



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Contribución al estudio de los concentrados de factor VIII de la coagulación

José Bruno Montoro Ronsano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS CONCENTRADOS
DE FACTOR VIII DE LA COAGULACION

Memória que para optar al Grado
de Doctor en Farmacia presenta
José Bruno Montoro Ronsano



BARCELONA 1992

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084047



Trabajo realizado en el Servicio de Farmacia del Hospital Vall d'Hebrón, y en el Departamento de Farmacia, bajo la dirección de los Profs. Drs. Elvira Bel Prieto y José María Suñé Negre, que autorizan su presentación.

Prof.Dra. Elvira, Bel Prieto

Prof.Dr. José María Suñé Negre

INDICE

OBJETIVOS

1. PARTE BIBLIOGRAFICA

1.1-INTRODUCCION

1.1.1-ANTECEDENTES HISTORICOS	3
1.1.2-GENETICA DE LA HEMOFILIA	6
1.1.2.1-Patrón de herencia	6
1.1.2.2-Detección de portadoras y diagnóstico prenatal	9
1.1.3-FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA	12
1.1.3.1-Vasoconstricción localizada	12
1.1.3.2-Agregación plaquetaria	13
1.1.3.3-Coagulación plasmática	17
1.1.3.3.1-Sistema intrínseco	19
1.1.3.3.2-Sistema extrínseco	20
1.1.3.3.3-Sistema común	22
1.1.3.3.4-Formación de fibrina	22
1.1.3.3.5-Inhibición de la coagulación	24
1.1.3.4-Fibrinolisis	27
1.1.4-CARACTERIZACION MOLECULAR DEL FACTOR VIII	29
1.1.4.1-Relación estructura-actividad	31
1.1.5-CLINICA DE LA HEMOFILIA	35
1.1.5.1-Sintomatología clínica	35
1.1.5.2-Diagnóstico de laboratorio	37
1.1.6-SITUACION ACTUAL	40
1.1.7-TRATAMIENTO INTEGRAL DE LA HEMOFILIA	42
1.1.7.1-Unidad de hemofilia	42

1.2.4.3.1-Immunomodulación	72
1.2.4.3.1.1-Importancia clínica	73
1.2.4.3.2-Aparición de inhibidores	74
1.2.4.3.3-Infecciones víricas	76
2-PARTE EXPERIMENTAL	78
2.1-PARAMETROS FARMACOTECNICOS	79
2.1.1-INTRODUCCION	80
2.1.2-METODOS	81
2.1.2.1-Concentrados de factor VIII	81
2.1.2.2-Características estructurales	81
2.1.2.3-Elementos traza	81
2.1.2.4-Tiempo de reconstitución	83
2.1.2.5-Determinación de la osmolaridad	83
2.1.2.6-pH	83
2.1.2.7-Aspecto	84
2.1.3-RESULTADOS	84
2.1.4-DISCUSION	93
2.2-CONTENIDO PROTEICO DE LOS CONCENTRADOS DE FACTOR VIII	96
2.2.1-INTRODUCCION	97
2.2.2-METODOS	100
2.2.2.1-Concentrados de factor VIII	100
2.2.2.2-Análisis de proteínas	101
2.2.2.2.1-Fibrinógeno	101
2.2.2.2.2-Fibronectina	103
2.2.2.2.3-Inmunoglobulinas	104
2.2.2.2.4-Factor von Willebrand	105
2.2.2.2.5-Albúmina	108

2.2.2.2.6-Proteína total	109
2.2.3-RESULTADOS	109
2.2.4-DISCUSSION	122
2.3-ESTABILIDAD DEL FACTOR VIII RECONSTITUIDO	128
2.3.1-INTRODUCCION	129
2.3.2-METODOS	133
2.3.2.1-Concentrados de factor VIII	133
2.3.2.2-Análisis del factor VIII	134
2.3.2.3-Análisis estadístico	137
2.3.3-RESULTADOS	137
2.3.4-DISCUSSION	147
2.4-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII	152
2.4.1-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII	
EN DOSIS UNICA	156
2.4.1.1-Introducción	156
2.4.1.2-Métodos	156
2.4.1.2.1-Pacientes	156
2.4.1.2.2-Administración del factor VIII	157
2.4.1.2.3-Análisis del factor VIII	157
2.4.1.2.4-Análisis farmacocinético	158
2.4.1.2.4.1-Modelo compartimental	159
2.4.1.2.4.2-Análisis modelo inde- pendiente	160
2.4.1.2.4.3-Recuperación "in vivo"	161
2.4.1.2.5-Análisis estadístico	162
2.4.1.3-Resultados	162

2.4.1.4-Discusión	171
2.4.2-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII EN DOSIS	
MULTIPLE	176
2.4.2.1-Introducción	176
2.4.2.2-Métodos	176
2.4.2.2.1-Pacientes	176
2.4.2.2.2-Administración del	
factor VIII	177
2.4.2.2.3-Análisis del factor VIII	178
2.4.2.2.4-Análisis farmacocinético	178
2.4.2.2.5-Análisis estadístico	179
2.4.2.3-Resultados	179
2.4.2.4-Discusión	185
2.4.3-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII EN	
PERFUSION CONTINUA	189
2.4.3.1-Introducción	189
2.4.3.2-Métodos	190
2.4.3.2.1-Pacientes	190
2.4.3.2.2-Administración del	
factor VIII	191
2.4.3.2.3-Análisis del factor VIII	192
2.4.3.2.4-Análisis farmacocinético	193
2.4.3.2.5-Análisis estadístico	193
2.4.3.3-Resultados	193
2.4.3.4-Discusión	196

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

OBJETIVOS

Los concentrados de factor VIII constituyen el instrumento terapéutico fundamental del tratamiento de la hemofilia A. Los concentrados de factor VIII, por sus propias características intrínsecas -hemoderivado- y por el tipo de paciente a que van destinados -hemofílicos A-, constituyen un grupo peculiar y diferenciado dentro del conjunto de medicamentos. Sin embargo, estas mismas características diferenciales los convierten en un grupo poco conocido y estudiado, desde el punto de vista farmacéutico.

Las características farmacotécnicas constituyen un aspecto importante dentro de la caracterización y definición de la calidad de cualquier especialidad farmacéutica, en general, y de los concentrados de factor VIII en particular. El carácter proteico del factor VIII, así como el elevado contenido de proteína (200-1000 mg/1000UI FVIII) en general, que caracteriza a los concentrados constituyen una particularidad en los liofilizados medicamentosos.

El conocimiento y definición de las características farmacotécnicas puede facilitar, junto con otros factores, la adecuada selección del tipo de preparado necesario para cada circunstancia. Por otro lado, la farmacotécnica podría influir en la respuesta farmacocinética y/o farmacológica del factor VIII, siendo imprescindible, para estudiar este proceso, el establecimiento de dichas características.

En este estudio, se analizarán las características estructurales,

presencia de elementos traza y tiempo de reconstitución del liofilizado de factor VIII, así como osmolaridad, aspecto y pH de la solución reconstituida, de las especialidades de concentrados de factor VIII empleadas en la práctica terapéutica en España.

Para la valoración de las características estructurales y contenido de elementos traza, en los liofilizados de los concentrados de factor VIII, se emplearán, por primera vez en un liofilizado medicamentoso, técnicas de difracción de Rx y espectrometría de emisión de plasma.

En relación al contenido total de proteína del plasma (70-80 mg/ml), el factor VIII puede considerarse una proteína marginal dada su baja concentración (0.1-0.2 mcg/ml). Los sucesivos procesos de fraccionamiento, concentración y purificación del plasma, para la obtención de los concentrados de factor VIII, eliminan la mayor parte de la proteína acompañante; sin embargo ésta representa todavía un porcentaje muy elevado del total de proteína presente en los concentrados.

La presencia de proteína -no factor VIII- en los concentrados de factor representa, en la mayor parte de los casos, un inconveniente, ya que su administración se ha relacionado con la aparición de complicaciones como, por ejemplo, alteraciones inmunológicas en los pacientes hemofílicos sometidos a tratamiento crónico con tales concentrados. Las principales proteínas presentes en los concentrados de factor VIII son, desde el punto de

vista cuantitativo, fibrinógeno (Fg), fibronectina (Fn), inmunoglobulinas y albúmina; y desde el punto de vista cualitativo, factor von Willebrand (FvW) y, lógicamente factor VIII.

La presencia de cada una de estas proteínas tiene distinto interés. El Fg, la Fn y las inmunoglobulinas no juegan ningún papel positivo, son contaminantes puros, y sólo representan una carga proteica administrada al paciente que podría alterar sus parámetros inmunológicos. Se han descrito, incluso, procesos de hemólisis relacionados con la presencia de isohemaglutininas.

La presencia de FvW tiene mucho más interés, ya que esta proteína se encuentra cuantitativamente en una proporción muy baja (del orden del factor VIII), pero cualitativamente tiene mucha importancia, ya que es la proteína estabilizadora natural del factor VIII. Por otro lado, la presencia de FvW funcional en los concentrados de factor VIII podría hacerlos útiles en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW).

