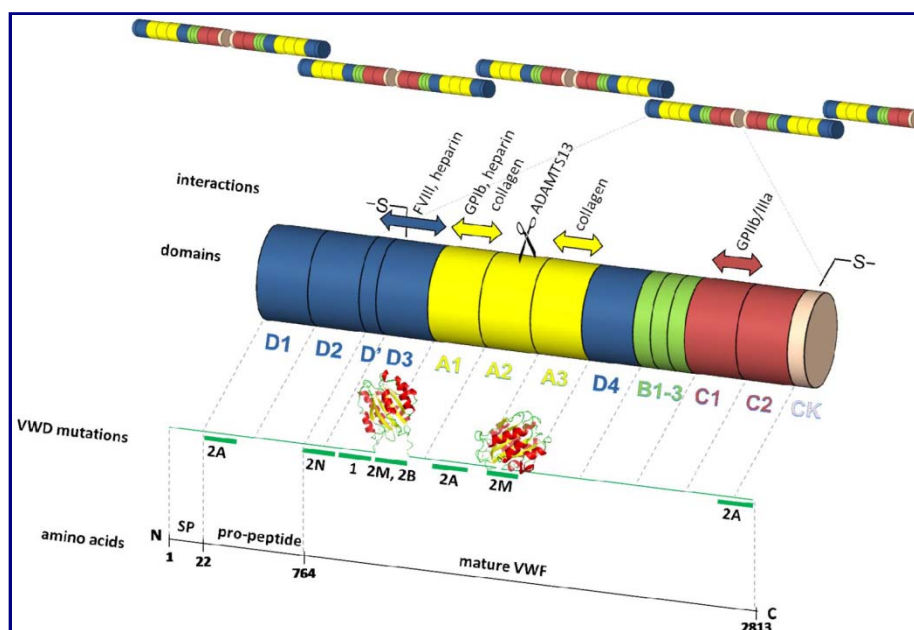


Figura 9. Representación del FvW: péptido señal de 22 residuos, propéptido de 741 aminoácidos y subunidad madura de 2050 aminoácidos (De Meyer, 2009).

Su actividad es dependiente de la extensión y del modelo de multimerización [Sadler, 2009]. Se produce la excreción local de multímeros ultra grandes de FvW en los lugares donde se producen las heridas vasculares pero, como estas proteínas son trombogénicas

en la circulación sanguínea, su actividad está muy regulada de manera que se digieren rápidamente, dando lugar a multímeros más pequeños. Una vez en la corriente sanguínea, estos multímeros más pequeños tienen una vida media de 8 a 12 horas. Todavía no se conoce en profundidad la forma de degradación del FvW [De Meyer et al., 2009].

La EvW es la coagulopatía de mayor prevalencia, afectando aproximadamente alrededor de un 1% de la población [Goodeve, 2010], precisando tratamiento hasta 0,01%. La patofisiología, clasificación y diagnóstico de la EvW son relativamente complejos pero fundamentales para un tratamiento apropiado.

Su clasificación queda recogida en la Tabla 2 [Sadler et al., 2006] [De Meyer et al., 2009] [Goodeve, 2010]. Al tipo 1 pertenecen los pacientes con deficiencias cuantitativas parciales de FvW, con una baja concentración plasmática de este factor. Por lo que se refiere al tipo 2 de esta enfermedad, mutación cualitativa, presenta mayor severidad que en el caso del tipo 1 y pueden diferenciarse, a su vez, distintos tipos: en el tipo 2A, la adhesión plaquetaria dependiente de FvW está disminuida de igual modo que la proporción de multímeros de FvW; en el tipo 2B, existe un incremento en la unión de las plaquetas al FvW, lo que provoca la degradación proteolítica y depleción de los grandes multímeros funcionales del FvW. Por lo que respecta al tipo 2M, se produce por una reducción en la interacción del FvW con el complejo GPIb de las plaquetas. Por último, en el tipo 2N hay una disminución en la unión entre el FVIII y el FvW. Por lo que respecta al tipo 3, hay una pérdida completa o casi completa de FvW, siendo éste el tipo más severo de la enfermedad.

Tabla 2: Clasificación de la enfermedad de von Willebrand (Sadler et al., 2006).

Tipo de EvW	Mecanismo implicado
1	Deficiencia leve a moderada de FvW (normal desde el punto de vista cuantitativo).
2	Mutaciones cualitativas de FvW:
A	Disminución de la función de FvW dependiente de plaquetas.
B	Incremento de la afinidad para la fijación de plaquetas.
M	Disminución de la función de FvW, multímeros normales.
N	Disminución de la fijación de FvW a FVIII, multímeros normales.
3	Deficiencia severa/completa de FvW y disminución moderadamente severa de FVIII.

Las terapias para prevenir o controlar el sangrado en los pacientes con esta enfermedad siguen tres estrategias generales: en primer lugar, incrementar, mediante el tratamiento con desmopresina, derivado sintético de la hormona antidiurética vasopresina, la concentración plasmática de FvW, mediante la liberación del FvW endógeno almacenado en las células endoteliales. En segundo lugar, mediante la terapia de reemplazo con concentrados de FVIII/FvW o de FvW, derivados del plasma. La relación entre el FvW y el FVIII varía dependiendo de los concentrados comercializados, oscilando entre 0'5 y 2'7. En el caso de pacientes que reciban concentrados de FVIII/FvW durante varios días, se recomienda monitorizar los niveles de FVIII. Por último, la tercera estrategia es utilizar agentes que promueven la hemostasia y la cicatrización de la herida pero sin alterar de manera significativa la concentración plasmática de FvW. Este es el caso de los antifibrinolíticos, como el ácido aminocaproico o el ácido tranexámico, que inhiben el paso del plasminógeno a plasmina, inhibiendo la fibrinólisis y ayudando a la estabilización del coágulo formado [Nichols et al., 2008].

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia*. 2006; 12 (3): 52-60.
- [2] Aznar JA, Lucía F, Abad-Franch L, Jiménez-Yuste V, Pérez R, Batlle J et al. Haemophilia in Spain. 2009; 15: 665-675.
- [3] Barrowcliffe TW. Standardization of FVIII & FIX assays. *Haemophilia*. 2003; 9: 397-402.
- [4] Barrowcliffe TW, Hubbard AR and Kitchen S. Standards and monitoring treatment. *Haemophilia*. 2012; 18 (4): 61-65.
- [5] Barrowcliffe TW. Laboratory testing and standardisation. *Haemophilia*. 2013; 19: 799-804.
- [6] Batlle FJ, Villar A, Liras A, Altisent C, Brito D, Alonso C et al. Recomendaciones para la selección y uso de productos terapéuticos para el tratamiento de la hemofilia y otras coagulopatías congénitas. Madrid: Real Fundación Victoria Eugenia. 2006.
- [7] Batorova A, High KA and Gringeri A. Special lectures in haemophilia Management. *Haemophilia*. 2010; 16 (5): 22-28.
- [8] Baudo F, Caimi T and De Cataldo F. Diagnosis and treatment of acquired haemophilia. *Haemophilia*. 2010; 16: 102-106.
- [9] Bhopale GM and Nanda RK. Blood coagulation factor VIII: An overview. *J Biosci*. 2003; 28 (6): 783-789.
- [10] Brooker M. Registry of clotting factor concentrates. *World Federation of Hemophilia*. 2012; 6: 1-13.
- [11] Butenas S, Krudysz-Amblo J, Rivard GE and Mann KG. Product-dependent anti-factor VIII antibodies. *Haemophilia*. 2013; 19: 619-625.
- [12] Camerer E, Kolsto A-B and Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*. 1996; 81 (1): 1-41.
- [13] Dalignat S, Repessé Y, Navarrete A-M, Meslier Y, Gupta N, Christophe OD et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 2012; 18: 248-254.

- [14] De Meyer SF, Deckmyn H and Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood*. 2009; 113 (21): 5049-5057.
- [15] Díaz A y Almagro D. Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2001; 17 (2): 77-89.
- [16] Escobar MA. Advances on the treatment of inherited coagulation. *Haemophilia*. 2013; 19: 648-659.
- [17] European Medicines Agency. Guideline on plasma-derived medicinal products. London: EMA; 2011. EMA/CHMP/BWP/706271/2010.
- [18] European Pharmacopoeia 7^a ed. Assay of human coagulation factor VIII (01/2008: 20704) and monograph human coagulation factor VIII (01/2010: 0275). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2010.
- [19] European Pharmacopoeia 8^a ed. Assay of human coagulation Factor VIII (07/2014:20704) and monograph human coagulation factor VIII (07/2013: 0275). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- [20] European Pharmacopoeia 7^a ed. Assay of human von Willebrand Factor (01/2008:20721) and monograph human von Willebrand factor (01/2011: 2298). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2010.
- [21] European Pharmacopoeia 8^a ed. Assay of human von Willebrand Factor (01/2008:20721) and monograph human von Willebrand factor (07/2013: 2298). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- [22] European Pharmacopoeia 8^a ed. Assay of human coagulation Factor VIII (rDNA) (01/2008: 1643). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- [23] Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of Factor VIII. *Thromb Res*. 2007; 119: 1-13.
- [24] Federación Mundial de Hemofilia [Internet] (actualizado Mayo 2012; citado Enero 2014) Disponible en: <http://www.wfh.org/es>.

- [25] Federici AB. Classification of onherited von Willebrand disease and implications in clinical practice. *Thromb Res.* 2009; 124 (1): S2-S6.
- [26] Fisher BE, Thomas KB and Dorner F. von Willebrand Factor: Measuring its Antigen or Function?. Correlation between the Level of Antigen, Activity and Multimer Size using Various Detection System. *Thromb. Res.* 1998; 91: 39-43.
- [27] García-Conde J, San Miguel JF, Sierra J, Urbano-Ispizua A, Vicente V y Vives JL. *Hematología*. Madrid: Arán Ediciones; 2003.
- [28] Green D. Factor VIII inhibitors: a 50-year perspective. *Haemophilia.* 2011; 17: 831-838.
- [29] Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Reviews.* 2010; 24: 123-134.
- [30] Heemskerk JWM, Bevers EM and Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 186-193.
- [31] Hoyer LW. The Factor VIII Complex: Structure and Function. *Blood.* 1981; 58 (1): 1-13.
- [32] Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RAP, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ et al. Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 2002; 297 (5584): 1176-1179.
- [33] Jódar RJ y Montoro JB. Hemoderivados. Editorial técnica. *Farm. Hosp.* 1995; 19 (5): 299-301.
- [34] Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL and Montgomery RR. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 1646-1652.
- [35] Klamroth R, Gröner A and Simon TL. Pathogen inactivation and removal methods for plasma-derived clotting factor concentrates. *Transfusion.* 2014; 54 (5): 1406-1417.
- [36] Koppelman SJ, van Hoeij M, Vink T, Lankhof H, Schiphorst ME, Damas C et al. Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. *Blood.* 1996; 87 (6): 2292-2300.
- [37] Kruse-Jarres R, Quon D., Schramm W and Dolans G. Management of bleeding disorders in the elderly. *Haemophilia.* 2012; 18 (2): 37-45.

- [38] Lenting PJ, van Mourik JA and Mertens K. The life cycle of coagulation Factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998; 92 (11): 3983-3996.
- [39] Lenting PJ, Christophe OD and Guéguen P. The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia*. 2010; 16: 6-15.
- [40] Lenting PJ, casari C, Christophe OD and Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 2428-2437.
- [41] Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? *Thromb Res*. 2008; 122 (4): S2-S8.
- [42] Liras A. Otras coagulopatías congénitas [Monografía en Internet]. Madrid: Asociación Española de Hemofilia; 2008 [acceso 21 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.hemofilia.com/fedhemo/que-es-la-hemofilia/otras-coagulopatias-congenitas/index.html>
- [43] Mahony BO, Noone D, Giangrande PLF and Prihodova L. haemophilia care in Europe – a survey of 35 countries. *Haemophilia*. 2013; 19: e239-e247.
- [44] Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Schulman S and White GC. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia. 6th Ed. Lippincott, Williams & Wilkins. 2013.
- [45] Mannucci PM. The role of natural VWF/FVIII complex concentrates in contemporary haemophilia care: a guideline for the next decade. *Haemophilia*. 2012; 18 (2): 2-7.
- [46] Mannucci PM. Evolution of the European guidelines for the clinical development of factor VIII products: little progress towards improved patient management. *Haemophilia*. 2013; 19: 344-348.
- [47] Mc Grath RT, Mc Rae E, Smyth OP and O'Donnell JS. Platelet von willebrand factor – structure, function and biological importance. *Brit J Haematol*. 2010; 148: 834-843.
- [48] Mikaelsson ME, Forsman N and Oswaldsson UM. Human factor VIII: a calcium-linked protein complex. *Blood*. 1983; 62: 1006-1015.
- [49] Munker et al., coordinador. *Modern Hematology*. 2ª ed. New Jersey: Humana Press Inc. 2007.
- [50] Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and

- management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*. 2008; 14: 171-232.
- [51] Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC and Furie B. Crystal structure of human Factor VIII: Implications for the formation of the Factor IXa-Factor VIIIa complex. *Structure*. 2008; 16: 597-606.
- [52] Ofosu FA, Santagostino E, Grancha S and Marcos P. Management of bleeding disorders: basic science. *Haemophilia*. 2012; 18 (2): 8-14.
- [53] Peyvandi F, Klamroth R, Carcao M, Federici AB, Di Minno G, Jimenez-Yuste V et al. Management of bleeding disorders in adults. *Haemophilia*. 2012; 18 (2): 24-36.
- [54] Pio SF, Ozelo MC, Dos Santos A, De Carvalho BV, Caram C, Zouain D et al. Factor VIII inhibitors in patients with congenital severe haemophilia A and its relation to genotype. *Haemophilia*. 2012; 18 (6): e411-e414.
- [55] Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*. 2009; 15: 1187-1196.
- [56] Raut S, Daniels S and Heath AB. Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII, concentrate (07/350). *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 1175-1176.
- [57] Ruggeri ZM. Von Willebrand factor: Looking back and looking forward. *Thromb Haemost*. 2007; 98: 55-62.
- [58] Sadler JE. Contact-How platelets touch von Willebrand factor. *Science*. 2002; 297 (5584): 1128-1129.
- [59] Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 2103-2114.
- [60] Sadler JE. Von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost*. 2009; 7 (1): 24-27.
- [61] Saenko EL, Loster K, Josic D and Sarafanov AG. Effect of von Willebrand Factor and its proteolytic fragments on kinetics of interaction between the Light and Heavy chains of human Factor VIII. *Thromb Res*. 1999; 96: 343-354.

- [62] Savage B, Cattaneo M and Ruggeri ZM. Mechanisms of platelets aggregation. *Curr Opin Hematol*. 2001; 8: 270-276.
- [63] Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation Factor VIII. *Blood*. 2008;111 (3): 1240-1247.
- [64] Skinner MW and Myles E. World federation of Hemophilia: 50 years of advancing treatment for all. *Haemophilia*. 2013; 19: 475-480.
- [65] Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 1759-1766.
- [66] Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Soucine JM, Walker Y and Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia*. 2010; 16: 20-32.
- [67] Terraube V, O'Donnell JS and Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: Biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*. 2010; 16: 3-13.
- [68] Triplett DA. Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clin Chem*. 2000; 46: 8(B): 1260-1269.
- [69] Vlot AJ, Koppelman SJ, van der berg MH, Bouma BN and Sixma JJ. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood*. 1995; 85 (11): 3150-3157.
- [70] Wang W, Wang YJ, Kelner DN. Coagulation Factor VIII: Structure and stability. *Int J Pharm*. 2003; 259: 1-15.
- [71] Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD and Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem*. 1991; 266 (32): 21948-21955.
- [72] Yardumian DA, Mackie IJ and Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: A review of methodology. *J Clin Pathol*. 1986; 39: 701-712.

2. OBJETIVO

“Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas”.

Albert Einstein (1879 - 1955)

2. OBJETIVO

El Factor VIII y el Factor von Willebrand son fármacos que se administran mayoritariamente en patologías asociadas a su déficit. Estas proteínas son el principio activo de los concentrados de origen plasmático obtenidos a escala industrial a partir de grandes volúmenes de plasma humano de diferente origen, mediante procedimientos de separación y purificación. Debido a la heterogeneidad de la materia prima, existe una gran variabilidad en su contenido interlote. Por tanto, es esencial disponer de un método de validación fiable, reproducible y exacto para asegurar la idoneidad de estos bioensayos. Los hemoderivados pertenecen al grupo de fármacos para los que se requiere la liberación oficial de lote, según la normativa europea *Official Control Authority Batch Release* (OCABR).

El objetivo de esta tesis es la puesta a punto y validación de dos bioensayos de la actividad correspondiente al Factor VIII y al Factor von Willebrand en fármacos hemoderivados. La tesis sigue un planteamiento multidisciplinar en el que se revisan y desarrollan aspectos bioquímicos, legislativos, estadísticos y analíticos.

3. NORMATIVA REGULATORIA

“Si algo no te gusta, cámbialo. Si no puedes cambiarlo, cambia tu actitud pero no te quejes”.

Maya Angelou (1928 - 2014)

3. NORMATIVA REGULATORIA

3.1 Regulación europea.

Las disposiciones legales, reglamentarias, administrativas así como recomendaciones sobre medicamentos se establecen por dos instituciones, la Unión Europea¹ (UE) y el Consejo de Europa² (CoE). En esta tesis se incluye una revisión de la normativa europea y nacional aplicable a medicamentos, en particular a los hemoderivados.

CONSEJO DE EUROPA (Council of Europe)	UNIÓN EUROPEA (European Union)
 <p>El Consejo de Europa fue la primera institución política de Europa.</p>	<p>Consejo Europeo (European Council)</p> <p>La forman los Jefes de Estado o Gobierno de los EM, con el Presidente de la Comisión Europea, para planificar la política de la UE.</p>
 <p>Asamblea Parlamentaria</p> <p>Formada por 318 representantes de los 47 países.</p>	<p>Parlamento Europeo</p> <p>Formada por 766 miembros del Parlamento de los 28 países.</p>
 <p>Comisión Europea de Derechos Humanos</p>	<p>Comisión Europea</p> <p>Órgano ejecutivo de la UE.</p>
<p>Tribunal Europeo de Derechos Humanos</p>	<p>Tribunal Internacional de Justicia</p>
	<p>Tribunal de Justicia de la UE</p>

Figura 10. Relaciones entre UE y CoE.

¹ La Unión Europea es una comunidad integrada por veintiocho estados europeos, sucesora de las Comunidades Europeas y que fue establecida el 1 de Noviembre de 1994 una vez en vigor el Tratado de la Unión Europea. Ha desarrollado e implementado un mercado único a través de ciertas normas de obligatoria aplicación en todos los Estados Miembros, las cuales aseguran entre otras cuestiones, la libre circulación de las personas, de bienes, servicios y capitales.

² Organización internacional con sede en Estrasburgo, que agrupa a 47 países, que fue creado para promover la democracia y proteger los derechos humanos y el Estado de Derecho en Europa.

Dentro del Título XIV del Tratado de Funcionamiento de la UE (TFUE), dedicado a la Salud Pública, el artículo 168 explica la acción de la UE para, complementando las legislaciones nacionales, “*mejorar la salud pública, prevenir las enfermedades humanas y evitar las fuentes de peligro para la salud física y psíquica*”. En concreto, fomentar la cooperación entre los Estados Miembros (EM) con el fin de mejorar la complementariedad de sus servicios de salud en las regiones fronterizas. En la Figura 10 se representa la relación entre las dos instituciones, UE y CoE, implicadas en la regulación de los medicamentos.

De acuerdo con el TFUE, los EM deben renunciar a una parte de su soberanía de forma que las instituciones europeas puedan adoptar una legislación, denominada Derecho derivado, que prevalezca sobre la legislación nacional.

Dentro del Derecho derivado se encuentran los actos jurídicos obligatorios (Reglamentos, Directivas y Decisiones) y no obligatorios (recomendaciones y dictámenes), además de disposiciones de otros tipos.

El Reglamento es aprobado o bien conjuntamente por el Consejo Europeo y el Parlamento Europeo o de manera independiente por la Comisión Europea. Aplica a todos los EM y es directamente aplicable y obligatorio de inmediato, con el rango de ley nacional.

La Directiva establece los objetivos que deben cumplir los EM pero sin indicar cómo conseguirlos. Puede ir dirigido a uno, varios o todos los EM, que deben hacer una transposición a la legislación nacional, teniendo en cuenta la fecha límite que marca la Directiva para ello.

En la legislación de medicamentos hay dos tipos de Directivas:

- **legislativas**, que emanan del Parlamento Europeo y del Consejo (procedimiento legislativo ordinario) o de alguna de estas dos instituciones (procedimientos legislativos especiales), que lo adoptan precisamente en su ejercicio del poder legislativo comunitario, pronunciándose sobre propuesta de la Comisión.
- **delegadas**, con el objetivo de que la Comisión complete o modifique, en elementos no esenciales, la eficaz aplicación de actos legislativos. La directiva delegada deberá expresar esta naturaleza en su propio título, y no estará revestida de la naturaleza de acto legislativo.

En España, las directivas se transponen en los Reales Decretos correspondientes, que se publican en el Boletín Oficial del Estado (BOE).

Son varias las Directivas europeas que legislan los medicamentos de uso humano y, más específicamente, aquellos derivados de la sangre y del plasma humanos y que se detallan a continuación:

La Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano, tiene como objetivo reagrupar en un único texto la legislación comunitaria relativa a los medicamentos de uso humano.

Esta Directiva consta de 130 artículos agrupados en 14 Títulos numerados y 3 Anexos. En la Tabla 3 se presenta un esquema del contenido de dicha directiva de la cual se describen los contenidos más relevantes y, en especial, los que afectan a hemoderivados. La Directiva ha ido modificándose parcialmente con nuevas disposiciones que se desarrollan en nuevas Directivas, de acuerdo con la evolución indicada en el diagrama de flujo representado en la Figura 11.

En el Título I, el artículo 1 define los distintos conceptos que se utilizarán a lo largo de la Directiva. Así se denomina medicamento a *“toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades humanas”*. También define los distintos tipos de medicamentos: inmunológico, homeopático, radiofármaco, y medicamentos derivados de sangre o plasma humanos; éstos últimos definidos como *“medicamentos a base de constituyentes sanguíneos preparados industrialmente por establecimientos públicos o privados”*. Dichos medicamentos, denominados hemoderivados, comprenden en particular, albúmina, factores de coagulación e inmunoglobulinas de origen humano.

En el Título II, artículo 3, referente al ámbito de aplicación de esta Directiva, se detalla que esta normativa no aplica a la sangre completa, el plasma y las células sanguíneas de origen humano.

El Título III, denominado genéricamente como Comercialización, desglosa en cuatro capítulos esta parte tan amplia de la Directiva.

Tabla 3. Resumen de la Directiva 2001/83/CE.

DIRECTIVA 2001/83/CE		
Título	Denominación	Artículos
I	DEFINICIONES	1
II	ÁMBITO DE APLICACIÓN	2 a 5
III	COMERCIALIZACIÓN	
	Capítulo 1. Autorización de comercialización	6 a 12
	Capítulo 2. Disposiciones particulares aplicables a los medicamentos homeopáticos	13 a 16
	Capítulo 3. Procedimiento relativo a la autorización de comercialización	17 a 26
	Capítulo 4. Reconocimiento mutuo de autorizaciones	27 a 39
IV	FABRICACIÓN E IMPORTACIÓN	40 a 53
V	ETIQUETADO Y PROSPECTO	54 a 69
VI	CLASIFICACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS	70 a 75
VII	DISTRIBUCIÓN AL POR MAYOR DE MEDICAMENTOS	76 a 85
VIII	PUBLICIDAD	86 a 100
IX	FARMACOVIGILANCIA	101 a 108
X	DISPOSICIONES PARTICULARES RELATIVAS A LOS MEDICAMENTOS DERIVADOS DE LA SANGRE Y DEL PLASMA HUMANOS	109 a 110
XI	VIGILANCIA Y SANCIONES	111 a 119
XII	COMITÉ PERMANENTE	120 a 121
XIII	DISPOSICIONES GENERALES	122 a 127
XIV	DISPOSICIONES FINALES	128 a 130
ANEXO	I Normas y protocolos analíticos, tóxico-farmacológicos y clínicos en materia de ensayos de medicamentos	
	II Directivas derogadas (Parte A) y lista de plazos de transposición al Derecho nacional (Parte B)	
	III Cuadro de correspondencias	

El capítulo 1, sobre la autorización de comercialización de los medicamentos, explica como deberán proceder los solicitantes de una autorización de comercialización de un medicamento, siempre y cuando esté establecido en la Comunidad y se trate de una autorización no prevista en el Reglamento 2309/93 (procedimiento centralizado de autorización). La solicitud, como consta en el Anexo I, debe ir acompañada de toda la información que se detalla en los artículos 8 al 12: datos administrativos y composición del medicamento (artículo 8), condiciones en las que el fabricante no tendrá obligación de presentar resultados de las pruebas toxicológicas o farmacológicas del medicamento sujeto a la solicitud de autorización (artículo 10), la información que debe incluir el resumen de las características del producto, conocido también como ficha técnica del

medicamento (artículo 11) y las características farmacológicas y clínicas que los expertos deben incluir sobre el medicamento (artículo 12).

El capítulo 3, bajo el nombre de procedimiento relativo a la autorización de comercialización, especifica todos los plazos de que dispone el EM para estudiar la documentación enviada por el solicitante. Desde el artículo 23 a 26, la Directiva incluye información acerca de la validez de 5 años para la autorización de comercialización aprobada, así como cuándo podrá ser denegada.

El capítulo 4 explica los objetivos del Comité de especialidades farmacéuticas, creado para facilitar las decisiones comunes que tomen los EM acerca de las autorizaciones de comercialización de los medicamentos, remarcando los criterios científicos de calidad, seguridad y eficacia en que deben basarse, para la libre circulación de los medicamentos dentro de la Comunidad. El Comité está adscrito a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA).

A partir del artículo 28, la Directiva señala los procedimientos que deben llevar a cabo los EM para evitar la duplicidad de la evaluación de las solicitudes presentadas al mismo tiempo en varios EM, mediante la elaboración de un informe de evaluación por parte del primer EM que estudie la solicitud de comercialización de un medicamento y la aceptación del resto de los EM de este informe.

El Título IV, denominado Fabricación e Importación, se refiere a la necesidad de disponer de una autorización de fabricación para todos aquellos medicamentos elaborados en el territorio de la UE, incluso cuando éste se fabrique para su posterior exportación. De especial importancia es el artículo 47, donde se anuncia la adopción de una Directiva para todo lo referente a las prácticas correctas de fabricación (habitualmente llamadas BPF's). Estas nuevas directrices quedan recogidas en la Directiva 2003/94/CE de la Comisión de 8 de octubre de 2003, por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas de correcta fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano. En este Título IV, también se definen todas las obligaciones del titular de esta autorización de fabricación así como de la cualificación de la persona definida como responsable (capítulos 48 a 52).

El Título V define toda la información que debe incluirse en el etiquetado, acondicionamiento primario, prospecto y embalaje exterior del medicamento,

incluyendo la necesidad de redactar estas indicaciones en la lengua o lenguas oficiales del EM donde vaya a comercializarse. El artículo 67 se refiere más específicamente a los radiofármacos y las precauciones que deben seguirse con estos medicamentos.

En el Título VI se especifica la clasificación de los medicamentos, comenzando por aquellos sujetos o no a receta médica. Una vez establecida esta primera clasificación, el artículo 71 pormenoriza cuando un medicamento estará sujeto a receta médica.

El Título VII comienza con el artículo 76, dedicado a la distribución al por mayor de medicamentos. Este tipo de distribución de medicamentos está sujeto a la posesión de una autorización para ejercer la actividad de mayorista de medicamentos, una vez que los solicitantes hayan cumplido los requisitos enumerados en el artículo 79: disponer de instalaciones y locales aptos para la buena conservación y distribución de los medicamentos, del personal adecuado y cualificado para realizar las funciones establecidas por el EM y comprometerse a cumplir los requisitos exigidos en el artículo 80. En cuanto al suministro de medicamentos a farmacéuticos o personal autorizado para su dispensación, los EM se comprometen a no endurecer los requisitos impuestos por otro EM. Existirán, sin embargo, requisitos más estrictos para la distribución al por mayor de medicamentos derivados de la sangre, sustancias narcóticas o psicotrópicas en su territorio, medicamentos inmunológicos y medicamentos radiofármacos.

El Título VIII, dedicado a la publicidad de los medicamentos, comienza definiendo este término e indicando las particularidades según la publicidad sea dirigida al público o a los profesionales que los prescriben. Los artículos posteriores definen muy claramente la información que puede utilizarse en la publicidad de los medicamentos.

El Título IX trata de la Farmacovigilancia, indicando que los EM pueden obligar a los médicos y otros profesionales sanitarios a informar de cualquier reacción adversa grave o inesperada que haya podido producirse. El artículo 103 obliga al titular de la comercialización a disponer de una persona responsable de la farmacovigilancia de sus medicamentos, debidamente cualificada. El artículo 104 pormenoriza los procedimientos para notificar cualquier reacción adversa grave que se haya producido en España o en el territorio de un tercer país. El artículo 106 requiere a la Comisión que, para facilitar el intercambio de información, elabore orientaciones sobre la realización de los correspondientes informes. El Título X se refiere exclusivamente a las disposiciones particulares para los medicamentos derivados de la sangre y del plasma

humanos. Consta de dos artículos: 109 y 110, donde se indica que *en lo que concierne a la utilización de sangre o plasma humano en tanto que materias primas para la fabricación de medicamentos, los EM adoptarán las medidas necesarias para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas*. También se menciona la aplicación de las monografías de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), a las que nos referiremos más adelante, que apliquen a estos medicamentos, incluyendo lo concerniente al plasma, además de las recomendaciones del *Consejo de Europa y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en lo que respecta particularmente a la selección y comprobación de los donantes de sangre y plasma*.

Los puntos 2 y 3 del artículo 109 señalan que *“los EM tomarán todas las medidas útiles para que los donantes y los centros de extracción de la sangre y el plasma humanos sean siempre claramente identificables. Además, deberán asegurarse todas las garantías de seguridad mencionadas en los apartados 1 y 2 para la importación de sangre y plasma humanos proveniente de terceros países”*.

Según el artículo 110, *los EM adoptarán todas las medidas necesarias para promover el autoabastecimiento de la Comunidad de sangre o plasma humanos. Deben estimularse las donaciones de sangre o de plasma voluntarias y no remuneradas y adoptarán todas las medidas necesarias para el desarrollo de la producción posterior y de la utilización de medicamentos derivados de sangre o plasma humanos procedentes de donaciones voluntarias y no remuneradas. Comunicarán las medidas adoptadas a la Comisión*.

El artículo 109 fue posteriormente modificado por la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes.

Esta nueva Directiva, denominada habitualmente como “Directiva de la Sangre”, define todos los términos relacionados con la transfusión, incluido los centros y servicios de transfusión. Considera que *la donación de sangre voluntaria y no remunerada constituye un factor que puede contribuir a conseguir altos niveles de seguridad de la sangre y sus componentes y, por lo tanto, a la protección de la salud humana. En particular, un EM podrá establecer requisitos para las donaciones voluntarias y no*

remuneradas, que incluyan la prohibición o restricción de las importaciones de sangre y sus componentes.

La Directiva 2002/98/CE aplica a la extracción y verificación de la sangre humana o sus componentes, sea cual sea su destino, así como a su tratamiento, almacenamiento y distribución cuando el destino sea la transfusión. Para verificar el cumplimiento de los requisitos que establece esta Directiva, los EM velarán por que las autoridades realicen inspecciones y controles adecuados en los centros de transfusión sanguínea. Los centros de transfusión mantendrán un sistema de calidad que siga los principios de buenas prácticas, y la Comisión establecerá las normas y especificaciones de las actividades incluidas en el mismo.

Por lo que respecta a la hemovigilancia, el artículo 14 sobre trazabilidad, indica que *los EM adoptarán las medidas necesarias para garantizar el seguimiento desde el donante al receptor, y viceversa, de la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento, conformidad y distribución de sangre y de sus componentes que tengan lugar en su territorio.* Para ello, los centros de transfusión dispondrán de un sistema de identificación de cualquier donación de sangre y de cada unidad de sangre y de componentes sanguíneos que permita la trazabilidad hasta el donante y, del mismo modo, hasta la transfusión y el receptor. Este sistema de trazabilidad también se aplicará a la sangre y sus componentes importados de terceros países. El etiquetado de la sangre o de sus componentes debe seguir un sistema de identificación definido en el Anexo III de esta Directiva. Todos los datos que permiten garantizar la trazabilidad se conservarán un mínimo de 30 años.

Por lo que se refiere a la protección de los datos, el capítulo VII, en su artículo 24, establece que todos los datos a los que tengan acceso terceras partes, deben convertirse en anónimos para que el donante no pueda ser identificado por ellas. Los datos se protegerán para evitar posibles modificaciones no autorizadas de los registros de los donantes, sin menoscabo de la trazabilidad de las donaciones.

Los controles analíticos que deben realizarse en las donaciones de sangre total y plasma quedan definidos en el Anexo IV: *Grupo ABO y Rh D (no necesario para plasma para fraccionamiento) y detección de las siguientes infecciones en los donantes: Hepatitis B (HBs-Ag), Hepatitis C (Anti HCV) y VIH 1/2 (Anti-HIV 1/2).* Para determinados

componentes o donantes o situaciones epidemiológicas concretas pueden ser necesarias otras pruebas adicionales.

Volviendo a la Directiva 2001/83/CE, el Título XI, en su artículo 111, indica que las autoridades competentes de los EM comprobarán el cumplimiento de las normas mediante inspecciones periódicas a los centros de fabricación de los medicamentos, donde *podrán tomar muestras e informarse de todos los documentos relacionados con el objeto de las inspecciones.*

Un aspecto específico y exclusivo de los medicamentos inmunológicos y de los hemoderivados es la liberación de cada lote de fabricación por un laboratorio estatal, lo cual se denomina **liberación oficial de lote**. En efecto, el artículo 114, en el punto 1, indica cómo, cuando se considere necesario para el interés de la Salud Pública, *los EM podrán exigir que el titular de la autorización de comercialización de vacunas vivas, medicamentos inmunológicos utilizados para la inmunización primaria de niños u otros grupos de riesgo, utilizados en programas de inmunización de Salud Pública o aquellos que sean nuevos o hayan sido fabricados con técnicas nuevas o modificadas, someta al control de un laboratorio estatal muestras de cada lote del producto a granel y/o medicamento, antes de su comercialización.* Lo mismo queda descrito en el apartado 2 del artículo 114 pero con respecto a los medicamentos derivados de sangre o plasma humanos. En el caso de los hemoderivados, el producto a granel es la mezcla de plasma que se utiliza como material de partida para la fabricación de cada lote, que se denomina habitualmente como “pool de plasma”. No será necesario realizar estos análisis si ya hubiesen sido hechos previamente por otro EM, cumpliendo las especificaciones aprobadas en el país receptor. Estos análisis deberán concluir en un plazo máximo de 60 días a partir de la recepción de las muestras. A este respecto, posteriormente, la Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, modifica la Directiva 2001/83/CE, incluyendo en su ámbito de aplicación el plasma elaborado mediante un proceso industrial y modificando los términos de “*un laboratorio estatal o de un laboratorio designado a este efecto*” por “*un laboratorio oficial de control de medicamentos o un laboratorio designado por un EM a tal efecto*”.

La Directiva 2001/83/CE, por tanto, permite, aunque no requiere, que los laboratorios estatales realicen controles de cada lote de pool de plasma y de producto terminado en los hemoderivados antes de su puesta en el mercado; es decir, son las autoridades

estatales competentes las que deciden si este sistema de liberación oficial es obligatorio y, en su caso, emiten un certificado de liberación de lote cuando los resultados son satisfactorios. Es lo que se conoce como Liberación Oficial de Lote de la Autoridad de Control (“Official Control Authority Batch Release”, OCABR). Actualmente, la gran mayoría de los EM, incluyendo España, así lo requieren, Además, dado que es una medida adicional de seguridad, muchos terceros países que importan de la UE estos productos, exigen este certificado. En el caso de los hemoderivados, los controles analíticos consisten en los marcadores virales de VHB, VHC y VIH, en el plasma, así como varios ensayos de actividad y seguridad en el producto final. También ha de revisarse la documentación de producción y control del fabricante de cada lote. Los controles analíticos del pool de plasma se realizan en la mezcla homogénea de unidades de plasma, material de partida de la fabricación de cada lote.

El artículo 115 establece que, en el caso de medicamentos derivados de sangre o plasma humanos, los procedimientos de fabricación deberán estar *validados adecuadamente, proporcionen homogeneidad entre lotes y garanticen, en la medida en que lo permita el estado de la técnica, la ausencia de contaminación vírica específica*. Los fabricantes tendrán que comunicar *el método que utiliza para reducir o eliminar los virus patógenos que puedan transmitirse por los medicamentos derivados de sangre o plasma humanos. Las autoridades competentes podrán enviar muestras del producto a granel y/o medicamento para su estudio a un laboratorio estatal o en un laboratorio designado a este efecto, bien durante el examen de la solicitud o bien después de haber concedido la autorización de comercialización*.

Los artículos 116 y 117 disponen que una autorización de comercialización puede ser suspendida o retirada si el medicamento es nocivo, carece de efectos terapéuticos, no posee la composición cuantitativa y cualitativa declarada, o si la información recogida en el expediente es errónea, o no se han realizado los controles descritos.

El Título XII se refiere al Comité permanente que asiste a la Comisión *para adaptar al progreso técnico las Directivas dirigidas a la supresión de los obstáculos técnicos en los intercambios en el sector de los medicamentos*.

El Título XIII, en sus disposiciones generales, indica las relaciones que deben mantener los EM para compartir la información relativa a sus requisitos para la autorización de fabricación o de comercialización de medicamentos.

En el Anexo 1 se indican los datos y documentos que deben acompañar a los expedientes para solicitar la autorización de comercialización de medicamentos, de acuerdo con las directrices comunitarias de calidad, seguridad y eficacia. Este anexo ha sido modificado por el anexo 1 de la Directiva 2003/63/CE de la Comisión. En él se describe el contenido del expediente, una vez que en el marco de la Conferencia internacional sobre armonización del año 2000 se llegó a acordar un formato y una terminología armonizados en un documento técnico común (DTC). Un DTC consta, de acuerdo con esta directiva, de cinco módulos: el primero es la información administrativa, el resumen de las características del producto, etiquetado y prospecto, información sobre los expertos que han realizado el DTC, así como una evaluación del riesgo para el medio ambiente. El segundo módulo contiene el resumen de los datos químicos, farmacéuticos y biológicos. El módulo 3 incluye la información química, farmacéutica y biológica del principio activo y del medicamento terminado. Los módulos 4 y 5 describen los estudios no clínicos y clínicos, respectivamente.

La Directiva considera que, *en el caso de los medicamentos biológicos, se entenderá por materiales de partida toda sustancia de origen biológico, tales como los microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares, sean o no recombinantes, incluidas las células primarias). Por lo que se refiere a los procesos de fabricación de este tipo de principios activos, los materiales de siembra, los bancos de células, las mezclas de suero o plasma sin elaborar y demás materias de origen biológico, así como, siempre que sea posible, los materiales de los que se hayan obtenido, deberán someterse a ensayos para comprobar que están libres de agentes extraños externos. Más específicamente, cuando se trate de medicamentos derivados de la sangre o del plasma humano, deberán describirse y documentarse el origen y los criterios de recogida, transporte y conservación de los materiales de partida.*

En el caso de los hemoderivados, como medicamentos de origen biológico, se utilizarán materiales de referencia biológicos de la Ph. Eur. Su seguridad depende del control riguroso de sus materiales de partida y de una fabricación basada en el manejo cuidadoso del plasma humano como material de partida.

A pesar de lo dispuesto previamente acerca de los materiales de partida y materias primas, en medicamentos derivados de la sangre humana, toda esta información podrá ser sustituida por un “Archivo Principal sobre Plasma”(APP) . Este archivo es definido en la Directiva como *“aquella documentación independiente y separada del expediente de autorización de comercialización que contenga toda la información pormenorizada pertinente sobre las características de todo el plasma humano empleado como material de partida y/o materia prima para la fabricación de subfracciones o fracciones, componentes del excipiente y principio(s) activo(s)”*. Su objetivo ha sido no repetir toda la documentación sobre el plasma en cada uno de los hemoderivados afectados, asegurando la consistencia en toda la UE. La certificación de un APP se realiza de la misma forma que en un procedimiento centralizado. Aunque es un sistema opcional, por sus grandes ventajas todos los fabricantes de hemoderivados lo utilizan, a diferencia del caso de las vacunas. El APP se debe certificar de nuevo cada año, con las modificaciones que hubiera.

- Directiva 2004/33/CE de la Comisión de 22 de marzo de 2004 por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos.

Para establecer estos requisitos técnicos, la Directiva tiene en cuenta la Recomendación 98/463/CE del Consejo, de 29 de junio de 1988, sobre la idoneidad de los donantes de sangre y de plasma y el cribado de las donaciones de sangre de la CE, algunas recomendaciones del Consejo de Europa, el dictamen del Comité científico de medicamentos y dispositivos médicos, las monografías de la Ph. Eur., especialmente en lo que concierne a la utilización de sangre o hemoderivados como materias primas para la fabricación de medicamentos, las recomendaciones de la OMS y la experiencia internacional en este ámbito. La sangre y los componentes sanguíneos importados de terceros países también deberán cumplir dichos requisitos técnicos. En los Anexos II a V de la Directiva se describen las pruebas y procedimientos que se contemplan y que los EM garantizarán la validación de todos ellos.

- Directiva 2005/61/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005, por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos de trazabilidad y a la notificación de reacciones y efectos adversos graves.

En los Anexos se definen las reacciones adversas graves que puedan producirse así como los formularios de notificación de dichos efectos adversos.

- Directiva 2005/62/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005, por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las normas y especificaciones comunitarias relativas a un sistema de calidad para los centros de transfusión sanguínea. Se define, en este sentido, que el sistema de calidad debe englobar los principios de gestión de la calidad, aseguramiento y mejora continua de la calidad y abarcar al personal, los locales y el equipo, la documentación, la extracción, la verificación, el tratamiento, el almacenamiento y la distribución, la gestión de contratos, la no conformidad y la autoinspección, el control de calidad, la retirada de componentes sanguíneos y las auditorías externa e interna.

Específicamente en lo que se refiere a los laboratorios, la Directiva indica que todos los procedimientos de verificación serán validados antes de ser utilizados, el equipo y los dispositivos técnicos se utilizarán de acuerdo a procedimientos validados, de igual manera que el tratamiento de los componentes sanguíneos, para evitar cualquier riesgo de contaminación y proliferación microbiana en los componentes sanguíneos preparados.

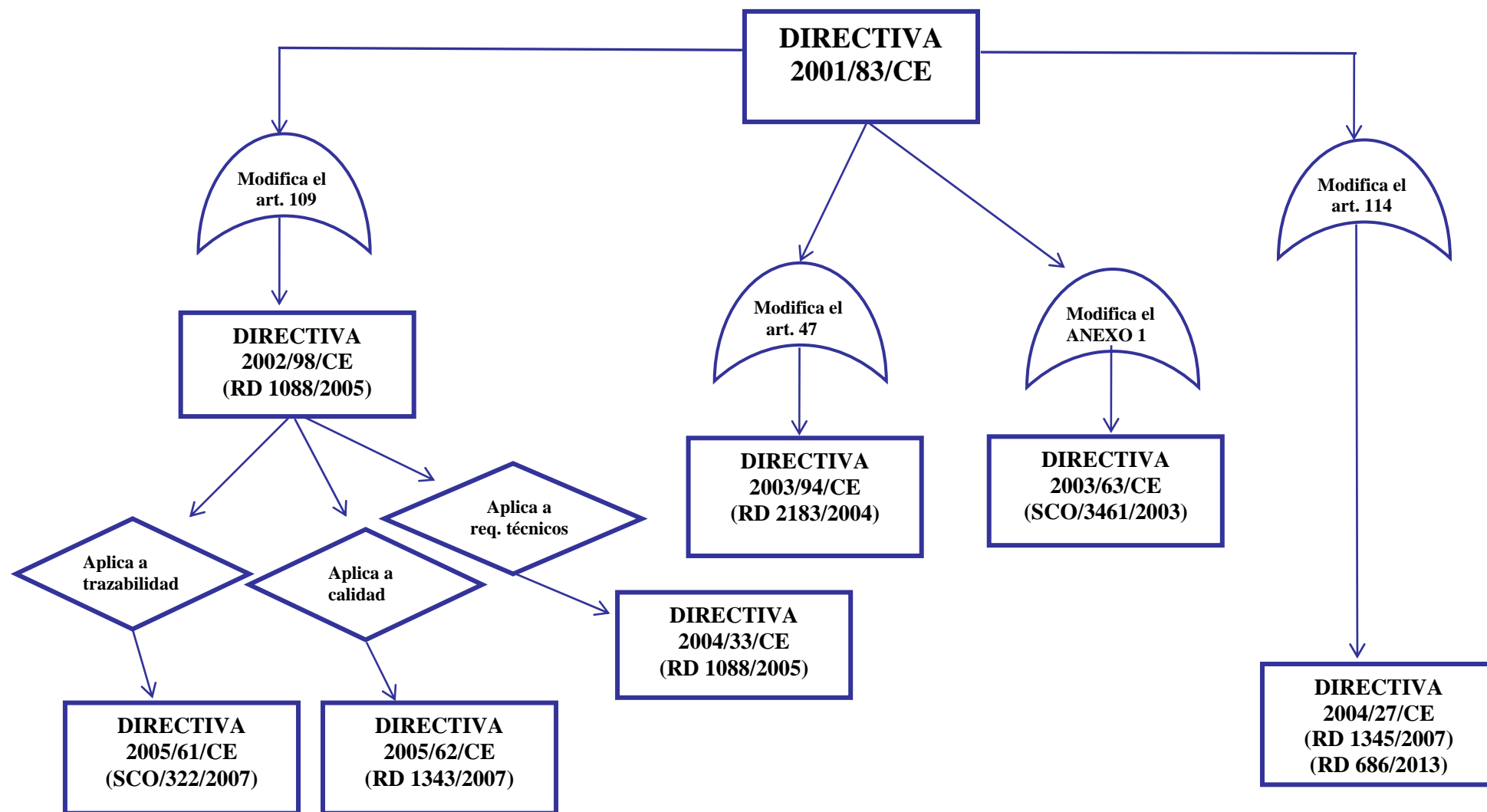


Figura 11: Evolución de la normativa europea aplicable a medicamentos hemoderivados y su transposición a la española (Reales Decretos).

3.2. EMA y Directrices.

Aunque desde finales de 1990 existían varias propuestas para la creación de una Agencia Europea de Medicamentos (EMA) con sede en Londres, no fue hasta el uno de enero de 1995 cuando entra en vigor su funcionamiento, como indica el Reglamento (CEE) N° 2309/93 DEL CONSEJO, de 22 de julio de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos. Sus funciones son las de coordinación y organización del sistema de autorizaciones de medicamentos en Europa. Su creación ha permitido la armonización de los requerimientos necesarios para la autorización de muchos medicamentos, tanto en la UE como en otros países asociados.

Anteriormente, en 1977 y 1981, respectivamente, se crearon los Comités de Especialidades Farmacéuticas (CPMP) y de Medicamentos Veterinarios (CVMP), formados por representantes de todos los EM y de la Comisión y que emiten dictámenes consultivos a requerimiento de cualquier EM o de la Comisión en relación con la autorización de medicamentos o de aspectos de la farmacovigilancia. Además, ambos comités son los encargados de aprobar las directrices o “guidelines” elaboradas por grupos de trabajo, y que son “*disposiciones de carácter no obligatorio basados en los conocimientos científicos del momento sobre un aspecto en concreto*”. Las directrices son instrumentos jurídicos ya que no obligan a su cumplimiento aunque cuando un solicitante decide no seguirlas, tiene que justificar la decisión tomada. Su carácter no obligatorio permite mantener la flexibilidad y evitar cualquier impedimento al desarrollo científico.

3.3. Regulación española.

La legislación española relativa a los medicamentos derivados de sangre y plasma humanos es la que se detalla a continuación:

- Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Deroga la ley 25/1990 del Medicamento y tiene como finalidad la

mejora del funcionamiento del mercado interior de los medicamentos pero sin olvidar la protección de la salud.

- Ley 10/2013, de 24 de julio, por la que se incorporan al ordenamiento jurídico español la Directiva 2010/84/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010, sobre Farmacovigilancia y la Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, sobre prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal, y se modifica la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.

- El Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Este RD transpone a la legislación española la Directiva 2001/83/CE y sus posteriores modificaciones (ver Figura 11). Posteriormente ha sido modificado por el RD 686/2013, actualizando la regulación vigente. En la Sección 1ª (Medicamentos Hemoderivados) del capítulo IV de este Real Decreto se explica la necesidad de llevar a cabo la autorización previa de cada lote de fabricación de producto terminado, condicionando la comercialización a su conformidad. Se exceptúan, entre otros, los derivados plasmáticos que se utilicen como excipientes o reactivos en la producción de otro medicamento o producto sanitario. La autorización previa de cada lote de fabricación consistirá en la realización de ensayos analíticos junto con la revisión de los protocolos de producción y control, enviados por el titular. En este caso, el plazo máximo para la resolución es de 60 días desde la fecha de su presentación. Si se acredita documentalmente que el lote ha sido certificado por la autoridad competente de otro EM, se otorgará la autorización sin realizar análisis.

- Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. Reúne en un único texto toda la normativa española relativa a la hemodonación y requisitos técnicos, además de incorporar al ordenamiento jurídico interno la Directiva 2002/98/CE y la Directiva 2004/33/CE.

- Real Decreto 2183/2004, de 12 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1564/1992, de 18 de diciembre, que desarrollaba y regulaba el régimen de autorización de los laboratorios farmacéuticos y de los importadores de medicamentos y

la garantía de calidad en su fabricación industrial. También incorpora en el ordenamiento jurídico español la Directiva 2003/94/CE. Amplia el ámbito de aplicación del Real Decreto a los medicamentos en investigación de uso humano y modifica el capítulo VI, para que las BPF's sean aplicables a los medicamentos en investigación de uso humano y a los medicamentos para exportación.

- Real Decreto 1343/2007, de 11 de octubre, por el que se establecen normas y especificaciones relativas al sistema de calidad de los centros y servicios de transfusión. Corresponde a la transposición de la Directiva 2005/62/CE, por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE.

- Orden SCO/3461/2003, de 26 de noviembre, por el que se actualiza el Anexo II del Real Decreto 767/1993, de 21 de mayo, por el que se regula la evaluación, autorización, registro y condiciones de dispensación de especialidades farmacéuticas y otros medicamentos de uso humano. También incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 2003/63/CE de la Comisión.

- Orden SCO/322/2007, de 9 de febrero, por la que se establecen los requisitos de trazabilidad y de notificación de reacciones y efectos adversos graves de la sangre y de los componentes sanguíneos. Incorpora al ordenamiento jurídico interior la Directiva 2005/61/CE.

3.4. Liberación de lote europeo.

La Directiva 2001/83/CE, en el artículo 114, permite, aunque no requiere, que los laboratorios estatales realicen controles de cada lote de producto a granel y de producto terminado en los medicamentos derivados de sangre y plasma humanos antes de su puesta en el mercado. Las autoridades competentes emiten un certificado de liberación de lote cuando los resultados son satisfactorios (OCABR). Consiste en los controles analíticos y revisión de documentación adicionales a la liberación de lote que debe llevar a cabo el fabricante en cada lote de acuerdo al artículo 51 de esta Directiva. El laboratorio oficial de control es la autoridad competente de cada país en materia de control de medicamentos. En el caso de España, el laboratorio oficial responsable de la liberación oficial de lote, como consta en el procedimiento OCABR, es la División de

Productos Biológicos y Biotecnología de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

Estos controles no serán realizados cuando otro EM ya lo haya realizado y haya declarado que cumple las especificaciones aprobadas. Para todos los controles descritos deben utilizarse las monografías de la Ph. Eur. disponibles, además de cualquier normativa recomendada por el Consejo de Europa y la OMS.

La red de laboratorios oficiales de control de medicamentos (OMCL's) es el foro para el intercambio de información confidencial sobre la calidad técnica y los medicamentos humanos biológicos así como todos los métodos relacionados y un eslabón clave en la cadena de regulación. También establece el procedimiento de liberación de lote europeo. Conforme a lo dispuesto por la Comisión Europea, el EDQM actúa como su secretaria.

La Dirección Europea de Calidad del Medicamento y Productos Sanitarios (EDQM), creada en 1996, es una Dirección del Consejo de Europa, cuya misión es la protección de la Salud Pública mediante el desarrollo, el mantenimiento y la monitorización de la aplicación de estándares de calidad que permitan disponer de medicamentos seguros.

El EDQM tiene a su cargo:

- 1.- La Secretaría Técnica de la Comisión Europea de Farmacopea.
- 2.- La publicación y la distribución de la Ph. Eur.
- 3.- La preparación y distribución de las sustancias químicas y biológicas de referencia.
- 4.- La certificación de conformidad con las monografías de la Ph. Eur.
- 5.- La red europea de OMCL's.

El organigrama del EDQM está detallado en la Figura 12.

Está supervisado por un grupo asesor elegido constituido por seis representantes (tres para las vacunas y tres para productos relacionados con sangre) de los distintos EM. Anualmente se celebra una reunión plenaria con todos los representantes para revisar las actividades de cada año. Esta reunión también es una oportunidad para adoptar el procedimiento europeo de liberación de lotes y las directrices, que, al igual que todas las demás actividades de la red de OMCL's, deben ser aprobados por todos los miembros de la red.

Este procedimiento OCABR afecta a los EM de la UE / EEE y también se aplica por cualquier Estado que haya firmado un acuerdo formal, incluyendo el reconocimiento de OCABR, con la UE. Terceros países que no pertenecen a la UE también lo solicitan

cuando importan medicamentos hemoderivados o vacunas, de la UE, como una medida de seguridad adicional. Países como Suiza, Israel y Canadá lo aplican a través de diferentes acuerdos de reconocimiento mutuo.

Por lo que se refiere a la Ph. Eur. es el organismo referencia para el control de calidad de los medicamentos de los estados signatarios de la Convención. Las normas oficiales publicadas en ella proporcionan una base legal y científica para el control de calidad durante los procesos de desarrollo, fabricación y comercialización. Estas normas se refieren a la composición cualitativa y cuantitativa así como a las pruebas que se deben realizar en los medicamentos, en las materias primas utilizadas en su producción y en la síntesis de los intermedios. Todos los productores de medicamentos o de sustancias activas deben aplicar estas normas de calidad para comercializar sus productos en todos estos países.

Las misiones de la Ph. Eur. son:

- Promover la salud pública mediante normas comunes reconocidas para su uso por los profesionales de la salud y cualquier persona interesada en la calidad de los medicamentos.
- Facilitar la libre circulación de los medicamentos en Europa.
- Garantizar la calidad de los medicamentos o de cualquiera de sus componentes importados o exportados desde Europa.
- Diseñar las monografías y cualquier texto adecuado a las necesidades de las autoridades reguladoras, para todos aquellos relacionados con el control de la calidad de los medicamentos y de sus componentes, así como para los fabricantes de las materias primas y sus productos.

Por lo que se refiere a los medicamentos hemoderivados, existen monografías específicas elaboradas por el EDQM para la liberación de lotes de: mezclas de plasma utilizado para la fabricación de medicamentos, albúmina humana, inmunoglobulina humana y factores de coagulación, inhibidores de plasma y sellantes de fibrina (ver Figura 13).

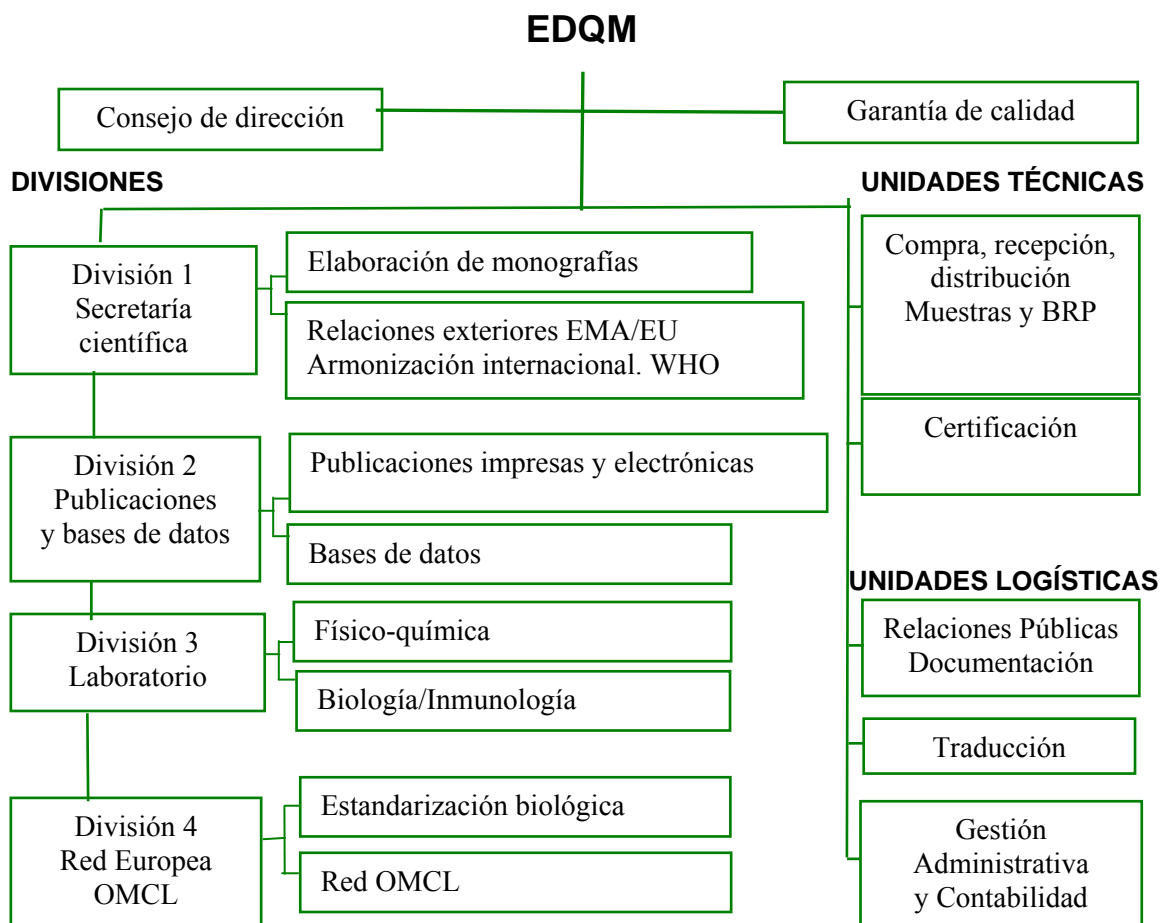


Figura 12: Organigrama del EDQM

En estas directrices se indican los ensayos a realizar según cada tipo de medicamento.

El procedimiento OCABR llevado a cabo para la liberación europea de lotes de medicamentos derivados de sangre y plasma humanos por el EM deberá ser mutuamente reconocido por todos los demás EM que requieran este procedimiento OCABR para ese producto.

Las autoridades competentes emitirán un certificado de liberación europea de lote cuando los resultados de los lotes analizados sean satisfactorios. Las Directivas también obligan a los EM a reconocer el certificado emitido en cualquier otro EM; esto significa que los lotes liberados por las autoridades competentes de un EM serán válidos para todos los demás.

HUMAN BIOLOGICAL MEDICINES		
Guidelines for EU Official Control Authority Batch Release		
Document Title	Last Web Update	In force from
Preface and Notes for Use	01/08/14	X
OCABR Administrative Procedures		
EU Administrative Procedure for Official Control Authority Batch Release	01/08/14	01/06/14
Procedure for Official Control Authority Batch Release of Centrally Authorised Immunological Medicinal Products for Human Use and Medicinal Products Derived From Human Blood and Plasma	01/08/14	01/07/10
Medicinal Products Derived From Human Blood and Human Plasma – Product Specific Guidelines		
Clotting Factor Concentrates, Plasma Inhibitor Concentrates and Fibrin Sealants	01/08/14	01/01/12
Human Albumin	01/08/14	01/01/12
Human Immunoglobulin	01/08/14	01/01/14
Human Plasma (pooled and treated for virus inactivation) formerly Solvent-Detergent (SD) Plasma	01/08/14	01/01/12
Protocol for Approval of Plasma Pools	01/08/14	01/01/09

Figura 13: Estado de las guías de hemoderivados para la liberación europea de lotes.

3.5. Aspectos de calidad.

Para reconocer este procedimiento OCABR, los laboratorios oficiales de control deben trabajar de acuerdo a un sistema de aseguramiento de la calidad, basado en la norma internacional: **UNE-EN ISO/IEC 17025:2005**. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Sustituye a la anterior UNE-EN ISO/IEC 17025:2000. En cuanto a validación de ensayos, la guía ICH (International Conference of Harmonization) Topic Q2 (R1), indica los parámetros que deben evaluarse para la validación de los procedimientos analíticos utilizados, una vez que se ha realizado la puesta a punto de los mismos (Tabla 4). Estos parámetros pueden variar dependiendo del tipo de ensayo que haya que realizar.

Tabla 4. Parámetros de validación.

Procedimiento	Identificación	Impurezas	Ensayo actividad
Parámetros:			
Exactitud	-	+	+
Precisión			
Repetibilidad	-	+	+
P. intermedia	-	+ (1)	+ (1)
Especificidad (2)	+	+	+
Lím. de detección	-	- (3)	-
Lím. de cuantificación	-	+	-
Linealidad	-	+	+
Rango	-	+	+

(1) Si se lleva a cabo estudios de reproducibilidad, no sería necesario estudiar la precisión intermedia del método.

(2) La falta de especificidad puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

(3) Puede ser necesario su determinación en algunos casos.

La guía UNE-EN ISO/IEC 17025 indica en el punto 5.4.5.2.: “*El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para*

satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto". No obstante, la red de OMCL's tiene un documento específico de validación de procedimientos analíticos [EDQM, 2007] donde se define la extensión de la validación que es necesario realizar, en función de la categorización de los procedimientos analíticos. Así, en el punto 1. Transfer of a Method, se indica: "In this category it is assumed that a certain amount or elements of validation data for this particular analysis it is already available; so no or only a few validation characteristics need to be considered. In an ideal situation, this can also be done by comparison of the results of two laboratories performed on the same sample. "No formal validation required" indicates that the respective validation characteristics have already been considered by others. However a verification of suitability under conditions of use (=method transfer check) has to be done in all cases by the OMCL".

En España, la entidad nacional de acreditación es ENAC (www.enac.es) que realiza las siguientes actividades:

- Declara la competencia técnica de los evaluadores de la conformidad.
- Promueve la aceptación internacional de las actividades de los evaluadores de la conformidad acreditados.
- Colabora con la Administración y otras organizaciones usuarias de la acreditación.
- Gestiona el sistema de acreditación.
- Promueve y difunde los procedimientos y criterios de acreditación facilitando el acceso de los evaluadores de la conformidad a la acreditación.
- Colabora con las instituciones y organizaciones nacionales e internacionales en los aspectos relacionados con sus objetivos y fines.

En Europa, el reconocimiento de los organismos de acreditación por las autoridades está establecido en el artículo 11 del Reglamento (CE) nº 765/2008 que establece los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado: *"Las autoridades nacionales reconocerán la equivalencia de los servicios prestados por los organismos de acreditación [...] y aceptarán de ese modo [...] los certificados de acreditación de dichos organismos y las certificaciones emitidas por los organismos de evaluación de la conformidad acreditados por ellos".*

En la AEMPS, en la Dirección de Medicamentos de Uso Humano, el Laboratorio de Hemoderivados de la División de Productos Biológicos y Biotecnología está acreditado por ENAC según la norma ISO/IEC 17025:2005 desde Enero de 2004, para las técnicas necesarias para realizar la liberación de lote europeo de acuerdo con el procedimiento OCABR para productos derivados de plasma, y hemoderivados tales como el Factor VIII, la albúmina e inmunoglobulinas. Así mismo el Laboratorio de Virología de la misma División está acreditado para las técnicas de marcadores virales en las mezclas de plasma. En este marco, la AEMPS emite certificados europeos de liberación oficial de lote, de plasma y de producto final de hemoderivados, para otros países, tanto países europeos que lo requieren como para terceros países que lo solicitan como una medida adicional de seguridad.

3.6. Bibliografía.

- [1] Dir. 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2001/311/L00067-00128.pdf>.
- [2] Dir. 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 2003. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2003/033/L00030-00040.pdf>.
- [3] Dir. 2003/63/CE de la Comisión, de 25 de junio de 2003. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2003/159/L00046-00094.pdf>.
- [4] Dir. 2003/94/CE de la Comisión de 8 de octubre de 2003. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2003/262/L00022-00026.pdf>.
- [5] Dir. 2004/33/CE de la Comisión de 22 de marzo de 2004. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2004/091/L00025-00039.pdf>.
- [6] Dir. 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2004/136/L00034-00057.pdf>.
- [7] Dir. 2005/61/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2005/256/L00032-00040.pdf>.
- [8] Dir. 2005/62/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005. Disponible en: <http://www.boe.es/doue/2005/256/L00041-00048.pdf>.
- [9] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Validation of Analytical Procedures. Strasbourg: EDQM; 2007. PA/PH/OMCL (05) 47 DEF.
- [10] Guías para la liberación europea de lotes. Disponible en: <http://www.edqm.eu/en/Human-OCABR-Guidelines1530.html>. [actualizada el 1 de agosto de 2014; fecha de acceso: 25 de agosto de 2014].
- [11] Ley 29/2006, de 26 de julio. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2006/07/27/pdfs/A28122-28165.pdf>.
- [12] Ley 10/2013, de 24 de julio. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2013/07/25/pdfs/BOE-A-2013-8083.pdf>.
- [13] Lista de contacto del procedimiento OACBR. Disponible en: <http://www.edqm.eu/en/human-biologicals-611.html>.
- [14] Mascaretti L, James V, Barbara J, Cárdenas JM, Blagoevska M and Haracic M. Comparative analysis of national regulations concerning blood safety across Europe. Transfusion Med. 2004; 14: 105-111.

- [15] RD 1088/2005, de 16 de septiembre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2005/09/20/pdfs/A31288-31304.pdf>.
- [16] Dir. 2010/84/UE del Parlamento Europea y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010 Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2010_84/dir_2010_84_es.pdf.
- [17] Dir. 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2011_62/dir_2011_62_es.pdf.
- [18] RD 1345/2007, de 11 de octubre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2007/11/07/pdfs/A45652-45698.pdf>.
- [19] RD 686/2013, de 16 de septiembre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2013/09/17/pdfs/BOE-A-2013-9638.pdf>.
- [20] RD 2183/2004, de 12 de noviembre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2004/11/13/pdfs/A37514-37517.pdf>.
- [21] RD 1343/2007, de 11 de octubre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2007/11/01/pdfs/A44626-44631.pdf>.
- [22] SCO 3461/2003, de 26 de noviembre. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2003/12/12/pdfs/A44292-44316.pdf>.
- [23] SCO/322/2007, de 9 de febrero. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2007/02/17/pdfs/A07010-07016.pdf>.
- [24] Timón M y Ruiz S. Bases regulatorias de los medicamentos de origen biotecnológico. Rev Esp Econ Salud. 2007; 6 (6): 346-351.
- [25] Valverde López JL, Rísquez Madrideo JP y Cabezas López M^a D. El concepto jurídico de la sangre y sus derivados desde la perspectiva del derecho comunitario y español. Ars Pharmaceutica. 1999; 40 (3): 131-141.

4. METODOLOGÍA

“La tecnología por sí sola no basta. También tenemos que poner el corazón”.

Jane Goodall (1934 -)

4. METODOLOGÍA

4.1 Conceptos estadísticos.

Los bioensayos o ensayos biológicos se definen como métodos de análisis para la estimación de la naturaleza o la actividad de una muestra (o de un proceso) mediante la utilización de reacciones que permiten su aplicación en cualquier sustancia biológica, siempre y cuando no pueda utilizarse otro método físico y/o químico para caracterizar la actividad de la muestra. Ejemplos de sustancias que pueden ser objeto de este tipo de análisis son hormonas, cancerígenos, compuestos toxicológicos, enzimas, etc. [Rosso, 2010] [Saha, 2002].

Los bioensayos se clasifican en ensayos cualitativos y cuantitativos. Se detallan los ensayos que se realizan en esta tesis.

Existen dos tipos de bioensayos cuantitativos:

- Bioensayos directos:

En este tipo de ensayos, una dosis de un estándar (de concentración conocida) y de una muestra son suficientes para producir una respuesta específica, que puede medirse directamente. Si z_S y z_T son las dosis del estándar y de la muestra y producen el mismo efecto, la potencia relativa, ρ , se define como la cantidad de estándar equivalente en su efecto a una unidad de la muestra y se representa mediante la fórmula:

$$\rho = z_S / z_T$$

En este tipo de ensayos, la respuesta debe ser clara y fácilmente reconocible.

- Bioensayos indirectos:

En estos ensayos, debe determinarse la relación existente entre la dosis y la respuesta de cada preparación de estándar y muestra analizados.

Por tanto, se obtiene una respuesta para cada dosis y la potencia relativa de la muestra con respecto al estándar se determinará por análisis estadísticos de relación dosis-respuesta.

Si Y_{S_i} e Y_{T_i} son las respuestas obtenidas para las distintas dosis de las preparaciones del estándar y de la muestra, respectivamente, las rectas de regresión dosis-respuesta obtenidas serán:

$$Y_{Si} = \alpha_S + \beta_S x_{Si} + e_{Si}$$

$$Y_{Ti} = \alpha_T + \beta_T x_{Ti} + e_{Ti},$$

donde e_{Si} y e_{Ti} representan los errores aleatorios puesto que los datos no pueden ser estimados sin ningún error [Kirkwood et al, 1984] [Saha, 2002]. Para determinados intervalos de concentración, una transformación logarítmica puede permitir que el modelo sea lineal. Las rectas así obtenidas serían:

$$E(Y_{Si}) = \alpha_S + \beta_S x_{Si}$$

$$E(Y_{Ti}) = \alpha_T + \beta_T x_{Ti}$$

Si d_S y d_T son dosis equipotentes de las preparaciones de estándar y muestra, respectivamente, entonces podremos decir que:

$$\log \rho = \log d_S - \log d_T = x_S - x_T$$

Puesto que $x_S = \log \rho + x_T$, podemos substituir este valor en las fórmulas anteriores:

$$E(Y_{Si}) = \alpha_S + \beta_S (\log \rho + x_{Ti}) = \alpha_T + \beta_S x_{Ti} = E(Y_{Ti}),$$

donde $\alpha_T = \alpha_S + \beta \log \rho$

La relación de la muestra también es lineal para la misma transformación que la preparación del estándar. El examen de las dos ecuaciones para las dos preparaciones muestra que las dos rectas tienen la misma pendiente y, por lo tanto, son paralelas.

De este modo, en un ensayo según este modelo, las dos rectas de regresión son paralelas y, además, los errores e_{Si} y e_{Ti} tienen la misma distribución.

Por lo tanto,

$$\beta_S = \beta_x = \beta$$

Como:

$$\alpha_T = \alpha_S + \beta \log \rho,$$

donde ρ es la potencia relativa de la muestra con respecto al estándar, se obtiene la función:

$$\log \rho = \{\alpha_T - \alpha_S\} / \beta$$

Los parámetros α_T , α_S y β se calculan a partir de los datos obtenidos en el ensayo y, como consecuencia, se calcula el valor de ρ [Saha, 2002].

Idealmente, los bioensayos deben hacerse repetidas veces de forma que la estimación de la potencia sea independiente de las diferencias encontradas entre ensayos y, por tanto, más precisa [Finney, 1978].

El diseño óptimo para un bioensayo se fundamenta en:

- Disponer de una muestra del estándar de actividad conocida para cada uno de los análisis que se realicen con la preparación de la muestra. Esto se debe a la gran variabilidad existente en este tipo de análisis, donde es altamente improbable que se obtenga la misma pendiente en ensayos distintos [Barrowcliffe et al., 1987] [Curtis, 1984].
- Realizar el número de diluciones del estándar y de la muestra en un rango que permita asegurar la linealidad de la relación dosis-respuesta o de las transformaciones que deban realizarse [Curtis, 1984]. El número de diluciones de un ensayo dependerá de la variabilidad de éste; tres dosis aseguran la linealidad y determinan la transformación que debe realizarse [Kirkwood et al, 1984].
- Número de replicaciones: como las relaciones dosis-respuestas de varios análisis pueden no ser lineales ni paralelos, se debe asegurar que la variación en la respuesta sea principalmente debida a la variación aleatoria como consecuencia de errores mínimos de pipeteos o en la detección de las respuestas o que, efectivamente, se trate de una relación que no es paralela ni lineal. Mediante replicaciones independientes de las dosis, se miden las desviaciones debidas al error aleatorio. Las diferencias entre las respuestas replicadas representan la magnitud del error acumulado en todos los pasos del ensayo y también permite obtener información sobre la precisión de cada razón de potencia [Curtis, 1984].
- Deriva temporal: da lugar a mayores errores aleatorios y a estimaciones mayores o menores de las potencias. Si replicados del estándar se analizan al comienzo y al final del análisis, las diferencias son indicativas de esta deriva. Por ese motivo, conviene disponer las muestras en un orden balanceado, también conocido como “en espejo” (Estándar – Muestra – Muestra – Estándar). Además, para evitar el mayor error aleatorio debido a la deriva temporal, es conveniente reducir el tiempo del ensayo todo lo posible y utilizar, siempre que sea posible, reactivos estables. [Barrowcliffe et al., 1987] [Curtis, 1984].

En estas condiciones, se obtienen gráficos con líneas rectas correspondientes a los datos del estándar y de la muestra con pendientes distintas pero que cortan el eje en el mismo punto (modelo de razón de pendientes) o gráficos con líneas rectas de igual pendiente (modelo de líneas paralelas) [Eur. Ph., 2014].

En el modelo de líneas paralelas, que es el modelo utilizado en los ensayos realizados en esta tesis, las representaciones gráficas, para el estándar y la muestra, del logaritmo de la dosis frente a la respuesta, dará una distancia constante entre ambas denominada R o razón de potencias (Figura 14) [Barrowcliffe, 1987] [Kirkwood et al., 1980].

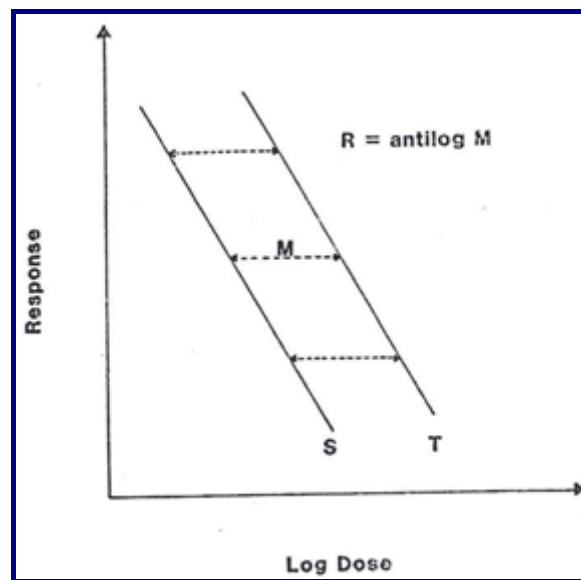


Figura 14. Método de análisis de líneas paralelas (Barrowcliffe, 1987).

En el modelo de razón de pendientes, utilizado en algunos ensayos microbiológicos, las dosis se representan en el eje x, con el valor 0 de concentración a la derecha y el máximo valor de la dosis a la izquierda del eje. En este caso, no suele utilizarse ninguna transformación para las dosis y/o las respuestas (Figura 15).

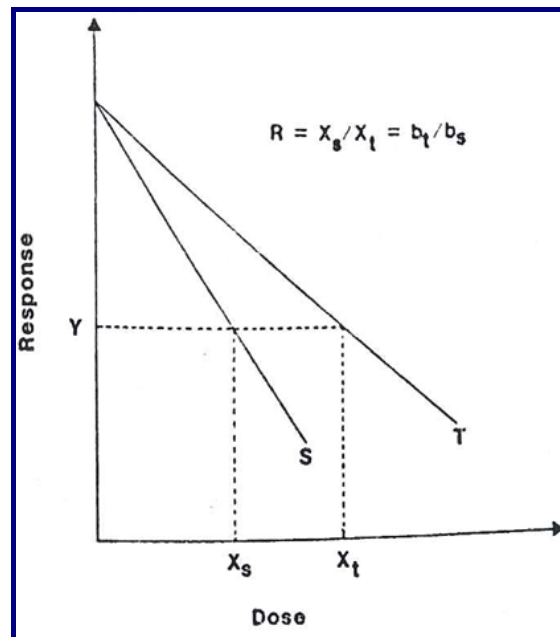


Figura 15. Método de razón de pendientes (Barrowcliffe, 1987).

4.2 Herramientas estadísticas.

Los ensayos realizados en esta tesis corresponden a ensayos biológicos de factores de coagulación; en concreto, de FVIII y de FvW.

En este tipo de análisis, las variaciones encontradas entre ensayos son debidos a errores aleatorios (ya mencionados antes) y a errores fijos, que deben ser subdivididos en los distintos componentes que puedan afectar al ensayo.

La validez de este tipo de ensayos se estudia mediante análisis de varianza (ANOVA), donde la variación total se subdivide en una serie de componentes y, cada uno de ellos, se compara con el error residual, para saber si son o no son debidos al azar.

Los bioensayos realizados para los factores FVIII y FvW se llevan a cabo de acuerdo con las directrices que son emitidas por el EDQM, siendo la Ph. Eur. la que elabora guías para el diseño de los bioensayos que deben realizarse, así como para el análisis de los resultados obtenidos. Por este motivo, la validez de los bioensayos se realiza de acuerdo con el estudio ANOVA que indica la Ph. Eur. [Ph. Eur., 2014] [Collazo et al., 2010].

La primera condición para la validez de los ensayos es que se realicen con, al menos, tres diluciones.

El análisis de varianza desarrollado por la Ph. Eur. es apropiado para ensayos simétricos donde una o más preparaciones de muestras que quieren analizarse (T, U, etc.) son comparadas con el estándar (S).

El esquema del análisis queda descrito en la Tabla 5.