El estado de alteración química de la proteína presente puede tener un interés añadido, ya que se ha apuntado la posibilidad de que a mayor grado de alteración, ésta presente un carácter más antigénico e inmunodepresor.

En este estudio se analizará el contenido en proteínas de los concentrados de factor VIII registrados y/o empleados en España. Las proteínas valoradas serán Fg, Fn, inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), albúmina y FvW, así como la proteína total. Se valorará

fundamentalmente la cantidad absoluta (antigénica) de estas proteínas. Únicamente se determinará la actividad funcional del Fg, con objeto de definir el cociente funcional/total que podría ser indicativo del grado de alteración proteica, dado que el Fg es una proteína lábil a la manipulación y/o calentamiento. Se valorará, además, la actividad funcional del FvW con objeto de establecer aquellos concentrados de factor VIII que podrían ser útiles en el tratamiento de la EvW.

Es necesario destacar que, en la actualidad, no se dispone de datos sobre el contenido en proteínas de los concentrados empleados en España. Únicamente se conocen las referencias de los concentrados, registrados en otros países, que pueden ser considerados equivalentes. Por otro lado, no existe ningún concentrado de factor VIII -de los estudiados- que incluya, en las indicaciones oficialmente reconocidas, su empleo en el tratamiento de la EvW.

La administración de los concentrados de factor VIII se realiza rutinariamente antes de las 2-4 horas de la reconstitución del liofilizado. Esta práctica se basa, generalmente, en las recomendaciones que los laboratorios farmacéuticos fabricantes establecen en sus monografías científicas sobre el producto o en los prospectos de la especialidad, sobre la correcta administración del concentrado de factor VIII. De este hecho se presupone que, en el mejor de los casos, la estabilidad del factor VIII en solución no es superior a las 2-4 horas definidas anteriormente.

Sin embargo, un análisis no demasiado exhaustivo del proceso de fabricación (fraccionamiento y purificación) permite comprobar que el factor VIII permanece en solución, en las distintas fases, durante un tiempo más prolongado, sin una pérdida evidente en el rendimiento del proceso.

La determinación o establecimiento de la estabilidad del factor VIII una vez reconstituido tiene, sin embargo, un gran interés. Cada vez está más extendida la práctica de la administración de los concentrados de factor VIII en perfusión continua debido, fundamentalmente, al mejor control del enfermo y a un ahorro en la dosis total de factor VIII administrada. Por otro lado, la dosis terapéutica a administrar no siempre coincide con las de las presentaciones comerciales (250, 500 y 1000 UI), por lo que no es infrecuente la pérdida de unidades de factor VIII, desechadas.

En este estudio se valorará la estabilidad química, a tiempo y temperatura reales, del factor VIII en los concentrados de factor liofilizados, tras la reconstitución y disolución del mismo. El estudio de estabilidad se centrará en la evolución de la concentración del fármaco, en solución, a lo largo del tiempo, es decir en la estabilidad química del producto reconstituido. Con ello, se pretende conocer el tiempo límite en que puede ser administrado el preparado con plenas garantías de poder desarrollar una acción terapéutica segura y eficaz.

De esta manera, el objetivo principal es definir cuál es el T90

(es decir el tiempo en el que la degradación del fármaco es igual al 10% de la concentración inicial, o en otras palabras, el tiempo en que el 90% del fármaco permanece inalterado) del factor VIII en los concentrados de factor empleados en la práctica terapéutica. Se estudiará, además, la C12 y la C24 (concentración remanente a las 12 y 24 horas, respectivamente), y el T50 (tiempo en que la degradación alcanza el 50% de la concentración inicial). Este último parámetro tiene más relación con la cinética de degradación, un factor que también se considerará en este estudio.

Aunque los datos publicados en los últimos años sobre la farmacocinética del factor VIII han arrojado luz sobre aspectos fundamentales de la misma, un análisis cuidadoso de la literatura indica que se requiere, todavía, mucha más información. No está claro aún si la gran variabilidad inter-estudios que se detecta en la "respuesta farmacocinética" refleja diferencias inter-pacientes o inter-productos verdaderas o es consecuencia de los distintos métodos de análisis farmacocinético empleados.

Para el análisis de curvas en dosis única se ha descrito una amplia gama de métodos que incluyen los modelos mono y bicompartimental, el análisis amodelístico e, inicialmente, técnicas gráficas en papel semilogarítmico. En regímenes de dosis múltiple, es todavía muy escasa la información de que se dispone, cuando, por otro lado, desde un punto de vista clínico, es la situación que con más frecuencia se repite.

Recientemente, se ha propuesto, por parte del Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia (ICTH), un modelo estandarizado para el análisis farmacocinético del factor VIII basado en el denominado método modelo-independiente. Este método de análisis farmacocinético está basado en el cálculo de tres parámetros farmacocinéticos: El aclaramiento plasmático (Cl), el volumen de distribución (Vd área) y el tiempo medio de residencia (MRT) o vida media evaluada como $MRT/1.443$. Estos parámetros poseen la ventaja de su alta reproducibilidad ya que están menos afectados por pequeñas variaciones individuales en los puntos de una curva, causados por errores en la manipulación de las muestras, errores de laboratorio en el análisis de la actividad del factor VIII, etc. El análisis modelo-independiente presenta, básicamente, dos ventajas: Una evaluación farmacocinética correcta del factor VIII independientemente de si la curva plasmática de descenso de la concentración es bifásica o monofásica (ya que ambas circunstancias pueden darse en el factor VIII) y unos resultados, expresados en parámetros farmacocinéticos modelo-independientes, que permiten la comparación homogénea de cualquier concentrado de factor VIII con amplias series de datos históricos analizados siguiendo la misma metodología.

Por otro lado, el modelo monocompartimental lineal estándar es el medio más generalmente aplicable para evaluar procesos de dosis múltiple, ya que se ha demostrado que describe bien el fenómeno de acumulación de factor VIII que se produce.

Independientemente de las consideraciones metodológicas que pudieran plantearse, o del volumen de información sobre los valores de los parámetros farmacocinéticos que se hayan descrito, es importante tener en cuenta que, hoy por hoy, no se dispone prácticamente de información referente a la "respuesta farmacocinética" tanto en los pacientes hemofílicos españoles como de los concentrados de factor VIII registrados o utilizados en España. Aportar urgentemente datos que puedan arrojar luz en este campo, identificando y cuantificando las diferencias, es fundamental, máxime cuando se trata de un fármaco cuya monitorización terapéutica, en el ejercicio clínico rutinario, es prácticamente obligada.

La farmacocinética del factor VIII se evaluará, en este estudio, desde tres puntos de vista: Análisis de curvas plasmáticas del factor VIII tras administración de una dosis única, análisis de regímenes de administración de dosis múltiple y análisis de regímenes de administración en perfusión continua.

El objetivo último es establecer los parámetros farmacocinéticos en la población hemofílica española, así como las características de dichos parámetros farmacocinéticos en los concentrados de factor VIII registrados o utilizados en el Estado Español.

PARTE BIBLIOGRAFICA

1.1-INTRODUCCION

1.1.1-ANTECEDENTES HISTORICOS

La existencia de una enfermedad hemorrágica, hereditaria y congénita que padecen únicamente los varones se conoce ya en los primeros siglos de nuestra era; aparece citada en el TALMUD (libro sagrado de los judíos), donde se establece el decreto del patriarca Rabbi Judah que dice "el sucesor de dos hermanos que hayan muerto desangrados tras la circuncisión, no debe ser circuncidado" (1).

Sin embargo, hasta hace dos siglos poco más se ha podido aportar al conocimiento de esta enfermedad. Únicamente se recogen precisiones de los sucesivos transcritores y comentaristas del TALMUD: Rabbi Isaac Alfasí (1013-1103), Mosés Maimónides, Rabbi Joseph Karo (1488-1575) y Rabbi Ezequiel Laudau (1737-1793) (1-3). Las citas en cualesquiera otras culturas, entre ellas la cristiana, son en la práctica inexistentes (4).

La primera referencia minuciosa de la enfermedad en la moderna literatura médica la estableció John Conrad Otto (1774-1844), un médico americano de Filadelfia, que deslindó a la hemofilia como una entidad nosológica dentro del complejo grupo de los síndromes hemorrágicos. Su investigación sobre los sangrantes fue publicada en una revista de Nueva York (Medical Repository 6: 1, 1803) bajo el título "An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families" (5). Nasse, en 1820, formuló la ley de transmisión de esta enfermedad (6), y el nombre de hemofilia fue dado por Schönlein en 1839 (7).

A principios de este siglo, Bullock y Fildes establecen claras pautas diagnósticas de la hemofilia, a la que identifican como una enfermedad hemorrágica congénita que sólo afecta a los varones, que transmiten las madres -que aparentemente son normales- y que cursa con un tiempo de coagulación prolongado (8). En 1911, Addis sentenció el origen plasmático del defecto coagulativo de los hemofílicos al comprobar que el plasma normal era capaz de acortar el retraso en la coagulación sanguínea que sufren estos pacientes (9). En 1937, los americanos Patek y Taylor aislan y definen un componente plasmático denominado "globulina antihe-mofílica" -más tarde factor VIII-, del que son deficientes estos pacientes, con lo que se define la hemofilia como un déficit congénito de este factor (10).

En un principio, debido a la semejanza clínica y de laboratorio así como a su igual transmisión hereditaria, se supuso que el déficit causante era debido a un único factor. Sin embargo, en 1947 el argentino Pawlosky observó que el tiempo de coagulación del plasma hemofílico podía acortarse al mezclarlo con el de otro hemofílico (11). Esto indujo a pensar que había más de un factor involucrado, tal como demostraron, más tarde, Biggs y Aggeler. Estos autores distinguieron y diagnosticaron pacientes con déficit de un nuevo factor, designado como "componente tromboplástico del plasma (PTC)", factor Christmas o factor IX. La nueva enfermedad se llama hemofilia B para distinguirla de la hemofilia A o déficit de factor VIII (12,13). A partir de 1953 se

conocen otras enfermedades hereditarias y que cursan con hipo-coagulabilidad: el déficit de factor V (14), el déficit de factor XI (hemofilia C) (15), o la enfermedad de vWillebrand, descrita en 1931 y de carácter autosómico dominante (16). En la actualidad, se han descrito déficits de prácticamente todos los factores de la cascada de la coagulación (17).

1.1.2-GENETICA DE LA HEMOFILIA

La hemofilia A es la enfermedad hemorrágica que se transmite ligada al sexo que se presenta con mayor frecuencia. Aproximadamente 1-2/10000 de los varones nacidos lo son, la mitad de los cuales sufren la enfermedad de forma severa (18). Aproximadamente una tercera parte de los casos se presentan aislados, debido a mutaciones recientes en el gen del FVIII, tal como ya predijo HALDANE sobre postulados teóricos en 1935 (19).

El gen de la hemofilia A se localiza en el brazo largo, concretamente en la banda q28, del cromosoma X (20). Su estructura es conocida, ya que fue clonada y registrada en 1984. Es bastante grande y complejo dado que consta de 186 kilobases, con 26 intrones y exones (21).

1.1.2.1-Patrón de herencia

Los trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como ocurre en el caso de la hemofilia, tienen un patrón de herencia fácil de reconocer. Este patrón demuestra que la enfermedad se manifiesta en los varones. Las mujeres, por regla general, no resultan afectadas, pero pueden transmitirla a sus hijos, que estarán afectados, y a sus hijas, que serán portadoras. No se produce transmisión de padre a hijo. Los hombres afectados no tienen hijos afectados, pero todas sus hijas serán portadoras. Los varones afectados no transmiten la enfermedad y sí el estado portador. El gen puede permanecer encubierto en mujeres portado

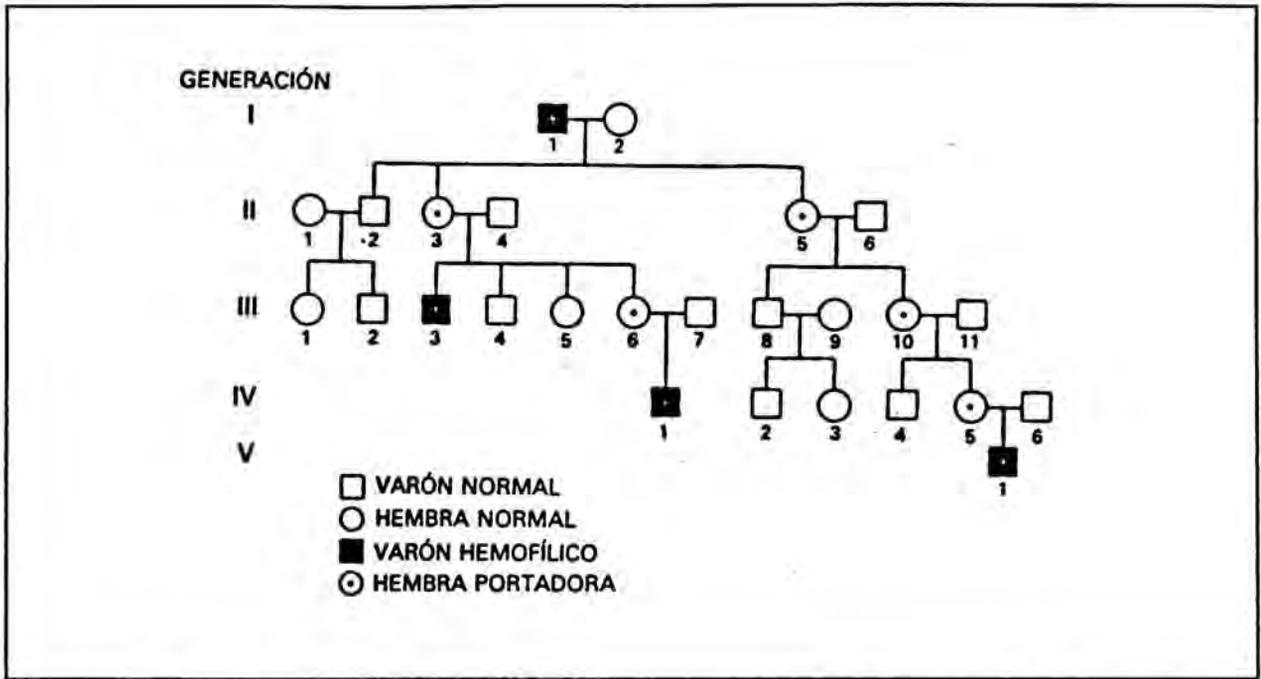


FIGURA 1.1.2-1. Ejemplo de transmisión de la hemofilia A en una familia.

ras durante varias generaciones, y aparecer después con el nacimiento de un varón afectado (Figura 1.1.2-1).

La base de este patrón se muestra en la Figura 1.1.2-2. Una mujer es portadora de la hemofilia si tiene en un cromosoma X un gen anormal para la producción de FVIII. Los efectos del gen de la hemofilia suelen estar encubiertos por el gen normal del otro cromosoma X. Dado que el cromosoma Y no contiene genes para los factores de la coagulación, un gen anormal en el cromosoma X, único, del varón, no puede permanecer oculto. Un varón que posee el gen de la hemofilia ha de manifestar la enfermedad, por lo tanto, el estado de portador no afectado no existe en los varones.