Tabla 5: Fórmulas para el análisis de líneas paralelas con **d** dosis para cada preparación

	Estándar (S)	1ª muestra (T)	2ª muestra (U)
Media de la respuesta de la dosis menor	S ₁	T ₁	U ₁
Media de la respuesta de la 2ª dosis	S ₂	T ₂	U ₂
.....
Media de la respuesta de la dosis mayor	S _d	T _d	U _d
Preparación total	P _S = S ₁ + S ₂ + ... + S _d	P _T = T ₁ + T ₂ + ... + T _d	P _U = 1U ₁ + U ₂ + ... + U _d
Contraste lineal	L _S = 1S ₁ + 2S ₂ + ... + dS _d - ½ (d+1)P _S	L _T = 1T ₁ + 2T ₂ + ... + dT _d - ½ (d+1)P _T	L _U =

Para poder calcular la suma de cuadrados y los grados de libertad para cada fuente de variación, descritos en la Tabla 8, debemos considerar 3 fórmulas adicionales (Tabla 6).

Tabla 6: Fórmulas adicionales

H _p = n/d	H _L = 12n/d ³ - d	K = n (P _S + P _T + ...)/hd
----------------------	---	--

Los cálculos de varianza realizados con las dosis y con las respuestas obtenidas:

$$S_{xx}(S) = \sum_{i=1}^{d_s} n_i \left(x_{Si} - \frac{x_S}{n} \right)^2$$

$$S_{xx}(T) = \sum_{i=1}^{d_T} m_i \left(x_{Ti} - \frac{x_T}{m} \right)^2$$

$$S_{xy}(S) = \sum_{i=1}^{d_S} n_i \left(x_{Si} - \frac{x_S}{n} \right) \left(\frac{y_{Si}}{n_1} - \frac{y_S}{n} \right)$$

$$S_{xy}(T) = \sum_{i=1}^{d_T} m_i (x_{Ti} - \frac{x_T}{m}) (\frac{y_{Ti}}{m_i} - \frac{y_T}{m})$$

permiten el posterior cálculo de la suma de cuadrados para obtener la variación total de las respuestas, causada por los distintos factores (Tabla 7).

Tabla 7: Fórmulas para calcular la suma de cuadrados y los grados de libertad

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados
Preparaciones	h - 1	$SS_{prep} = n(\frac{y_S}{n} - (\frac{y_S + y_T}{n+m}))^2 + m(\frac{y_T}{m} - \frac{y_S + y_T}{n+m})^2$
Regresión lineal	1	$SS_{reg} = \frac{(S_{xy}(S) + S_{xy}(T))^2}{S_{xx}(S) + S_{xx}(T)}$
No paralelismo	h - 1	$SS_{par} = \frac{(S_{xy}(S))^2}{S_{xx}(S)} + \frac{(S_{xy}(T))^2}{S_{xx}(T)} - \frac{(S_{xy}(S) + S_{xy}(T))^2}{S_{xx}(S) + S_{xx}(T)}$
No linealidad ^(*)	h (d - 2)	$SS_{lin}(estandar) = \sum_{i=1}^{d_S} n_i (\frac{y_{Si}}{n_i} - \frac{y_S}{n})^2 - \frac{(S_{xy}(S))^2}{S_{xx}(S)}$ $SS_{lin}(muestra) = \sum_{i=1}^{d_T} m_i (\frac{y_{Ti}}{m_i} - \frac{y_T}{m})^2 - \frac{(S_{xy}(T))^2}{S_{xx}(T)}$
Tratamientos	hd - 1	$SS_{treat} = SS_{prep} + SS_{reg} + SS_{par} + SS_{lin}$
Error residual	hd (n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
Total	\sum g.l.	$SS_{tot} = \sum_{i=1}^{n+m} (y_i - (\frac{y_S + y_T}{n+m}))^2$
^(*) No calculado en caso de que sean análisis de dos dosis		

Una vez definidos los valores de la suma de cuadrados, se calcula la media de cuadrados (o cuadrado medio), como se indica en la Tabla 8, dividiendo cada suma de cuadrados por el número de grados de libertad que le corresponda (ej.: $SS_{prep}/g.l._{prep}$).

El cuadrado medio obtenido para cada fuente de variación se expresa como una razón del error residual (F-ratio), dividiendo cada cuadrado medio por el cuadrado medio del error residual (ej.: MS_{prep}/MS_{res}).

Tabla 8. Análisis de ANOVA para factores de coagulación.

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (S.S.)	Cuadrado medio (M.S.)	F-ratio	Significación
Preparaciones	h-1	SS _{prep}	SS _{prep} /g.l.	MS _{prep} /MS _{res}	-
Regresión	1	SS _{reg}	SS _{reg} /g.l.	MS _{reg} /MS _{res}	0,01
No paralelismo	h-1	SS _{par}	SS _{par} /g.l.	MS _{par} /MS _{res}	0,05
No Linealidad	h (d-2)	SS _{lin}	SS _{lin} /g.l.	MS _{lin} /MS _{res}	0,05
Tratamientos	hd-1	SS _{treat}	SS _{treat} /g.l.	MS _{treat} /MS _{res}	-
Error Residual	hd (n-1)	SS _{res}	SS _{res} /g.l.	-	-
Total	\sum g.l.		-	-	-

n = Número total de respuestas; h= Número de preparaciones; d = Número de dosis.

Es importante conocer cómo afecta a la variabilidad total del ensayo cada una de las cinco fuentes de variación incluidas en el ANOVA:

- Preparaciones.

Es debida a las diferencias medias de las absorbancias de estándar y muestra. No deben existir diferencias significativas lo que indica una buena elección de las series de diluciones, junto con un F-ratio no significativo.

- Regresión.

Esta segunda fuente de variación es debida al cambio de absorbancia cuando cambia la concentración, bajo la hipótesis de que la relación dosis – respuesta es lineal y paralela para estándar y muestra. La F-ratio debe ser altamente significativa.

- No paralelismo.

La variación se debe a las diferencias en las pendientes de las rectas de regresión de ambas preparaciones. La F-ratio, por tanto, no debe ser significativa [Das et al, 2008] [Plikaytis et al, 1994].

- No linealidad.

Variación debida a las desviaciones de la linealidad. La F-ratio no debe ser significativa, al igual que en el caso del no paralelismo.

- Error residual.

Mide la variación que se aprecia entre los pares de replicados de muestra y estándar. La precisión de la estimación de la razón de potencias se valora a partir del error

debido al azar en las respuestas obtenidas y viene indicado por el valor del cuadrado medio del error residual en el análisis de ANOVA (MS_{res}) [Kirkwood et al, 1984].

Los valores obtenidos en F-ratio serán los que permitan conocer la validez de los ensayos.

Cuando la F-ratio toma el valor 1, la variación debida al cuadrado medio correspondiente es la misma que se esperaría si el resultado sólo se debiera al azar. Por lo tanto, la fuente de variación estudiada no tiene ningún peso en el ensayo. Por el contrario, cuando el valor de F es muy superior a 1, la fuente de variación con este resultado si tiene un peso significativo en el ensayo.

De acuerdo con los requerimientos de los ensayos de esta tesis, la fuente de variación debida a la regresión debe ser muy significativa y, por lo tanto, el valor de F será muy alto, indicando que la pendiente común de las dos rectas de regresión es mayor que 0.

Por el contrario, para las fuentes de variación de no paralelismo y no linealidad, el valor de F debe ser aproximadamente 1, puesto que no deben obtenerse resultados significativos para estas dos fuentes de variación. Concretamente para el no paralelismo, el valor de F indica si el modelo se ajusta mejor a una o a dos líneas de regresión. Si la relación es de no paralelismo, el análisis no es válido puesto que la potencia relativa dependería de la dosis [Curtis, 1984]. Por lo tanto, no podría calcularse la razón de potencia [Kirkwood et al, 1984]. En el caso de la no linealidad, el ensayo no es válido cuando el resultado de F es significativo pero, en este caso, sería posible hacer una transformación para eliminar la curvatura o cambiar el intervalo de las dosis y reanalizar los datos.

Si bien el valor obtenido para F-ratio nos da una idea de la validez o no del modelo aplicado al ensayo, es importante definir la significación estadística del F-ratio para cada una de las fuentes de variación. Para ello, hay que utilizar las tablas de distribución F de Snedecor.

En general, un ensayo no será válido cuando los valores de F-ratio para no paralelismo y no linealidad sean significativos al 5% [Kirkwood et al., 1980] [Curtis, 1984] [Finney, 1978].

Una vez verificada la validez del ensayo, se realiza la estimación de la potencia y de los límites de confianza [Beyene et al, 2005] [Volker, 2007] [Bland, 1996][Fieller, 1940] [Motulsky, 1995].

Para ello, conociendo el valor de la pendiente para los ensayos con d dosis (donde I es el logaritmo decimal de la relación de dosis):

$$b = \frac{H_L (L_S + L_T + \dots)}{I * n * h}$$

Y sabiendo el logaritmo de la razón de potencia de la preparación de la muestra es:

$$M'_T = \frac{P_T - P_S}{db}$$

La potencia calculada será un estimado de la potencia “real” de la preparación. Los límites de confianza se pueden calcular como el antilogaritmo de:

$$CM'_T \pm [(C - 1)(CM'^2_T + 2V)]^{1/2}, \text{ donde } C = \frac{SS_{reg}}{SS_{reg} - s^2 t^2} \quad \text{y } V = \frac{SS_{reg}}{b^2 dn}$$

El valor t se obtiene de las tablas de distribución de Student para $p = 0,05$ y grados de libertad correspondientes al error residual. La potencia estimada (R_T) y los límites de confianza correspondientes se calculan multiplicando por la potencia asumida al inicio del ensayo (A_T) los valores obtenidos, una vez tomados los antilogaritmos.

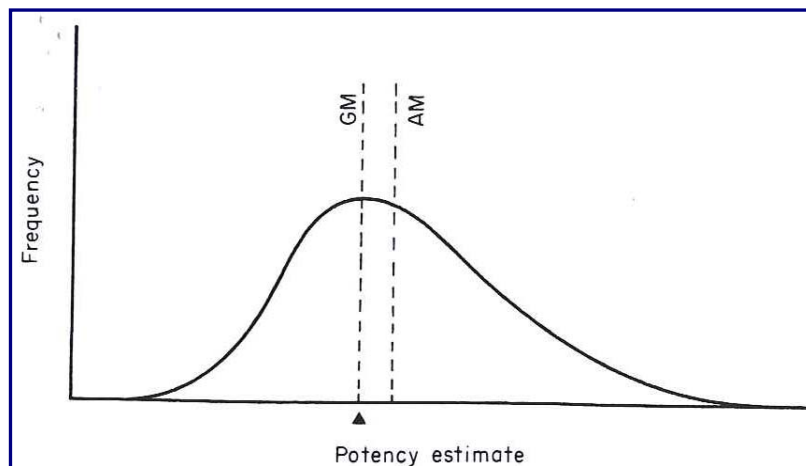
También debe calcularse la precisión de la estimación de la razón de potencia, que se obtiene del error aleatorio de los resultados, dado por el valor del cuadrado medio residual en el análisis de la varianza.

Por lo tanto, el cuadrado medio residual juega un doble papel en el ensayo: primero, para el cálculo de las F-ratio de las distintas fuentes de variación estudiadas y, segundo, para el cálculo de la precisión de la razón de potencia. Es un valor que no debe ser infra- o sobrevalorado: cuando se sobreestima este valor, disminuye la posibilidad de que el análisis se rechace convenientemente mientras que si se infra-valora, aumenta la probabilidad de que un ensayo robusto sea falsamente rechazado.

Cuando sea necesario realizar más de un ensayo para una misma muestra, se hará la combinación de potencias [Zuo Y, 2010] y el resultado final será una estimación

combinada y ponderada de las potencias individuales y no su promedio, por los motivos que se indican a continuación: en primer lugar, la estimación de los logaritmos de las potencias sigue una distribución log-normal (ver Figura 16), debido a que la media aritmética sobreestima la potencia real porque es muy sensible a los valores extremos de la distribución normal.

Por este motivo, es mejor estimación calcular la media geométrica de los estimados individuales, definida como el antilogaritmo del promedio de la razón de los logaritmos de las potencias individuales. La media geométrica no es tan sensible a los valores extremos de la distribución normal y, de este modo, siempre es menor que la media aritmética [Kirkwood et al, 1984], [Curtis, 1984] [Hirschberg et al., 2010].



GM: Geometric Mean; AM: Arithmetic Mean.

Figura 16. Log de la distribución normal para estimados repetidos de potencia de una única preparación. (Kirkwood et al, 1984)

En segundo lugar, las potencias individuales que se combinan pueden tener diferente precisión, siendo deseable que el valor combinado esté más sesgado hacia el valor más preciso. Mediante un ensayo de homogeneidad previo se asegura si la variación se explica adecuadamente por el error aleatorio dentro de cada ensayo. Una heterogeneidad significativa entre las potencias individuales evidencia una variabilidad entre ensayos que no ha sido tomada en cuenta.

Por ello, si no existe una diferencia significativa entre los valores individuales de las potencias, el valor real se calcula mediante la combinación ponderada, mientras que, si la diferencia entre potencias individuales es significativa, el valor real se calcula mediante la combinación semi-ponderada o no ponderada. Esta metodología está

incluida en los ensayos realizados en esta tesis [Kirkwood et al, 1980] [Barrowcliffe, 1987].

4.3 Software.

Existen distintos tipos de software comercializados para bioensayos. Las ventajas que presentan son: tiempos de desarrollo menores por la posibilidad de disponer de herramientas informáticas y librerías; fácilmente auditables; eficientes; se acomodan a las necesidades de cada bioensayo en particular; tienen aplicaciones específicas y se dispone de gran cantidad de publicaciones que permiten conocer su utilización con facilidad.

Los siguientes software que se encuentran actualmente en el mercado y más utilizados son:

- UNISTAT Statistics Software.
Utiliza EXCEL[®] como soporte estadístico. Ofrece el desarrollo de análisis de bioensayos; en concreto, para los métodos de líneas paralelas, de razón de pendientes, de respuesta cuantal así como combinación de ensayos. Dentro del método de líneas paralelas, los datos se analizan de acuerdo a los requerimientos de la Eur. Ph. Para realizar la comprobación de la validez de los bioensayos dispone de varias opciones de análisis de varianza.
- GEN5 data analysis software. BioTeK.
Realiza el cálculo de la potencia relativa y el análisis de líneas paralelas, incluso en sistemas biológicos complejos, donde no puede realizarse la determinación directa de la potencia.
- PLA 2.1. Stegmann Systems.
En el análisis de líneas paralelas realiza también ANOVA así como el cálculo y la combinación de potencias. Cumple con los requerimientos de la USP (<1032>, <1033> y <1034>) y de Ph. Eur. (capítulo 5.3).
- Cambridge Soft BioAssay. Para el estudio de datos químicos y biológicos. Utiliza las plantillas de la hoja de cálculo EXCEL[®] y sólo disponible en la plataforma WINDOWS.

- Bioassay Enterprise 11.0 de Perkin Elmer. Para el análisis de datos biológicos, incluyendo análisis estadístico de los datos y validación de los ensayos.

Los software utilizados en esta tesis son: Combistats[®], hoja de cálculo Excel[®] y programación en lenguaje R.

4.3.1. CombiStats[®].

Combistats[®] es un programa informático, elaborado y distribuido por EDQM, para el cálculo estadístico de los datos obtenidos en los ensayos biológicos realizados mediante diluciones. Incluye el análisis del modelo de líneas paralelas, de razón de pendientes, probit, determinación de la ED₅₀, etc.

Una vez instalado este software, su utilización es sencilla mediante la creación de plantillas de trabajo para la entrada de datos y la realización de cálculos y posterior combinación de resultados.

Una plantilla de trabajo es una hoja estándar con la extensión *.epm, donde se definen las características de cada ensayo. En la Figura 17 se define el tamaño de las tablas (a), se muestra la entrada de datos que permite incluir características de información relacionada con la muestra (b), la elección del modelo (c) y el diseño elegido (d).

En la Figura 18 se define la dosis (e), la transformación (f), la varianza elegida (g) y el ANOVA (h).

De todos los modelos posibles en este software (líneas paralelas, razón de pendientes, curvas sigmoidales, etc.), en esta tesis se utiliza el modelo de líneas paralelas, en el que se asume que la respuesta y depende de la dosis x , de acuerdo a la relación $f(y) = c_i + b \log_e(x) + \varepsilon$, donde f es cualquier tipo de transformación, c es el valor de la ordenada en el origen de la preparación i , b es la pendiente de la recta y ε es el error estadístico asociado a $f(y)$. Como se desconoce la dosis exacta de la muestra, normalmente los valores de c no coinciden. La distancia horizontal entre las líneas paralelas obtenidas corresponde a la corrección aplicada a la potencia “asumida” con el fin de obtener un estimado de la potencia “verdadera”. En función del modelo, se puede elegir entre distintas transformaciones. Por defecto, aparecerá siempre la opción de “no transformación” ($y' = y$).

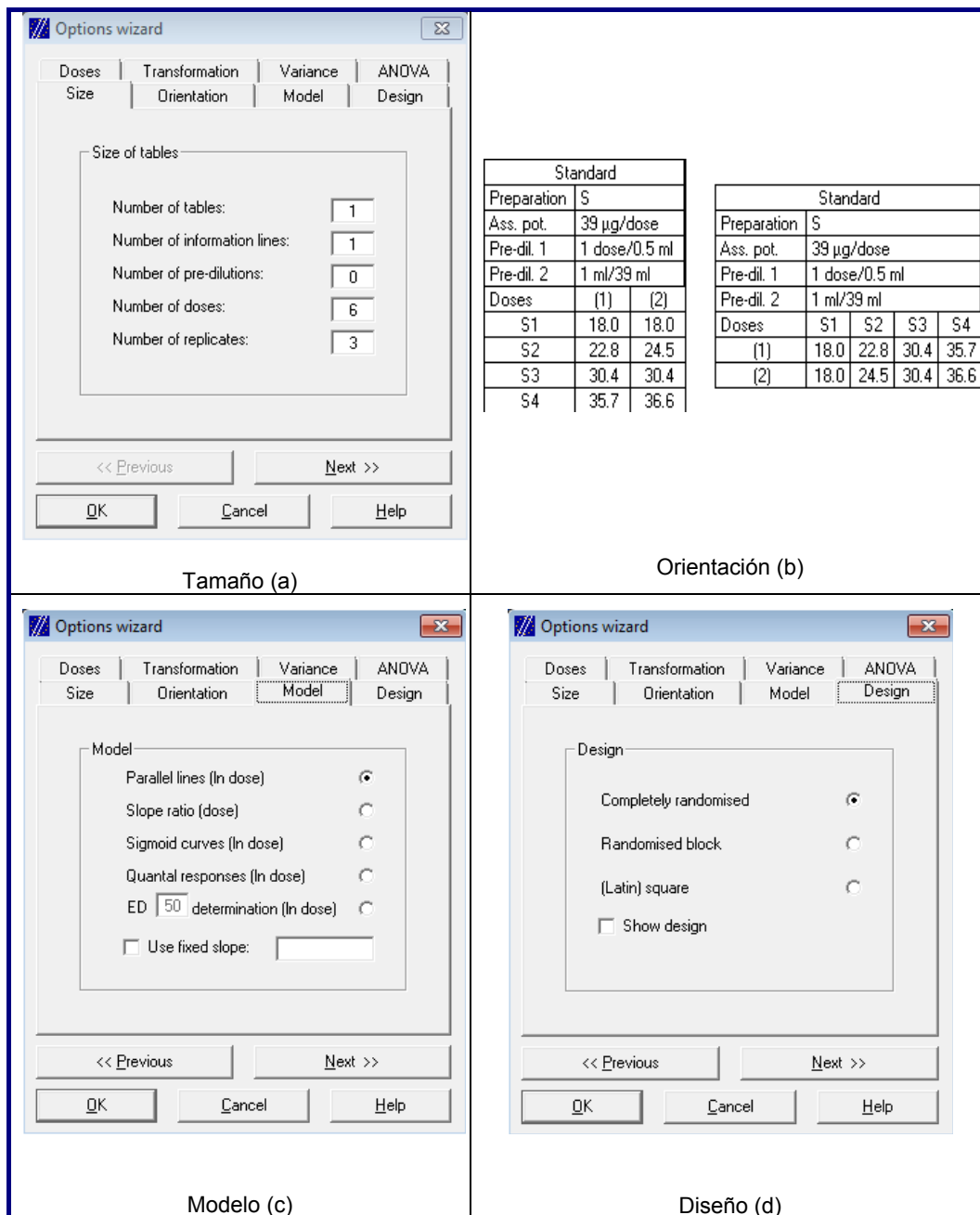


Figura 17. Creación de una plantilla de trabajo (I). Tamaño(a), orientación (b), modelo (c) y diseño (d).

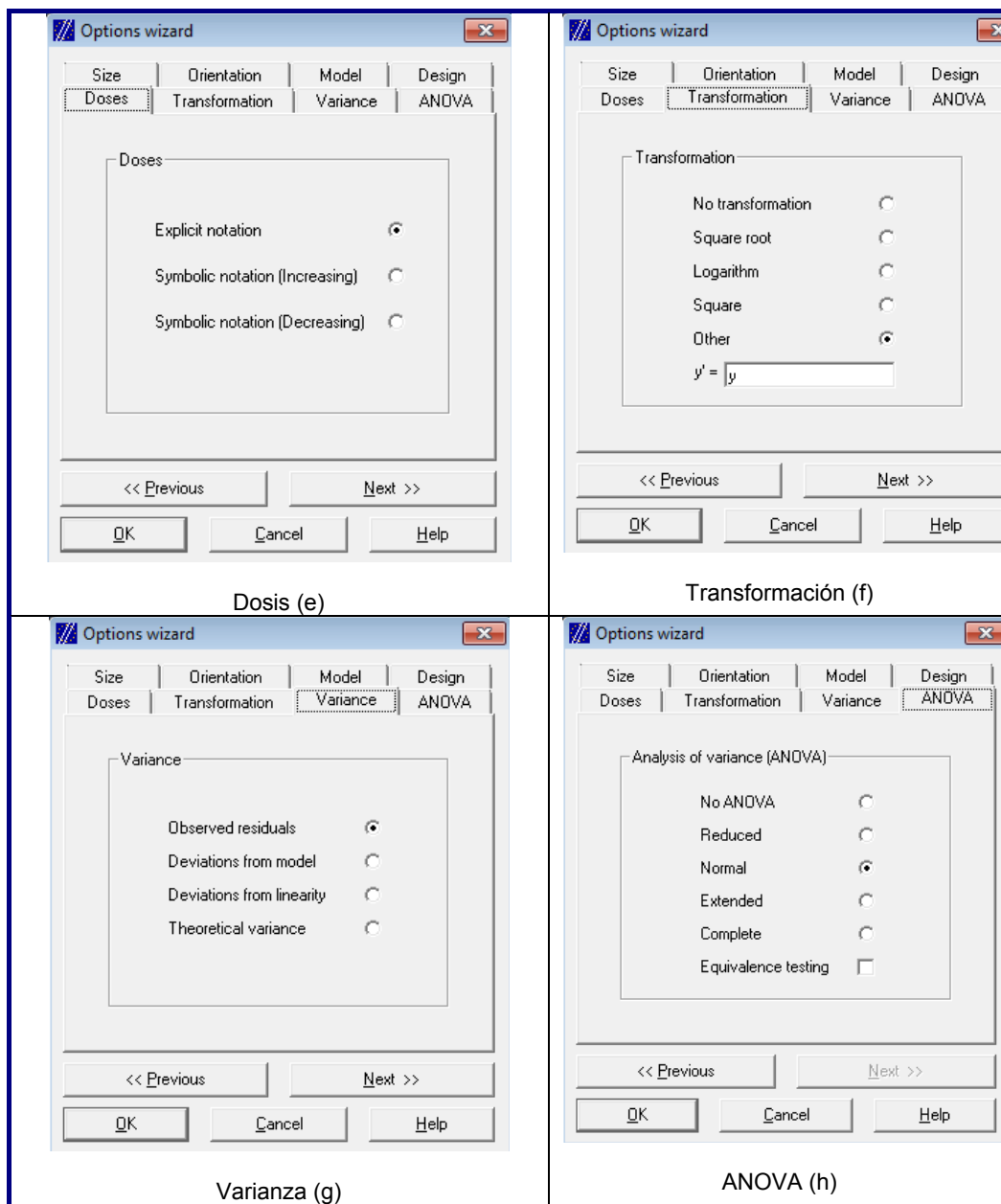


Figura 18: Creación de una plantilla de trabajo (II). Dosis (e), transformación (f), varianza (g) y ANOVA (h).

Para el análisis de varianza aparece por defecto “ANOVA normal” pero existen otras posibilidades:

- No ANOVA: cuando no es necesario verificar la validez del modelo. Si el ensayo es de una única dosis, se selecciona esta opción para evitar la confusión con el test de Wilcoxon-Mann-Whitney.
- ANOVA reducido: la suma total de cuadrados se subdivide en sólo tres fuentes de variación correspondiente a la variación explicada por el modelo (altamente

significativa), la variación debida a las desviaciones del modelo (no deberían ser significativas) y el error residual.

- ANOVA normal: para verificar los parámetros estadísticos normales, como es el caso de la regresión, el no paralelismo y la no linealidad.
- ANOVA extendido: esta opción permite verificar la curvatura cuadrática y la falta de ajuste cuadrático.
- ANOVA completo: además del ANOVA extendido, también permite visualizar los parámetros estadísticos del ANOVA reducido.

Una vez definidas las características del ensayo en la plantilla de trabajo, se introducen los datos obtenidos, se realizan los cálculos necesarios y el análisis ANOVA. En este último caso, las probabilidades (p -valores) son señaladas con estrellas para indicar el nivel de significación:

- (*) Probabilidad inferior a 0'05 (significativa).
- (**) Probabilidad inferior a 0'01 (muy significativa)
- (***) Probabilidad inferior a 0'001 (más significativa).

La validez dependerá de los requerimientos concretos para el tipo de ensayo y puede implicar otros niveles de significación.

En el caso concreto del modelo de líneas paralelas, los criterios de validez son:

- ✓ El p -valor para el contraste de regresión es significativo (al menos, una estrella). Si no se cumple, no es posible calcular los límites de confianza. En la mayoría de los ensayos aparecen 2 ó 3 estrellas para la regresión. Con probabilidad inferior a 0'05, el criterio cumple pero los límites de confianza son normalmente demasiado amplios para que puedan ser aceptados.
- ✓ El p -valor de los blancos no es significativo. Este criterio sólo se aplica cuando se han incluido en el análisis blancos o dosis cero.
- ✓ El p -valor para no paralelismo no es significativo.
- ✓ El p -valor para no linealidad no es significativo.

También se incluye la representación gráfica de los resultados obtenidos para el estándar y las muestras.

Si un análisis cumple los criterios de validez, se calcula la potencia “estimada”, que se expresa en las mismas unidades que la potencia “asumida”. También se considera los

resultados de los límites de confianza al 95%. Las potencias y los límites de confianza se expresan como un porcentaje de la potencia “asumida” y de la potencia “estimada”.

En los análisis que se llevan a cabo para el FVIII y el FvW se combinan las distintas potencias de dos análisis independientes, obteniendo un único resultado para la estimación de la potencia del lote estudiado.

Se obtienen tres posibles resultados, eligiendo el más adecuado en función del valor del p -valor obtenido:

- Si el p -valor es mayor de 0'1, los intervalos de confianza son suficientemente homogéneos para utilizar una combinación ponderada (Figura 19: weighted combination).
- Si el p -valor es inferior de 0'1, los intervalos de confianza tienden a ser heterogéneos y es más conveniente utilizar la combinación semi-ponderada (Figura 19: semi-weighted combination).
- Sólo en el caso de, al menos diez ensayos, se considera la opción no ponderada (Figura 19: unweighted combination).

También aparece en la hoja de cálculo la representación gráfica de los intervalos de confianza de los ensayos implicados en la combinación.

En la Figura 19 se muestra un hoja de cálculo para la combinación de dos ensayos de FVIII.

4.3.2. Hoja de cálculo Excel®.

Excel® es una aplicación de Microsoft que permite hacer hojas de cálculo. Con este software se elaboran tablas y formatos que incluyen cálculos matemáticos utilizando fórmulas. Las fórmulas se desarrollan mediante operadores o funciones matemáticas. Toda la información generada puede, además, gestionarse, agrupándose, filtrándose, etc. Se ha realizado un estudio comparativo de los cálculos de potencia que evalúa el programa anteriormente citado con la hoja de cálculo Excel®.

Se realiza la transformación logarítmica de los resultados de absorbancia para estándar (patrón) y muestra (Figura 20), se calculan las medias de cada dilución y la suma total de cuadrados. A continuación, se implementan el conjunto de fórmulas matemáticas, definidas en Ph. Eur., [Ph. Eur., 2014] para la realización del ANOVA. La Figura 21 corresponde a la entrada de datos y a las sumas de cuadrados debidas a las fuentes de variación así como la suma de cuadrados total. En la Figura 22 se presenta los grados de

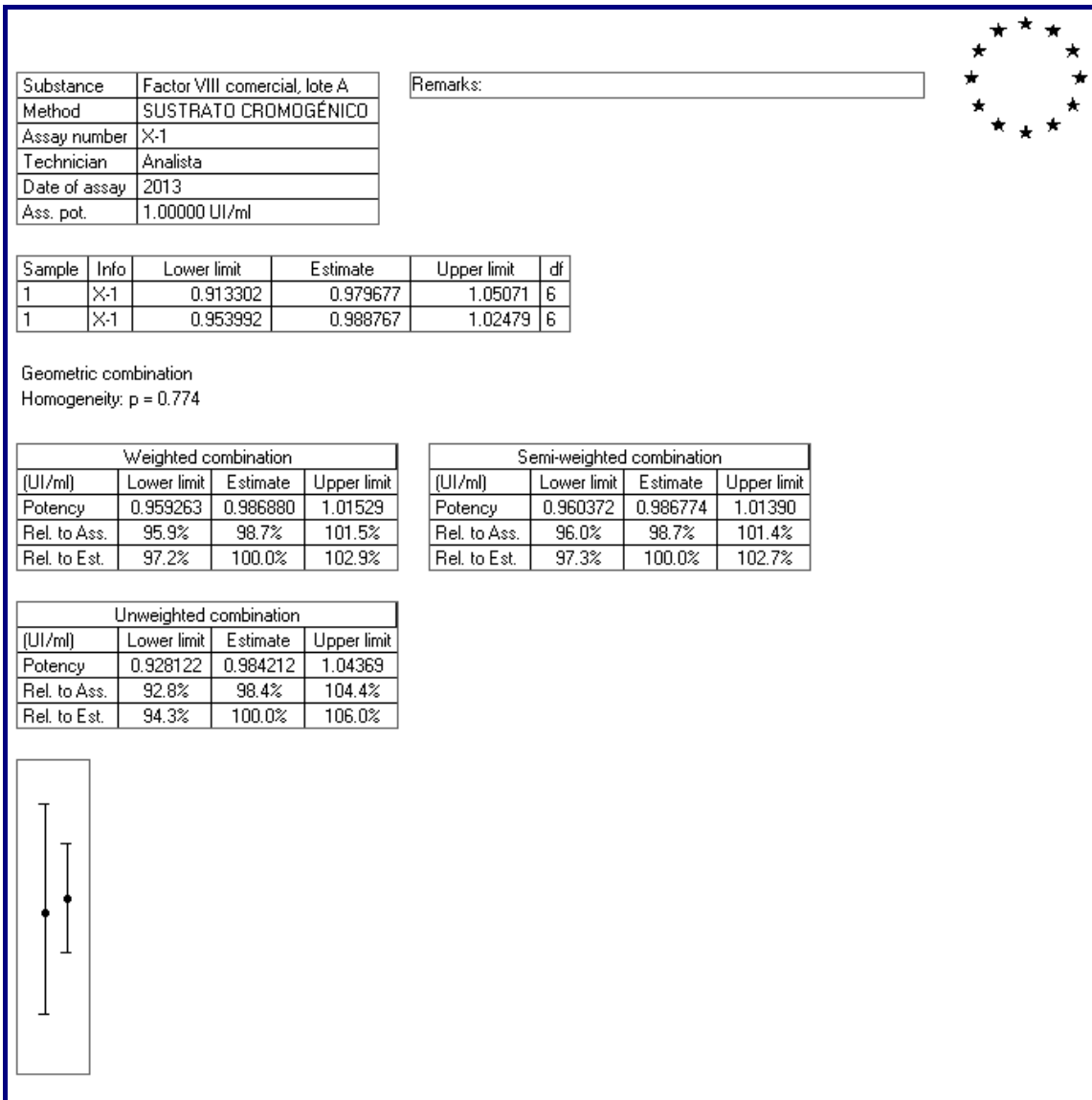


Figura 19. Hoja de combinación de dos potencias.

libertad correspondientes a cada una de las fuentes de variación así como la suma de cuadrados, los cuadrados medios, el valor de la F de Snedecor asignada a cada fuente de variación y su correspondiente p -valor. En la Figura 23 se presentan las fórmulas para el cálculo de la potencia y sus respectivos límites de confianza. El procedimiento de cálculo es similar en ambos bioensayos aunque los resultados de absorbancias en el análisis de FvW no necesitan una transformación logarítmica de la respuesta.

Las estimaciones de potencia del mismo ensayo, cuando se realiza con Excel[®] o con el método descrito en Ph. Eur. (ver 5.2.4.2. y 5.3.4.2. *Análisis con Excel[®]*) son iguales.

	A	B	C	D	E	F	G	H
5			Patrón		Preparación T			
6		S1	S2	S3	T1	T2	T3	
7	Lecturas de absorbancias	s11	s21	s31	t11	t21	t31	
8		s12	s22	s32	t12	t22	t32	
9	Log(y)	=LOG(B7)	=LOG(C7)	=LOG(D7)	=LOG(E7)	=LOG(F7)	=LOG(G7)	
10		=LOG(B8)	=LOG(C8)	=LOG(D8)	=LOG(E8)	=LOG(F8)	=LOG(G8)	
11	Media	=PROMEDIO(B9:B10)	=PROMEDIO(C9:C10)	=PROMEDIO(D9:D10)	=PROMEDIO(E9:E10)	=PROMEDIO(F9:F10)	=PROMEDIO(G9:G10)	
12	(Y-Ymedia) ²	=REDONDEAR((B9-\$B\$11)^2;5)	=REDONDEAR((C9-\$C\$11)^2;5)	=REDONDEAR((D9-\$D\$11)^2;5)	=REDONDEAR((E9-\$E\$11)^2;5)	=REDONDEAR((F9-\$F\$11)^2;5)	=REDONDEAR((G9-\$G\$11)^2;5)	Suma ((Y-Ymedia) ²)
13		=REDONDEAR((B10-\$B\$11)^2;5)	=REDONDEAR((C10-\$C\$11)^2;5)	=REDONDEAR((D10-\$D\$11)^2;5)	=REDONDEAR((E10-\$E\$11)^2;5)	=REDONDEAR((F10-\$F\$11)^2;5)	=REDONDEAR((G10-\$G\$11)^2;5)	=SUMA(B12:G13)

Figura 20. Resultados de absorbancias, transformación logarítmica, media y diferencias al cuadrado

	A	B	C	D
14			Patrón S	Preparación T
15	Ps P _T : Suma total de la preparación S1+S2+.. Sd		=SUMA(B11:D11)	=SUMA(E11:G11)
16	Ls: Contraste lineal '1*S1+2*S2+3*S3+...-1/2		=1*B11+2*C11+3*D11- 1/2*(C17+1)*C15	=1*E11+2*F11+3*G11- 1/2*(C17+1)*D15
17	d: No de diluciones diferentes		3	
18	n: n° de replicados por dilución		2	
19	h: donde h= refer+N° muestras= total preparaciones		2	
20	H _p	n/d	=C18/C17	
21	H _L	12*n/(d ³ -d)	=12*C18/(C17 ³ -C17)	
22	K	n(Ps+Pt+...) ² /hd	=C18*(C15+D15) ² /(C19*C17)	
23	SSprep	H _p (Ps ² +Pt ² +...)-K	=C20*(C15 ² +D15 ²)-C22	
24	SSreg	1/h*H _L *(Ls+Lt+...) ²	=1/C19*C21*(C16+D16) ²	
25	SSpar	H _L *(Ls ² +Lt ² +...)-SSreg	=C21*(C16 ² +D16 ²)-C24	
26	SSLin	SSstrat-SSprep-SSreg-SSpar	=C27-C23-C24-C25	
27	SSstrat	n*(S ₁ ² +...+S _d ² +T ₁ ² +...+T _d ² +U ₁ ² ...)-K	=C18*C30-C22	
28	SSres	SStot-SSstrat	=C29-C27	
29	SStot	Suma((y-Ymed) ²)	=H13	
30		Suma de medias al cuadrado	=B11 ² +C11 ² +D11 ² + E11 ² +F11 ² +G11 ²	

Figura 21. Fórmulas matemáticas para el cálculo de ANOVA.

	A	B	C	D	E	F	G
31	Fuente de variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad (<i>p</i> -valor)
32	Preparaciones (h-1)		=C19-1	=C23	=D32/C32	=E32/E\$37	=DISTR.F(F32;C32;C\$37)
33	Regresión (1)		1	=C24	=D33/C33	=E33/E37	=DISTR.F(F33;C33;C\$37)
34	No paralelismo (h-1)		=C19-1	=C25	=D34/C34	=E34/E\$37	=DISTR.F(F34;C34;C\$37)
35	No linealidad	Gl= h(d-2)	=C19*(C17-2)	=C26	=D35/C35	=E35/E\$37	=DISTR.F(F35;C35;C\$37)
36	Tratamientos	hd-1	=C19*C17-1	=C27	=D36/C36	=E36/E\$37	=DISTR.F(F36;C36;C\$37)
37	Error residual	aleatorizado	=C19*C17*(C18-1)	=C29	=D37/C37		
38	Total		=(C\$19*C\$17*C\$18-1)	=D37+D36			

Figura 22. ANOVA del modelo de rectas paralelas.

	A	B	C	D	E
40	Diluciones o dosis en UI/ml	0.005	0.0025	0.00125	
41	Razón de diluciones o dosis	=B40/C40			
42	Pendiente $b = HL(Ls+Lt+...)/I * n * h$	=C21*(C16+D16)/(B43*C18*C19)			
43	I es ln de la relación de dosis	=LN(B41)			
44	$M_T = P_T - P_S / d * b$	=(D15-C15)/(B42*C17)			
45	$C = SS_{reg} / (SS_{reg} - s^2 t^2)$	=C24/(C24-B47*B46^2)			
46	= "t student para p=0,05 gl= " & C37	=DISTR.T.INV(0.05;C37)			
47	s es el error residual medio	=E37			
48	$V = SS_{reg} / b^2 * n * d$	=C24/(B42^2*C18*C17)			
49					
50	Ln de los Límites de confianza				
51	$C * M_T \pm (C - 1 * (C * M_T + 2V))^{0,5}$	=B45*B44	±	=((B45-1)*(B45*B44^2+2*B48))^{0.5}	
52	Tomando antilogaritmos, la razón de potencias será				
53			=EXP(B51-D51)	=EXP(B51)	=EXP(B51+D51)
54	Potencia Muestra	=1/E53	=1/D53	=1/C53	UI/mL
55	Relativo al estimado	=B54/C54*100	=C54/C54*100	=D54/C54*100	%

Figura 23. Cálculo de potencia y límites de confianza.