Una mujer portadora puede tener hijos de cuatro tipos: Hijo

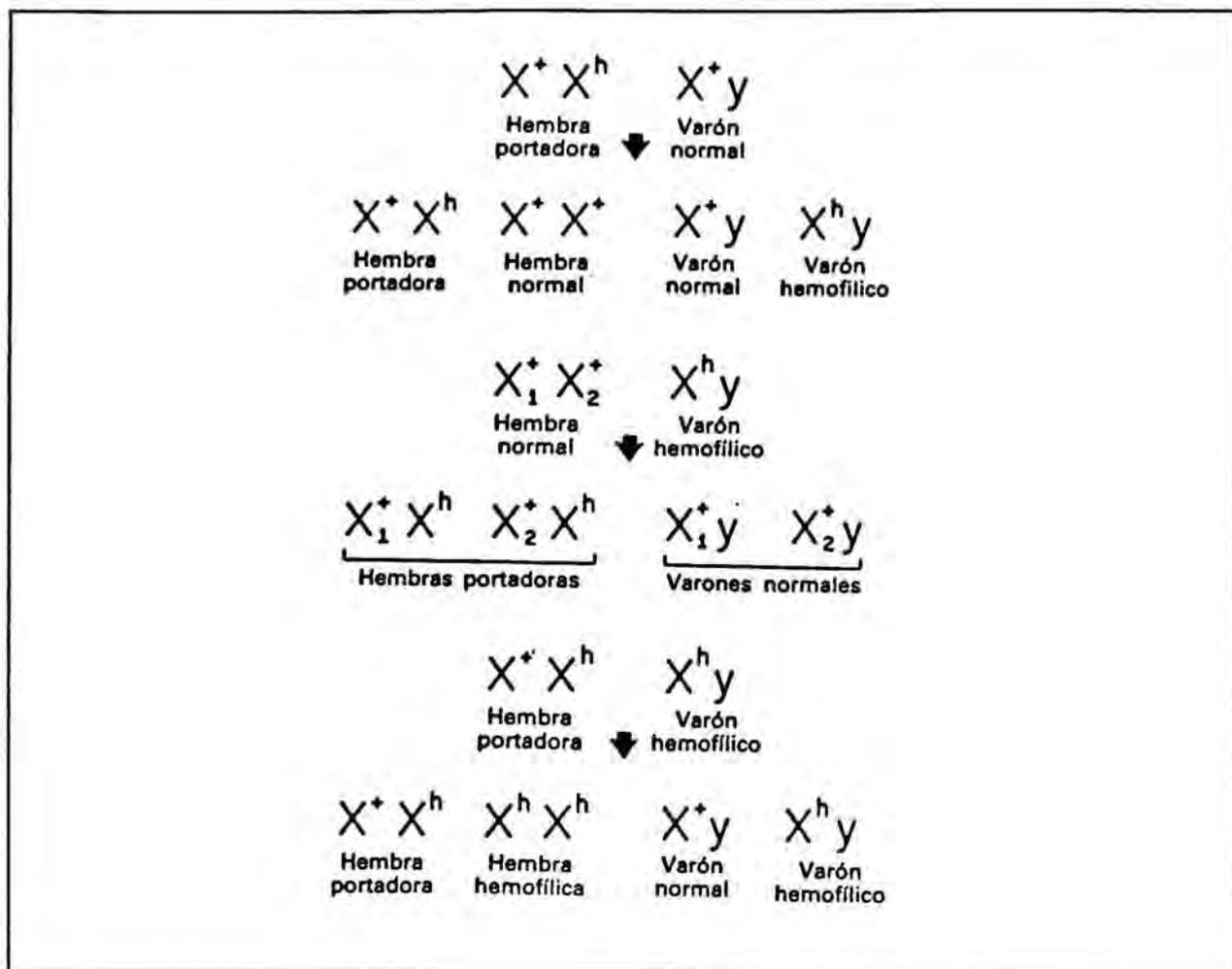


FIGURA 1.1.2-2. Patrón de herencia en la hemofilia A.

normal, hijo hemofílico, hija normal e hija portadora. En cada embarazo existe igual riesgo de tener un hijo de cualquiera de los cuatro tipos. El resultado de embarazos anteriores no cambia las posibilidades. El riesgo se mantiene intacto para cada embarazo.

Un varón hemofílico puede tener solamente dos tipos de hijos: Hijos varones, no afectados, e hijas portadoras. Dado que los varones sólo adquieren el cromosoma Y, ellos no heredan el gen de

la hemofilia. Las hijas han de heredar el cromosoma X y por lo tanto el gen de la hemofilia. No son los hijos de un hombre hemofílico los que corren el riesgo de ser hemofílicos, sino sus nietos.

Los hijos de una madre portadora y un padre hemofílico podrían incluir mujeres hemofílicas así como varones hemofílicos. Sin embargo, esta unión casual es improbable dada la proporción de mujeres portadoras y de hemofílicos en la población general (1/5000 y 1/10000, respectivamente) (22).

1.1.2.2-Detección de portadoras y diagnóstico prenatal

La detección de portadoras en la hemofilia A se realiza habitualmente valorando la razón obtenida entre la actividad coagulante del FVIII (FVIII:C) y el nivel de actividad detectado inmunológicamente asociado al FVIII (FVIII:R-Ag)(23). Este método, cuando se realiza repetidamente y se complementa con el estudio clínico de la expresión de la enfermedad, tiene un índice de confianza estadísticamente elevado, aunque se registran errores en la detección individual de portadoras. Un método alternativo se basa en el análisis del ligamiento genético entre los loci para la hemofilia A y para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (24). Sin embargo, la falta de polimorfismos a este gen en determinadas subpoblaciones humanas no resuelve de forma absoluta el problema.

El aislamiento del gen del FVIII ha permitido la búsqueda de

polimorfos en el mismo -los llamados fragmentos de restricción polimórficos (FRP)-, y la adopción de nuevas estrategias de diagnóstico (25). La sonda molecular St14 (un fragmento de DNA humano que reconoce una región muy polimórfica próxima al locus de la hemofilia A), marcada con P³², permite diferenciar un polimorfismo multialélico cuando el DNA de estudio se digiere con el enzima de restricción TaqI (26). El diagnóstico de portadoras por este método es posible en el 93% de las familias estudiadas (27).

Los métodos clásicos de diagnóstico prenatal de la hemofilia dependen de la determinación del sexo fetal mediante amniocentesis a las 16-18 semanas de gestación y posteriores estudios citogenéticos en la muestra obtenida. Si el cariotipo evidencia la presencia de un feto varón se procede a la obtención de sangre fetal para dosificar el nivel de FVIII:C como parámetro diagnóstico. La sangre fetal se obtiene habitualmente mediante fetoscopia, que aún realizada por un obstetra experto, representa un alto riesgo fetal. El empleo de estos métodos, aboca en ocasiones, a efectuar un aborto terapéutico muy tardío (28,29).

En la actualidad, gracias a la introducción de la biopsia corial y del análisis del DNA, es posible efectuar el diagnóstico de la hemofilia A durante el primer trimestre de gestación. La biopsia de corión permite la determinación del sexo, por cariotipo, alrededor de las nueve semanas de gestación, y el DNA de estas muestras puede emplearse para el diagnóstico prenatal de la hemofilia A mediante la sonda molecular St14, siendo informativa

en un tanto por ciento muy elevado de casos (26,28).

1.1.3-FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA.

La hemostasia es el conjunto de procesos fisiológicos encargados de mantener la integridad del árbol vascular evitando y corrigiendo las disrupciones u obstrucciones en alguno de sus segmentos. Se puede hablar de hemostasia profiláctica -en la que la resistencia parietal de los vasos, junto con las plaquetas, juega un papel esencial- y de hemostasia correctora, a la cual se hace referencia normalmente cuando se habla de hemostasia. La hemostasia correctora se divide en cuatro fases, en cada una de las cuales se puede establecer una interacción entre la sangre y la pared de los vasos: Vasoconstricción localizada, agregación plaquetaria, formación del coágulo y fibrinolisis (30).

1.1.3.1-Vasoconstricción localizada.

Tras una lesión vascular, se produce un proceso de vasoconstricción, originado por una estimulación refleja de terminaciones nerviosas simpáticas sobre la musculatura lisa de la pared de los vasos. Este proceso, de corta duración -aproximadamente 30 segundos-, tiene como objetivo lograr la estasis de la circulación en la zona y favorecer así la formación del trombo o coágulo plaquetario. La vasoconstricción refleja, breve, es continuada por una vasoconstricción secundaria provocada por sustancias vasoactivas como adrenalina, serotonina y tromboxano- A_2 (TxA_2), liberadas por las plaquetas una vez adheridas al tejido conjuntivo subendotelial (30).

1.1.3.2-Agregación plaquetaria.

Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la detención de la hemorragia debido a que son las responsables de la formación del trombo plaquetario, el cual produce la hemostasia primaria o provisional. En la formación del trombo plaquetario hay que distinguir dos fases: La adhesión de los trombocitos al subendotelio y el proceso de agregación.

Como consecuencia de la lesión vascular, las plaquetas se adhieren a las estructuras del subendotelio que han quedado denudadas. Su forma se vuelve esférica y emiten pseudopodos, con lo que la superficie de adhesión al subendotelio es máxima. Para que la adhesión sea adecuada es necesaria la presencia de la glucoproteína I (GPI) de la membrana plaquetaria, el factor von Willebrand (FvW) del plasma, la fibronectina -tanto del plasma como del subendotelio- y hematíes. La GPI es la más externa de las glucoproteínas de la membrana plaquetaria. Tiene un peso molecular de 150.000 daltons, y es muy rica en ácido siálico, especialmente la GPI de superficie (GPIs) o glucocalicina, la cual es responsable directo de la negatividad de la carga de superficie. El FvW, que forma un complejo molecular con el FVIII, está formado por una glucoproteína de alto peso molecular integrada por varias subunidades e interviene en la interacción entre el subendotelio y la GPI plaquetar. La fibronectina actúa de una forma similar al FvW. Los hematíes contribuyen al proceso de adhesión plaquetar al ocupar, dado su mayor tamaño, el centro de

gránulos densos o alfa del trombocito, y la síntesis intraplaque-

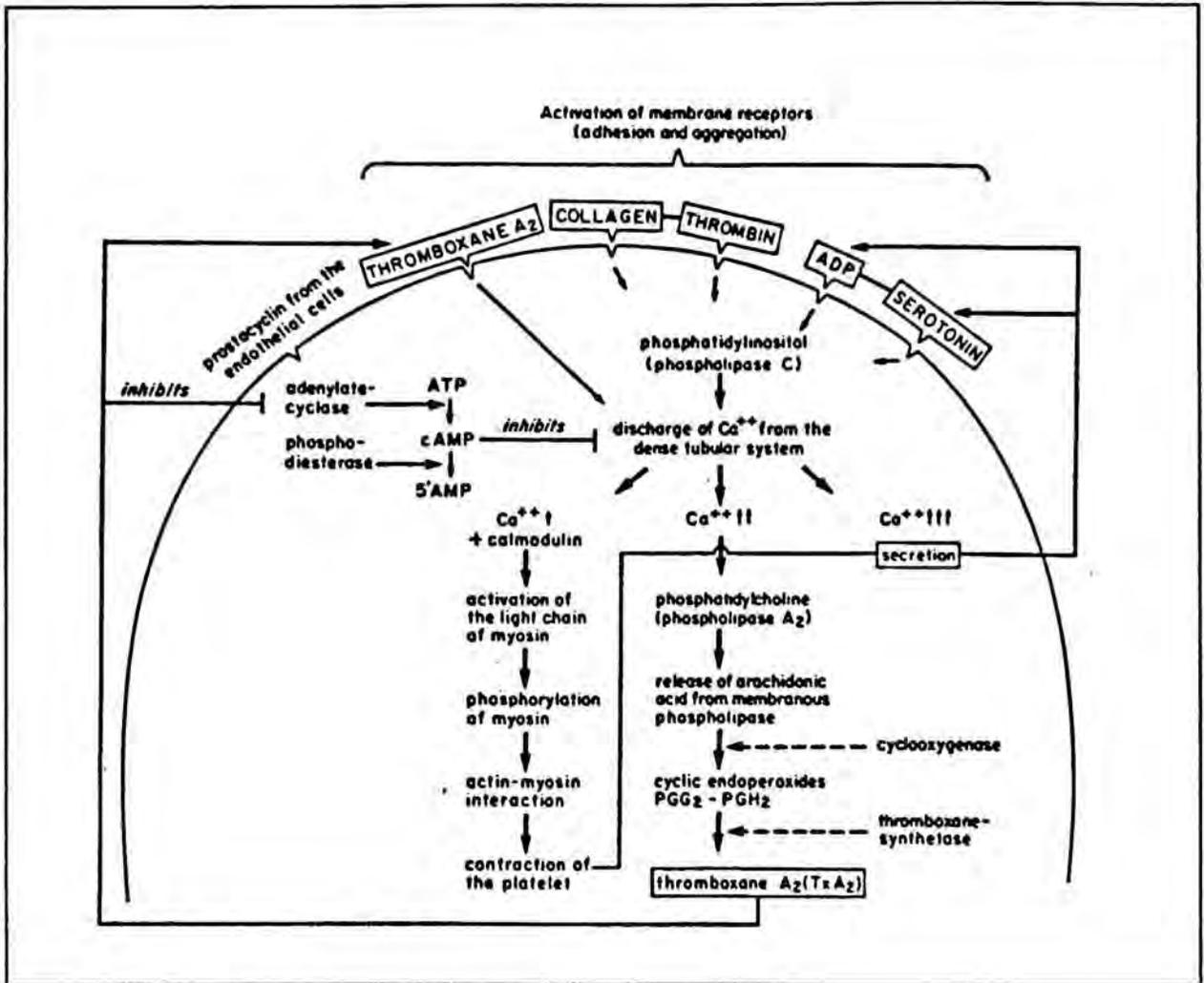


FIGURA 1.1.3-2. Esquema del proceso de agregación plaquetaria (31). El ADP y el TxA₂ son los responsables del incremento citoplasmático de calcio. En la síntesis del TxA₂ interviene parte del calcio que se ha vuelto disponible durante la activación de la membrana plaquetaria, el cual parece activar la fosfolipasa A₂, enzima que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. En el sistema tubular denso de la membrana plaquetaria, a partir del ácido araquidónico, por efecto del enzima ciclooxigenasa, se forman endoperóxidos cíclicos (PGG₂ y PGH₂), a partir de los cuales se

forma TxA_2 mediante el enzima tromboxano-sintetasa. La síntesis de TxA_2 provoca, a su vez, un aumento del calcio citoplasmático por liberación de éste del sistema tubular denso de la membrana citoplasmática. El TxA_2 es un potente vasoconstrictor y el más poderoso inductor de la agregación de las plaquetas que se conoce. El grado de contracción de las plaquetas -la disponibilidad de calcio- es regulado por el AMPc, que estimula la reincorporación del calcio desde el citoplasma hasta el sistema tubular denso. La cantidad de AMPc está condicionada por la adenilciclase, que cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP, y una fosfodiesterasa específica, que hidroliza el AMPc en AMP. En la pared vascular hay también un proceso que se inicia con el

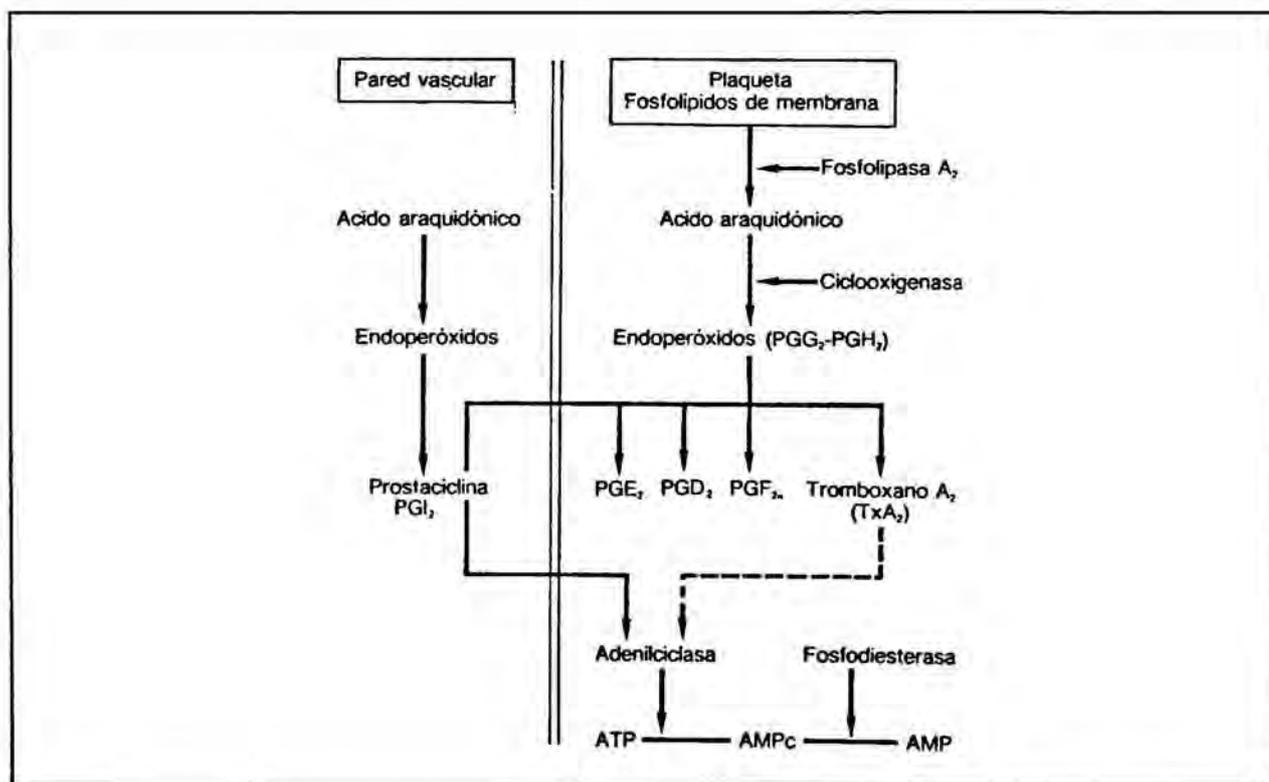


FIGURA 1.1.3-3. Síntesis de prostaciclina en la pared vascular e interacción de la misma en el funcionalismo plaquetario.

ácido araquidónico. En este caso, los endoperóxidos cíclicos producidos por la ciclooxigenasa (PGG_2 y PGH_2) son transformados por la prostaciclina-sintasa en prostaciclina (PGI_2). La PGI_2 es una sustancia de características biológicas completamente opuestas al TxA_2 , ya que tiene capacidad vasodilatadora sistémica y es, además, el mayor inhibidor de la agregación plaquetaria que se conoce. La prostaciclina tiende a aumentar el nivel de AMPc plaquetario por estimulación de la adenilciclase, con lo que disminuye o equilibra el proceso de agregación. En la última etapa de la agregación se producen puentes interplaquetarios formados por la unión, en presencia de calcio extracelular, de fibrinógeno, FvW y fibronectina entre las glucoproteínas GPIIb/IIIa de la superficie de la membrana (33,34,35).

1.1.3.3-Coagulación plasmática.

La coagulación plasmática se basa en la transformación del fibrinógeno, soluble, en una proteína insoluble, la fibrina, como consecuencia de la acción proteolítica de la trombina. La coagulación del plasma intensifica y asegura la hemostasia temporal iniciada con la vasoconstricción y desarrollada por las plaquetas. La protrombina, precursora de la trombina, y el fibrinógeno constituyen, junto con otros elementos, los factores de coagulación que son necesarios para la formación de la fibrina. Excepción hecha del calcio, los factores de coagulación son proteínas, las cuales se dividen en tres grupos según sus propiedades: factores dependientes de la vitamina K, factores sensibles a la

trombina y factores contacto.