4.3.3. Software estadístico R.

Creado por R. Ihaka y R. Gentleman, es un sistema que permite el análisis estadístico y los gráficos y que tiene una doble naturaleza al tratarse de un software y también de un lenguaje de programación. Es gratuito y puede instalarse en un sistema operativo tipo Windows. Una de sus grandes ventajas es que, actualmente, numerosas personas colaboran en su desarrollo.

En este apartado se estudia de nuevo el tratamiento matemático aplicado que nos permite conocer la validez del resultado obtenido y su incertidumbre asociada en forma de intervalo de confianza, utilizando el software R [R Core Team, 2013].

Los resultados obtenidos con el software R son similares a los obtenidos con el método descrito en Ph. Eur., (ver 5.2.4.3. y 5.3.4.3. *Análisis con R*). En la Figura 24 se muestra el análisis de varianza realizado con los dos procedimientos.

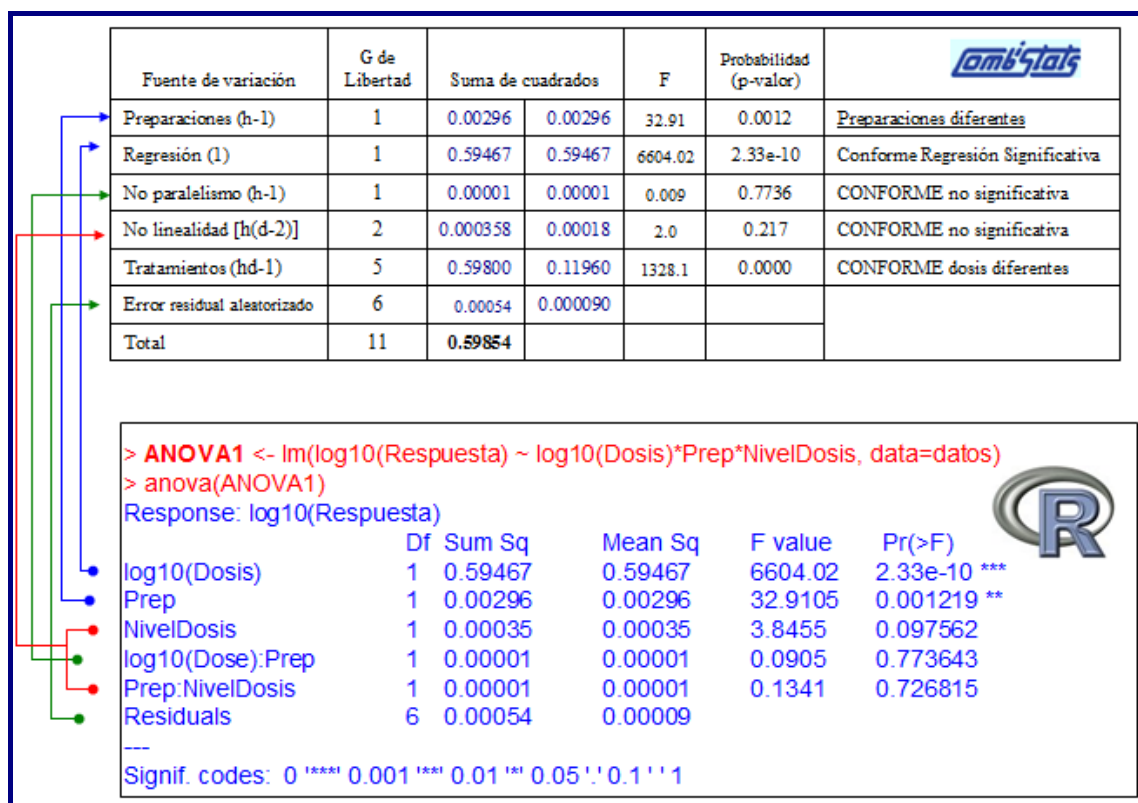


Figura 24. Comparación de resultados de Ph. Eur. y R.

Una vez introducidos los datos, se realizan posteriormente, los análisis de regresión, ANOVA y se muestra el gráfico para las líneas paralelas obtenidas, utilizando los *scripts* recogidos en la Figura 25. El cálculo de potencia se realiza utilizando un archivo

de órdenes definido a continuación (Figura 26), basado en el paquete *mratio*s [Djira, 2012].

```
#####
# Lectura de datos (Script 1)
#####

setwd("i:\\MVCL2013\\ejemp FVIII\\R") #Define directorio de trabajo

datpl <- read.table("FVIII-001036-1.txt", header=TRUE) #Carga fichero de datos
datpl # Muestra los datos: 12 líneas con 3 columnas

#####
# Regresión (Script 2)
#####

#two lines one for every Treat with the same slope
Resul t_3 <- lm(log10(Response) ~ log10(Dose)+Treat, data=datpl) #Regresión Y=
s+t+b*X
summary(Resul t_3) #resumen de resultados la o de t es la suma con la de s
res3<-summary(Resul t_3)

#####
# Análisis de varianza extendido (Script 3)
#####

datpl$Serie <- gl(2, 6, 12, labels=c("a", "b"))
#Incluye nueva columna en los datos para distinguir por serie.
datpl$doslevel <- c("A", "B", "C", "A", "B", "C", "A", "B", "C", "A", "B", "C")
#Incluye nueva columna para clasificar por diluciones

#Define el anova para la regresión considerando los factores tratamiento S y T
# y el nivel de concentración doslevel.
ANOVA2 <- lm(log10(Response) ~ log10(Dose)*Treat*doslevel, data=datpl)
anova(ANOVA2) #Muestra la tabla ANOVA

#####
# Gráfico (Script 4)
#####

plot(log10(Response) ~ log10(Dose),
data=datpl[datpl$Treat=="S", ], col="green", ylim=c(-0.5, 0.15))
lines(log10(Response) ~ log10(Dose),
data=datpl[datpl$Treat=="T", ], col="blue", type="p")
abline(coef(res3)[1, 1], coef(res3)[2, 1], lty=2, col="green")
abline(coef(res3)[1, 1]+coef(res3)[3, 1], coef(res3)[2, 1], lty=2, col="Blue")
```

Figura 25. Archivo de órdenes para la entrada de datos, análisis de regresión, varianza y gráfico.

El cálculo de cocientes entre parámetros estimados así como sus límites de confianza se obtienen utilizando la función *mratio*s del software R. Esta función es de aplicación general específicamente en medicina, para determinar el efecto de diferentes tratamientos en terapias con fármacos y en farmacia, para ver el efecto de diferentes dosis en estudios farmacocinéticos.

En *mratio*s se distinguen las siguientes funciones:

- *t.test.ratio*: compara varios tratamientos para saber cual puede ser superior o si son diferentes.

- `sci.ratio.gen`: estima cocientes entre los parámetros del modelo lineal general múltiple.
- `contrMatRatio`: crea las matrices de contraste de numerador y denominador, necesarias para otras funciones. Es aplicable a modelos más complejos.
- `gsci.ratio`: es la función más básica para modelo lineal simple como el de dos tratamientos. En la estimación de los intervalos de confianza simultáneos (el parámetro `adjusted=TRUE`) utiliza el método plug-in [Djira, 2010], basado en filtrar las estimaciones de probabilidad máximas obtenidas en la matriz correlacionada de cocientes usada para calcular los cuantiles de una distribución multivariante t o normal. Los comentarios sobre cada una de las funciones se inician con el carácter “#”.

```

1  library(mratios) # Cargar paquete mratios (Version 1.3.17)
2  setwd("P:\\MVCL2013\\ejemp fVIII\\R") # Elegir directorio de trabajo
3  # Cargar datos
4  dat<- read.table("Relative_potency_mratios_combistat.txt", header=TRUE)
5
6  # El objetivo es estimar la potencia relativa
7  # por ejemplo, la potencia será: (OrdenadaT - ordenadaS)/pendiente
8
9  datp1=dat[dat$Ensayo==1,] # Del conjunto de datos se eligen sólo los del ensayo 1
10
11 # El modelo corresponde a distintas ordenadas con una misma pendiente
12 # para estimar directamente las dos ordenadas se utiliza la expresión Preparacion-1
13 # Modelo de ajuste lineal, los valores de absorbancia se transforman con log
14 fitp11 <- lm(log10(Respuesta) ~ Preparacion-1 + Conc, data=datp1)
15 summary(fitp11)
16
17 # Los parámetros estimados para aplicar mratios son: la matriz de covarianza y
18 # los grados de libertad de los residuales que pueden extraerse del modelo ajustado:
19 coef(fitp11); vcov(fitp11); fitp11$df.residual
20
21 # En esta parametrización, los coeficientes 1 y 2 son las ordenadas de S y T
22 # y el coeficiente 3 es la pendiente común
23 numc <- matrix(c(-1, 1, 0) , nrow=1) # La diferencia de ordenadas, en el numerador
24 denc <- matrix(c(0, 0, 1) , nrow=1) # La pendiente común, en el denominador
25
26 #El cálculo de la potencia y los intervalos de confianza se obtienen mediante
27 #esta expresión:
28 CI1 <- gsci.ratio(est=coef(fitp11), vcmat=vcov(fitp11),
29                 degfree=fitp11$df.residual,
30                 Num.Contrast=numc, Den.Contrast=denc,
31                 adjusted=TRUE,
32                 conf.level = 0.975)) #two.sided --> 0.95 is for one side
33
34 CI1 #muestra los resultados obtenidos
35 plot(CI1) #presenta un gráfico con el intervalo de confianza
36
37 # Una vez obtenidos los antilogaritmos, tendremos:
38 # la potencia estimada; límite inferior; límite superior
39 10^CI1$estimate ; 10^CI1$conf.int[1,1]; 10^CI1$conf.int[1,2]

```

Figura 26. Archivo de órdenes para el cálculo de potencias.

Para la aplicación de *mratios* al estudio de rectas paralelas se utiliza la función `lm` del software R, que realiza estudios de regresión. Se incluye la variable “preparación” que

puede tener valores S (estándar) o T (muestra) a partir de los que se obtienen los coeficientes de ajuste del modelo lineal, $\text{coef}(\text{modelo})$, la matriz de covarianza del modelo, $\text{vcov}(\text{modelo})$ y el número de grados de libertad para los residuales en el modelo. *mratios* utiliza estos valores generados por *lm* y aplica los cálculos del cociente mediante la definición de dos matrices: la matriz del numerador corresponde, en nuestro caso, a (-1,1,0), donde el primer coeficiente de $\text{coef}(\text{modelo})$ corresponde a la ordenada en el origen en la recta de la preparación estándar, con signo negativo; el segundo coeficiente corresponde a la ordenada de la recta de la preparación T, con signo positivo y el tercer coeficiente corresponde a la pendiente común, que no está en el numerador y sí en la matriz que representa al denominador (0,0,1). El nivel de confianza utilizado,

```
### replicando para todos los i ensayos.
Num_ensayos=length(dat[,2])/12 #cada ensayo consta de 12 filas
I <- numeric();E<-numeric();S<-numeric() #inicia las variables para la tabla
for (i in 1:Num_ensayos ) {
  datp1=dat[dat$Ensayo==i,] #cada Ensayo está numerado
  Fit <- lm(log10(Respuesta) ~ Preparacion-1 + Conc, data=datp1)
  CI<- gsci.ratio(est=coef(Fit), vcmat=vcov(Fit),
                 degfree=Fit$df.residual,
                 Num.Contrast=numc, Den.Contrast=denc, #definidos anteriormente
                 adjusted=TRUE,
                 conf.level = 0.975) #two.sided --> 0.95 es para una cola

  I<-c(I, 10^unname(CI$conf.int[1,1]))
  E<-c(E,10^CI$estimate)
  S<-c(S,10^unname(CI$conf.int[1,2]))
}
Resultados<-data.frame(I,E,S) #construye la tabla con el estimado y límites
names(Resultados)<-c("Inf","Estimado","Sup") #nombres de las columnas
Resultados # muestra la tabla con los resultados para cada uno de los n ensayos
```

Figura 27: Archivo de órdenes aplicable a *i* ensayos.

95% para dos colas, se expresa con $\text{f.level}=0.975$.

Con el propósito de comparar los cálculos obtenidos con diferentes software se realizaron también los análisis sobre un conjunto de 10 ensayos independientes.

Para tratarlos con *mratios* de R, se utilizó el formato de datos consistente en un conjunto de 12 filas por ensayo, con las 4 variables. Con este fin, se utilizó el script incluido en la Figura 27, consistente en aplicar un bucle “*for*” sobre los ensayos.

4.4. Validación de métodos.

La validación de un bioensayo es un procedimiento empleado para demostrar que un método analítico, utilizado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica, es fiable y reproducible para el uso previsto [ICH, 1995].

En esta tesis se han realizado validaciones para el ensayo de actividad del FVIII y del FvW en medicamentos. Los parámetros que se han estudiados han sido los siguientes:

4.4.1. Especificidad.

Se define como la capacidad para evaluar el analito de manera inequívoca en presencia de otros componentes presentes en la matriz estudiada.

Para ello, pueden analizarse los distintos componentes presentes en la matriz del producto terminado, como excipientes, para estudiar si se produce una respuesta similar a la obtenida con el analito.

4.4.2. Exactitud.

Expresa la proximidad existente entre el valor que se considera verdadero (valor de referencia aceptado) y el valor encontrado en el análisis.

Este parámetro se puede estudiar utilizando varios métodos:

4.4.2.1. Partiendo de la matriz del producto pero sin el analito, se añaden concentraciones conocidas del estándar de referencia, se lleva a cabo el ensayo aplicando las siguientes fórmulas para expresar el resultado obtenido:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Valor referencia} - \text{Valor obtenido}}{\text{Valor referencia}} \times 100$$

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \times 100$$

4.4.2.2. Si no fuese posible disponer de una matriz adecuada, se puede estudiar este parámetro mediante la comparación del procedimiento analítico frente a otro procedimiento perfectamente documentado y ya validado.

4.4.3. Precisión.

Indica la proximidad entre una serie de valores obtenidos del análisis de una misma muestra homogénea, en las condiciones deseadas. Se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de los valores obtenidos.

Se considera la precisión en dos niveles:

4.4.3.1. Repetibilidad.

Se refiere a los estudios de precisión realizados en las mismas condiciones de ensayo y en un corto periodo de tiempo. Se denomina también precisión intra-ensayo.

4.4.3.2. Precisión intermedia.

Estudia las variaciones que se producen si varía alguna de las condiciones del ensayo, diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

4.4.4. Linealidad.

La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad (dentro de un rango dado) del procedimiento para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad de analito que hay en la muestra.

4.4.5. Rango.

Es el intervalo existente entre la concentración mayor y menor del analito (incluidas ambas) para el que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad.

4.5. Gráficos de control.

En los ensayos rutinarios, el manual Combistats[®] recomienda estudiar y comparar, en los ensayos rutinarios, el error residual con los datos históricos [Daas, 2013]. Para ello, deben hacerse gráficos de control de los errores residuales obtenidos en el ANOVA para los distintos ensayos a lo largo del tiempo. De acuerdo con la carta de control obtenida para individuales, un error residual excepcionalmente alto podría indicar que existe un problema en la aplicación puntual del ensayo; en este caso, el análisis debería rechazarse incluso aunque se cumplan los requerimientos del mismo ya que la no significación de la varianza entre las preparaciones problema y referencia o la de no paralelismo puede ser debida a la anomalía consistente en un elevado error residual con el que se compara en el test de Fischer. Por el contrario, un error residual

excepcionalmente bajo puede aparecer esporádicamente en los ensayos rutinarios y dará lugar a p -valores significativos para algún factor, no siendo debido a la alta varianza del factor en si mismo, sino mas bien al inusualmente pequeño valor del residual con el que se compara. En estos casos, podría estar justificado reemplazarlo por el “error residual observado”, calculado como el promedio de los errores residuales obtenidos de los datos históricos.

En su aplicación a los laboratorios de control, los datos incluidos en el gráfico pueden provenir de una substancia de referencia o de una muestra y se monitorizan a lo largo del tiempo para, con su análisis, determinar si el ensayo genera resultados y/o variabilidad que están en una situación controlada mediante el establecimiento de límites de tolerancia, inferior y superior, que pueden ser calculados con los límites de aceptación fijados por la normativa regulatoria para el ensayo [Montgomery, 2009]. Los datos, tanto de la muestra como del estándar, deben seguir una distribución normal. Si se encuentran dentro del área delimitada por los límites de control establecidos, puede afirmarse que el ensayo funciona adecuadamente.

Los modelos para gráficos de control individuales más utilizados son:

- Gráficos para mediciones o por “variables”, que se utilizan cuando se dispone de datos que miden una característica.
- Gráficos para datos del tipo pasa-no pasa o por “atributos”, donde se utilizan los gráficos de porcentaje defectuoso o gráficos p .

Para los análisis de actividad de FVIII y de FvW, los gráficos de control utilizados son gráficos para variables y nos referiremos únicamente a éstos.

En los gráficos de control por variables se utilizan las dos características más importantes de una distribución de frecuencias; es decir, la media de los datos como medida de tendencia central y el rango o la desviación estándar como medida de dispersión.

Se utilizan límites de tolerancia de ± 3 -sigma ya que, si las distribuciones son normales, con estos límites se encuentran dentro del intervalo el 99'9% de los datos. Por lo tanto, previamente a la realización del gráfico, se comprueba que los datos cumplen una distribución normal o, en su defecto, hay que transformar la distribución para “normalizarla”.

El estudio mediante gráficos de control se realiza en dos fases diferenciadas: en la fase 1, se recogen datos retrospectivos, pertenecientes a ensayos que transcurrieron sin ninguna incidencia. Los límites de confianza calculados se denominan de prueba, puesto que

permiten verificar si el análisis ha estado bajo control. Si al realizar el gráfico de control se observan puntos que salen fuera de los límites de prueba, deben buscarse las posibles causas y, una vez identificadas, eliminarse los puntos que queden fuera de control.

Se realizará un nuevo gráfico de control con los puntos restantes (gráfico de control revisado), obteniendo también nuevos límites de control (límites de control revisados). Sólo cuando todos los puntos están bajo control se considera que el análisis se encuentra bajo control estadístico y comienza la fase 2. En esta fase, están definidos, por tanto, qué datos darán lugar a un análisis representativo y con unas condiciones estables puesto que se asume que la mayoría de las fuentes de variabilidad se han eliminado en la fase 1. Los límites de control definidos en la fase 1 como de prueba o revisados, dependiendo de los gráficos de control que hayan sido necesarios realizar antes de obtener todos los datos bajo control, serán los límites que se utilizarán en esta segunda fase para monitorizar los datos de los análisis que se vayan a realizar [Montgomery, 2009] [Feigenbaum AV, 1986].

Una vez realizado el gráfico de control para individuales, se dispone de LTL y UTL, correspondientes a los límites de tolerancia inferior y superior, respectivamente y, además, los “violating runs” y los “beyond limits”, respecto a las tolerancias.

Los puntos denominados “violating runs” corresponden a puntos que se encuentran bajo control pero comienzan a comportarse como si siguiesen un modelo no aleatorio (tendencia) dentro del gráfico de control.

En general, estos puntos se marcan con un color distinto al resto para mostrar que se está produciendo alguna de las posibilidades que alertan sobre la tendencia de otros datos a estar fuera de control de tolerancias [Western Electric Company, 1956].

Los puntos denominados “beyond limits” corresponden a puntos fuera de control puesto que superan los límites de tolerancia inferior y/o superior establecidos.

Todos los gráficos de control de individuales se han realizado con el paquete estadístico R, utilizando las funciones `saphiro.test` y `qcc` [Scrucca, 2004], adaptadas a los datos de esta tesis, de acuerdo al archivo de órdenes mostrado en la Figura 28.

```

setwd("P:\\MVCL2013\\ejemp FVII\\R\\Cchar") #Define el directorio de trabajo
# Carga los 210 datos
FVII_datos_individuales <-
read.table("FVII_Residual_error_individuales.txt", header=TRUE)

#####
# Pruebas de normalidad
#####

shapiro.test(FVII_datos_individuales$error_residual) #Test de Shapiro

hist(FVII_datos_individuales$error_residual, freq=FALSE, col='grey', #
Histograma de la distribución
      main="Histograma de FVII residual es individuales en ANOVA",
      xlab="FVII_residual")

lines(density(FVII_datos_individuales$error_residual), col=9) # En negro línea
de ajuste de la distribución
lines(density(FVII_datos_individuales$error_residual, adjust=2),
      lty="dotted", col=9) # otro ajuste
# Para dibujar la distribución normal
media=mean(FVII_datos_individuales$error_residual) #Media de n= 210 datos
SD=sd(FVII_datos_individuales$error_residual) #Desviación de los n datos
curve(dnorm(x, media, SD), col=2, add=TRUE) # Dibuja la curva normal con media y
SD

p_valor<-shapiro.test(FVII_datos_individuales$error_residual)$p.value # p-
valor del test de Shapiro
# Leyenda de las curvas
legend("topright", c("distribución de datos", "distribución normal"),
      fill=c("black", "red"))

shapiro<-paste ("Shapiro p-valor=", format(p_valor, digits=3), colapse = "") #
Texto con el test de Shapiro
text(0.013, 250, shapiro) # Incluye en el gráfico el test de shapiro.

#####
# Transformaciones a normal
#####

#Transformación según
#Titulo: HANDBOOK OF STATISTICAL DISTRIBUTIONS WITH APPLICATIONS
#Autor: K. DRISHNAMOORTHY
#Editorial: CHAPMAN & HALL / CRC. Taylor & Francis Group.
#Lugar y año: New York. 2006

#Peizer DB and Pratt Jw. (1968)
#A normal approximation for binomial, F, beta and other common related tail
probabilities
#Journal of the American Statistical Association 63, 1416-1456

#formula  $y=(x-n+2/3-0.08/n)/abs(x-n+1)*((n-1)*log((n-1)/x)+x-n+1)^{0.5}$ 
x<-(FVII_datos_individuales$error_residual) # Se pasan a una variable con
nombre más reducido

n=6 # n son los grados de libertad
T_FVII<-(((x-n)+2/3-0.08/n)/abs(x-n+1))*((n-1)*log((n-1)/x)+x-n+1)^0.5 #
Transformación
T_FVII
shapiro.test(T_FVII) # Verificación de la Transformada chi 2-normal
(K. DRISHNAMOORTHY)

hist(T_FVII, freq=FALSE, col=8,
      main="Histograma de FVII Chi^2 a Normal de residual es en ANOVA",
      xlab="FVII_T_residual")
lines(density(T_FVII))
lines(density(T_FVII, adjust=2), lty="dotted", col=9)
curve(dnorm(x, mean(T_FVII), sd(T_FVII)), col=2, add=TRUE)
legend("topleft", c("distribución de datos", "distribución normal"),
      fill=c("black", "red"))

p_valor<-shapiro.test(T_FVII)$p.value

shapiro<-paste ("Shapiro p-valor=", format(p_valor, digits=3), colapse = "")
text(-7.3, 0.9, shapiro)#, col="white")

```

```
#####
# Gráfico de control del transformado a normal
#####

library(qcc) # Librería para gráficos de control

### Definiciones para el aspecto del gráfico
old <- qcc.options() # save defaults
qcc.options("cex.stats") # get a single parameter
qcc.options("cex.stats"=.8) # change parameters
qcc.options(bg.margin="azure2")
#qcc.options("violating.runs" = list(pch = 15, col = "purple"))
#qcc.options("beyond.limits" = list(pch = 15, col = "orangered"))

obj1<-qcc(T_FVIII, type="xbar.one", nsigmas = 3,
  data.name='Error residual en ANOVA de FVIII transformado chi ^2 a normal')

beyond.limits(obj1) # Datos fuera de límites
violating.runs(obj1) # Datos que tienen tendencia
obj1$limits # Resultado de los límites de control inferior y superior
obj1$center # Resultado de la media
obj1$std.dev # Desviación estándar

two.sigmas<-qcc(T_FVIII, type="xbar.one", nsigmas = 2)$limits # Para obtener las
líneas de 2 sigmas
n_datos<-length(T_FVIII) # número de datos
two.sigmas<-data.frame(seq(n_datos) , two.sigmas) # Genera una tabla con 3
columnas

plot(obj1, add.stats=T) # Dibuja el gráfico de control

lines(two.sigmas$LTL, lty=3, col="blue") # Añade en azul la línea inferior de 2
sigmas
lines(two.sigmas$UTL, lty=3, col="blue") # Añade en azul la línea superior de 2
sigmas
text(n_datos+2, two.sigmas$LCL[1], cex=0.7, "-2 Sigma", col="blue")
text(n_datos+2, two.sigmas$UCL[1], cex=0.7, "+2 Sigma", col="blue")
```

Figura 28. Archivo de órdenes para el gráfico de control.

4.6. Bibliografía.

- [1] Barrowcliffe TW, Curtis AD. Principles of bioassay. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. Haemostasis and Thrombosis. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987: 996-1004.
- [2] Beyene J, Moineddin R. Methods for confidence interval estimation of a ratio parameter with application to location quotients. BMC Medical Research Methodology. 2005;5: 32.
- [3] Bland JM, Altman DG. Transformations, means, and confidence intervals. BMJ. 1996; 312:1079.
- [4] Collazo MV, Muñiz M, Alonso C y Frutos G. El análisis estadístico en la Farmacopea Europea. En: XXIX Congreso internacional Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino. Granada. 2010.
- [5] Collazo MV, Muñiz MM, Alonso C y Frutos G. El análisis estadístico en la Farmacopea Europea: diseño completamente aleatorizado en un bioensayo de FVIII. Ars Pharm. 2010; 51 (3): 749-754.
- [6] Curtis AD. The statistical evaluation of factor VIII clotting assays. Scand J Haematol. 1984; 33 (Suppl. 41): 55-68.
- [7] Das RG and Robinson CJ. Assessing Nonparallelism in Bioassays. BioProcess International. 2008; 6:46–56.
- [8] Daas A. The CombiStats User Manual. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2013.
- [9] Djira GD. Relative Potency Estimation in Parallel-Line Assays – Method Comparison and Some Extensions. Communications in Statistics. Theory and Methods. 2010; 39:1180-1189.
- [10] Djira GD, Hasler M, Gerhard D and Schaarschmidt F. *mratios*: Inferences for ratios of coefficients in the general linear model. 2012. Disponible en: <http://cran.r-project.org/web/packages/mratios/mratios.pdf>
- [11] European Pharmacopoeia 8ª ed. Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests (01/2013:50300). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2014.
- [12] Feigenbaum AV. Control total de la calidad. 9ª ed. México: Compañía editorial continental, S.A. de C.V. 1986.

- [13] Fieller EC. The Biological Standardization of Insulin. Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society. 1940; 7:1-64.
- [14] Finney DJ. Statistical method in biological assay. Griffin ed. 3rd ed. London. 1978.
- [15] Hirschberg J and Lye J. A Geometric Comparison of the Delta and Fieller Confidence Intervals. The American Statistician. 2010;64:234-241.
- [16] International Conference of Harmonization. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva; 1995.
- [17] Kirkwood TBL, MSc MA and Snape TJ. Biometric principles in clotting and clot lysis assays. Clin Lab Haemat. 1980; 2: 155-167.
- [18] Kirkwood TBL and Snape TJ. Statistics of bioassay of blood coagulation factors. In: Biggs R editor. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1984: 542-561.
- [19] Montgomery DC. Introduction to Statistical Quality Control. 6th ed. John Wiley & sons, Inc. 2009.
- [20] Motulsky HJ. Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking. Oxford University Press. 1995. 285-286.
- [21] Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. Journal of clinical microbiology. 1994; 32: 2441-2447.
- [22] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2013.
- [23] Rosso A. Statistical analysis of experimental designs applied to biological assays. Department of Statistics. Lund University. 2010.
- [24] Saha GM. Design and Analysis for Bioassays. Design Workshop Lectures Notes. 2005; 25-29: 61-76.
- [25] Scrucca L. qcc: An R package for quality control charting and statistical process control. R News. 2004; 4/1: 11-17.
- [26] Volker F. Ratios: A short guide to confidence limits and proper use. Cornell University Library. 2007.
- [27] Zuo Y. Is the t Confidence Interval $\bar{X} \pm t_{\alpha} (n - 1)s / \sqrt{n}$ Optimal? The American Statistician. 2010; 64:170-173.

- [28] Western Electric Company. Statistical quality control handbook. New York: Western Electric Co., Inc. 1956.

5. BIOENSAYOS de FVIII y FvW

“Defiende tu derecho a pensar porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar”.

Hipatia de Alejandría (c. 370 - 415)

5. Bioensayos de FVIII y FvW.

Las monografías de Ph. Eur. de los ensayos FVIII (01/2008: 20704) y de FvW (01/2008: 20721) describen los métodos oficiales de valoración correspondientes a estos medicamentos.

5.1. Instrumentación analítica para FVIII y FvW.

Los análisis de actividad del FVIII y del FvW han sido realizados en un analizador automático denominado ACL[®], modelo ELITE PRO (Instrumentation Laboratory, IL) que, con respecto a la técnica manual en microplacas [Kleinveld et al., 1999], proporciona muchas ventajas:

- Dosifica los volúmenes de muestra y reactivos de manera automática, realizando diluciones a partir de 3 μ l.
- Permite estandarizar los tratamientos, tanto en tiempo como en temperatura, para la muestra y para el estándar dentro del mismo ensayo o en inter-ensayos.
- La mezcla de muestras o reactivos se realiza mediante centrifugación. Las lecturas colorimétricas se realizan también por centrifugación, cada 750 msg, lo que permite obtener hasta 1200 lecturas para cada determinación.
- La respuesta generada en cada lectura, expresada en absorbancia, es transformada mediante la normalización (algoritmo delta) $2 \times \log(R/M)$, utilizada de manera rutinaria por este equipo. M y R representan los valores de la muestra o estándar y la referencia óptica, respectivamente. El resultado final es el incremento de absorbancia de los valores medios correspondientes a los 10 últimos datos y a los 10 primeros.
- Dado un conjunto de datos, la técnica *media móvil* consiste en calcular las medias aritméticas de subgrupos de igual tamaño (*smooth*) formados desplazando un elemento en la muestra ordenada. El equipo ACL[®] utiliza esta técnica para eliminar el ruido o la oscilación de las medidas y así, reducir la variabilidad de las series de datos. El fabricante del equipo recomienda fijar un *smooth* de 62 datos, que se ha aplicado a los datos del ensayo de determinación de cofactor de ristocetina de FvW.

La dispensación se realiza en cubetas de reacción integradas en un rotor hasta un número total de 20 cubetas. En el análisis desarrollado se aplica una calibración por rotor, dispensando muestras y estándares en el mismo rotor.

El ACL[®] está diseñado para el análisis de muestras de plasma de pacientes y no dispone de programas específicos para las prediluciones que son necesarias en el caso de la evaluación de concentrados de hemoderivados, donde las concentraciones pueden ser de hasta más de 1000 veces las encontradas en las muestras de plasma de pacientes. Por lo tanto, es una etapa necesaria, previa a la validación del ensayo, la configuración específica del equipo para conseguir la concentración adecuada al inicio. Se han utilizado dos procedimientos consecutivos que, en el caso del FVIII son:

1. Diluciones realizadas directamente en la bandeja de muestras (dilución en copa), que permite obtener una dilución máxima de 1/80.
2. Diluciones realizadas en el rotor (en línea), en el momento de dispensar la muestra y el primer reactivo, que permite obtener una dilución máxima de 1/40.

Para el ensayo del FvW sólo son necesarias diluciones en el rotor.

5.2. Bioensayo de Factor VIII.

Los métodos analíticos que se han utilizado en medicamentos para la determinación de la actividad del FVIII fueron, inicialmente, los métodos coagulativos en una o dos etapas y, posteriormente, el método cromogénico, que tiene lugar en dos etapas.

El método coagulativo en una etapa fue desarrollado en los años 50 y se basa en la capacidad del FVIII, contenido en una muestra, de acortar el tiempo de formación de un coágulo en un plasma deficiente en este factor. Fue el método preferido por los laboratorios clínicos por su simplicidad [Oldenburg et al., 2010]. El método coagulativo en dos etapas, en la misma década, fue utilizado por los fabricantes de concentrados de FVIII debido a su mayor precisión y sensibilidad, además de no ser necesario la utilización de un plasma deficiente en FVIII. En un primer paso, se generan FVa y FXa, relacionados con la cantidad de FVIII presente en la muestra. En un segundo paso, se añaden protrombina y fibrinógeno y se determina la cantidad de trombina y fibrina generadas, respectivamente [Hubbard et al., 1986].

El método cromogénico es, actualmente, el método oficial de la Ph. Eur. para realizar los ensayos de actividad de FVIII en medicamentos [Chandler et al., 2003] [Aurell et al., 1977] [Rosén, 1984].

5.2.1. Fundamentos del método de análisis cromogénico.

En la monografía 2.7.4. *Ensayo de Factor VIII de coagulación* de la Ph. Eur. [Ph. Eur., 2010], el FVIII de coagulación se analiza, en cuanto a su actividad biológica como cofactor en la activación del FX, mediante la activación previa del FIX, en presencia de iones calcio y fosfolípidos. En la Figura 29 se muestra un esquema de la activación del FX.

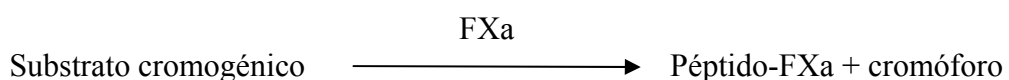
La actividad de FVIII se calcula comparando la cantidad de este factor necesaria para conseguir al menos, el 50% de FXa, con ayuda de un reactivo que contiene todos los componentes para que pueda producirse dicha activación excepto el FVIII; es decir, FX, FIXa, calcio y fosfolípidos. Todos estos componentes están en exceso, siendo el factor limitante el FVIII aportado por la muestra a ensayar, por lo que la cantidad de FXa será proporcional a la cantidad de FVIII presente en la muestra [Wagenvoord et al., 1989].

El método de ensayo cromogénico implica dos etapas:

- En primer lugar, se produce la formación de FXa, a partir de FIXa, calcio, fosfolípidos (reactivo 1) y el FVIII suministrado por la muestra y que, a su vez, es activado (FVIIIa) por la trombina existente en el reactivo 1 de partida [Hultin et al., 1978] [Hultin, 1982] [van Dieijen et al., 1985], tal como se muestra en el siguiente esquema:



- En la segunda etapa, el FXa rompe un substrato cromogénico formado por un péptido unido a un grupo cromóforo (para-nitro anilina, *p*-NA), denominado reactivo 2, de manera que queda unido al péptido y se libera el grupo cromóforo, que origina el color y puede ser medido espectrofotométricamente, tal como se muestra en el siguiente esquema:



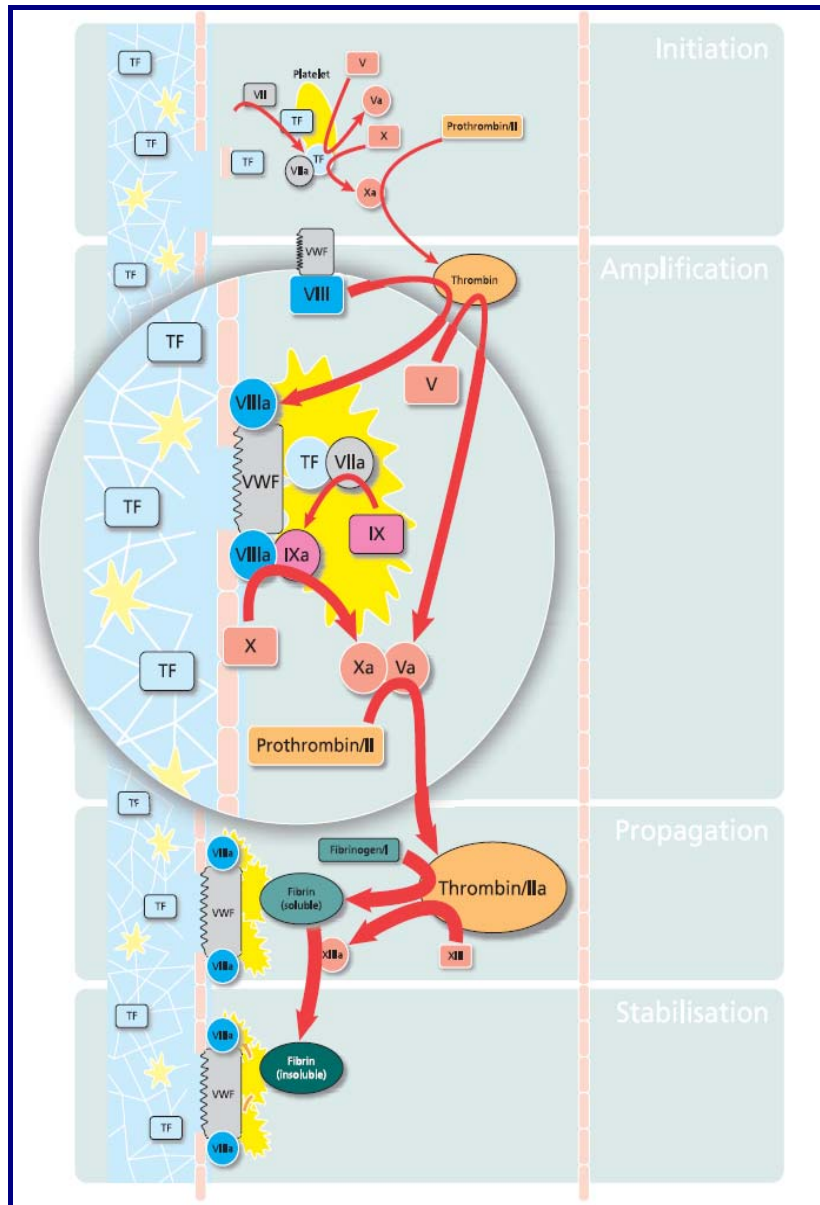


Figura 29. Activación del Factor X [Lillicrap, 2008]

El FXa pertenece al grupo de las enzimas denominadas serin-proteasas. La reacción de unión y rotura producida por el enzima sobre el sustrato cromogénico es el resultado de la interacción entre éste último y la triada catalítica del enzima, formado a partir de las cadenas laterales de tres aminoácidos específicos: el grupo hidroxilo de la serina (Ser), el grupo imidazol de la histidina (His) y el grupo carboxílico del ácido aspártico (Asp). La acción proteolítica del enzima sobre su sustrato implica varios pasos: comienza con la formación de un complejo no covalente entre el enzima y el sustrato. El ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la Ser sobre el carbono carbonilo del grupo amido

del sustrato da lugar a la rotura de la unión del grupo amido y a la formación de un intermediario, acyl – enzima. La unión éster de la molécula intermediaria es hidrolizada y el enzima queda libre para catalizar de nuevo otra molécula de sustrato (Figura 30) [Ekici, 2008].