Los factores dependientes de la vitamina K -la protrombina y los factores VII, IX y X- se sintetizan en las células del parenquima hepático. Este grupo de factores tienen en su estructura un aminoácido especial, el ácido gamma-carboxiglutámico, imprescindible para que la molécula sea activa. La vitamina K interviene de forma decisiva en la carboxilación del ácido glutámico. A excepción de la protrombina no se consumen en el proceso de coagulación y, por lo tanto, pueden encontrarse en el suero. También son dependientes de la vitamina K las proteínas plasmáticas C y S. La proteína C se activa por el complejo trombina-trombomodulina e inhibe los factores V y VIII. La función de la proteína S no está bien establecida aún, pero se sabe que actúa como coenzima de la proteína C. El grupo de factores sensibles a la trombina está formado por el fibrinógeno y los factores V, VIII y XIII. Todos ellos son moléculas de alto peso molecular y se consumen durante el proceso de la coagulación, por lo que sólo están presentes en el plasma. Los factores V y VIII no son propiamente enzimas, aunque aceleran decisivamente las reacciones enzima-sustrato en que están implicados. El grupo de factores contacto está constituido por los factores XI y XII, la precali-creína (factor Fletcher) y el quininógeno de alto peso molecular (factor Fitzgerald). Actúan en la primera fase de la coagulación y en el desencadenamiento de la fibrinólisis (36,37).

La coagulación plasmática consiste en una serie de reacciones en cascada en las que, de forma sucesiva, un proenzima inactivo es

convertido en enzima, activo, el cual, a su vez, activa a otro proenzima. El objetivo de esta cascada de reacciones es el de conseguir un efecto multiplicador y expansor del proceso que garantice su eficacia. La activación de la protrombina, último paso de la cascada, puede llevarse a cabo por dos sistemas distintos: intrínseco o sanguíneo y extrínseco o hístico, cuya fase final es común (38).

1.1.3.3.1-Sistema intrínseco.

El sistema intrínseco se inicia con la activación del factor XII o factor de Hageman producida al entrar éste en contacto con una superficie desprovista de endotelio. Por esta razón se denomina también factor contacto. Inicialmente, el factor XII -una serinproteasa- al entrar en contacto con una superficie cargada negativamente sufre un cambio de conformación sin modificación del peso molecular. Esta nueva conformación es más sensible a la activación proteolítica de la calicreína, la cual, en una segunda fase, transforma el factor XII en XII activado (XIIa). La calicreína, a su vez, deriva de la precalicreína por efecto del factor XIIa. Estas conversiones son aceleradas por el quinínógeno de alto peso molecular. Una vez activado, el factor XII reacciona con el factor XI para proporcionar, sin provocar cambios en el peso molecular, el factor XI activado (XIa) que es una serinproteasa. Este paso enzimático requiere calcio. El factor XIa, junto con calcio, factor VIII y fosfolípido, actúa sobre el factor IX pasándolo a factor IXa. El papel del factor VIII en la

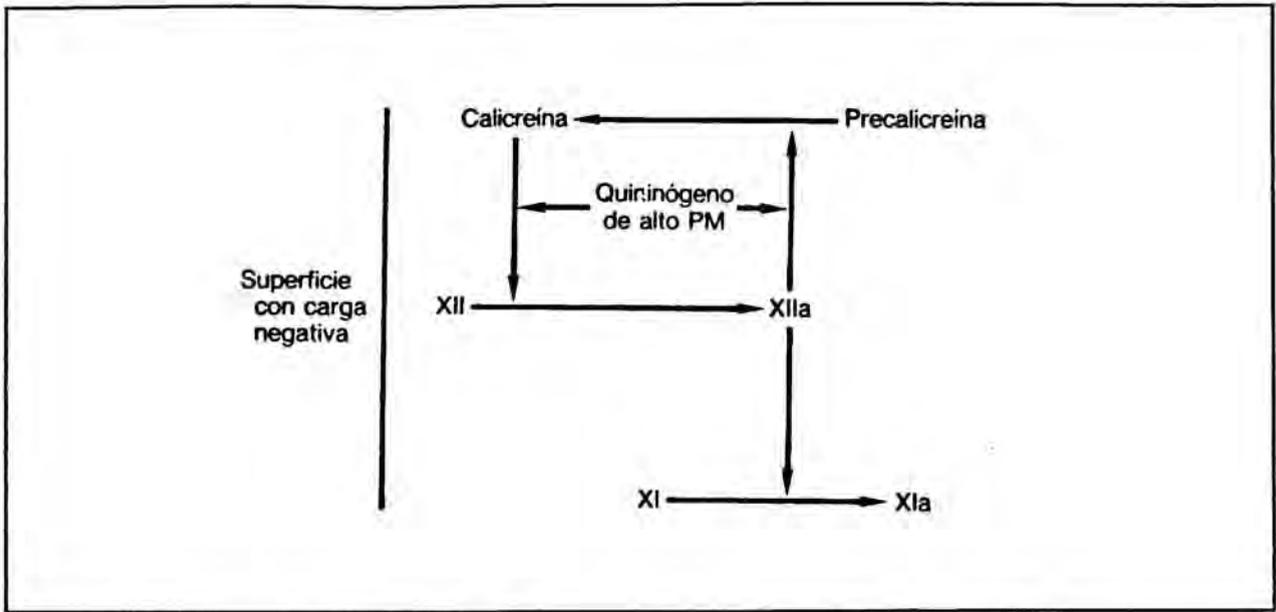


Figura 1.1.3-4. Activación del mecanismo intrínseco de la coagulación.

activación del factor IX no ha sido perfectamente establecido, aunque parece que actúa sobre la reacción acelerándola, del mismo modo que, más tarde, el factor V acelera la conversión de protrombina. Es probable que el factor VIII sea activado por la presencia de trombina. Los fosfolípidos que intervienen en las reacciones del sistema intrínseco provienen de las plaquetas (factor 3 plaquetario) (30,39,40).

1.1.3.3.2-Sistema extrínseco.

El sistema extrínseco se inicia cuando la sangre entra en contacto con el factor hístico o tromboplastina tisular, que es un componente de la membrana celular de alto peso molecular y naturaleza lipoproteica. El factor VII, una serina-proteasa que se encuentra -al igual que el factor VIII- en muy baja concentración