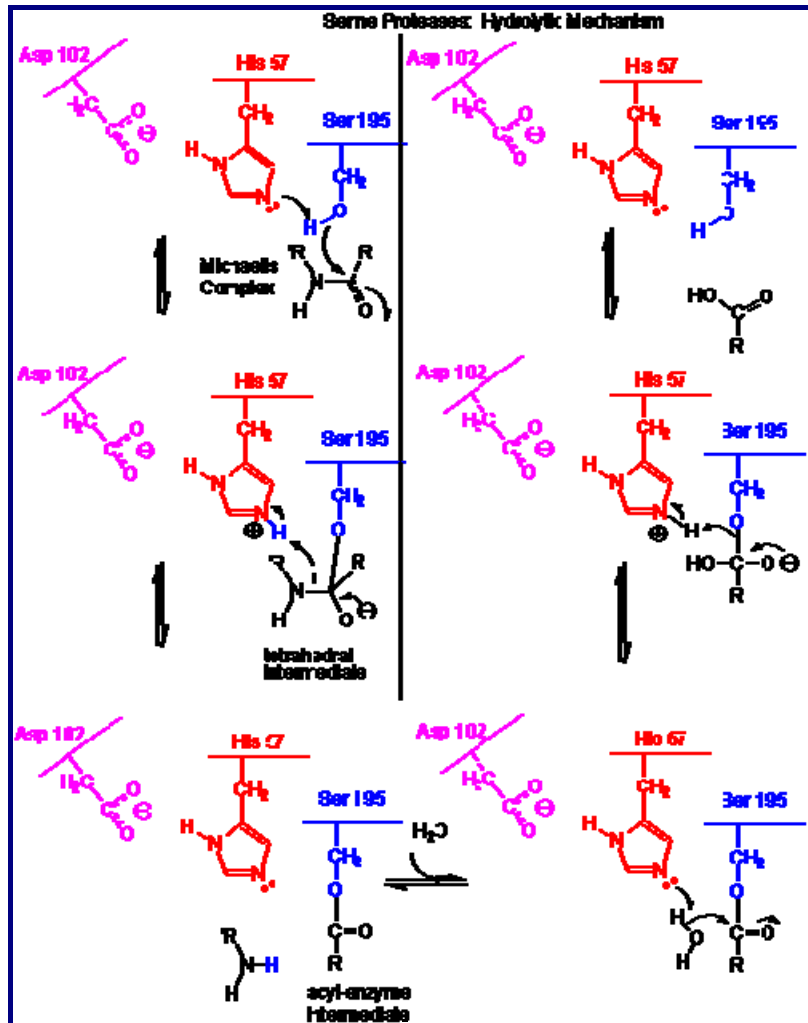


Figura 30. Mecanismo hidrolítico de las serin proteasas [Jakubowski, 2014].

5.2.2. Puesta a punto del ensayo de FVIII.

Para analizar los concentrados plasmáticos de FVIII de coagulación se ha utilizado un kit cromogénico comercial denominado COAMATIC® (Chromogenix) compuesto por los dos reactivos mencionados previamente: reactivo 1 (Factor Reagent), que incluye 0'3 U de FIXa, 2'7 U de FX, 1 NIH-U de trombina, coliofilizado con 40 mmol de CaCl₂ y 0'2 mmol de fosfolípidos, y el sustrato cromogénico S-2765 (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-p-NA) junto con 0'2 mg de un inhibidor de trombina (I-2581) y manitol.

El estándar utilizado es el BRP de Ph. Eur. de FVIII plasmático, lote 3, con una actividad de 8'6 UI/ampolla.

En el ensayo de FVIII, los factores con influencia crítica sobre la respuesta son el *tiempo de activación* (TA), tiempo que transcurre mientras se produce la activación del FX, y el *tiempo de lectura* (TL), tiempo de centrifugación mientras se realiza la lectura de las muestras a 405 nm. Teniendo en cuenta la importancia decisiva de estos factores en el resultado del análisis, el primer objetivo de esta tesis ha sido estudiar la influencia de TA y TL en la optimización del método, que permitirá establecer las condiciones experimentales idóneas para que el equipo ACL[®] pueda medir el contenido de FVIII en estas preparaciones farmacéuticas.

Con el fin de conocer la región experimental correspondiente a la curva respuesta, para encontrar el intervalo lineal que permitiera aplicar el modelo de líneas paralelas, se realizaron una serie de ensayos con distintos TA para un mismo TL. Se prediluyó hasta 1 UI/ml una preparación de estándar (STD) y de muestra. El análisis se realizó en espejo: STD – MUESTRA – MUESTRA – STD, aplicando los mismos valores de TA a las diluciones realizadas: diluciones 1/800, 1/400 y 1/200 (0'00125, 0'0025 y 0'005 UI/ml). Los TA de trabajo fueron: 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 minutos. El valor de TL seleccionado a partir de experimentación previa [Alonso et al., 2005] fue TL = 3 minutos, para todas las experiencias. La Tabla 9 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 9. Resultados de absorbancia, a distintos TA para TL = 3 minutos.

Diluciones	TA (minutos)						
	1	2	4	6	8	10	15
1/800	0'3865	0'5295	0'6388	0'7474	0'8023	0'8516	0'9228
1/400	0'6974	0'9192	1'1103	1'2990	1'3432	1'4334	1'4878
1/200	1'2195	1'5421	1'8071	2'0400	2'0932	2'1724	2'2114

De acuerdo con el perfil de las gráficas que se muestran en la Figura 31, se asume que la absorbancia se incrementa exponencialmente. Los datos experimentales de la Tabla 9 fueron ajustados al modelo matemático $Absorbance = b_0 + b_1(1 - e^{-b_2 * TA})$.

De la ecuación del modelo puede postularse que existen dos mecanismos implicados: un efecto *burst* y un proceso cinético de primer orden. El primer término de la derecha de la ecuación, b_0 , se asocia con el efecto *burst* (absorbancia *cuasi* instantánea) debido a la

absorbancia intrínseca de los reactivos mientras que el segundo término estaría asociado a un proceso cinético de primer orden donde b_1 representa la absorbancia en la asíntota, y b_2 la constante cinética aparente de primer orden.

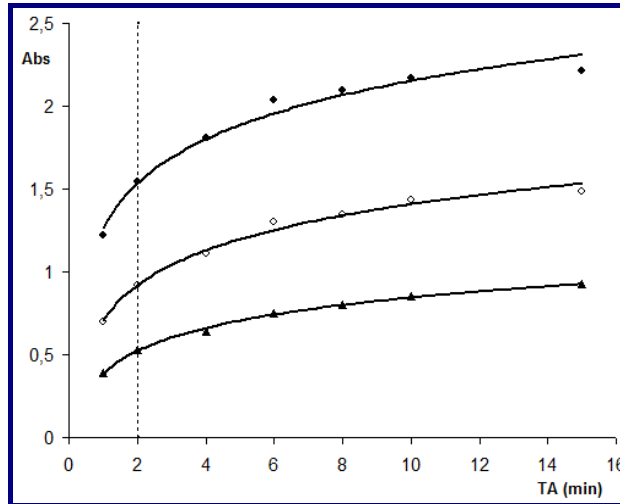


Figura 31. Absorbancias frente a TA para las tres concentraciones (▲ 0'00125; ○ 0'0025; ● 0'005).

Los valores correspondientes a los coeficientes de regresión b_0 , b_1 y b_2 , para cada dilución se incluyen en la Tabla 2, junto con sus correspondientes errores estándar. La tabla también incluye los coeficientes de determinación, para cada dilución que, en todos los casos, son mayores de 0'99. La bondad del ajuste queda probada mediante la concordancia de los valores experimentales y la función ajustada (Figura 31) y también mediante los coeficientes de determinación de la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de b_0 , b_1 y b_2 para el modelo exponencial.

Coeficientes	Dilución		
	1/200	1/400	1/800
b_0	0'8691 (0'063)	0'4880 (0'046)	0'2867 (0'028)
b_1	1'3506 (0'055)	1'0200 (0'039)	0'6644 (0'027)
b_2	0'3177 (0'031)	0'2493 (0'028)	0'1947 (0'026)
r^2	0'996	0'994	0'994

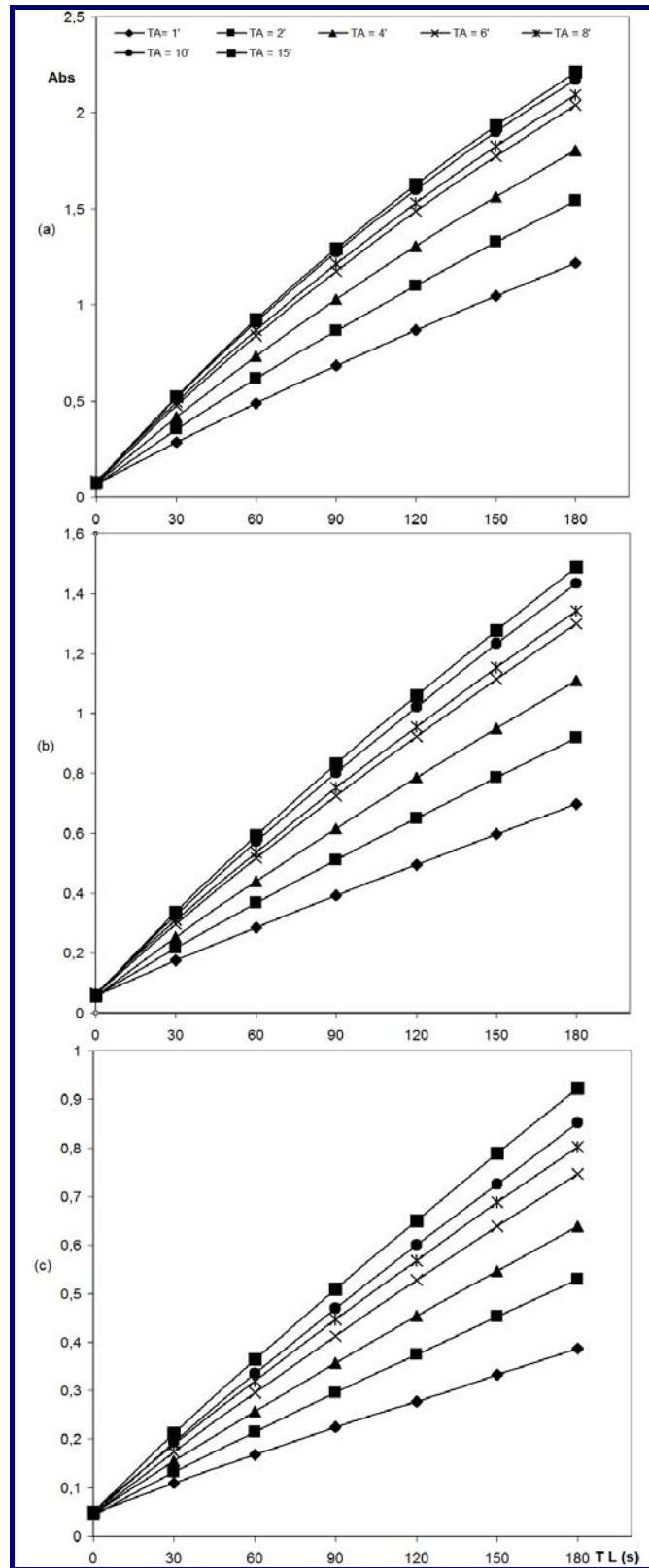


Figura 32. Absorbancia frente a TL para 7 diferentes TA. Tres diluciones de trabajo (a) ,(b) y (c), correspondientes a 1/200, 1/400 y 1/800.

El modelo matemático sugiere que debería ser utilizado un TA de al menos 2 minutos, indicado por una línea de puntos en la Figura 31, para alcanzar el 50% de FXa y cumplir, de esta forma, la Ph. Eur. [Ph. Eur., 2010].

La Figura 32 muestra los resultados obtenidos en un diseño experimental $7 \text{ TL} \times 7 \text{ TA}$ en las 3 diluciones de trabajo, $n = 147$ determinaciones. El intervalo de variación de TL ha sido desde 0 a 180 segundos, mientras que los TA variaron entre 1 y 15 minutos, siendo las diluciones las mencionadas anteriormente (1/200, 1/400 y 1/800).

El objetivo de este estudio fue determinar el intervalo para el cual la relación entre absorbancia y TL se puede aceptar como lineal. Los valores de los coeficientes de determinación disminuían cuando los TA se incrementaban, en las 3 diluciones (r^2 varió desde 0'9994 a 0'9932).

De acuerdo con estos resultados, se fijan las condiciones de realización del ensayo para la determinación de potencia de FVIII en TA = 2 min y TL = 3 min.

5.2.3. Determinación de potencia de concentrados de FVIII.

Las condiciones, TA = 2 min y TL = 3 min para los ensayos de potencia en concentrados de FVIII, basadas en el estudio anterior, se fijaron para los ensayos de la determinación de potencia, que según el esquema representado en la Figura 33 implican: una predilución de las preparaciones, estándar y muestra, hasta una concentración de 1 UI/ml. Las diluciones de trabajo (0'00125, 0'0025 y 0'005 UI/ml) se obtienen a partir de ésta mediante una predilución 1/50 en copa y, posteriores diluciones de trabajo en línea (1/16, 1/8 y 1/4). De todas las diluciones de estándar y muestra se hacen dos series de tres diluciones [Alonso et al., 2005]. La concentración final de FVIII en la mezcla de reacción es inferior a 0'01 UI/ml, y se trabaja con una configuración en espejo (STD – MUESTRA – MUESTRA – STD).

Una vez fijadas las condiciones experimentales, se realizan los ensayos de lotes de concentrados comerciales de FVIII con el objeto de evaluar su contenido como potencia, expresando finalmente su resultado en UI/vial.

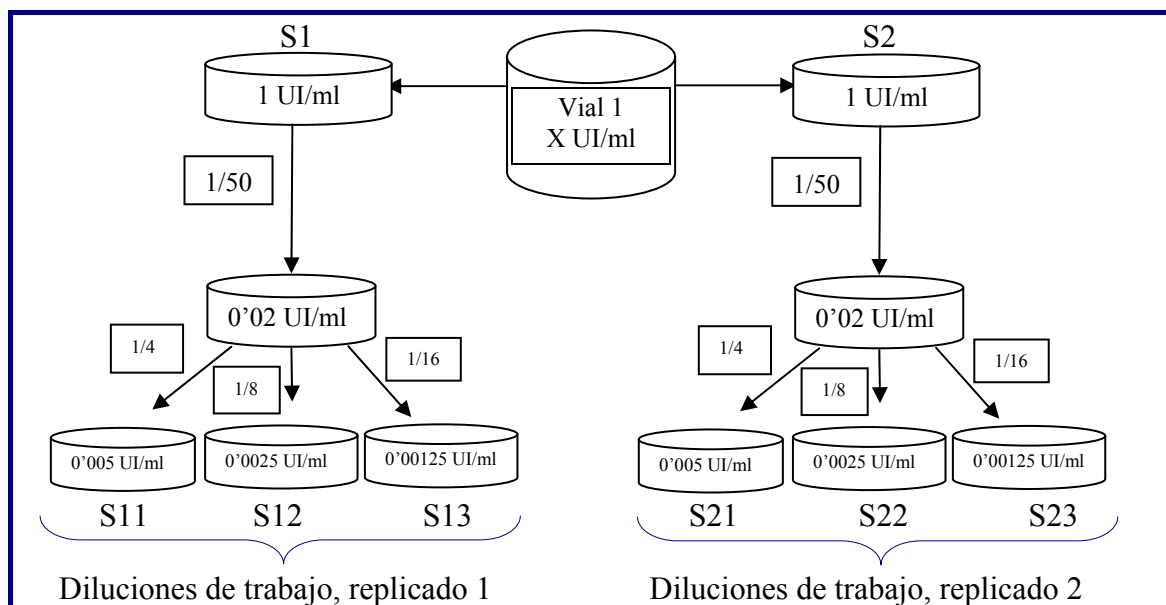


Figura 33. Series de diluciones de trabajo para el vial de estándar (S). El diseño es similar para la muestra.

5.2.4. Análisis estadístico de datos.

El tratamiento de los datos experimentales se realizó según la metodología descrita en el punto 4 de esta tesis. A modo de ejemplo, en la Tabla 11, se presentan datos obtenidos utilizando un lote comercial X-1 de concentrado de FVIII.

Tabla 11. Resultados de absorbancia de un ensayo para FVIII

ID	Dosis	Estándar	Muestra	Absorbancia
1	0'005	1	0	1'290
2	0'005	1	0	1'290
3	0'0025	1	0	0'712
4	0'0025	1	0	0'712
5	0'00125	1	0	0'356
6	0'00125	1	0	0'383
7	0'005	0	1	1'217
8	0'005	0	1	1'202
9	0'0025	0	1	0'663
10	0'0025	0	1	0'653
11	0'00125	0	1	0'343
12	0'00125	0	1	0'343

5.2.4.1. Análisis con Combistats®.

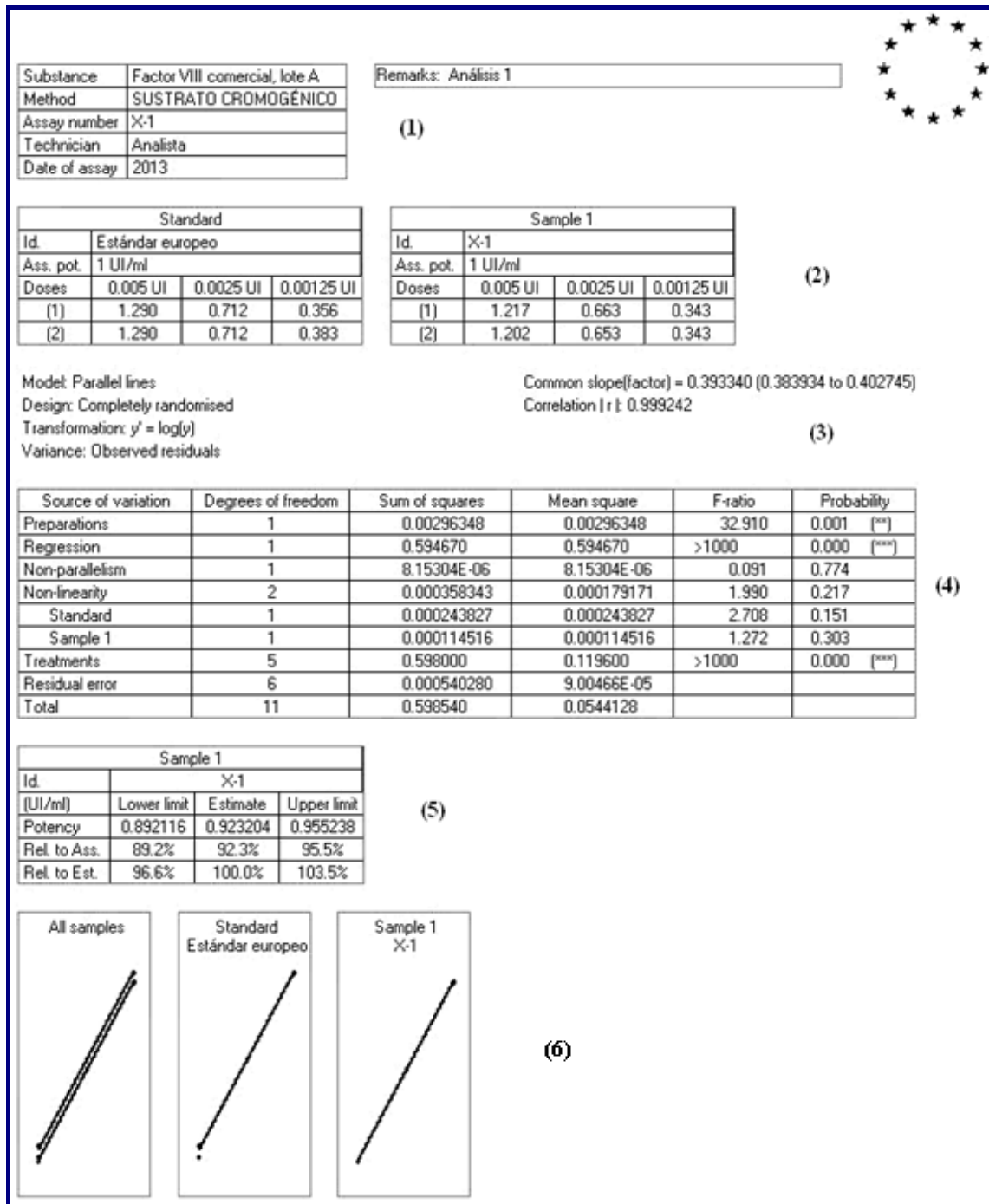


Figura 34. Análisis mediante Combistats® de concentrados de FVIII.

Los valores de absorbancia obtenidos para estándar y muestra se incluyen en el software Combistats®. En la Figura 34 se presentan los resultados del análisis correspondiente a los datos de la tabla 11: en primer lugar, la identificación del ensayo (1); en segundo

lugar, la tabla de datos de estándar y muestra, incluyendo el valor de la potencia asignada, 1 IU/ml (2). A continuación se define el modelo (líneas paralelas), el diseño, la transformación aplicada a los datos y el modelo de varianza elegido. Asimismo, la pendiente común en el ajuste lineal y el coeficiente de correlación (3). En cuarto lugar, se muestran los resultados del análisis de varianza. Para estos datos, el ANOVA verifica el cumplimiento de todos los requerimientos de validez del ensayo, en cuanto a regresión, no paralelismo y no linealidad, de acuerdo al nivel de significación estadístico al 95% (4). Finalmente, se presenta una tabla con la potencia y su intervalo de confianza al 95%, estimada a partir de los datos según el modelo prefijado. Además, la tabla incluye dos potencias relativas y sus intervalos al 95%, una respecto a la potencia asignada y otra respecto a la potencia estimada (5). Finalmente Combistats[®] presenta un informe gráfico (6).

5.2.4.2. *Análisis con Excel[®].*

En la Figura 35 se presenta el resultado del análisis obtenido con Excel[®] para los mismos datos: en primer lugar, se hace referencia al análisis realizado y al modelo elegido así como referencia al texto de la Ph. Eur. donde se detalla este tratamiento estadístico (1); en segundo lugar, la tabla de datos de estándar y muestra, incluyendo la transformación realizada para los resultados de absorbancia (2). A continuación, se incluyen los cálculos previos necesarios al análisis de la varianza (3). En cuarto lugar, se presenta el informe gráfico y el coeficiente de determinación para cada recta (4). También se muestran los resultados del análisis de varianza donde el ANOVA verifica el cumplimiento de todos los requerimientos de validez del ensayo, en cuanto a regresión, no paralelismo y no linealidad, de acuerdo al nivel de significación estadístico al 95% (5). Finalmente, se presenta la pendiente común y el cálculo de la potencia y de los límites de confianza (6). Además, una tabla resume las dos potencias relativas y sus intervalos al 95%, una respecto a la potencia en relación a la concentración de partida (1 UI/ml) y otra respecto a la potencia estimada (7).

Farmacopea Europea		Página 542 versión española		Rectas PARALELAS				
Datos de la Muestra		M1			Valoración Factor VIII			(1)
		Referencia S		Preparación T			Transformación	
		S1	S2	S3	T1	T2	T3	Log(y)
absorbancias		1.290	0.712	0.356	1.217	0.663	0.343	Ymedia
		1.290	0.712	0.383	1.202	0.653	0.343	-0.1723
(y-Ymedia) ²		0.08000	0.00061	0.07634	0.06633	0.00004	0.08553	Suma(y-Ymedia) ²
		0.08000	0.00061	0.05981	0.06358	0.00016	0.08553	0.598540
				Ref S	Prep T			
Ps Pr:	Suma total de la preparación S1+S2+... S			-0.5	-0.6			
LS:	Contraste lineal '1*S1+2*S2+3*S3+...-1/2			-0.54	-0.55			
d:	No de diluciones diferentes			3				
n:	nº de replicados por dilución			2				
h:	donde h= refer+Nº muestras= total prepar			2	(3)			
Hp	n/d			0.667				
H _L	12*n/(d ³ -d)			1				
K	n(Ps+Pt+...) ² /hd			0.35604				
SSprep	Hp(Ps ² +Pt ² +...)-K			0.00296				
SSreg	1/h*H _L *(Ls+Lt+...) ²			0.59467				
SSpar	H _L *(Ls ² +Lt ² +...)-SSreg			0.000008				
SSlin	SSstrat-SSprep-SSpar			0.000358				
SSstrat	n*(S ₁ ² +...+S _d ² +T ₁ ² +...+T _d ² +...			0.598				
SSres	SStot-SSstrat			0.00054				
SStot	suma((y-Ymed) ²)			0.59854				(4)

Fuente de variación	G de libertad	Suma de cuadrados	F	Probabilidad (p-valor)	
Preparaciones (h-1)	1	0.00296	0.00296	32.9	0.0012
Regresión (1)	1	0.5947	0.59467	6604.0	0.0000
No paralelismo (h-1)	1	0.000008	0.00001	0.09	0.774
No linealidad Gl= h(d-2)	2	0.00036	0.00018	2.0	0.217
Tratamientos hd-1	5	0.5980	0.11960	1328.2	0.000
Error residual aleatorizado	6	0.00054	0.000090		
Total	11	0.59854			

pend b	HL(Ls+Lt+...)/I * n*h	-0.39334	(7)
I es ln de la relación de dosis	2	0.693	
dosis	0.005	0.0025	0.00125
M _T	P _T - P _S /db		0.0799
C	SSreg / (SSreg-s ² t ²)	(6)	1.00091
t student para p=0,05 gl= 6		2.446912	
s	error residual medio	0.000090	
V	SSreg / b ² *n*d		0.6406

Ln de los Límites de confianza			
C*MT ± (C-1*(C*Mt+2V)) ^{1/2}	0.08	±	0.03418
Tomando antilogaritmos, la razón de potencias sera			
	1.05	1.08	1.12
Potencia Muestr	0.892116	0.92	0.9552
Relativo al estim	96.63953	100	103.48
			%

Figura 35. Análisis mediante Excel® de concentrados de FVIII.

5.2.4.3. Análisis con el paquete estadístico R.

En la Figura 36, se presenta el resultado que produce R al cargar los datos experimentales, utilizando el script 1 correspondiente a la entrada de datos.

A) Conjunto de datos, información reducida.	B) Conjunto de datos con la información ampliada comprendiendo todas las posibles causas de varianza.
<pre>> datpl Response Prep Dose 1 1.290 S 0.00500 2 0.712 S 0.00250 3 0.356 S 0.00125 4 1.217 T 0.00500 5 0.663 T 0.00250 6 0.343 T 0.00125 7 1.290 S 0.00500 8 0.712 S 0.00250 9 0.383 S 0.00125 10 1.202 T 0.00500 11 0.653 T 0.00250 12 0.343 T 0.00125</pre>	<pre>> datpl Response Prep Dose Doselevel DoselevelSample Serie 1 1.290 S 0.00500 A A1 a 2 0.712 S 0.00250 B B1 a 3 0.356 S 0.00125 C C1 a 4 1.217 T 0.00500 A A2 a 5 0.663 T 0.00250 B B2 a 6 0.343 T 0.00125 C C2 a 7 1.290 S 0.00500 A A1 b 8 0.712 S 0.00250 B B1 b 9 0.383 S 0.00125 C C1 b 10 1.202 T 0.00500 A A2 b 11 0.653 T 0.00250 B B2 b 12 0.343 T 0.00125 C C2 b</pre>

Figura 36. Disposición de los datos analíticos en el paquete estadístico R.

La Figura 37 muestra el resultado, según el script 2 del punto 4, correspondiente al modelo de líneas paralelas utilizado. En primer lugar, presenta un resumen de estadísticos muestrales de los residuales, los coeficientes de regresión, su error estándar y su significación estadística al 95%, utilizada por defecto. Finalmente, presenta el índice de bondad de ajuste.

```
> Summary (Result_3)
Call: lm (formula = log10 (Response) ~ log10 (Dose) + Prep, data = datpl)
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.019373 -0.004959 -0.001743  0.009015  0.012376

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr (>|t|)
(Intercept)  2.200145  0.030948  71.092  1.09e-13 ***
log10 (Dose)  0.905698  0.011789  76.826  5.43e-14 ***
PrepT        -0.031430  0.005795  -5.423  0.00042 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.01004 on 9 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9985, Adjusted R-squared: 0.9981
F-statistic: 2966 on 2 and 9 DF, p-value: 2.05e-13
```

Figura 37. Estudio de regresión con el paquete estadístico R.

Aunque el paquete estadístico R define cada uno de los parámetros de ANOVA de manera diferente a como se definen en los programas Combistats® y Excel®, el análisis de la varianza aporta los mismos resultados. Utilizando las instrucciones de R en el script 3, se obtiene la Figura 38, que presenta el análisis de la varianza realizado para contrastar las condiciones que debe cumplir el ensayo.

```

> ANOVA2 <- lm(log10(Response) ~ log10(Dose)*Prep*Doselevel, data=datpl)
> anova(ANOVA2) Analysis of Variance Table. Response: log10(Response)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
log10(Dose)	1	0.59467	0.59467	6604.0237	2.338e-10 ***
Prep	1	0.00296	0.00296	32.9105	0.001219 **
Doselevel	1	0.00035	0.00035	3.8455	0.097562
log10(Dose):Prep	1	0.00001	0.00001	0.0905	0.773643
Prep:Doselevel	1	0.00001	0.00001	0.1341	0.726815
Residuals	6	0.00054	0.00009		

```

> aov(ANOVA2)
Call: aov(formula = ANOVA2)
Terms:

```

	log10(Dose)	Prep	Dose level	log10(Dose): Prep	Prep: Dose level
Sum of Squares	0.5946701	0.0029635	0.0003463	0.0000082	0.0000121
Deg. of Freedom	1	1	1	1	1

```

Residuals Sum of Squares 0.0005403   Deg. of Freedom 6

```

Figura 38. ANOVA con el paquete estadístico R.

En la Figura 39 se presenta el gráfico correspondiente al modelo de líneas paralelas para el ensayo de FVIII en concentrados de FVIII.

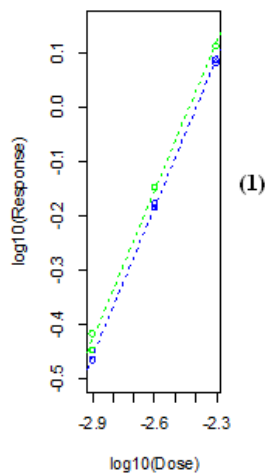


Figura 39. Representación gráfica del modelo de líneas paralelas.

En la Figura 40 se muestra la hoja de salida de los resultados de la potencia y los intervalos de confianza obtenidos utilizando el script 5 incluido en el capítulo 4.

```

> CI1 <- gsci.ratio(est=coef(fitpl1), vcmat=vcov(fitpl1),
+                 degfree=fitpl1$df.residual,
+                 Num.Contrast=numc, Den.Contrast=denc,
+                 adjusted=FALSE,
+                 conf.level = 0.975) #two.sided --> 0.95 is for one side
>
> CI1 #muestra los resultados obtenidos
Unadjusted 97.5% confidence intervals
Degree of freedom:9, quantile:2.685
      estimate  lower  upper
estimate -0.03471 -0.05198 -0.01752
> plot(CI1) #presenta un gráfico con el intervalo de confianza
>
> # Una vez obtenidos los antilogaritmos, tendremos:
> # la potencia estimada; límite inferior; límite superior
> 10^CI1$estimate ; 10^CI1$conf.int[1,1]; 10^CI1$conf.int[1,2]
      estimate
estimate 0.9231849
      lower
0.8871888
      upper
0.9604538

```

Figura 40. Análisis mediante el paquete estadístico R de concentrados de FVIII.

5.2.4.4. Comparación de los resultados obtenidos mediante los tres software.

Una vez puesto a punto el ensayo de actividad de FVIII, se realizó el análisis en concentrados de FVIII y el tratamiento de datos se llevó a cabo con ayuda de los tres programas de cálculo Combistats[®], Excel[®] y el paquete estadístico R. En la Tabla 12 se muestran los resultados de potencia (en UI/ml) obtenidos para 10 ensayos de 10 lotes distintos de concentrados de FVIII analizados y sus correspondientes límites de confianza.

Tabla 12. Resultados de potencia de FVIII con 3 software.

Combistats [®]			Excel [®]			R		
Inferior	Estimado	Superior	Inferior	Estimado	Superior	Inferior	Estimado	Superior
0'87389	0'92894	0'98703	0'87409	0'92874	0'98682	0'87359	0'92894	0'98738
0'90675	0'97299	1'04386	0'90695	0'97289	1'04363	0'90352	0'97299	1'04756
0'95889	1'04561	1'14077	0'95913	1'04588	1'14047	0'95246	1'04558	1'14851
0'93714	0'97931	1'02331	0'93756	0'97928	1'02285	0'92710	0'97928	1'03431
0'96204	1'04035	1'12546	0'96220	1'04050	1'12530	0'95823	1'04032	1'12992
0'95423	0'99335	1'03405	0'95400	0'99330	1'03420	0'94238	0'99332	1'04700
0'92170	0'99041	1'06417	0'92170	0'99040	1'06410	0'92673	0'99039	1'05835
0'95343	1'00765	1'06501	0'95340	1'00770	1'06500	0'95451	1'00763	1'06374
0'86485	0'93914	1'01914	0'86500	0'93880	1'01900	0'85526	0'93912	1'03033
0'90642	0'96197	1'02072	0'90610	0'96190	1'02110	0'89761	0'96195	1'03061

Los valores estimados con los tres software son muy similares en los 10 concentrados analizados, tanto en lo que respecta a la estimación de la potencia como a sus límites de confianza.

El software Combistats[®] está reconocido por las autoridades europeas y es el utilizado por la red de laboratorios oficiales de control de medicamentos (OMCL's) del EDQM, para el análisis estadístico de ensayos biológicos, siguiendo las referencias de la Ph. Eur. Requiere un aprendizaje específico para su utilización.

El software Excel[®] es ampliamente conocido y utilizado como hoja de cálculo y no requiere un aprendizaje previo debido a su sencillo manejo.

El entorno de programación estadística integrado en el lenguaje R ofrece las mismas posibilidades de cálculo que Combistats[®] y Excel[®] pero sin ningún coste adicional ya que se trata de un software abierto y accesible a cualquier usuario aunque para la validación de sus resultados necesita su comprobación mediante otros software como los anteriormente mencionados. Su manejo es muy complejo y requiere un entrenamiento previo y conocimientos de estadística.

5.2.5 Validación del ensayo de FVIII.

Una vez realizada la puesta a punto del ensayo de potencia en concentrados de FVIII, se lleva a cabo la validación de este método [ICH, 1995] [EDQM, 2007]. La validación se ha realizado en dos etapas: primero, la calibración analítica instrumental del aparato de medida (ACL[®]), utilizando como señal la absorbancia y posteriormente, la validación del método, (bioensayo de FVIII), considerando la potencia de los concentrados como variable dependiente en el modelo de líneas paralelas. Los parámetros considerados en la validación han sido: especificidad, exactitud, precisión. La linealidad, de acuerdo con el método de líneas paralelas, se verifica en cada ensayo, de manera que sin la hipótesis de linealidad, el ensayo no es válido. [Collazo et al., 2010, 2012]. No es necesario calcular ni el límite de detección (LOD) ni el límite de cuantificación (LOC) puesto que se trata de una valoración de la actividad con una concentración nominal de FVIII preparada en un intervalo de concentración determinado [Collazo et al., 2013].

5.2.5.1. Calibración del ACL[®]: recta de calibración.

El estudio de calibración analítica instrumental se realizó mediante la preparación de diluciones seriadas del estándar de la Ph. Eur. en vigor (8'6 UI/ampolla), a partir de una concentración de 0'5 UI/ml. El intervalo de concentraciones seriadas comprendía desde 0'000625 UI/ml (1/1600) hasta 0'01 UI/ml (1/100). De acuerdo con la guía ICH, se realizaron dos replicados a partir de cinco diluciones seriadas de BRP. Se analizaron verdaderos replicados (no repeticiones de lectura) para obtener información de la variación de los valores de absorbancia entre las muestras de la misma concentración.

Se eligió el modelo multiplicativo, $\text{absorbancia} = a \times \text{concentración}^b$, donde a y b son parámetros de regresión. La curva de calibración ajustada es la linearización del modelo multiplicativo: $\log(\text{absorbancia}) = \log(a) + b \times \log(\text{concentración})$.

La concentración se expresa en UI/ml (variable x) y la respuesta en Δ (delta) de absorbancias (variable y). El modelo de regresión lineal se ajustó mediante el método de mínimos cuadrados aplicando la transformación logarítmica a ambas variables. Se utilizó el software estadístico Statgraphics[®]. Para probar la consistencia de la recta de calibración, se realizaron tres ensayos independientes en tres días diferentes.

En la Tabla 13 se muestran los resultados de absorbancias para el ensayo realizado el día 1.

Tabla 13. Resultados linealidad para el ensayo en el día 1.

CONCENTRACIÓN		RESPUESTA	
UI/ml FVIII	Log UI/ml FVIII	Absorbancia	Log Absorbancia
1 x 10 ⁻²	-2'000	1'948	0'2896
		1'969	0'2942
5 x 10 ⁻³	-2'3010	1'188	0'0748
		1'185	0'0737
2'5 x 10 ⁻³	-2'6021	0'913	-0'1469
		0'688	-0'1624
1'25 x 10 ⁻³	-2'9031	0'389	-0'4100
		0'386	-0'4134
6'25 x 10 ⁻⁴	-3'2041	0'225	-0'6478
		0'219	-0'6596

La ecuación del modelo ajustado es: $\log y = 1'88942 + 0'792383 \cdot \log x$,

donde x es la concentración en UI/ml de FVII e y es la absorbancia en Δ (absorbancia).

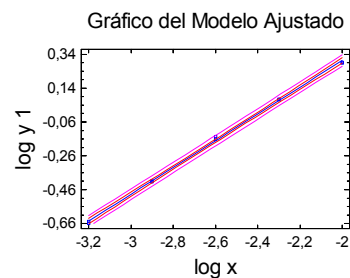
En la Tabla 14 se muestran los resultados del análisis de regresión para los datos de la Tabla 13.

Tabla 14. Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 1.

Parámetro	Error Estimación	Estadístico estándar	T	p-valor
Ordenada	1'88942	0'0249529	75'7192	0'0000
Pendiente	0'792383	0'009472	83'6553	0'0000

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	p-valor
Modelo	1'13017	1	1'13017	6998'21	0'0000
Residuo	0'00129195	8	0'000161494		

Total (Corr.) 1'13146 9
 Coeficiente de Correlación (r) = 0'999429
 R-cuadrado = 99'8858 porcentaje
 R-cuadrado (ajustado para g. l.) = 99'8715 porcentaje
 Error estándar de est. = 0'012708
 Error absoluto medio = 0'009378
 Estadístico de Durbin-Watson = 0'890502 (P=0'0057)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = 0'397702



En la Tabla 19 se muestra un resumen de los valores de las pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación calculados en los estudios de regresión realizados en los tres ensayos independientes. Como se observa en la tabla, los resultados obtenidos para las pendientes y las ordenadas en el origen son muy similares. Los coeficientes de correlación son iguales en los tres casos.

Tabla 19. Resumen del cálculo de regresión de los resultados de linealidad.

CONCENTRACIÓN (UI/ml FVIII)	RESPUESTA (absorbancias)		
	Día 1	Día 2	Día 3
PENDIENTE	0'7924	0'7777	0'7630
ORDENADA	1'8894	1'8386	1'8166
r	0'999	0'999	0'999

Para verificar las posibles diferencias entre los tres ensayos, se compararon las pendientes y las ordenadas en el origen. El modelo ajustado para describir la relación entre log (absorbancia) y log (concentración) incluye una variable denominada código que toma los valores 1, 2 y 3 para los días de ensayo 1, 2 y 3, respectivamente. La ecuación del modelo fijado es:

$$\begin{aligned} \text{Log}(\text{Absorbancia}) = & 4'338 + 0'789 * \log(\text{Concentración}) - 0'117 * (\text{código} = 2) \\ & - 0'167 * (\text{código} = 3) - 0'115 * \log(\text{Concentración})(\text{código} = 2) - 0'292 \\ & \log(\text{Concentración}) * (\text{código} = 3) \end{aligned}$$

En la ecuación del modelo ajustado, los términos código = 2 y código = 3 son variables indicadoras, que toman el valor 1 si es verdadero y el valor 0 si es falso, dando lugar a tres líneas separadas, una para cada código. El coeficiente de correlación r^2 indica que el modelo ajustado explica el 99'87% de la variabilidad en el log (concentración). El error estándar del valor estimado muestra que la desviación estándar de los residuales es 0'031. Para probar si existen diferencias entre las ordenadas en el origen o entre las pendientes, se realizó otro análisis de varianza cuyos resultados muestran la significación estadística de los términos del modelo. Como el p -valor para las pendientes fue 0'139, no había diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes para los valores de los códigos a un 95% de confianza o mayor. Sin embargo, el p -valor para las ordenadas en el origen era 0'032, por lo que existían diferencias estadísticamente significativas entre las ordenadas en el origen para los valores de los

códigos al 95% de confianza, como requiere el modelo de líneas paralelas. Como la determinación de la potencia de FVIII se evalúa en un intervalo prefijado, que no incluye el origen de coordenadas, la falta de consistencia de las ordenadas en el origen no afecta a la determinación de su actividad.

La Tabla 20 muestra los resultados del modelo lineal ajustado para describir la relación entre absorbancia y concentración, utilizando una transformación logarítmica. De acuerdo con estos resultados, la absorbancia, como función de la concentración, sigue un modelo lineal dado por la ecuación:

$$\log(\text{absorbancia}) = 1'848 + 0'777 \log(\text{concentración})$$

El coeficiente de correlación fue 0'9989. El valor r^2 explica el 99'8% de la variabilidad en el logaritmo de la absorbancia. El error estándar residual fue 0'0153.

Los datos fueron lineales en el intervalo 0'000625 – 0'01 UI/ml. La Figura 41 muestra la recta de calibración a partir de los datos experimentales.

Tabla 20. Resultados para recta de regresión común.

Parámetro	Estimado	ES	Estadístico t	p-valor
Ordenada en el origen	1'848	0'017	106'580	0'000
Pendiente	0'777	0'006	118'190	0'000
Coeficiente de correlación = 0'9989; ES del estimado = 0'0153				

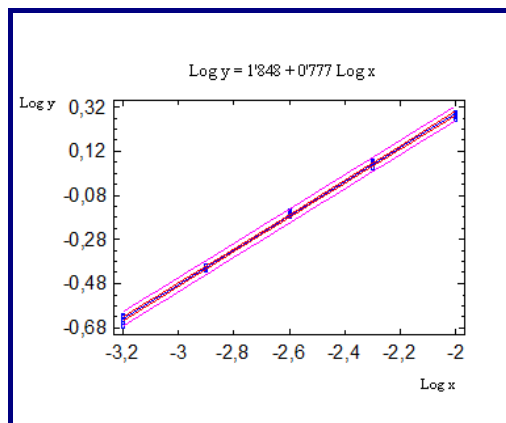


Figura 41. Representación gráfica de linealidad del ensayo de FVIII.

5.2.5.2. *Parámetros de validación del método: Especificidad.*

La especificidad se estudió con respecto a la albúmina, excipiente habitual en concentrados comerciales de FVIII.

Se realizó el ensayo en dos muestras de albúmina con la misma concentración que la que se encuentra como excipiente en los medicamentos de FVIII. Se procede del mismo modo con un tampón Tris concentrado, reactivo utilizado habitualmente en estos ensayos.

En la Tabla 21 se muestran los resultados de los valores de absorbancia para ambos reactivos, obtenidos en dos ensayos independientes.

Tabla 21. Resultados de especificidad.

Dilución	Valores de absorbancia	
	1	2
Tampón, 1/200	0'085	0'086
Tampón, 1/400	0'085	0'084
Tampón, 1/800	0'084	0'084
Albúmina, 1/200	0'076	0'072
Albúmina, 1/400	0'070	0'062
Albúmina, 1/800	0'074	0'072

Se obtienen valores de absorbancia similares en todos los casos ya que no están afectados por la concentración y, por tanto, se considera adecuada la especificidad. Además, comparando los resultados de absorbancia en el ensayo de especificidad con los obtenidos en un ensayo de FVIII (ver Tabla 23), en el primer caso, los valores obtenidos son muy inferiores, lo que indica que la albúmina y los reactivos no interfieren en el ensayo.

5.2.5.3. *Parámetros de validación del método: Exactitud.*

Se realizaron ensayos comparativos independientes utilizando el analizador automático ACL[®] y un método acreditado en nuestro laboratorio (ENAC), *manual en microplacas*, utilizado como referencia. La exactitud se determinó para la absorbancia y la potencia.

Se realizó un primer estudio para evaluar el coeficiente de correlación, r , de 120 resultados de absorbancia obtenidos para el BRP lote 3, de acuerdo con el diseño: 10 viales \times 3 dosis \times 2 replicados \times 2 métodos. El coeficiente de correlación de Pearson dió como resultado un valor de 0'984, indicando la existencia de una relación lineal entre

los resultados de los dos métodos, con una correlación significativa (p -valor bilateral = 0'01). En el segundo estudio se obtuvieron los coeficientes de correlación, r , de 20 valores de potencia de 10 lotes de FVIII comercial, una vez aplicado el modelo de líneas paralelas y el software Combistats[®] en un total de 240 valores de absorbancia y de acuerdo al diseño: 10 lotes \times 2 viales \times 3 dosis \times 2 replicados \times 2 métodos de análisis. El coeficiente de correlación de Pearson calculado a partir de la comparación estadística de los 20 valores de potencia indica una correlación significativa ($r = 0'699$).

Para ambos estudios de exactitud se ha probado que hay una alta correlación entre el método nuevo (ACL[®]) y el método de referencia (microplaca).

Tabla 22. Resultados de potencia para el ensayo de exactitud.

Lotes	Potencia ACL [®] (UI/ml)	Potencia microplaca (UI/ml)
1	94'2	106'7
2	100'1	98'8
3	84'9	94'3
4	97'0	91'4
5	89'2	88'2
6	100'8	94'1
7	98'8	102'1
8	106'8	106'2
9	107'7	113'3
10	90'6	89'1
Media	97'01 UI/ml	98'42 UI/ml
DS	7'41	8'43
IC (95%)	[92'42 – 101'60]	[93'19 – 103'65]
p-valor F-test	0'7050	
p-valor T-test	0'6959	

Como se observa en la Tabla 22, el intervalo de confianza al 95% para la potencia media calculada para el ACL[®] es menor que el intervalo calculado utilizando el método de microplacas. Por lo tanto, la incertidumbre asociada al método nuevo, puesto a punto y validado, es menor que la incertidumbre asociada al método de referencia utilizado hasta ahora.

5.2.5.4. *Parámetros de Validación del método: Precisión.*

La precisión se estableció a dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

a) Repetibilidad.

El estudio se ha realizado valorando seis muestras de un lote comercial de FVIII, en las 3 concentraciones de trabajo, en el mismo día, por el mismo analista y en el mismo equipo. Los resultados de absorbancia se muestran en la Tabla 23 Los coeficientes de variación (CV%) de las absorbancias están comprendidos entre el 2'8% y el 4'1%, inferior al 10% establecido como criterio interno de aceptación para este parámetro Tabla 24).

Tabla 23. Resultados de repetibilidad en absorbancias, para las diluciones 0'005 (1), 0'0025 (2) y 0'00125 (3), de un concentrado de FVIII.

Dil	Muestra											
	M1		M2		M3		M4		M5		M6	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0'858	0'876	0'828	0'850	0'801	0'850	0'831	0'871	0'854	0'844	0'859	0'894
2	0'487	0'489	0'467	0'476	0'434	0'468	0'455	0'488	0'494	0'467	0'480	0'495
3	0'244	0'245	0'251	0'254	0'237	0'253	0'249	0'274	0'246	0'263	0'263	0'263

Tabla 24. Valores descriptivos de los datos.

	Dilución	Media	Desvest	CV%
Muestra	0'005	0'8513	0'0243	2'8498
	0'0025	0'4750	0'0180	3'7842
	0'00125	0'2535	0'0105	4'1356

Se calculó la potencia frente al BRP para las muestras M1 a M6. Los seis resultados de potencia estimada se presentan en la Tabla 25 junto con los extremos de los intervalos de confianza correspondientes al 95%. La estimación de la potencia en todos los ensayos realizados cumple los requerimientos.

Tabla 25. Resultados de repetibilidad para potencias.

Cálculo de potencia (%)			
Ensayo	LCL	Estimado	UCL
1	95'8	100'0	104'3
2	95'6	98'6	104'7
3	90'3	101'1	110'8
4	89'9	106'8	111'4
5	95'5	102'1	104'7
6	96'9	105'2	103'2

b) Precisión intermedia.

Para la evaluación de la precisión intermedia se realizaron, sobre una misma muestra de aproximadamente 10 UI/ampolla, tres ensayos independientes en tres días consecutivos, con reactivos del mismo lote, reconstituidos cada día de trabajo. Los resultados de absorbancia se muestran en la Tabla 26. Los resultados de CV% de las absorbancias están comprendidos entre el 4'8% y el 7'7%, inferior al 10% establecido como criterio interno de aceptación para este parámetro; por tanto, la precisión intermedia es aceptable.

Tabla 26. Resultados de precisión intermedia en absorbancias, para las diluciones 0'005, 0'0025 y 0'00125 de un concentrado de FVIII.

Dil	Muestra ($\approx 10^0$ UI/ampolla)						Media	Desvest	CV%
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6			
0'005	0'933	0'819	0'915	0'879	0'852	0'906	0'8840	0'0427	4'8313
0'0025	0'519	0'459	0'495	0'464	0'458	0'463	0'4763	0'0250	5'2571
0'00125	0'263	0'217	0'252	0'226	0'251	0'227	0'2393	0'0184	7'6710

Se calculó la potencia de los tres ensayos independientes frente al BRP correspondientes al día 1 (Rep. 1 y 2), al día 2 (Rep. 3 y 4) y al día 3 (Rep. 5 y 6). Las potencias se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados de precisión intermedia para potencias.

Ensayo	LCL	Estimado	UCL
1	87'9	102'4	113'8
2	94'3	100'2	106'1
3	91'1	97'5	109'7

En condiciones de precisión intermedia, los resultados de CV% son inferiores al 10% establecido como criterio de aceptación.

5.2.6 Estudio de calidad.

5.2.6.1. Calidad de un ensayo.

Los requerimientos de calidad que debe cumplir cada lote de concentrado plasmático de FVIII, de acuerdo con la monografía de la Ph. Eur. son que la potencia asumida no sea menor del 80% ni superior al 120% y que los límites de confianza ($p = 0'95$) no sean inferiores al 80% ni superiores al 120% de la potencia estimada.

La Ph. Eur. define la potencia asumida como aquella que se asigna a una muestra antes de realizar el ensayo mientras que la potencia estimada es la calculada a partir de los resultados obtenidos en el ensayo. La potencia asignada corresponde a la potencia del estándar [Ph. Eur., 2014].

5.2.6.2. Gráficos individuales para errores residuales.

Como variable de calidad para la realización de los gráficos individuales del ensayo de FVIII se ha utilizado el error residual obtenido en los ANOVA correspondientes a un total de 210 ensayos independientes, como se muestra en la Tabla 28. Los errores residuales del ANOVA siguen una distribución χ^2 con los grados de libertad correspondientes a la suma de cuadrados residual ($n=6$). En la Figura 42 se muestra el histograma y las funciones de densidad simuladas: las líneas oscuras continua y discontinua representan el perfil de la distribución de los datos y el perfil una vez suavizado, respectivamente. La línea roja representa la distribución normal correspondiente a la media y desviación de los datos muestrales.

El test de normalidad de Shapiro-Wilk ($p\text{-valor} = 2,2 \times 10^{-16}$) pone de manifiesto la no normalidad de los datos.

Las gráficas para valores individuales son muy sensibles a la falta de normalidad de los datos por lo que los valores de errores residuales deben tratarse mediante una transformación que genere un conjunto de datos distribuido normalmente. Para ello, puede utilizarse la escalera de Tukey de transformaciones, aunque en nuestro caso, ya que los residuales siguen una distribución χ^2 , es conveniente utilizar la transformación de Krishnamoorthy [Krishnamoorthy K, 2006], derivada de Peizer et al [Peizer et al., 1968], para garantizar la obtención de una distribución normal a partir de una distribución χ^2 . Se utiliza la fórmula:

$$Y = \frac{X - n + \frac{2}{3} - \frac{0.08}{n}}{|X - n + 1|} \sqrt{\left((n-1) \ln \left(\frac{n-1}{X} \right) + X - n + 1 \right)}$$

donde X denota una variable aleatoria con n grados de libertad e Y representa la variable transformada. Substituyendo el valor $n = 6$, resulta:

$$Y = \frac{X - \frac{1996}{300}}{|X - 5|} \sqrt{\left(5 \ln \left(\frac{5}{X} \right) + X - 5 \right)}$$

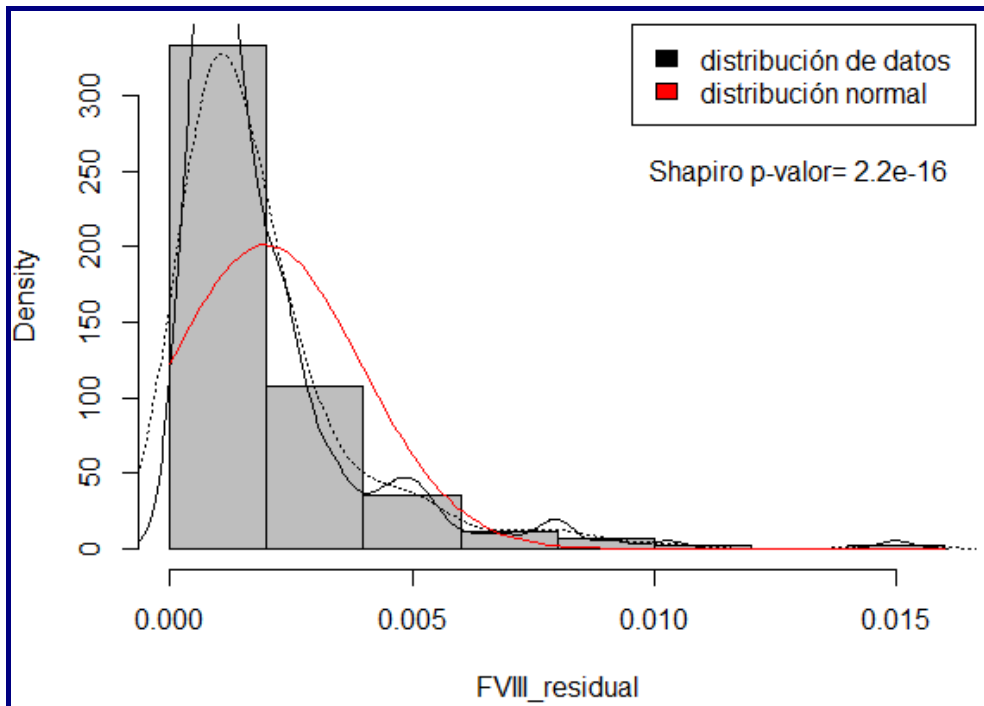


Figura 42. Histograma de errores residuales en ensayos de FVIII.

Tabla 28: Datos de errores residuales correspondientes a 210 ensayos individuales de FVIII

0'001035	0'001424	0'001721	0'000958	0'000836	0'007041	0'000769	0'002059
0'001604	0'000428	0'000743	0'001290	0'000895	0'000441	0'001580	0'000502
0'008010	0'000698	0'000710	0'003174	0'000994	0'002332	0'001582	0'001679
0'005294	0'001321	0'000540	0'001118	0'008199	0'002633	0'001981	0'000673
0'002274	0'001005	0'000342	0'001003	0'000393	0'004976	0'000278	0'001464
0'001733	0'001257	0'000891	0'002066	0'001337	0'000461	0'000915	0'000547
0'005094	0'004829	0'000716	0'000672	0'000994	0'001470	0'001508	0'001237
0'001659	0'004483	0'000422	0'002237	0'002089	0'003515	0'000521	0'001302
0'003997	0'000227	0'005069	0'001171	0'000813	0'001625	0'004665	0'004818
0'000329	0'000473	0'005366	0'002653	0'001073	0'009138	0'000571	0'002067
0'003219	0'000580	0'000551	0'000377	0'001294	0'014983	0'000888	0'000810
0'000837	0'001272	0'000814	0'002506	0'001042	0'001098	0'001159	0'000408
0'001712	0'000315	0'000976	0'000079	0'000660	0'001984	0'000782	0'002416
0'001154	0'001420	0'000522	0'000736	0'000409	0'002478	0'003171	0'001283
0'001991	0'000976	0'000816	0'002350	0'002523	0'001151	0'002109	0'010282
0'001667	0'001370	0'000731	0'003521	0'001459	0'002275	0'000176	0'001868
0'002184	0'000767	0'004059	0'006128	0'002511	0'000997	0'001663	0'005710
0'001110	0'001348	0'000731	0'000757	0'000380	0'000785	0'003682	0'002654
0'002763	0'002420	0'000958	0'004503	0'001784	0'001176	0'000588	0'002035
0'007802	0'000842	0'000590	0'001385	0'000148	0'001390	0'002211	0'001147
0'007854	0'000913	0'000335	0'000504	0'002262	0'000922	0'001652	0'001650
0'003467	0'004223	0'002492	0'003445	0'000586	0'001126	0'003262	---
0'002809	0'001169	0'001288	0'001197	0'002262	0'000859	0'006671	---
0'000713	0'001225	0'001641	0'002603	0'001130	0'004456	0'000716	---
0'002202	0'001410	0'002973	0'000418	0'001399	0'002141	0'000706	---
0'001321	0'000425	0'000280	0'001125	0'000757	0'001215	0'001068	---
0'003074	0'001500	0'002308	0'000522	0'002960	0'005301	0'002378	---

Los 210 datos transformados, según la expresión anterior, se muestran en la Tabla 29 y se representan en la Figura 15.

Tabla 29: Datos de errores residuales correspondientes a 210 ensayos individuales de FVIII, transformados [Krishnamoorthy K, 2006].

-6'54108	-6'40015	-6'31504	-6'57479	-6'63382	-5'64210	-6'66957	-6'23327
-6'34681	-6'91610	-6'68406	-6'44399	-6'60425	-6'90354	-6'35345	-6'84941
-5'57656	-6'71114	-6'70339	-6'03167	-6'55859	-6'17589	-6'35296	-6'32610
-5'78451	-6'43343	-6'81951	-6'50729	-5'56464	-6'11948	-6'25093	-6'72654
-6'18757	-6'55359	-7'00774	-6'55452	-6'95136	-5'81506	-7'09229	-6'38776
-6'31190	-6'45538	-6'60592	-6'23178	-6'42811	-6'88523	-6'59465	-6'81364
-5'80354	-5'82974	-6'69983	-6'72711	-6'55869	-6'38593	-6'37436	-6'46268
-6'33150	-5'86602	-6'92171	-6'19515	-6'22664	-5'98317	-6'83442	-6'43999
-5'92155	-7'17415	-5'80594	-6'48667	-6'64585	-6'34087	-5'84665	-5'83078
-7'02421	-6'87464	-5'77786	-6'11608	-6'52501	-5'50883	-6'79621	-6'23149
-6'02505	-6'78939	-6'81101	-6'96873	-6'44253	-5'24689	-6'60750	-6'64711
-6'63310	-6'45022	-6'64530	-6'14268	-6'53818	-6'51503	-6'49148	-6'93533
-6'31733	-7'04190	-6'56677	-7'58087	-6'73487	-6'25019	-6'66207	-6'15953
-6'49332	-6'40124	-6'83379	-6'68840	-6'93448	-6'14782	-6'03215	-6'44654
-6'24857	-6'56661	-6'64420	-6'17231	-6'13940	-6'49431	-6'22237	-5'44741
-6'32936	-6'41733	-6'69144	-5'98237	-6'38929	-6'18741	-7'27399	-6'27786
-6'20611	-6'67056	-5'91413	-5'71190	-6'14159	-6'55746	-6'33055	-5'74712
-6'51020	-6'42464	-6'69145	-6'67602	-6'96466	-6'66076	-5'96107	-6'11590
-6'09711	-6'15879	-6'57463	-5'86381	-6'29866	-6'48492	-6'78367	-6'23872
-5'58999	-6'63031	-6'78224	-6'41258	-7'34308	-6'41092	-6'20051	-6'49605
-5'58663	-6'59537	-7'01629	-6'84857	-6'18995	-6'59119	-6'33336	-6'33404
-5'98974	-5'89501	-6'14524	-5'99285	-6'78518	-6'50403	-6'01871	---
-6'08929	-6'48742	-6'44486	-6'47713	-6'18995	-6'62213	-5'66938	---
-6'70176	-6'46693	-6'33636	-6'12490	-6'50268	-5'86893	-6'69998	---
-6'20240	-6'40450	-6'06269	-6'92552	-6'40785	-6'21534	-6'70603	---
-6'43343	-6'91901	-7'08986	-6'50435	-6'67648	-6'47040	-6'52731	---
-6'04693	-6'37692	-6'18084	-6'83311	-6'06476	-5'78387	-6'16699	---

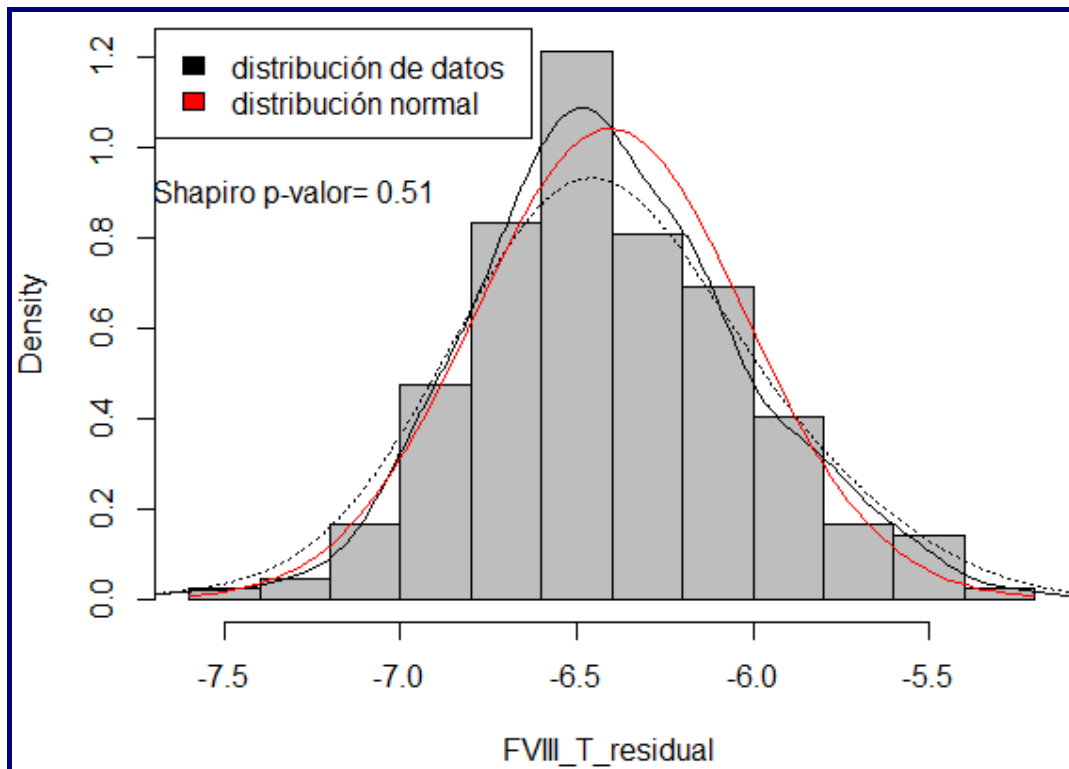


Figura 43. Histograma de errores residuales correspondientes a la Tabla 29.

Como se observa en la figura, los residuales transformados presentan una distribución normal y el test de normalidad de Shapiro-Wilk (p -valor = 0.51) muestra que Y sigue una distribución normal.

El gráfico (Figura 44) con los datos normalizados se realiza mediante la función `qqc` de R [Scrucca, 2004] para datos individuales. Los límites de tolerancia corresponden a los valores $LTL = -7.544587$ y $UTL = -5.26493$. Los puntos indicados en color amarillo indican que existen varios puntos consecutivos a un lado de la línea central.

Únicamente dos valores, los correspondientes a los residuales 94 y 146, respectivamente se encuentran fuera de los límites de tolerancia calculados (puntos en color rojo) pero ambos ensayos se consideraron válidos porque se cumplen los requerimientos fijados a priori de validez del ensayo. El gráfico de individuales permite detectar la debilidad del modelo de líneas paralelas, resuelto utilizando métodos paramétricos, tales como el ANOVA propuesto por la Ph. Eur. Técnicas alternativas están en distintas vías de desarrollo.

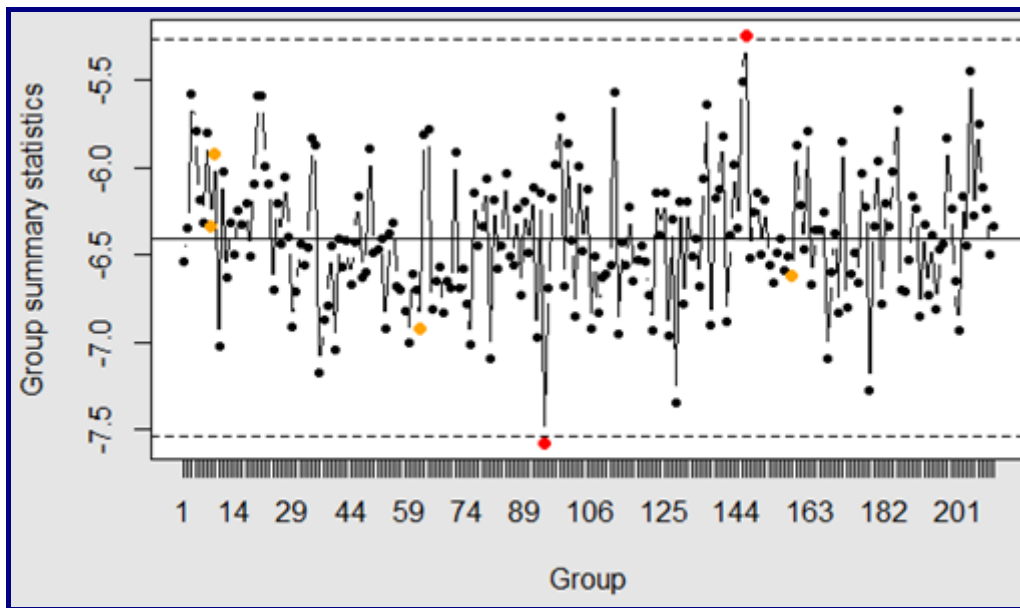


Figura 44. Gráfico de control para errores residuales transformados del ensayo de FVIII.

Cuando el resultado de un error residual es tan bajo (dato 94, $ER = 0'000079$) se recomienda la substitución de este valor por la media histórica del error residual ($ER = 0'00186$) en la hoja de cálculo de Combistats[®] del ensayo correspondiente.

Para investigar el motivo de un resultado de error residual tan alto (dato 146, $ER = 0'0149834$), ha sido revisado el análisis de actividad de FVIII correspondiente a este resultado: este ensayo cumple todos los requisitos exigidos por la monografía de FVIII donde los p -valores obtenidos para no paralelismo y no linealidad son estadísticamente no significativos (p -valor $> 0'05$) y corresponden a $0'255$ y $0'874$, respectivamente.

Como todos los parámetros del ensayo son válidos, se considera que se trata de un valor que queda fuera de los límites de confianza debido a la probabilidad del 5% de que existan datos que caigan fuera de los límites.

Una vez establecidos los límites de tolerancia para el ensayo de actividad de FVIII ($LTL = -7'546342$ y $UTL = -5'282113$), se repite el gráfico de control con los resultados obtenidos durante el año 2014, correspondientes a un total de 54 análisis individuales de FVIII (Figura 45).

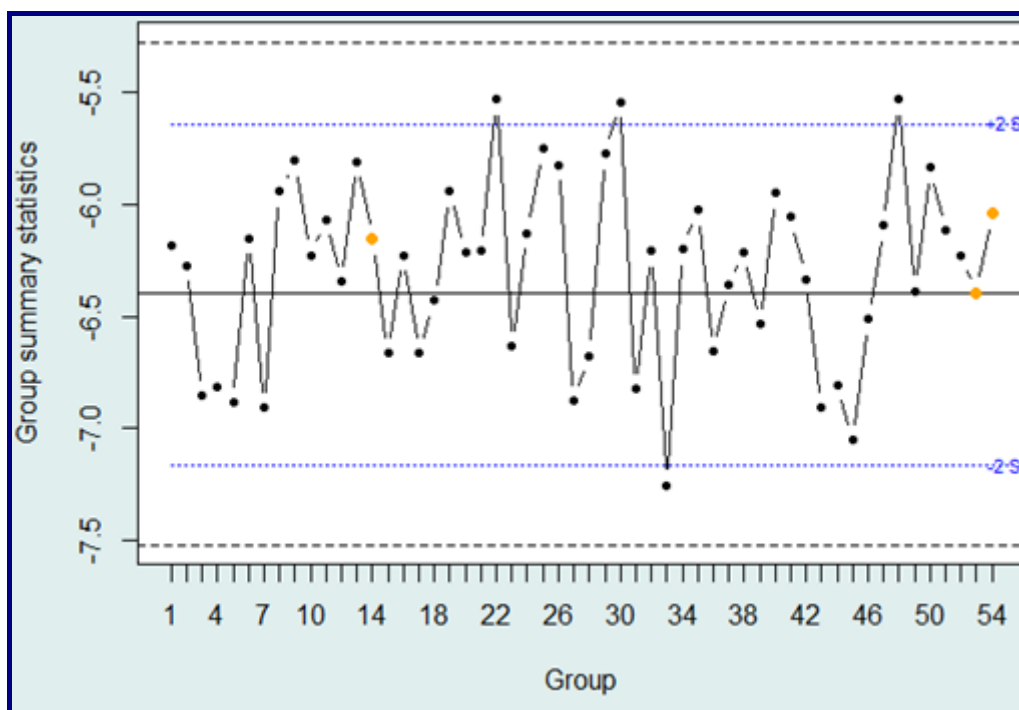


Figura 45. Gráfico de control para el análisis de FVIII en el año 2014.

Todos los resultados se encuentran dentro de los límites de control establecidos.

5.3. BIOENSAYO DE FACTOR von WILLEBRAND.

5.3.1. Fundamentos del método de análisis.

Desde 1971 se conoce que el antibiótico ristocetina produce trombocitopenia e induce la agregación plaquetaria en un plasma rico en plaquetas [Nachman et al., 1977], siempre y cuando esté presente en el plasma el FvW [Coller et al., 1977] [Coller, 1978]. Esta característica se utiliza en el ensayo de actividad del FvW. La monografía de la Ph. Eur. que indica los requerimientos que hay que cumplir para este ensayo es la 2.7.21. *Ensayo de Factor von Willebrand*. Existen dos ensayos para analizar su actividad biológica: cofactor de ristocetina y unión a colágeno. Sin embargo, como indica la Farmacopea, en esta tesis se ha realizado la determinación de la actividad de FvW mediante el ensayo de cofactor de ristocetina [Bowyer et al., 2011] [Lippi et al., 2008] [Patzke et al., 2010], utilizando el analizador automático ACL[®], modelo ELITE PRO, descrito anteriormente y desarrollado para diagnóstico y no para fármacos. El desarrollo del ensayo es muy similar al definido para el ensayo cromogénico de FVIII: se analiza la muestra mediante la comparación con un estándar internacional de FvW [Redaelli et al., 2005], valorado para cofactor de ristocetina. Este ensayo no exige llegar a una dilución tan grande como en el caso del FVIII; por tanto, no es necesario llevar a cabo diluciones en copa previamente a las diluciones de trabajo programadas en el rotor. A partir de dos preparaciones de estándar y muestra de 1 UI/ml, el equipo realiza las diluciones de trabajo 1/16, 1/8 y 1/4 mediante diluciones en línea.

Para la puesta a punto se necesitan dos reactivos: plaquetas, que se agregan en presencia del FvW y de un segundo reactivo, la ristocetina. La agregación plaquetaria será mayor cuanto mayor sea la concentración de FvW presente en la mezcla de reacción [Hillarp et al., 2010] [Lawrie et al., 2011].

5.3.2. Puesta a punto del ensayo de FvW.

Son varios los parámetros que deben optimizarse para conseguir un método de análisis adecuado, tal y como se exponen a continuación:

5.3.2.1. Diluciones de trabajo.

Se estudiaron dos series de 5 diluciones seriadas, con razón de diluciones 1'5 y 2. En la Tabla 30 se muestran dichos resultados en absorbancias y sus coeficientes de variación.

Tabla 30. Resultados de absorbancias para 2 series de diluciones y CV(%).

Factor de dilución	1/1'33	1/2	1/3	1/4,5	1/6'75
1'5	0'517	0'489	0'480	0'458	0'423
	0'502	0'484	0'453	0'438	0'421
	0'512	0'503	0'472	0'459	0'438
	0'521	0'503	0'494	0'460	0'425
CV(%)	1'60	1'97	3'60	2'32	1'80
Factor de dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
2'0	0'530	0'522	0'503	0'457	0'425
	0'532	0'523	0'501	0'449	0'429
	0'533	0'530	0'503	0'449	0'432
	0'534	0'524	0'501	0'443	0'429
CV(%)	0'32	0'68	0'23	1'28	0'67

Como se muestra en la tabla, la variabilidad entre valores en las mismas condiciones experimentales (dilución 1/2) presenta menor variabilidad (CV% = 0'32) frente a la correspondiente a un factor de dilución 1'5 (CV% = 1'97). En la Figura 46, se representan los valores medios y sus desviaciones estándar para los datos mostrados en la Tabla 30.

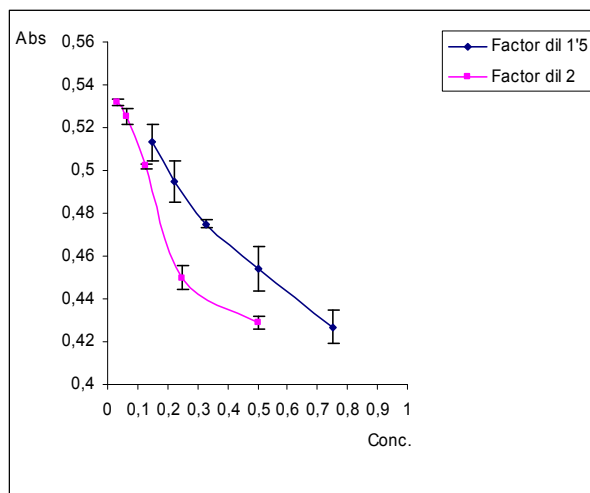


Figura 46. Absorbancia frente a concentraciones para las diluciones (♦ dil 1'5; ■ dil 2.)

Como se observa en la figura, los ensayos realizados con factor de dilución 2 presentan un valor medio mayor y una barra de desviación típica menor. Como resultado de este estudio se fija la razón de dilución 2 para el ensayo.

5.3.2.2. Velocidad de centrifugación.

La velocidad de centrifugación recomendada por el fabricante de los reactivos para la realización de este ensayo es 600 rpm. Sin embargo, también se dispone en el equipo de una velocidad de 1200 rpm, recomendada por otros fabricantes. Por lo tanto, se han realizado ensayos con ambas velocidades.

En la Figura 47 se muestran los perfiles de los dos ensayos donde se han utilizado ambas velocidades de centrifugación. Los perfiles obtenidos, para todas las diluciones, a 600 rpm, muestran mayor ruido que los obtenidos a 1200 rpm, para los cuales el nivel de ruido es prácticamente nulo.

Como consecuencia de este estudio la velocidad de centrifugación se fija en 1200 rpm.

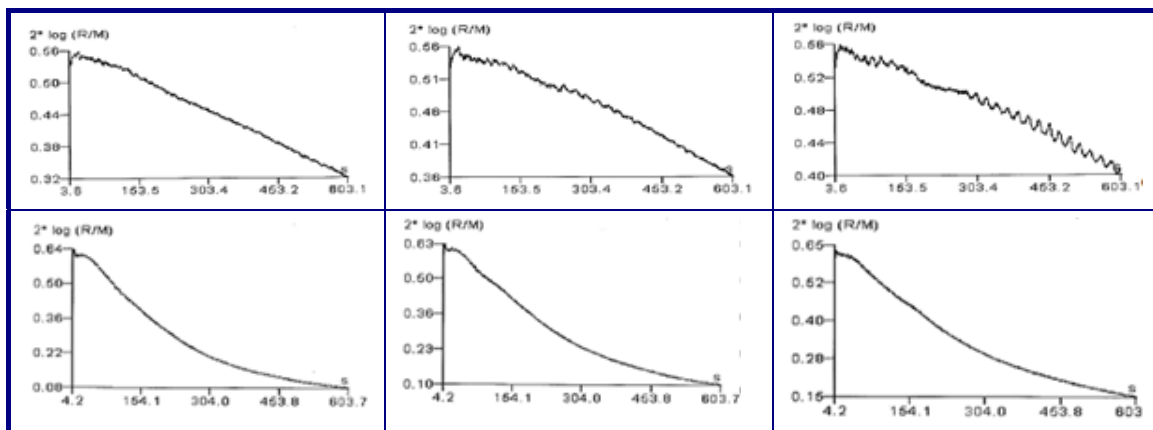


Figura 47. Resultados para la velocidad de centrifugación de 600 y 1200 rpm.

5.3.2.3. Tiempo de lectura.

El tiempo de lectura máximo recomendado para el ensayo es de 10 minutos [Redaelli et al., 2005]. Se realizaron dos replicados en las mismas condiciones: 5 diluciones, factor de dilución 2 y velocidad de centrifugación de 1200 rpm. Los 10 tiempos de lectura programados hasta 10 minutos (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 y 600 segundos) fueron seleccionados entre los 1200 datos que registra el aparato. En la Tabla 31 se muestra, para los dos replicados seriados, las absorbancias, la correlación lineal y el coeficiente de determinación (r^2).

Tabla 31. Resultados de absorbancia para 2 replicados seriados con TL = 10 minutos.

SERIE 1 (s)	Log(concentración)					Correlación	r ²
	-0'3010	-1'5051	-0'6021	-0'9031	-1'2041		
100	0'452	0'513	0'478	0'496	0'508	0'965	0'930
150	0'354	0'458	0'394	0'424	0'447	0'979	0'958
200	0'274	0'406	0'316	0'352	0'389	0'992	0'984
250	0'216	0'359	0'252	0'292	0'338	0'995	0'990
300	0'172	0'318	0'203	0'243	0'294	0'995	0'990
350	0'142	0'285	0'168	0'205	0'259	0'993	0'986
400	0'120	0'258	0'141	0'176	0'231	0'990	0'980
450	0'104	0'234	0,120	0,153	0'207	0'985	0'971
500	0'091	0'212	0,104	0,132	0'186	0'980	0'960
600	0'073	0'175	0,081	0,103	0'154	0'970	0'941

SERIE 2 (s)	Log(concentración)					Correlación	r ²
	-0'3010	-1'5051	-0'6021	-0'9031	-1'2041		
100	0'41	0'48	0'45	0'49	0'49	0'832	0'692
150	0'32	0'41	0'36	0'40	0'42	0'924	0'854
200	0'24	0'36	0'28	0'33	0'35	0'967	0'936
250	0'18	0'31	0'22	0'26	0'29	0'985	0'971
300	0'14	0'27	0'18	0'21	0'25	0'994	0'987
350	0'11	0'23	0'14	0'18	0'21	0'998	0'996
400	0'09	0'21	0'12	0'15	0'18	0'998	0'995
450	0'08	0'18	0'10	0'13	0'16	0'996	0'991
500	0'07	0'16	0'08	0'11	0'14	0'994	0'988
550	0'06	0'15	0'07	0'10	0'13	0'991	0'983
600	0'05	0'13	0'06	0'08	0'11	0'986	0'972

Los intervalos de tiempo para los cuales se observan los mejores valores de correlación lineal no se mantienen constantes entre series. Los ensayos que cumplen el criterio de aceptación de correlación que se ha fijado ($r \geq 0'99$), oscilan entre 200 y 400 segundos en la serie 1 y entre 300 y 550 segundos en la serie 2.

5.3.2.4. Concentración de ristocetina.

Se utiliza una concentración de ristocetina de 10 mg/ml, siguiendo la recomendación del fabricante. Para verificar este dato, se realizaron análisis de un mismo lote, en las condiciones fijadas, con 5 diluciones de ristocetina: 1, 5, 10, 12'5 y 15 mg/ml. Como se observa en la Tabla 32, los resultados mostraron coeficientes de variación similares con las concentraciones de 12'5 mg/ml y 10 mg/ml de ristocetina. Se elige ésta última como la concentración más favorable para la realización de los ensayos de FvW porque supone un ahorro importante dado el elevado coste de la ristocetina (hacer el ensayo con un vial de ristocetina frente a tener que utilizar dos viales, para el mismo ensayo). En la

Figura 48 se muestra el perfil obtenido para las tres diluciones de las cinco concentraciones de ristocetina. Los perfiles para las tres diluciones son muy similares para las concentraciones de ristocetina de 10, 12'5 y 15 mg/ml. En el caso de una concentración de ristocetina de 5 mg/ml, se observa que la variabilidad de los resultados de absorbancia es mayor. Cuando la concentración es de 1 mg/ml de ristocetina, los perfiles para las tres diluciones estudiadas muestran mucha variabilidad, siendo ésta muy grande en la dilución 1/16. Estos resultados, también confirman la utilización de 10 mg/ml de ristocetina para el ensayo de FvW.

Tabla 32. Resultados en absorbancias para distintas concentraciones de ristocetina.

Concentración Ristocetina (mg/ml)	Dilución estándar FvW	Resultado (absorbancias) Ensayo 1	Resultado (absorbancias) Ensayo 2	CV%
15	1/4	0'753	0'738	1'423
15	1/8	0'690	0'678	1'240
15	1/16	0'640	0'649	0'987
12'5	1/4	0'674	0'665	0'951
12'5	1/8	0'630	0'627	0'337
12'5	1/16	0'586	0'579	0'850
10	1/4	0'657	0'648	0'975
10	1/8	0'615	0'607	0'926
10	1/16	0'565	0'565	0'0
5	1/4	0'494	0'500	0'854
5	1/8	0'464	0'476	1'805
5	1/16	0'411	0'406	0'865
1	1/4	0'219	0'232	4'076
1	1/8	0'222	0'231	2'810
1	1/16	0'227	0'225	0'626

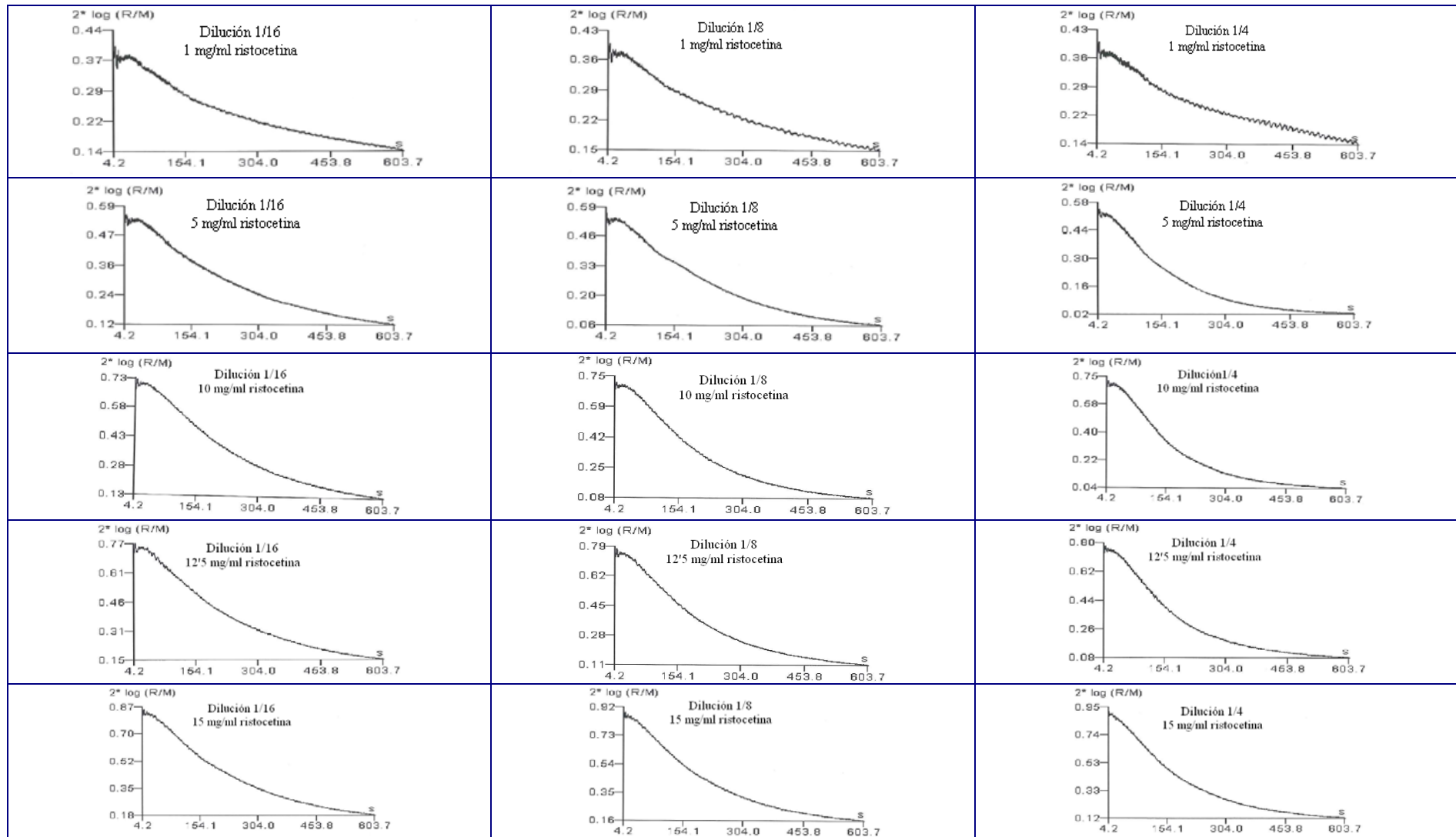


Figura 48. Optimización de la concentración de ristocetina para tres diluciones y cinco concentraciones de ristocetina.

5.3.3 Determinación de potencia de concentrados de FVIII con FvW.

El análisis de determinación de cofactor de ristocetina para FvW se realiza en concentrados de FVIII que tienen en su composición FvW. Las condiciones para los ensayos de potencia en concentrados de FVIII con indicación de FvW, basadas en el estudio anterior, se fijaron para los ensayos de la determinación de potencia que, según el esquema representado en la Figura 49 implican: una predilución de las preparaciones, estándar y muestra, hasta una concentración de 1 UI/ml. Las diluciones de trabajo (0'0625, 0'125 y 0'25 UI/ml) se obtienen como diluciones en línea (1/16, 1/8 y 1/4). De todas las diluciones de estándar y muestra se hacen 2 series de 3 diluciones.

Una vez fijadas las condiciones experimentales, se realizan los ensayos de lotes de concentrados comerciales de FVIII con indicación de FvW con el objeto de evaluar su contenido como potencia, expresando finalmente su resultado en UI/vial.

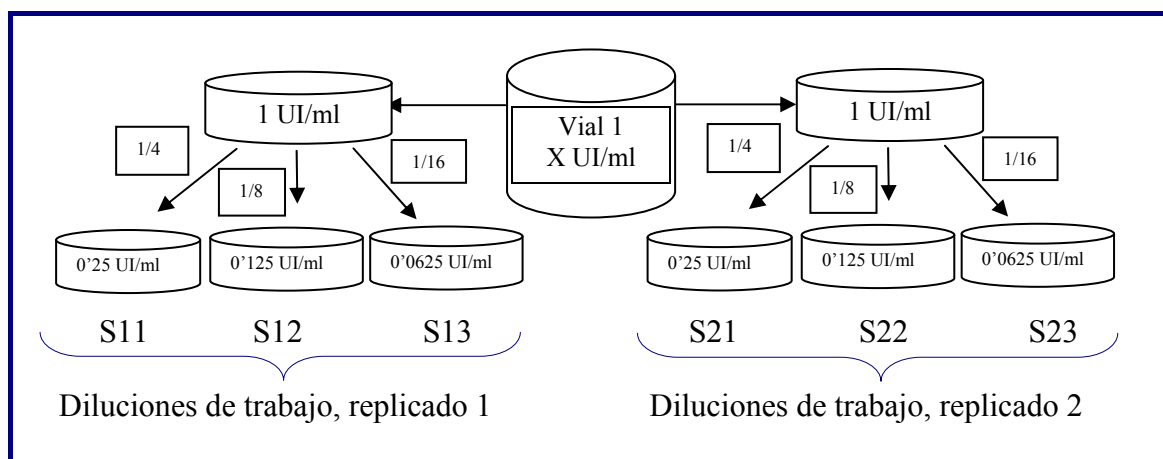


Figura 49. Series de diluciones de trabajo para el vial de estándar (S). El diseño es similar para la muestra.

5.3.4. Análisis estadístico de datos.

El tratamiento de los datos experimentales se ha realizado según la metodología descrita en el punto 4 de esta tesis. A modo de ejemplo, en la Tabla 33, se presentan datos obtenidos utilizando un lote comercial X-1 de concentrado de FVIII con indicación de FvW.

Tabla 33. Resultados de un ensayo para FvW.

Dosis	STD	Muestra	Absorbancia
0'25	1	0	0'648
0'25	1	0	0'660
0'125	1	0	0'603
0'125	1	0	0'601
0'0625	1	0	0'545
0'0625	1	0	0'543
0'25	0	1	0'659
0'25	0	1	0'661
0'125	0	1	0'601
0'125	0	1	0'619
0'0625	0	1	0'550
0'0625	0	1	0'560

5.3.4.1. Análisis con Combistats[®].

Los valores de absorbancia obtenidos para estándar y muestra se incluyen en el software Combistats[®]. En la Figura 50 se presentan los resultados del análisis correspondiente a los datos de la Tabla 33. Al principio de la hoja de salida de resultados se muestra la identificación del ensayo (1); en el apartado siguiente (2) se presentan los datos experimentales del estándar y la muestra, incluyendo el valor de la potencia asignada, 1 IU/ml. A continuación se define el modelo, el diseño, la ausencia de transformación aplicada a los datos y el modelo de varianza elegido. Asimismo, la pendiente común en el ajuste lineal y el coeficiente de correlación (3). En cuarto lugar, se muestran los resultados del análisis de varianza. Para estos datos, el ANOVA verifica el cumplimiento de todos los requerimientos de validez del ensayo, en cuanto a regresión, no paralelismo y no linealidad, de acuerdo al nivel de significación estadístico al 95% (4). El apartado siguiente (5) presenta los resultados de interés en forma de tabla que incluye la potencia del FvW y su intervalo de confianza al 95%, estimada a partir de los datos según el modelo prefijado. Además, la tabla incluye dos potencias relativas y sus intervalos al 95%, una respecto a la potencia asignada y otra respecto a la potencia estimada. Finalmente Combistats[®] presenta un informe gráfico (6).

5.3.4.2. *Análisis con Excel[®]*

En la Figura 51 se presenta el resultado del análisis obtenido con Excel[®] para los mismos datos: en primer lugar, se hace referencia al análisis realizado y al modelo elegido (1); en segundo lugar, la tabla de datos de estándar y muestra, indicando que no aplica ninguna transformación en los resultados de absorbancia (2). A continuación, se incluyen los cálculos previos necesarios al análisis de la varianza (3). En cuarto lugar, se presenta el informe gráfico y el coeficiente de determinación para cada recta (4). También se muestran los resultados del análisis de varianza donde el ANOVA verifica el cumplimiento de todos los requerimientos de validez del ensayo, en cuanto a regresión, no paralelismo y no linealidad, de acuerdo al nivel de significación estadístico al 95% (5). Finalmente, se presenta la pendiente común y el cálculo de la potencia y de los límites de confianza (6). Además, se presenta una tabla que resume las dos potencias relativas y sus intervalos al 95%, una respecto a la potencia en relación a la concentración de partida (1 UI/ml) y otra respecto a la potencia estimada (7).



Substance	Factor VIII comercial, lote B
Method	Cofactor de ristocetina
Assay number	X-1
Technician	Analista
Date of assay	2013

Remarks: Análisis 1

(1)

Standard			
Id.	Estándar OMS		
Ass. pot.	1 UI/ml		
Doses	0.25 UI	0.125 UI	0.0625 UI
(1)	0.648	0.603	0.545
(2)	0.660	0.601	0.543

Sample 1			
Id.	X-1		
Ass. pot.	1 UI/ml		
Doses	0.25 UI	0.125 UI	0.0625 UI
(1)	0.659	0.601	0.550
(2)	0.661	0.619	0.560

(2)

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = y$

Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.0775449 (0.0706541 to 0.0844356)

Correlation |r|: 0.993149

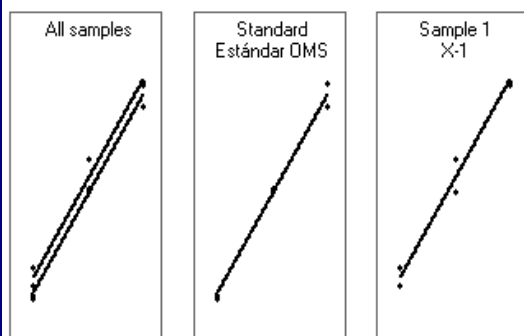
(3)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.000208333	0.000208333	4.310	0.083
Regression	1	0.0231125	0.0231125	478.190	0.000 (****)
Non-parallelism	1	1.25000E-05	1.25000E-05	0.259	0.629
Non-linearity	2	2.03333E-05	1.01667E-05	0.210	0.816
Standard	1	1.20000E-05	1.20000E-05	0.248	0.636
Sample 1	1	8.33333E-06	8.33333E-06	0.172	0.692
Treatments	5	0.0233537	0.00467073	96.636	0.000 (****)
Residual error	6	0.000290000	4.83333E-05		
Total	11	0.0236437	0.00214942		

(4)

Sample 1			
Id.	X-1		
(UI/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	0.980973	1.11345	1.26727
Rel. to Ass.	98.1%	111.3%	126.7%
Rel. to Est.	88.1%	100.0%	113.8%

(5)



(6)

Figura 50. Análisis mediante Combistats® de actividad de FvW.

Farmacopea Europea		Pág 542 versión española		Rectas PARALELAS					
Datos de la Muestra		M1		Valoración Factor vW					(1)
	Referencia S		Preparación T			Transformación			
	S1	S2	S3	T1	T2	T3	No aplica		
absorbancias	0.648	0.603	0.545	0.659	0.601	0.55	Ymedia		(2)
	0.660	0.601	0.543	0.661	0.619	0.560	0.6042		
(y-Ymedia) ²	0.00192	0.00000	0.00350	0.00301	0.00001	0.00293	Suma(y-Ymedia) ²		
	0.00312	0.00001	0.00374	0.00323	0.00022	0.00195	0.023644		
				Ref S	Prep T				
Ps Pr: Suma total de la preparación S1+S2+.. Sd				1.8	1.8				
Ls: Contraste lineal '1*S1+2*S2+3*S3+...-1/2				-0.11	-0.11				
d: No de diluciones diferentes				3					
n: nº de replicados por dilución				2					
h: donde h= refer+Nº muestras= total preparación				2					(3)
Hp	n/d			0.667					
H _L	12*n/(d ³ -d)			1					
K	n(Ps+Pt+...) ² /hd			4.380208					
SSprep	Hp(Ps ² +Pt ² +...)-K			0.00021					
SSreg	1/h*H _L *(Ls+Lt+...) ²			0.023113					
SSpar	H _L *(Ls ² +Lt ² +...)-SSreg			0.000012					
SSlin	SSstrat-SSprep-SSreg-SSpar			0.000020					
SSstrat	n*(S ₁ ² +.....+S _d ² +T ₁ ² +.....+T _d ² +U ₁ ² ...			0.023354					
SSres	SStot-SSstrat			0.00029					
SStot	suma((y-Ymed) ²)			0.02364					
Fuente de variación	G de libert	Suma de cuadrados	F	Probabilidad (p-valor)					(4)
Preparaciones (h-1)	1	0.00021	0.00021	4.3	0.0832	CONFORME no significativa			
Regresión (1)	1	0.0231	0.02311	478.2	0.0000	CONFORME Regresión significativa			
No paralelismo (h-1)	1	0.000012	0.00001	0.26	0.629	CONFORME no significativa			
No linealidad Gl= h(d-2)	2	0.00002	0.00001	0.2	0.816	CONFORME no significativa			(5)
Tratamientos hd-1	5	0.023	0.00467	96.6	0.000	CONFORME diluciones diferentes			
Error residual aleatorizado	6	0.00029	0.000048						
Total	11	0.0236							
Pendiente b HL(Ls+Lt+...)/I * n*h				-0.07754					(7)
I es ln de la relación de dosis		2	0.693						
dosis	0.25	0.125	0.0625						
M _T	P _T - P _S /db			-0.10746		Ln de los Limites de confianza			
C	SSreg / (SSreg-s ² t ²)	(6)	1.01268			C*MT ± (C-1*(C*Mt+2V)) ^{1/2} -0.1088 ± 0.12804			
t student para p=0,05 gl= 6		2.44691				Tomando antilogaritmos, la razón de potencias sera			
s	error residual medio	0.000048				0.79	0.90	1.02	
V	SSreg / b ² *n*d		0.640604			Potencia Muestra	0.980973	1.115	1.2673
						Relativo al estim	87.98204	100	113.66
									UI/mL
									%

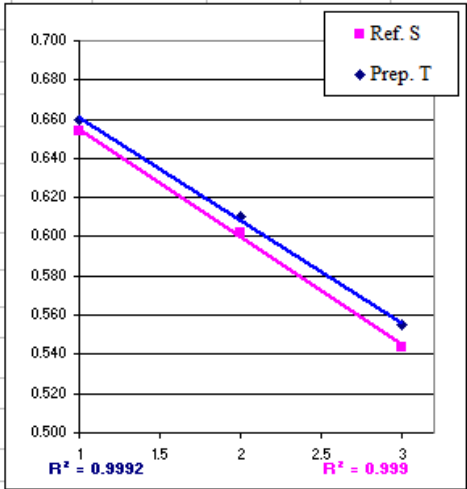


Figura 51. Análisis mediante Excel® de actividad de FvW.

5.3.4.3. Análisis con el paquete estadístico R.

En la Figura 52, se presenta el resultado que produce R al cargar los datos experimentales utilizando el script 1 correspondiente a la entrada de datos.

A) Conjunto de datos, información reducida				B) Conjunto de datos con la información ampliada comprendiendo todas las posibles causas de varianza				
<code>> datp1</code>				<code>> datp1</code>				
	Response	Treat	Dose	Response	Treat	Dose	Serie	doslevel
1	0.648	S	0.2500	1	0.648	S	0.2500	a A
2	0.603	S	0.1250	2	0.603	S	0.1250	a B
3	0.545	S	0.0625	3	0.545	S	0.0625	a C
4	0.659	T	0.2500	4	0.659	T	0.2500	a A
5	0.601	T	0.1250	5	0.601	T	0.1250	a B
6	0.550	T	0.0625	6	0.550	T	0.0625	a C
7	0.660	S	0.2500	7	0.660	S	0.2500	b A
8	0.601	S	0.1250	8	0.601	S	0.1250	b B
9	0.543	S	0.0625	9	0.543	S	0.0625	b C
10	0.661	T	0.2500	10	0.661	T	0.2500	b A
11	0.619	T	0.1250	11	0.619	T	0.1250	b B
12	0.560	T	0.0625	12	0.560	T	0.0625	b C

Figura 52. Disposición de los datos analíticos en el paquete estadístico R

La Figura 53 muestra el resultado, según el script 2 del punto 4, correspondiente al modelo de líneas paralelas utilizado. En primer lugar presenta un resumen de estadísticos muestrales de los residuales, los coeficientes de regresión, su error estándar y su significación estadística al 95%, utilizada por defecto. Finalmente, presenta índice de bondad de ajuste.