en el plasma, y que posiblemente circula en su forma activada, ve

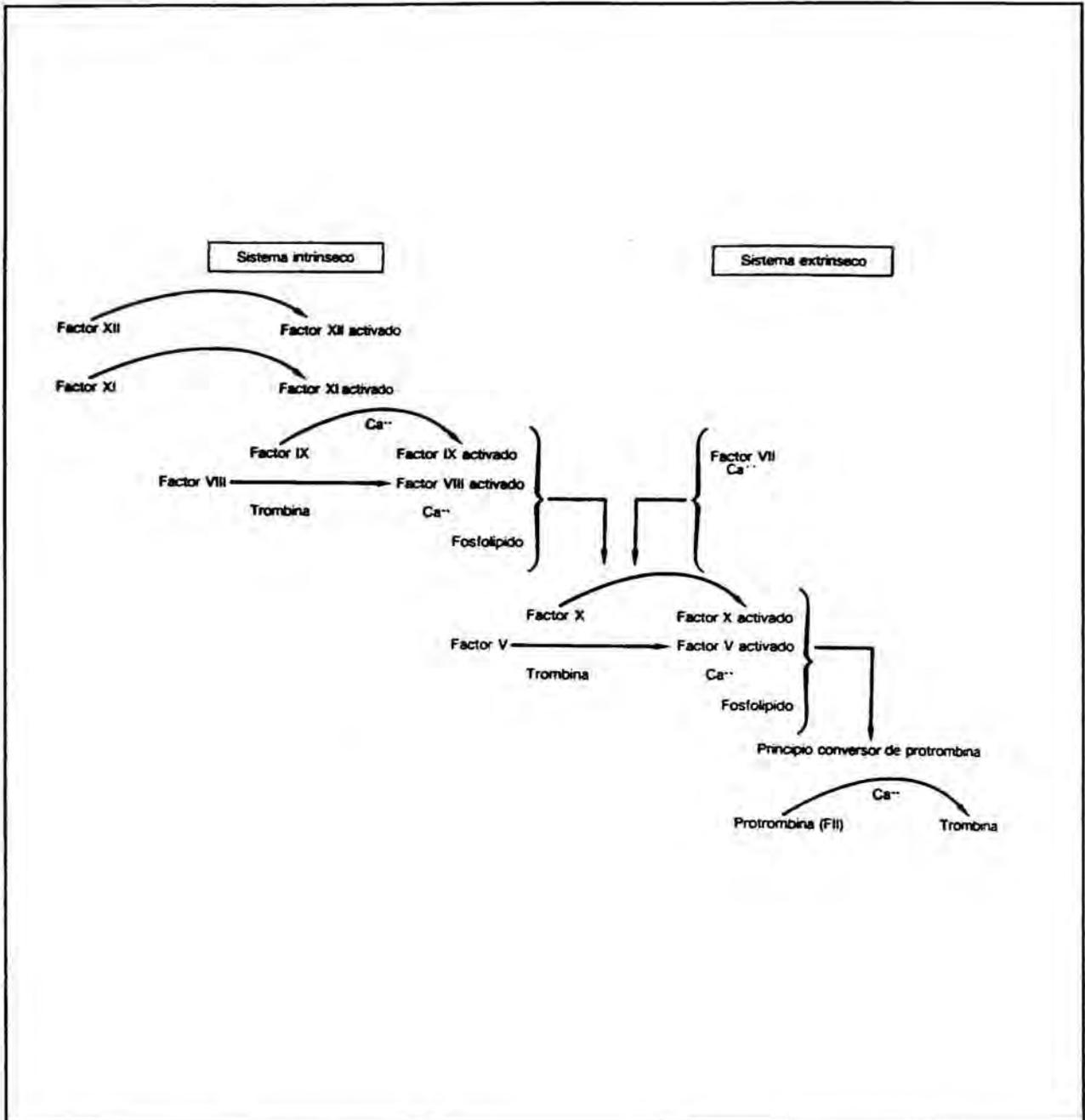


Figura 1.1.3-5. Esquema de la cascada de la coagulación.

aumentada su actividad enzimática por el componente proteico de la tromboplastina tisular. El componente fosfolipídico de la misma favorece la interacción entre los factores VII y X. La

consecuencia inmediata es la activación del factor X (factor Xa) en un proceso similar al del sistema intrínseco (36,40).

1.1.3.3.3-Sistema común.

La activación de la protrombina, en su fase final, es común a los sistemas intrínseco y extrínseco. La conversión de la protrombina en trombina requiere, además de factor Xa, fosfolípido, calcio y factor V. El factor V es una proteína de alto peso molecular que actúa probablemente haciendo más accesible la protrombina a la acción proteolítica del factor Xa. Se activa por la presencia de trombina. La naturaleza del fosfolípido varía según el sistema desencadenante de la reacción: fosfolípido plaquetar (factor plaquetario 3) en el caso del sistema intrínseco y fosfolípido tisular -procedente de la tromboplastina hística- en el caso del sistema extrínseco (36).

1.1.3.3.4-Formación de fibrina.

El fibrinógeno es una proteína de alto peso molecular, dimérica, formada por dos subunidades idénticas, cada una de las cuales está constituida por tres cadenas polipeptídicas llamadas alfa, beta y gamma. Tanto las cadenas como las dos subunidades están unidas entre si por puentes disulfuro. La concentración normal en plasma del fibrinógeno es de 2 a 5 g/l; no está presente en el suero. El fibrinógeno se sintetiza en el hepatocito, aunque existen también fuentes extrahepáticas de fibrinógeno, ya que no se han detectado niveles disminuidos tras hepatectomía (30).

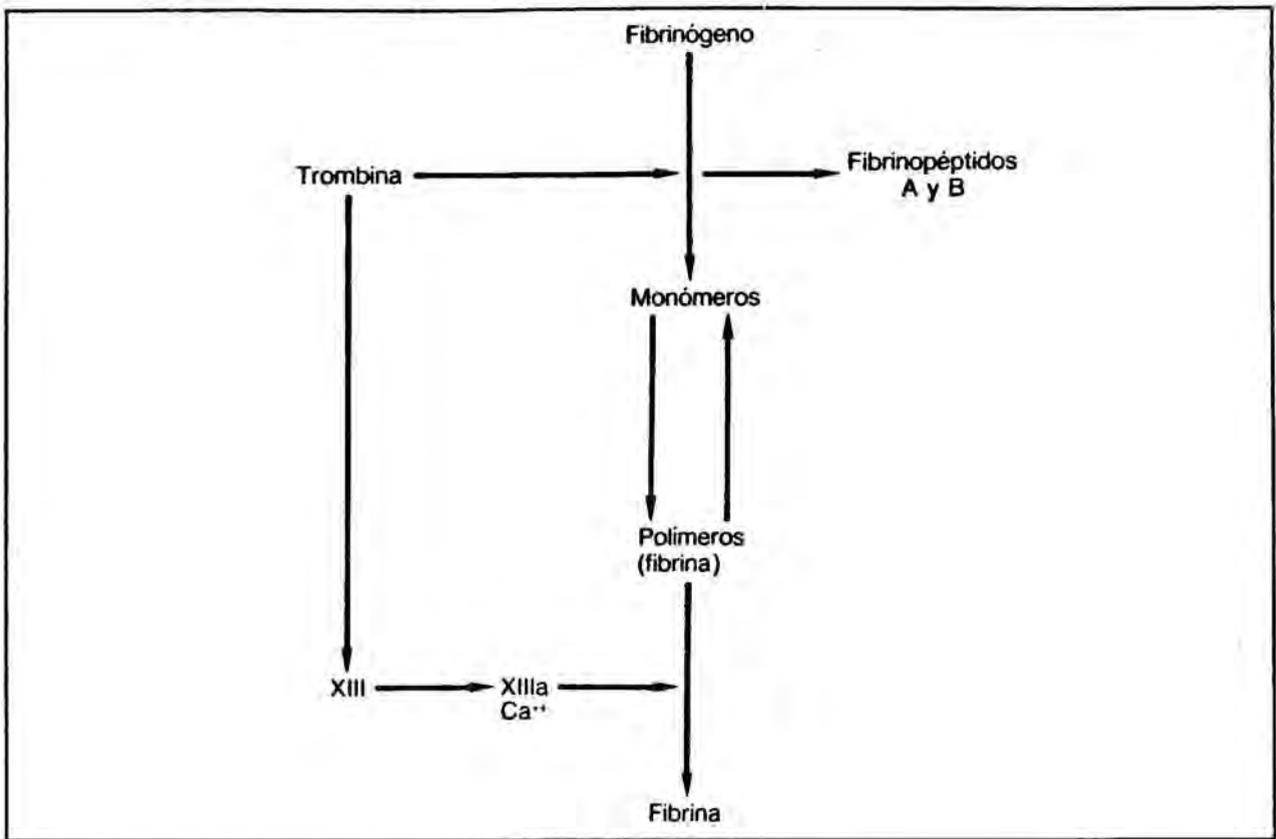


Figura 1.1.3-6. Esquema del proceso final de formación de fibrina.

La transformación del fibrinógeno en fibrina se debe a la acción de un enzima proteolítico como es la trombina. La acción de la trombina libera cuatro péptidos de bajo peso molecular, llamados fibrinopéptidos A y B, correspondientes a las cadenas alfa y beta respectivamente. La rotura en cada caso se produce a nivel de un enlace arginina-glicina. Una vez liberados los fibrinopéptidos, la masa molecular restante del fibrinógeno constituye el monómero de fibrina. Durante el proceso de liberación de los fibrinopéptidos hay una redistribución de las densidades de carga eléctrica en la molécula de fibrinógeno, lo cual provoca la aparición de atracciones electroestáticas que favorecen la unión de los monó-

meros de fibrina. La unión de los monómeros de fibrina entre sí constituye los polímeros,. Al principio, la fuerza electroestática de unión entre los monómeros es poco estable y la fibrina creada es soluble en urea 5 M y en monocloroacetato sódico al 1 por ciento. La estabilización de la fibrina se realiza por el factor XIIIa. La activación del factor XIII se realiza por la trombina en presencia de calcio. El factor XIIIa actúa como una transglutaminasa y produce, inicialmente, una reacción entre el grupo amida del residuo glutamilo en posición 14 y el grupo amina de la lisina en posición 6, localizados en la región amino terminal de dos cadenas gamma. Se forma de esta manera una unión polipeptídica estable gammaglutamilo-lisina, con liberación de amonio. En una fase posterior, las cadenas se unen formando oligómeros y polímeros de alto peso molecular (30,33).

La estabilización y fijación del trombo plaquetario se producen gracias a la trombina liberada que, independientemente de su acción sobre la agregación, actúa sobre el fibrinógeno periplaquetario produciendo polímeros de fibrina que se adhieren a la superficie de las plaquetas (33).

1.1.3.3.5-Inhibición de la coagulación.

La sangre contiene, de una forma natural, inhibidores de los factores de la coagulación activados que tienen el importante papel de limitar la formación de la fibrina únicamente a los lugares donde existe una lesión vascular y mantener la fluidez de

la sangre en circunstancias normales. Existen dos tipos de inhibidores de la coagulación sanguínea: Los que actúan inhibiendo las serina-proteasas y los que actúan inhibiendo los factores V y VIII activados. En el primer caso, los principales inhibidores son la antitrombina-III, el C₁-inhibidor, la alfa-1-antitripsina, la alfa-2-antiplasmina, la alfa-2-macroglobulina y el cofactor II de la heparina; y en el segundo la proteína C y la proteína S. El déficit congénito o adquirido de antitrombina-III, proteína C o proteína S, fundamentalmente, se asocia a una predisposición a sufrir trombosis venosa, o más raramente arterial, recurrente (41,42).