```

>summary(Result_3)
Call:
lm(formula = Response ~ log10(Dose) + Treat, data = datp1)
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.007333 -0.003583 -0.001167  0.003604  0.010667

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  0.761250   0.006807  111.84 1.85e-15 ***
log10(Dose)  0.178554   0.007034   25.38 1.10e-09 ***
TreatT       0.008333   0.003458    2.41 0.0393 *
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.005989 on 9 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9863,    Adjusted R-squared:  0.9833
F-statistic: 325.1 on 2 and 9 DF, p-value: 4.061e-09
    
```

Figura 53. Estudio de regresión con el paquete estadístico R.

Aunque el paquete estadístico R define cada uno de los parámetros de ANOVA de manera diferente a como se definen en los programas Combistats® y Excel®, el análisis de la varianza aporta los mismos resultados. Utilizando las instrucciones de R en el script 3, se obtiene la Figura 54, que presenta el análisis de varianza realizado para contrastar las condiciones que debe cumplir el ensayo.

```

> ANOVA2 <- lm(Response ~ log10(Dose)*Prep*doslevel, data=datpl)
> anova(ANOVA2) Analysis of Variance Table. Response: Response

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
log10(Dose)	1	0.0231125	0.0231125	478.1897	5.974e-07 ***
Prep	1	0.0002083	0.0002083	4.3103	0.08318 .
doslevel	1	0.0000202	0.0000202	0.4172	0.54222
log10(Dose):Prep	1	0.0000125	0.0000125	0.2586	0.62922
Prep:doslevel	1	0.0000002	0.0000002	0.0034	0.95508
Residuals	6	0.0002900	0.0000483		

```

> aov(ANOVA2)
Call: aov(formula = ANOVA2)
Terms:

```

	log10(Dose)	Prep	doslevel	log10(Dose):Prep	Prep:doslevel
Sum of Squares	0.0231125	0.000208333	0.000020167	0.000012500	0.000000167
Deg. of Freedom	1	1	1	1	6

```

Residuals Sum of Squares 0.000290000 Deg. of Freedom 6

```

Figura 54. ANOVA con el paquete estadístico R.

En la Figura 55 se presenta el gráfico correspondiente al modelo de líneas paralelas para el ensayo de FvW en concentrados de FVIII con indicación de FvW (script 4).

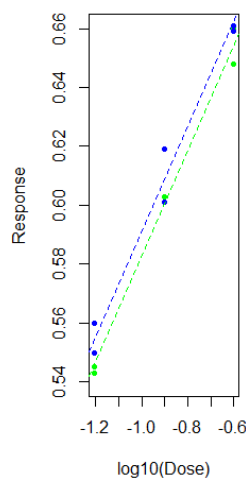


Figura 55. Representación gráfica del modelo de líneas paralelas.

En la Figura 56 se muestra la hoja de salida de los resultados de la potencia y los intervalos de confianza obtenidos utilizando el script 5 incluido en el capítulo 4.

```

> CI1 <- gsci.ratio(est=coef(fitpl1), vcmat=vcov(fitpl1),
+                 degfree=fitpl1$df.residual,
+                 Num.Contrast=numc, Den.Contrast=denc,
+                 adjusted=TRUE,
+                 conf.level = 0.975) #two.sided --> 0.95 is for one side
>
> CI1 #muestra los resultados obtenidos
Simultaneous 97.5% confidence intervals
Degree of freedom:9, quantile:2.685
      estimate lower upper
estimate 0.04667 -0.00533 0.09973
> plot(CI1) #presenta un gráfico con el intervalo de confianza
>
> # Una vez obtenidos los antilogaritmos, tendremos:
> # la potencia estimada; límite inferior; límite superior
> 10^CI1$estimate; 10^CI1$conf.int[1,1]; 10^CI1$conf.int[1,2]
      estimate
estimate 1.113452
      lower
0.9878034
      upper
1.258138

```

Figura 56. Hoja de salida de resultados R de actividad de FvW.

5.3.4.4 Comparación de los resultados obtenidos mediante los tres software.

Una vez puesto a punto el ensayo de actividad del FvW se realizó el análisis en concentrados de FVIII con indicación de FvW con ayuda de los tres programas de cálculo Combistats[®], Excel[®] y el paquete estadístico R. En la Tabla 34 se muestran los resultados de potencia obtenidos para 10 ensayos de concentrados de FVIII con FvW analizados y sus correspondientes límites de confianza.

Tabla 34. Resultados de potencia de FvW con tres software.

Combistats®			Excel®			R		
Inferior	Estimado	Superior	Inferior	Estimado	Superior	Inferior	Estimado	Superior
0'98086	1'11416	1'26904	0'98097	1'11497	1'26727	0'98780	1'11345	1'25814
0'96365	1'07181	1'19356	0'96411	1'07202	1'19199	0'93451	1'07137	1'23077
0'89782	1'02117	1'16210	0'89898	1'02132	1'16030	0'89317	1'02102	1'16786
0'98709	1'12943	1'29676	0'98784	1'13058	1'29394	0'99339	1'12862	1'28627
0'96439	1'09140	1'23771	0'96474	1'09198	1'23600	0'97140	1'09082	1'22718
1'03424	1'13424	1'24600	1'03488	1'13433	1'24334	1'03865	1'13338	1'23860
0'86245	0'99073	1'13777	0'86337	0'99064	1'13667	0'86490	0'99078	1'13468
0'84868	0'95344	1'07008	0'84993	0'95325	1'06913	0'84954	0'95369	1'06957
0'94868	1'07732	1'22570	0'94919	1'07788	1'22401	0'94075	1'07685	1'23527
0'86396	0'96014	1'06629	0'86539	0'96003	1'06502	0'82263	0'96033	1'11941

Los valores estimados con los tres software son muy similares en los 10 concentrados analizados, tanto en lo que respecta a la estimación de la potencia como a sus límites de confianza.

5.3.4. Validación del ensayo de FvW.

Los parámetros estudiados en la validación del ensayo de FvW fueron los mismos que se realizaron en la validación del FVIII. La linealidad, de acuerdo con el método de líneas paralelas se verifica en cada ensayo, de manera que sin la hipótesis de linealidad, el ensayo no es válido. No es necesario calcular ni el límite de detección (LOD) ni el límite de cuantificación (LOC) puesto que se trata de una valoración de la actividad con una concentración nominal de FvW preparada en un intervalo de concentración determinado [Collazo et al., 2011].

5.3.4.1. Calibración del ACL[®]: Recta de calibración.

La linealidad se estimó mediante la preparación de diluciones seriadas del estándar de la OMS en vigor. El intervalo de concentraciones seriadas comprendía desde 0'03125 UI/ml (1/32) hasta 0'5 UI/ml (1/2).

La concentración se expresa en UI/ml (variable x) y la respuesta en Δ (incremento) de absorbancia (variable y), calculando la regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados, a partir de la transformación semilogarítmica, $x \longrightarrow \log x$.

En las Tablas 35 a 40 se muestran los resultados, el coeficiente de correlación (r), la ordenada en el origen (intersección), la pendiente (b), el análisis de varianza y la representación gráfica de la recta de regresión, obtenidos con el programa informático Statgraphics[®] y correspondientes a los tres ensayos independientes realizados en el equipo automático ACL[®].

Todos los resultados obtenidos cumplen los criterios de aceptación para el coeficiente de correlación ($r \geq 0'98$) y el coeficiente de determinación ($r^2 > 0'96$).

Tabla 37. Resultados linealidad para el ensayo en el día 2.

CONCENTRACIÓN		Absorbancias
UI/ml FvW	Log UI/ml FvW	
0'5	-0'3010	0'540
0'25	-0'6021	0'502
0'125	-0'9031	0'437
0'0625	-1'2041	0'365
0'03125	-1'5051	0'303

La ecuación del modelo ajustado es: $y = 0'612703 + 0'202975 \cdot \log x$.

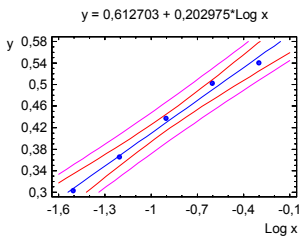
En la Tabla 38 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados.

Tabla 38. Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 2.

Parámetro	Error Estimación	Estadístico estándar	T	p-valor
Ordenada	0'612703	0'0113863	53'8106	0'0000
Pendiente	0'202975	0'0114047	17'7976	0'0004

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	p-valor
Modelo	0'0373316	1	0'0373316	316'75	0'0004
Residuo	0'000353571	3	0'000117857		

Total (Corr.)	0'0376852	4
Coefficiente de Correlación (r)	= 0'995298	
R-cuadrado	= 99'0618 por ciento	
Error estándar de est.	= 0'0108562	
Error absoluto medio	= 0'00764503	
Estadístico de Durbin-Watson	= 1'89301 (P=0'1455)	
Autocorrelación residual en Lag 1	= - 0'162034	



$y = 0,612703 + 0,202975 \cdot \text{Log } x$

En la Tabla 39 se muestran los resultados de absorbancias para el ensayo realizado el día 3.

Tabla 39. Resultados linealidad para el ensayo en el día 3.

CONCENTRACIÓN		Absorbancias
UI/ml FvW	Log UI/ml FvW	
0'5	-0'3010	0'548
0'25	-0'6021	0'518
0'125	-0'9031	0'455
0'0625	-1'2041	0'346
0'03125	-1'5051	0'304

La ecuación del modelo ajustado es: $y = 0'632203 + 0'219253 \cdot \log x$

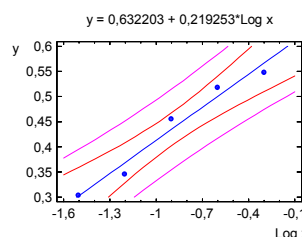
En la Tabla 40 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados.

Tabla 40. Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 3.

Parámetro	Error Estimación	Estadístico estándar	T	p-valor
Ordenada	0'632203	0'0240515	26'2854	0'0001
Pendiente	0'2192535	0'0240903	9'10128	0'0028

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	p-valor
Modelo	0'0435592	1	0'0435592	82'83	0'0028
Residuo	0'0015776	3	0'000525866		

Total (Corr.) 0'0451368 4
 Coeficiente de Correlación (r) = 0'982369
 R-cuadrado = 96'5049 por ciento
 Error estándar de est. = 0'0229318
 Error absoluto medio = 0'0161633
 Estadístico de Durbin-Watson = 2'36523 (P=0'0721)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = - 0'288704



En los tres ensayos de linealidad se obtienen resultados del coeficiente de determinación superiores a $r = 0'98$, que es el criterio de aceptación para este parámetro de validación.

5.3.4.2. *Parámetros de validación del método: Especificidad.*

Se han realizado los ensayos para dos muestras de albúmina y dos muestras de tampón Tris concentrado, de igual manera que en la especificidad de FVIII.

En la Tabla 41 se muestran los resultados de los valores de absorbancia para el tampón Tris-albúmina y para las muestras de albúmina, obtenidos en dos ensayos independientes.

Tabla 41. Resultados de especificidad.

Dilución	Valores de absorbancia	
	1	2
Tampón, 1/4	0'400	0'405
Tampón, 1/8	0'408	0'404
Tampón 1/16	0'408	0'413
Albúmina, 1/4	0'402	0'411
Albúmina, 1/8	0'402	0'414
Albúmina, 1/16	0'411	0'413

La absorbancia residual medida es prácticamente constante e independiente de la concentración del reactivo o excipiente en la muestra analizada.

5.3.4.3. *Exactitud.*

No se dispone de ningún método de referencia por lo que la exactitud se realizó diluyendo una muestra de un concentrado comercializado de FVIII hasta obtener una matriz de la muestra a una concentración de 0'01 UI/ml. A esta matriz se le añadieron tres concentraciones conocidas del segundo estándar internacional de la OMS de FvW: 0'7 UI/ml (70%), 1'0 UI/ml (100%) y 1'3 UI/ml (130%). Las tres muestras se sometieron a tres ensayos independientes de actividad de cofactor de ristocetina, junto con dos muestras del estándar internacional de la OMS en vigor de FvW, a una concentración de 1 UI/ml (100%).

En la Tabla 42 se recogen los resultados obtenidos en los tres ensayos.

Tabla 42. Resultados de exactitud.

Mezcla	STD añadido (UI/ml)	UI/ml obtenidas			Media	Desviación estándar	% recuperado
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3			
A	0'7	0'718	0'770	0'702	0'730	0'0356	104'3
B	1'0	0'985	1'057	1'022	1'021	0'0360	102'1
C	1'3	1'250	1'369	1'300	1'306	0'0598	100'5
Media							102'3

La recuperación obtenida se encuentra dentro del criterio de aceptación para este parámetro, definido en $100\% \pm 20\%$.

5.3.4.4. Precisión.

La precisión se estableció a dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

a) Repetibilidad.

El ensayo de repetibilidad se realizó con el estándar internacional de la OMS en vigor para FvW, realizando tres análisis para las tres concentraciones de trabajo (diluciones 1/16, 1/8 y 1/4). También se realizaron 3 análisis para las 3 concentraciones de trabajo con una muestra de concentrado de FVIII con FvW.

En las Tablas 43 y 44 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de repetibilidad. Todos los resultados tienen un coeficiente de variación inferior al 7%, definido como criterio de aceptación para este parámetro.

Tabla 43. Resultados de repetibilidad con estándar internacional de la OMS para FvW.

Dilución	Absorbancias			Media	Desvest	CV(%)	IC (95%)
1/4	0'509	0'515	0'517	0'514	0'0042	0'8105	$\pm 0'0047$
1/8	0'488	0'511	0'499	0'499	0'0115	2'3038	$\pm 0'0130$
1/16	0'474	0'475	0'481	0'477	0'0038	0'7943	$\pm 0'0043$

Tabla 44. Resultados de repetibilidad con una muestra de concentrado de FVIII con FvW.

Dilución	Absorbancias			Media	Desvest	CV(%)	IC (95%)
1/4	0'515	0'516	0'516	0'516	0'0006	0'1120	$\pm 0'0007$
1/8	0'495	0'487	0'493	0'492	0'0042	0'8468	$\pm 0'0047$
1/16	0'461	0'471	0'466	0'466	0'0050	1'0730	$\pm 0'0057$

b) Precisión intermedia.

Se han llevado a cabo tres ensayos independientes, en dos días diferentes, para las tres diluciones de trabajo con una misma muestra de un concentrado.

Del mismo modo, se ha realizado la precisión intermedia para este producto estudiando los resultados de la potencia obtenida en las condiciones de trabajo indicadas anteriormente en dos días de trabajo.

En las Tablas 45 a 47 se adjuntan los resultados obtenidos para la precisión intermedia.

Tabla 45. Resultados de precisión intermedia (día 1).

Dilución	Absorbancias			Media	Desvest	CV(%)	IC (95%)
1/4	0'503	0'495	0'506	0'5310	0'0057	1'1342	± 0'0064
1/8	0'434	0'435	0'434	0'4343	0'0006	0'1329	± 0'0007
1/16	0'353	0',336	0',335	0'3413	0'0101	2'9637	± 0'0114

Tabla 46. Resultados de precisión intermedia (día 2).

Dilución	Absorbancia			Media	Desvest	CV(%)	IC (95%)
1/4	0'512	0'504	0'506	0'5073	0'0042	0'8206	± 0'0047
1/8	0'455	0'445	0'441	0'4470	0'0072	1'6132	± 0'0082
1/16	0'367	0'357	0'374	0'3660	0'0085	2'3344	± 0'0097

Tabla 47. Resultados de la precisión intermedia de producto.

Muestra	DÍA 1	DÍA 2
Potencia	96'2%	106'4%
Media	101'30%	
Desvest	7'2125	
CV%	7'1199	
IC (95%)	± 9'9958 [91'30% - 111'29%]	

El criterio de aceptación para la precisión intermedia es del 10%, que se cumple en todos los resultados obtenidos.

5.2.6. Estudio de calidad.

5.2.6.1. Calidad en un ensayo.

Los requerimientos de calidad que debe cumplir cada lote de concentrado plasmático de FVIII con indicación de FvW, de acuerdo con la monografía de la Ph. Eur., son que la potencia asumida no sea menor del 60% ni superior al 140%.

5.2.6.2. Gráficos individuales para errores residuales.

En el caso de los ensayos de FvW, el número de datos disponibles para realizar gráficos de control es menor puesto que este análisis no es tan frecuente como el análisis de potencia de FVIII. Se han utilizado 106 resultados históricos (Tabla 48), que siguen una distribución χ^2 , y, como se muestra en la Figura 57, no es comparable a la normal representada con la línea roja y correspondiente a la media y desviación de los datos muestrales.

Tabla 48. Datos de errores residuales correspondientes a 106 ensayos individuales de FvW.

0'0002215	0'0001980	0'0001310	0'0001855	0'0002275	0'0002610	0'0003835	0'0001640
0'0001380	0'0001165	0'0002915	0'0000585	0'0001610	0'0001135	0'0003935	---
0'0001090	0'0001205	0'0000495	0'0001155	0'0000795	0'0002060	0'0002285	---
0'0004630	0'0002045	0'0003200	0'0000860	0'0003255	0'0000895	0'0002060	---
0'0001090	0'0001120	0'0001515	0'0000740	0'0001385	0'0001330	0'0002150	---
0'0002325	0'0003510	0'0003555	0'0000590	0'0001190	0'0000475	0'0001135	---
0'0005535	0'0000845	0'0003360	0'0001060	0'0003230	0'0000580	0'0000700	---
0'0004725	0'0002910	0'0001435	0'0001140	0'0000505	0'0002160	0'0000495	---
0'0004660	0'0002360	0'0001090	0'0002755	0'0000270	0'0001235	0'0003135	---
0'0003535	0'0002555	0'0002035	0'0004760	0'0000760	0'0001110	0'0001340	---
0'0001735	0'0000930	0'0002905	0'0001445	0'0003285	0'0002930	0'0001065	---
0'0003475	0'0000835	0'0001855	0'0001920	0'0001930	0'0000605	0'0000755	---
0'0002900	0'0001100	0'0001635	0'0003440	0'0003255	0'0001710	0'0001375	---
0'0002010	0'0001285	0'0002045	0'0000345	0'0004875	0'0001660	0'0000435	---
0'0002000	0'0000935	0'0001135	0'0004970	0'0001695	0'0003525	0'0000905	---

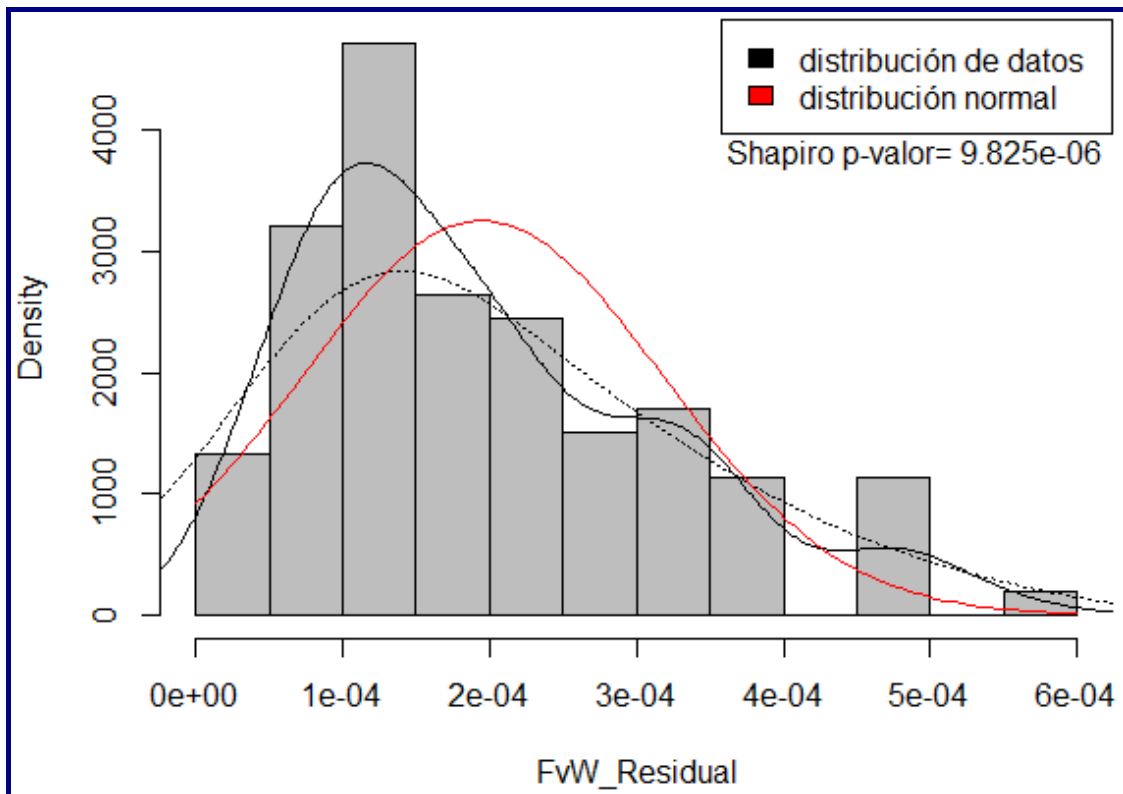


Figura 57. Histograma de errores residuales en ensayos de FvW.

El test de Shapiro-Wilk prueba, con una confianza del 95%, que la distribución de los datos difiere significativamente de la distribución normal (p -valor = 9.825×10^{-6}).

Por lo tanto, procedemos, como en el caso del FVIII, a transformar los datos mediante la fórmula:

$$Y = \frac{X - \frac{1996}{300}}{|X - 5|} \sqrt{\left(5 \ln\left(\frac{5}{X}\right) + X - 5\right)}$$

Los datos transformados (Tabla 49) presentan una distribución normal y el test de Shapiro-Wilk (p -valor = 0.229) muestra que Y sigue una distribución normal (Figura 58).

Una vez obtenida la normalidad de los datos transformados, se realiza el gráfico de control correspondiente (Figura 59).

Tabla 49: Datos de errores residuales correspondientes a 106 ensayos individuales de FvW, transformados [Krishnamoorthy K, 2006].

-7'183112	-7'227605	-7'389167	-7'253350	-7'172468	-7'117512	-6'961257	-7'301736
-7'369001	-7'434409	-7'072988	-7'694724	-7'308960	-7'444433	-6'950680	---
-7'459951	-7'421417	-7'756537	-7'437723	-7'579917	-7'211923	-7'170720	---
-6'883473	-7'214819	-7'035191	-7'550221	-7'028264	-7'535102	-7'211923	---
-7'459951	-7'449540	-7'332707	-7'606906	-7'367598	-7'383303	-7'194954	---
-7'163799	-6'997523	-6'992317	-7'691562	-7'426240	-7'771722	-7'444433	---
-6'808939	-7'556880	-7'015340	-7'470638	-7'031399	-7'697912	-7'627760	---
-6'875034	-7'073682	-7'353825	-7'442745	-7'749163	-7'193111	-7'756537	---
-6'880791	-7'157834	-7'459951	-7'095766	-7'976798	-7'411939	-7'043524	---
-6'994623	-7'126060	-7'216761	-6'871966	-7'596878	-7'452980	-7'380402	---
-7'279658	-7'520535	-7'074377	-7'351125	-7'024532	-7'070914	-7'468837	---
-7'001615	-7'561382	-7'253350	-7'239765	-7'237713	-7'682225	-7'599361	---
-7'075073	-7'456451	-7'302931	-7'005746	-7'028264	-7'285355	-7'370409	---
-7'221655	-7'396617	-7'214819	-7'888465	-6'862029	-7'296989	-7'804012	---
-7'223629	-7'518497	-7'444433	-6'853986	-7'288811	-6'995780	-7'530886	---

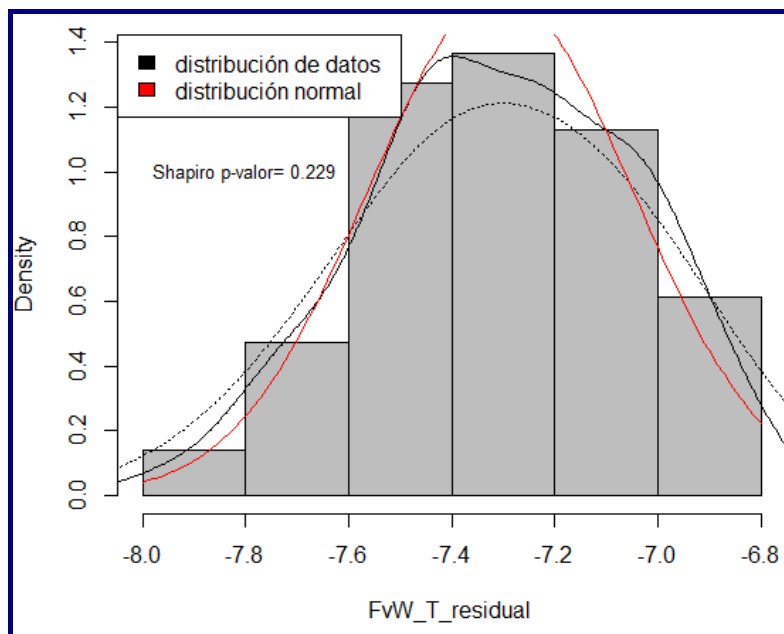


Figura 58. Histograma de errores residuales transformados en ensayos de FvW.

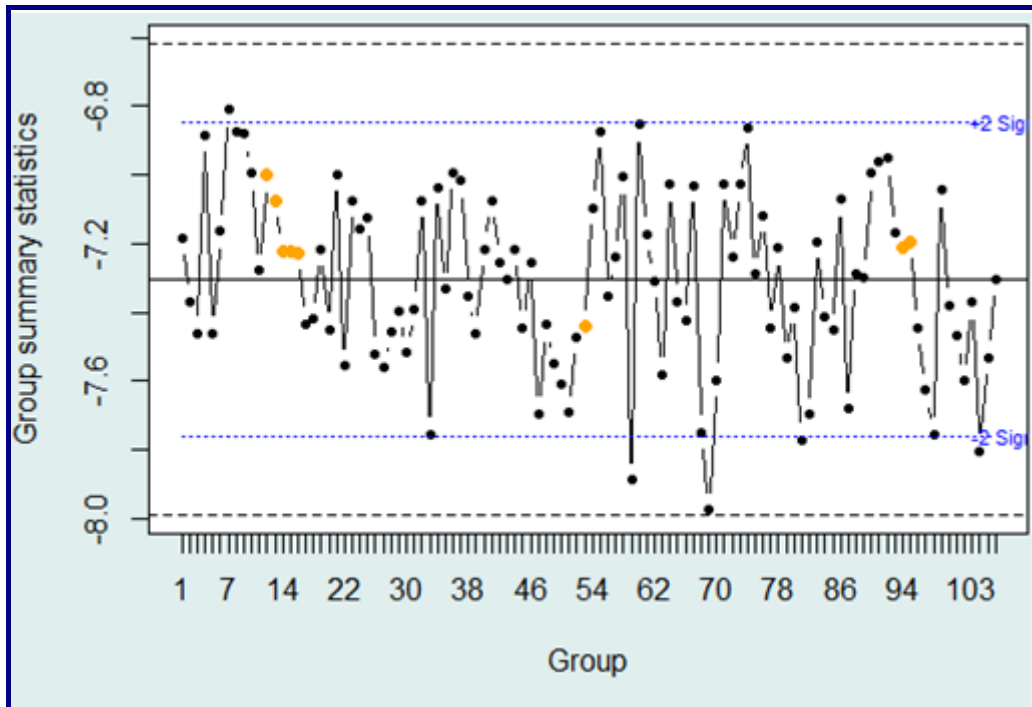


Figura 59. Gráfico de control para errores residuales transformados del ensayo de FvW.

En este caso no hay ningún punto fuera de los límites de control. No se han observado puntos de control cercanos al límite superior por lo que el riesgo de error residual fuera de control es menor que en el caso de FVIII.

Los límites de tolerancia para este ensayo se corresponden con: $LTL = -7.991666$ y $UTL = -6.619855$.

Con estos límites de control, realizamos el gráfico de control para los datos del año en curso, con un número de resultados disponibles de 30 (Figura 60).

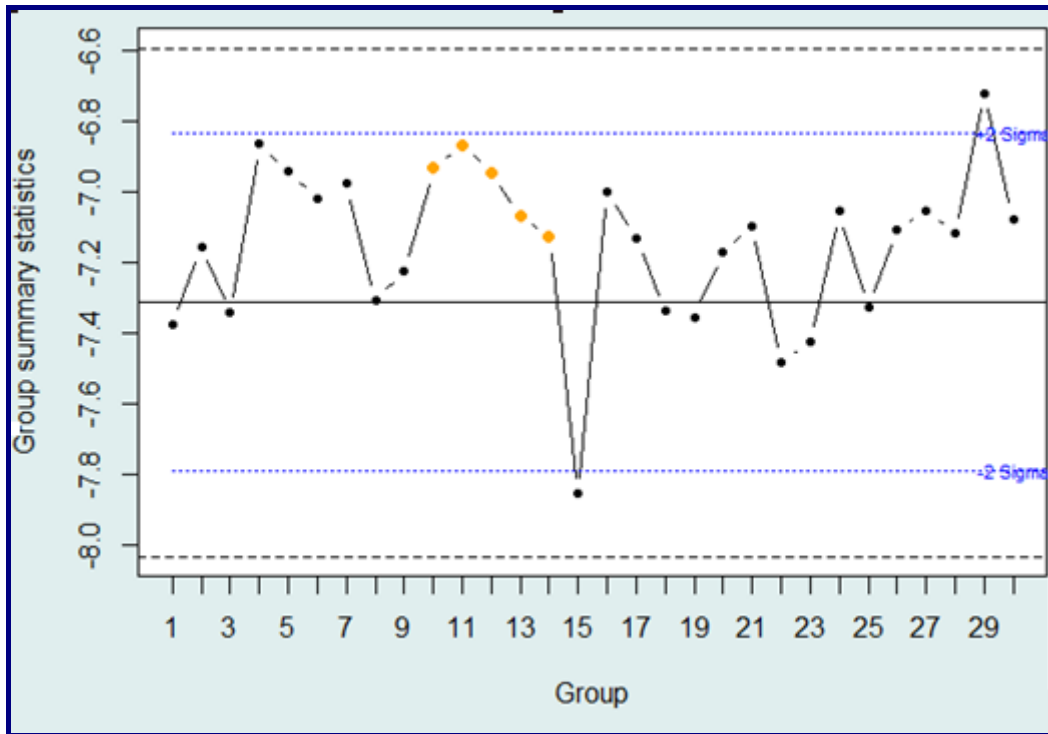


Figura 60. Gráfico de control para el análisis de FvW en el año 2014.

En general, en este ensayo se observa mayor variabilidad que en el caso del ensayo de actividad de FVIII aunque el número de datos recogidos es menor.

5.4. BIBLIOGRAFIA

- [1] Alonso C, González A, Frutos G. Chromogenic assay of human coagulation factor VIII: Statistical comparison of 2 working dilution procedures. *Pharmeuropa Scientific Notes*. 2005; 1: 33-40.
- [2] Aurell L, Friberger P, Karlsson G and Claesson G. A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for Factor Xa, *Thromb Res*. 1977; 11 (5): 595–609.
- [3] Bowyer AE, Shepherd F, Kitchen S and Makris M. A rapid, automated VWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. *Thromb Res*. 2011; 127: 341-344.
- [4] Chandler WL, Ferrell C, Lee J, Tun T and Kha H. Comparison of Three Methods for Measuring Factor VIII Levels in Plasma. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120: 34-39.
- [5] Collazo V, Huescar T, Alarcón E, Alonso C, Frutos G. Validation of a chromogenic substrate bioassay method for determination of Factor VIII activity in drugs. En: *AAPS/2010 FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC)*. New Orleans, La; 2010.
- [6] Collazo V, Alonso C, Frutos G. Validation of a ristocetin cofactor assay for determination of von Willebrand factor activity in FVIII concentrates. En: *2011 AAPS Annual Meeting and Exposition*. Washington, D.C.; 2011.
- [7] Collazo MV, Alonso C, Frutos G. Automatización del ensayo de Factor VIII y de Factor von Willebrand en medicamentos. En: *XXX Congreso internacional Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino*. Roma; 2012.
- [8] Collazo V, Alonso C, Frutos G. Validation of an automated chromogenic assay of potency of factor VIII in commercial concentrates. *Int Jnl Lab Hem*. 2013; 35: 38-45.
- [9] Collier BS and Gralnick HR. Studies on the mechanism of Ristocetin-Induced Platelet Agglutination. *J Clin Invest*. 1977; 60: 302-312.
- [10] Collier BS. The Effects of Ristocetin and von Willebrand Factor on Platelet Electrophoretic Mobility. *J Clin Invest*. 1978; 61 (5): 1168-1175.

- [11] Ekici OD, Paetzel M and Dalbey RE. Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci.* 2008; 17: 2023-2037.
- [12] European Pharmacopoeia 7^a ed. Assay of human coagulation factor VIII (01/2008: 20704) and monograph human coagulation factor VIII (01/2010: 0275). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2010.
- [13] European Pharmacopoeia 8^a ed. Assay of human coagulation Factor VIII (07/2014:20704) and monograph human coagulation factor VIII (07/2013: 0275). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- [14] European Pharmacopoeia 7^a ed. Assay of human von Willebrand Factor (01/2008:20721) and monograph human von Willebrand factor (01/2011: 2298). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2010.
- [15] European Pharmacopoeia 8^a ed. Assay of human von Willebrand Factor (01/2008:20721) and monograph human von Willebrand factor (07/2013: 2298). Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2014.
- [16] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Validation of Analytical Procedures. Strasbourg: EDQM; 2007. PA/PH/OMCL (05) 47 DEF.
- [17] European Pharmacopoeia 8^a ed. Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests (01/2013:50300). Strasbourg: European Directorate for the Quality of medicines & HealthCare. 2014.
- [18] Hillarp A, Stadler M, Haderer C, Weinberger J, Kessler CM and Römisch J. Improved performance characteristics of the von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay using a novel automated assay protocol. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 2216-2223.
- [19] Hubbard AR, Curtis AD, Barrowcliffe TW, Edwards SJ, Jennings CA and Kembell-Cook G. Assay of Factor VIII concentrates: Comparison of the chromogenic and two-stage clotting assays. *Thromb, Res.* 1986; 44: 887-891.

- [20] Hultin MB and Nemerson Y. Activation of Factor X by Factor IXa and VIII; A Specific Assay for Factor IXa in the Presence of Thrombin-activated Factor VIII. *Blood*. 1978; 52 (5): 928-940.
- [21] Hultin MB. Role of Human Factor VIII in Factor X Activation. *J Clin Invest*. 1982; 69: 950-958.
- [22] International Conference of Harmonization. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva; 1995.
- [23] Jakubowski H. Mechanisms of enzyme catalysis en *Biochemistry Online* [monografía en Internet]. California: Saint John's University; 2014. Disponible en: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bcintro/default.html>.
- [24] Kleinveld HA, Andersson N-E, Van Voorthuizen H, Den Hartog J and De Groot PG. Determination of coagulation factor VIII activity by a chromogenic substrate method on STA, an automated coagulation analyzer. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999; 59: 335-342.
- [25] Krishnamoorthy K. *Handbook of Statistical Distributions with Applications*. Boca Raton. Taylor & Francis Group, LLC. 2006.
- [26] Lawrie AS, Mackie IJ, Machin SJ and Peyvandi F. Evaluation of an automated platelet-based assay of ristocetin cofactor activity. *Haemophilia*. 2011; 17: 252-256.
- [27] Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand?. *Thromb Res*. 2008; 122 (4): S2-S4.
- [28] Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G and Guidi GC. Correlation between von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and factor VIII activity in plasma. *J Thromb Thrombolysis*. 2008; 26: 150-153.
- [29] Nachman RL, Jaffe EA and Weksler BB. Immunoinhibition of Ristocetin-Induced Platelet Aggregation. *J Clin Invest*. 1977; 59: 143-148.
- [30] Oldenburg J and Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hämostaseologie*. 2010; 30: 207-211.

- [31] Patzke J and Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Hämostaseologie*. 2010; 30: 203-206.
- [32] Peizer DB and Pratt JW. A normal Approximation for Binomial, F, Beta and other common, related Tail Probabilities. *J An Stat Assoc*. 1968; 63 (324): 1416-1456.
- [33] Redaelli R, Corno AR, Borroni L, Mostarda G, Nichelatti M, Morra E et al. von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF:RCo) assay: implementation on an automated coagulometer (ACL). *J Thromb Haemost*. 2005. 3: 2684-2688.
- [34] Rosén S. Assay of Factor VIII:C with a Chromogenic Substrate, *Scan J Haematol*. 1984; 33 (S40): 139-145.
- [35] Scrucca L. qcc: an R package for quality control charting and statistical process control. *R News*. 2004; 4/1: 11-17.
- [36] Van Dieijen G, van Rijn JLML, Govers-Riemslog JWP, Hemker HC and Rosing J. Assembly of the Intrinsic Factor X Activating Complex-Interactions between Factor IXa, Factor VIIIa and Phospholipid. *Thromb Haemost*. 1985; 53 (3): 396-400.
- [37] Wagenvoord RJ, Hendrix HH and Hemker HC. Development of a Simple Chromogenic Factor VIII Assay for Clinical Use. *Haemostasis*. 1989; 19: 196-204.

6. CONCLUSIONES

“Comienza de nuevo. Cada vez que fracasas empieza otra vez y te harás más fuerte, hasta que finalmente logres tu propósito”.

Anne Sullivan (1866 - 1936)

CONCLUSIONES

La armonización y la mejora continua de la normativa europea ha sido crítica para la seguridad de los pacientes crónicos tratados con medicamentos hemoderivados y, por tanto, relevante para la Salud Pública. La revisión y análisis del marco legal y de las directrices que afectan a los hemoderivados, presentados en este trabajo, constituyen una herramienta eficaz para el entendimiento y utilización de esta normativa tan compleja y extensa, por parte de los profesionales sanitarios, de la industria farmacéutica y de los reguladores.

La aplicación de un enfoque estadístico adecuado resulta una ayuda imprescindible para el correcto tratamiento de los datos que se generan en un bioensayo. La utilización del Análisis de Varianza y el control de los residuales derivados del mismo, aplicados a los resultados de los análisis de FVIII y FvW en concentrados de FVIII con indicación de FvW, prueba que el diseño y la realización de ambos bioensayos son adecuados para la liberación oficial de lotes de medicamentos hemoderivados.

Se ha desarrollado e implementado un software libre para el tratamiento de datos de los bioensayos realizados, aplicado a los análisis de varianza y a las gráficas de control individuales de los residuales del ANOVA. El software se ha validado con el Combistats[®], programa oficial de la Ph. Eur., produciéndose los mismos resultados en todos los casos.

El sistema automático ACL[®] Elite Pro es un equipo de amplia utilización en hospitales y laboratorios de análisis para la detección de parámetros bioquímicos y hematológicos en muestras de plasma de pacientes. En esta tesis, se ha configurado y adaptado el equipo para su utilización en el bioensayo de potencia de medicamentos derivados de plasma en los que el FVIII y el FvW están en concentraciones de hasta mil veces superiores a las muestras de plasma de pacientes.

Se ha realizado la puesta a punto de los parámetros instrumentales que afectan a la medida de potencia de FVIII, tales como la temperatura, longitud de onda y los tiempos de activación (TA) y de lectura (TL), respectivamente. Dada la importancia de los dos últimos factores, se realizaron diversos diseños de experimentos con el fin de optimizar

la respuesta. Los resultados permitieron el ajuste de modelos matemáticos según los cuales los valores óptimos de estas variables fueron TA = 2 minutos y TL = 3 minutos.

La ecuación del modelo correspondiente a la calibración del equipo ACL es: $\log(\text{absorbancia}) = 1,848 + 0,777 \log(\text{concentración})$, que explica el 98,0% de variabilidad en el logaritmo de la absorbancia. El intervalo de linealidad determinado fue 0,000625 – 0,01 UI/ml. En la validación se determinó la especificidad, la exactitud, la repetibilidad y la precisión intermedia. Para la determinación de la exactitud, se compararon los resultados obtenidos en el equipo ACL con un método de referencia, manual, acreditado previamente por ENAC. La incertidumbre asociada al nuevo método de potencia de FVIII, puesto a punto y validado, es menor que la incertidumbre asociada al método de referencia utilizado hasta ahora (intervalo de confianza, al 95% de 4,59% frente a 5,23%).

En el caso del FvW, se ha realizado la puesta a punto de los factores que afectan a la medida de potencia de FvW, tales como la velocidad de centrifugación, el tiempo de lectura (TL) y la concentración de ristocetina. Los valores óptimos encontrados fueron: 1200 rpm, TL = 10 minutos y 10 mg/ml, respectivamente. En todos los ensayos de validación se fijaron estos parámetros en los valores definidos previamente.

La linealidad se estimó mediante la preparación de diluciones seriadas de un estándar de la OMS. El intervalo de linealidad determinado fue 0,03125 – 0,05 UI/ml. En la validación se determinó la especificidad, la exactitud, la repetibilidad y la precisión intermedia. Para la determinación de la exactitud, se realizó un estudio de recuperación de tres muestras de concentración conocida del estándar de la OMS diluidas en una matriz de concentrado de FVIII, verificándose que los resultados se encontraban dentro del criterio de aceptación definido previamente.

En los bioensayos realizados en esta tesis, la utilización de gráficos de control individuales ha permitido definir unos valores de tolerancia a partir de un amplio estudio realizado con errores residuales de datos históricos. La utilización regular en el laboratorio de este procedimiento y de las tolerancias generadas se propone como un método de control interno, puesto que es una herramienta eficaz que ayuda a decidir la aceptación o rechazo de una muestra con una mayor fiabilidad.

La metodología de esta tesis, en cuanto a nueva configuración de un equipo analizador, validación de un bioensayo y análisis estadístico para cálculo de los parámetros de validación, abre la posibilidad de utilizarla como modelo y aplicarla, en términos generales, a otros bioensayos de medicamentos y equipos analíticos.

ANEXOS

ANEXO I. ABREVIATURAS

FvW:	Factor von Willebrand
Ph. Eur.:	Farmacopea Europea
TFPI:	Tissue Factor Pathway Inhibitor
t-PA:	Tissue Plasminogen Activator
PAI-1:	Plasminogen Activator Inhibitor
TF:	Factor tisular
TxA ₂ :	Tromboxano A ₂
βTG:	β-tromboglobulina
PF4:	Factor plaquetario 4
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TAFI:	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
FII, FIIa:	Factor II, FII activado
FV, FVa:	Factor V, FV activado
FVII, FVIIa:	Factor VII, FVII activado
FVIII, FVIIIa:	Factor VIII, Factor VIII activado
FIX, FIXa:	Factor IX, FIX activado
FX, FXa:	Factor X, FX activado
FXII, FXIIa:	Factor XII, FXII activado
FXIII, FXIIIa:	Factor XIII, FXIII activado
rFVIII:	Factor VIII recombinante
pdFVIII:	Factor VIII derivado del plasma
EvW:	Enfermedad de von Willebrand
EMA:	Agencia Europea de Medicamentos
OMS:	Organización Mundial de la Salud
RE:	Retículo endoplasmático
VHA, VHB, VHC:	Virus de la hepatitis A, B, C
VIH:	Virus e la inmunodeficiencia humana
UI:	Unidades internacionales
BRP:	Biological referente Preparation
UE:	Unión Europea
CoE:	Consejo de Europa
TFUE:	Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea

EM:	Estado(s) Miembro(s)
BPF's:	Prácticas correctas de fabricación
CPMP:	Comité de Especialidades Farmacéuticas
CVMP:	Comité de Medicamentos veterinarios
RD:	Real Decreto
OCABR:	Official Control Authority Batch Release
DTC:	Documento Técnico Común
APP:	Archivo principal sobre Plasma
AEMPS:	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
OMCL:	Laboratorio Oficial de Control de Medicamentos
EDQM:	Dirección Europea de Calidad del Medicamento y Productos Sanitarios
ICH:	International Conference of Harmonization
ENAC:	Entidad Nacional de Acreditación
ANOVA:	Analysis of Variance
CV%:	Coefficiente de variación
r^2 :	Coefficiente de determinación
r:	Coefficiente de Pearson
STD:	Estándar

ANEXO II. FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

- [1] Representación esquemática de la plaqueta.
- [2] Cascada de coagulación.
- [3] FVIII y cascada de coagulación.
- [4] Estructuras del FVIII: molécula precursora y FVIII maduro.
- [5] Heterodímero circulante de FVIII en plasma.
- [6] Complejo FVIII/FvW.
- [7] Molécula de FVIIIa.
- [8] Inactivación de la molécula de FVIII.
- [9] Representación del FvW: Péptido señal de 22 residuos, propéptido de 741 aminoácidos y subunidad madura de 2050 aminoácidos.

3. NORMATIVA REGULATORIA

- [10] Relaciones entre UE y CoE.
- [11] Evolución de la normativa europea aplicable a medicamentos hemoderivados y su transposición a la española (Reales Decretos).
- [12] Organigrama del EDQM.
- [13] Estado de las guías de hemoderivados para la liberación europea de lotes.

4. METODOLOGÍA

- [14] Método de análisis de líneas paralelas.
- [15] Método de razón de pendientes.
- [16] Log de la distribución normal para estimados repetidos de potencia de una única preparación.
- [17] Creación de una plantilla de trabajo (I). Tamaño (a), orientación (b), modelo (c) y diseño (d).

- [18] Creación de una plantilla de trabajo (II). Dosis (e), transformación (f), varianza (g) y ANOVA (h).
- [19] Hoja de combinación de dos potencias.
- [20] Resultados de absorbancias, transformación logarítmica, media y diferencias al cuadrado.
- [21] Fórmulas matemáticas para el cálculo de ANOVA.
- [22] ANOVA del modelo de rectas paralelas.
- [23] Cálculo de potencia y límites de confianza.
- [24] Comparación de resultados de Ph. Eur. y R.
- [25] Archivo de órdenes para la entrada de datos, análisis de regresión, varianza y gráfico.
- [26] Archivo de órdenes para el cálculo de potencias.
- [27] Archivo de órdenes aplicable a i ensayos.
- [28] Archivo de órdenes para el gráfico de control.

5. BIOENSAYOS DE FVIII Y FvW

- [29] Activación del Factor X.
- [30] Mecanismo hidrolítico de las serín proteasas.
- [31] Absorbancias frente a TA para las tres concentraciones (\blacktriangle 0'00125; \circ 0'0025; \bullet 0'005).
- [32] Absorbancia frente a TL para 7 diferentes TA. Tres diluciones de trabajo (a), (b) y (c), correspondientes a 1/200, 1/400 y 1/800.
- [33] Series de diluciones de trabajo para el vial de estándar (S). El diseño es similar para la muestra.
- [34] Análisis mediante Combistats[®] de concentrados de FVIII.
- [35] Análisis mediante Excel[®] de concentrados de FVIII.
- [36] Disposición de los datos analíticos en el paquete estadístico R.
- [37] Estudio de regresión con el paquete estadístico R.
- [38] ANOVA con el paquete estadístico R.
- [39] Representación gráfica del modelo de líneas paralelas.
- [40] Análisis mediante el paquete estadístico R de concentrados de FVIII.

- [41] Representación gráfica de linealidad del ensayo de FVIII.
- [42] Histograma de errores residuales en ensayos de FVIII.
- [43] Histograma de errores residuales correspondientes a la Tabla 29.
- [44] Gráfico de control para errores residuales transformados del ensayo de FVIII.
- [45] Gráfico de control para el análisis de FVIII en el año 2014.
- [46] Absorbancia frente a concentraciones para las diluciones (♦ dil 1'5; ■ dil 2).
- [47] Resultados para la velocidad de centrifugación de 600 y 1200 rpm.
- [48] Optimización de la concentración de ristocetina para tres diluciones y cinco concentraciones de ristocetina.
- [49] Series de diluciones de trabajo para el vial de estándar (S). El diseño es similar para la muestra.
- [50] Análisis mediante Combistats[®] de actividad de FvW.
- [51] Análisis mediante Excel[®] de actividad de FvW.
- [52] Disposición de los datos analíticos en el paquete estadístico R.
- [53] Estudio de regresión con el paquete estadístico R.
- [54] ANOVA con el paquete estadístico R.
- [55] Representación gráfica del modelo de líneas paralelas.
- [56] Hoja de salida de resultados R de actividad de FvW.
- [57] Histograma de errores residuales en ensayos de FvW.
- [58] Histograma de errores residuales transformados en ensayos de FvW.
- [59] Gráfico de control para errores residuales transformados del ensayo de FvW.
- [60] Gráfico de control para el análisis de FvW en el año 2014.

ANEXO III. TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

- [1] Niveles de severidad para la hemofilia A.
- [2] Clasificación de la enfermedad de von Willebrand.

3. NORMATIVA REGULATORIA

- [3] Resumen de la Directiva 2001/83/CE.
- [4] Parámetros de validación.

4. METODOLOGÍA

- [5] Fórmulas para el análisis de líneas paralelas con **d** dosis para cada preparación.
- [6] Fórmulas adicionales.
- [7] Fórmulas para calcular la suma de cuadrados y los grados de libertad.
- [8] Análisis de ANOVA para factores de coagulación.

5. BIOENSAYOS DE FVIII Y FvW

- [9] Resultados de absorbancia, a distintos TA para TL = 3 minutos.
- [10] Valores de b_0 , b_1 y b_2 para el modelo exponencial.
- [11] Resultados de absorbancia de un ensayo para FVIII.
- [12] Resultados de potencia de FVIII con tres software.
- [13] Resultados linealidad para el ensayo en el día 1.
- [14] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 1.
- [15] Resultados linealidad para el ensayo en el día 2.
- [16] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los

datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 2.

- [17] Resultados linealidad para el ensayo en el día 3.
- [18] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 3.
- [19] Resumen del cálculo de regresión de los resultados de linealidad.
- [20] Resultados para recta de regresión común.
- [21] Resultados de especificidad.
- [22] Resultados de potencia para el ensayo de exactitud.
- [23] Resultados de repetibilidad, en absorbancias, para las diluciones 0'005 (1), 0'0025 (2) y 0'00125 (3) de un concentrado de FVIII.
- [24] Valores descriptivos de los datos.
- [25] Resultados de repetibilidad para potencias.
- [26] Resultados de precisión intermedia en absorbancias para las diluciones 0'005, 0'0025 y 0'00125 de un concentrado de FVIII.
- [27] Resultados de precisión intermedia para potencias.
- [28] Datos de errores residuales correspondientes a 210 ensayos individuales de FVIII.
- [29] Datos de errores residuales correspondientes a 210 ensayos individuales de FVIII transformados [Krishnamoorthy K, 2006].
- [30] Resultados de absorbancia para 2 series de diluciones y CV(%).
- [31] Resultados de absorbancia para 2 replicados seriados con TL = 10 minutos.
- [32] Resultados en absorbancias para distintas concentraciones de ristocetina.
- [33] Resultados de un ensayo para FvW.
- [34] Resultados de potencia de FvW con tres software.
- [35] Resultados linealidad para el ensayo en el día 1.

- [36] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 1.
- [37] Resultados linealidad para el ensayo en el día 2.
- [38] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 2.
- [39] Resultados linealidad para el ensayo en el día 3.
- [40] Cálculo de parámetros del modelo ajustado, ANOVA de la regresión, índices de bondad de ajuste y representación gráfica de la recta de calibración estimada, incluyendo los datos experimentales y las bandas de confianza y de predicción del modelo para el ensayo en el día 3.
- [41] Resultados de especificidad.
- [42] Resultados de exactitud.
- [43] Resultados de repetibilidad con el estándar internacional de la OMS para FvW.
- [44] Resultados de repetibilidad con una muestra de concentrado de FVIII con FvW.
- [45] Resultados de precisión intermedia (día 1).
- [46] Resultados de precisión intermedia (día 2).
- [47] Resultados de la precisión intermedia de producto.
- [48] Datos de errores residuales correspondientes a 106 ensayos individuales de FvW.
- [49] Datos de errores residuales correspondientes a 106 ensayos individuales de FvW transformados [Krishnamoorthy K, 2006].

SUMMARY

Title: BIOASSAYS IN BLOOD DERIVED MEDICINES: LEGISLATIVE, STATISTICAL AND ANALYTICAL ASPECTS

Introduction

The clotting factor concentrates are medicines containing proteins of the coagulation cascade and are mainly used as replacement therapy in congenital coagulopathies. Of the medicines available, Factor VIII (FVIII), indicated in hemophilia A, is the most significant due to the quantitative prevalence of this disease and to its plasma half-life. Physiologically FVIII is bound to the factor von Willebrand (vWF), which prolongs its half-life. At present there are recombinant concentrates and plasma origin concentrates. The recombinant medicines are obtained by recombinant genetic engineering techniques in cultures of mammalian cells. Those of plasma source, also called blood derivatives, are produced on an industrial scale from large volumes of human plasma, using various separation and purification procedures. In blood derivatives, depending on the latter procedure, both proteins FVIII and vWF can be found as active ingredients. As biological medicines and because of the process of obtaining them, there is a wide inter-lot variability in the characteristics of the active ingredient, which has to be considered for their therapeutic use. The methods for their evaluation are set by the European Pharmacopoeia and the corresponding monographs determine the acceptability criteria of their specifications.

In this thesis are studied, in a multidisciplinary approach, the regulatory and analytical aspects of the two medicines, FVIII and vWF, obtained from human blood plasma. The present regulatory framework and directives which affect blood derived products are reviewed and discussed. For the analytical study, an instrument used routinely for the diagnosis of patients has been adapted to the analysis of these medical drugs.

Objective

The aim of this thesis is the development and validation of two bioassays for the FVIII and vWF activity in blood derived products. These analyses are required in the Official

Batch Release, according to the *Official Control Authority Batch Release* (OCABR) European rules.

Validation parameters are calculated using appropriate statistical methodologies, and the internal quality of the bioassays is developed.

Methods

The experimental work has been performed at the Biological Products and Biotechnology Division of the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (AEMPS), in the Blood Products Laboratory, which is accredited by the Spanish National Accreditation Body (ENAC) for these bioassays.

First of all, the concept of haemostasis and the role of these two proteins in the coagulation, their corresponding molecular structures, their mechanism of action and associated pathologies are reviewed. Subsequently, the applicable European and national rules are discussed and finally, the methodology and corresponding set-up are developed along with the validation of both bioassays. Different statistical tools have been used for data evaluation and this thesis has been completed with individual control charts used to verify the suitability of the bioassays for the control of these medicines.

Results

For FVIII, the development of the instrumental parameters which affect the measurement of its activity, such as temperature, wavelength and activation (AT) and reading (RT) times respectively, was completed with several designs of experiments in order to optimize the response. The optimum values obtained for these variables were AT = 2 minutes and RT = 3 minutes for the best adjustment of mathematical models. The equation model for the equipment ACL[®] calibration is:

$$\log(\text{absorbance}) = 1.848 + 0.777 \log(\text{concentration});$$

which explains 98.0% of variability in the logarithm of the absorbance.

The range of linearity is determined as 0.000625 - 0.01 IU/ml. The specificity, accuracy, repeatability and intermediate precision validation parameters were checked. To determine the accuracy, the results obtained with the ACL[®] equipment were compared

with a manual reference method, previously accredited by ENAC. The uncertainty associated with the new bioassay of FVIII activity is smaller than the uncertainty associated with the reference method (the 95% confidence interval was 4.59% vs. 5.23%). The estimated values of potency of FVIII obtained in ten batches with the three statistical tools used Combistats[®], Excel[®] and statistical package R- are very similar including the confidence limits.

For vWF, the setting up of the factors affecting the measurement of vWF activity, such as centrifugation speed, reading time (RT) and concentration of ristocetin were established. The optimum values found were: 1,200 rpm, RT = 10 minutes and 10 mg/ml, respectively. The linearity was estimated by preparing serial dilutions of a WHO standard. The range of linearity was determined as 0.03125 - 0.05 IU/ml. The specificity, accuracy, repeatability and intermediate precision validation parameters were checked.

Conclusions

The harmonization and continuous improvement of European regulations has proven critical for the safety of patients chronically treated with blood derived products and, thus relevant for Public Health. The review and analysis done of the legal framework and guidelines which affect the blood derived products is an effective tool for health professionals, pharmaceutical industry and regulators to understand and apply correctly these regulations, which are complex and extensive.

The application of an appropriate statistical approach is a prerequisite for the correct processing of data generated in a bioassay. The use of analysis of variance (ANOVA) and the control of its residual errors, applied to the results of FVIII and vWF assays in concentrates of FVIII with vWF indication, demonstrate that the design and implementation of both bioassays, as developed in this thesis, are suitable for the Official Batch Release of blood derived medicines.

A free software has been developed and implemented to process the data of the bioassays. It was applied to the analysis of variance and to the individual control charts from ANOVA residual errors. The software is validated with Combistats[®], the official program of the European Pharmacopoeia, as equal results were obtained in all cases.

The automatic instrument ACL[®] Elite Pro is widely used in hospitals and clinical laboratories for the detection of biochemical and hematological parameters in plasma samples of patients. In this work, this instrument has been configured and adapted for use in the bioassay of the activity of samples of batches of plasma derived medicines in which the FVIII and vWF are at concentrations several thousand times higher than in the plasma samples of patients.

In the bioassays performed in this thesis, the use of individual control charts has allowed to define values of tolerance from a large study with historical residual errors. The routine use in the laboratory of this procedure and the tolerances obtained are proposed as an internal control method, since it is an effective tool to decide the acceptance or rejection of a test with a greater reliability.

The methodology of this thesis in terms of a new configuration for an analyzer instrument, the validation of a bioassay and a statistical analysis to estimate the validation parameters opens the possibility of using it as a model methodology to apply broadly to other bioassays and analytical equipments.