La antitrombina-III es una glucoproteína de una sola cadena con un peso molecular de 58000, que se encuentra en el plasma en una concentración de 100-150 mcg/mililitro. Es el más importante inhibidor plasmático de la trombina, con la que forma un complejo inactivo irreversible a consecuencia del cual los dos componentes quedan inactivos. La reacción se produce estequiometricamente en la forma 1:1 entre un lugar arginina activo de la antitrombina-III y un lugar serina activo de la trombina. La antitrombina-III es la responsable del 75 % del efecto antitrombótico del plasma y actúa, además, como potente inhibidor del factor Xa. La heparina aumenta la velocidad de inactivación de la trombina y el factor Xa por la antitrombina-III, lo que constituye la base de su actividad anticoagulante y profiláctica en la trombosis venosa (33,43).

El C₁-inhibidor es una glucoproteína de peso molecular 105000

cuya concentración en el plasma es de 180 mcg/ml y que actúa neutralizando los factores de contacto. La alfa-1-antitripsina es una glucoproteína de una sola cadena y un peso molecular de 55000 que se encuentra en el plasma a una elevada concentración -2.5 mg/ml- y que actúa inhibiendo el factor Xa. Aunque su acción representa el 70 % de la inhibición total del factor Xa, su déficit no origina, sin embargo, un cuadro trombótico evidente. La alfa-2-macroglobulina es una glucoproteína tetramérica de peso molecular 725000, con una concentración plasmática de 2.5 mg/ml que puede ser superior en el embarazo y en niños, y que actúa inhibiendo las proteasas especialmente la trombina y la calicreína. La alfa-2-antiplasmina es una glucoproteína de una sola cadena y de peso molecular 70000 que circula en el plasma a la concentración de 70 mcg/ml y que actúa inhibiendo la acción de la plasmina, aunque también inhibe la acción de las serina-proteasas. El cofactor II de la heparina es una glucoproteína de peso molecular 66000 que inhibe la acción de la trombina por reacción covalente en proporción 1:1. La presencia de heparina multiplica por 1000 la velocidad de reacción, al igual que ocurre con la antitrombina-III (44-46).

La proteína C es una serina-proteasa vitamina K dependiente con un peso molecular de 62000 que se encuentra en el plasma a la concentración de 4 mcg/ml y que se activa por acción de la trombina. La acción anticoagulante se ejerce por destrucción proteolítica de la cadena pesada de los factores Va y VIIIA, lo que provoca su inactivación. La acción sobre los factores V y VIII

nativos no parece tan intensa. La actividad de la proteína C activada (Ca) se ve muy acelerada por la presencia de fosfolípidos y calcio. Otra proteína, la proteína S, actúa en este mismo proceso como cofactor de la proteína C acelerando la degradación de los factores Va y VIIIa. La proteína S es una glucoproteína vitamina K dependiente, de peso molecular 69000, que se encuentra en el plasma a la concentración de 35 mcg/ml que se diferencia de las demás proteínas vitamina K dependientes en que no es una serina-proteasa. La actividad de la proteína C es modulada por el factor inhibidor de la actividad de la proteína C, una proteína de peso molecular 57000 que se encuentra en el plasma a la concentración de 5 mcg/ml. Este factor actúa también, por otro lado, como inhibidor de los factores Va, VIIIa, Xa y de la trombina y su acción es heparina dependiente (el tercer factor de la heparina, junto a la antitrombina-III y el cofactor II de la heparina) (40,47,48).

1.1.3.4-Fibrinólisis.

La fibrinólisis consiste en la destrucción de la fibrina originada en el proceso de la coagulación. El mecanismo de la fibrinólisis tiene una estructura semejante al de la formación del trombo pero mucho menos conocido y con el objetivo contrario. En este caso también, al final del proceso se origina un enzima proteolítico -la plasmina- a partir de un precursor inactivo del plasma -el plasminógeno-. La activación del plasminógeno se produce fundamentalmente por un activador hístico, el activador tisular del plasminógeno, más conocido como TPA. El TPA es sintetizado,

almacenado y, posteriormente, liberado por las células endoteliales si son dañadas o estimuladas. Recientemente se ha observado que el factor XII al activarse por contacto desencadena, a la vez, la coagulación y la fibrinólisis. El plasminógeno es una globulina de una sola cadena que está presente en el plasma a la concentración de 200 mcg/ml, aunque también difunde a otros tejidos. El plasminógeno circula en el plasma en su mayor parte como glu-1-plasminógeno, aunque una pequeña parte lo hace como lis-plasminógeno. Esta última forma tiene mayor afinidad por los receptores de la fibrina y es más fácilmente activada a plasmina. En condiciones normales, un 15% del plasminógeno circula unido al fibrinógeno. La plasmina es una serina-proteasa que digiere la fibrina dando productos de degradación de cuatro tipos distintos, con un peso molecular que oscila entre 240000 y 45000 daltons. La plasmina, sin embargo, puede actuar también sobre el fibrinógeno, los factores V, VIII y vW y otros componentes de la coagulación. Para que esto no ocurra, al finalizar la digestión de la fibrina, la plasmina es inactivada selectivamente por la alfa-2-antiplasmina, y en menor medida, por la antitrombina-III, la alfa-2-macroglobulina y la alfa-1-antitripsina (33,49).

1.1.4-CARACTERIZACION MOLECULAR DEL FACTOR VIII.

La molécula del factor VIII -en su concepto clásico- está constituida por dos proteínas distintas, con estructura, función biológica, expresión antigénica y determinación genética diferentes, pero que circulan conjuntamente en el plasma constituyendo un complejo molecular. Los dos componentes básicos son el factor VIII procoagulante (factor VIII en sentido estricto, factor antihemofílico o FVIII:C) y el antígeno relacionado del factor VIII (factor von Willebrand, FvW o FVIIIIR) (50).

El factor von Willebrand es una glucoproteína multifuncional que es esencial para una hemostasis normal. Se sintetiza en las células del endotelio vascular y se almacena en unos orgánulos especializados denominados cuerpos de Weibel-Palade, desde los que es liberada tras estimulación. Circula en el plasma en forma de una serie de multímeros unidos por puentes disulfuro, que pueden alcanzar pesos moleculares superiores a 10.000.000 daltons. Los multímeros de alto peso molecular juegan un papel fundamental en la adhesión de las plaquetas al subendotelio tras una lesión o daño vascular ya que median la unión entre el colágeno del subendotelio y los receptores GPIIb de las plaquetas. Toda una serie de anomalías, en la síntesis o funcionalismo de esta molécula se conocen con el nombre de enfermedad de von Willebrand (51-54).

El factor VIII es una molécula que tiene un papel muy importante en la cascada de la coagulación sanguínea acelerando, tras ser

activado por la trombina, el paso del factor X a factor Xa por parte del factor IXa y cuya consecuencia última es la formación del coágulo de fibrina (51,55).

El clonado del DNA que codifica la síntesis de la molécula de factor VIII ha permitido establecer su estructura primaria (21,56,57). El factor VIII se sintetiza inicialmente en forma de un precursor de cadena única compuesto por 2351 aminoácidos, 2332 si se descuenta un resto peptídico de 19 aminoácidos que se pierde en el retículo endoplasmático. La molécula precursora se procesa proteolíticamente hasta conseguir una cadena pesada -en el extremo amino terminal- con un peso que oscila entre 90 y 200 kDa y una cadena ligera -en el extremo carboxi terminal- con un peso de 80 kDaltons. La molécula del factor VIII consta (Figura 1.1.4-1) de tres dominios que aparecen en el orden A1-A2-B-A3-C1-C2. El dominio A aparece dos veces en la cadena pesada y una vez en la ligera, y tiene homología con la ceruloplasmina -una proteína plasmática que fija y transporta cobre-. El dominio B es único. El dominio C aparece dos veces en la cadena ligera y tiene homología con proteínas que fijan fosfolípidos (58). La proteína tiene 25 puntos potenciales de N-glucosilación mediante restos de asparragina, 19 de los cuales están situados en el dominio B. El dominio B se elimina proteolíticamente cuando la molécula es activada por la trombina y no tiene actividad procoagulante tanto "in vitro" como "in vivo" (59). En el plasma el factor VIII se encuentra como un complejo inónico metálico de la cadena pesada de 200 kDa y de la cadena ligera de

80 kDaltons. El complejo está unido de forma no covalente a la molécula de von Willebrand en la relación de una molécula de factor VIII por cien moléculas de FvW (60,61). Para estabilizar la molécula de factor VIII en el plasma es necesaria la presencia del factor von Willebrand (62,63).

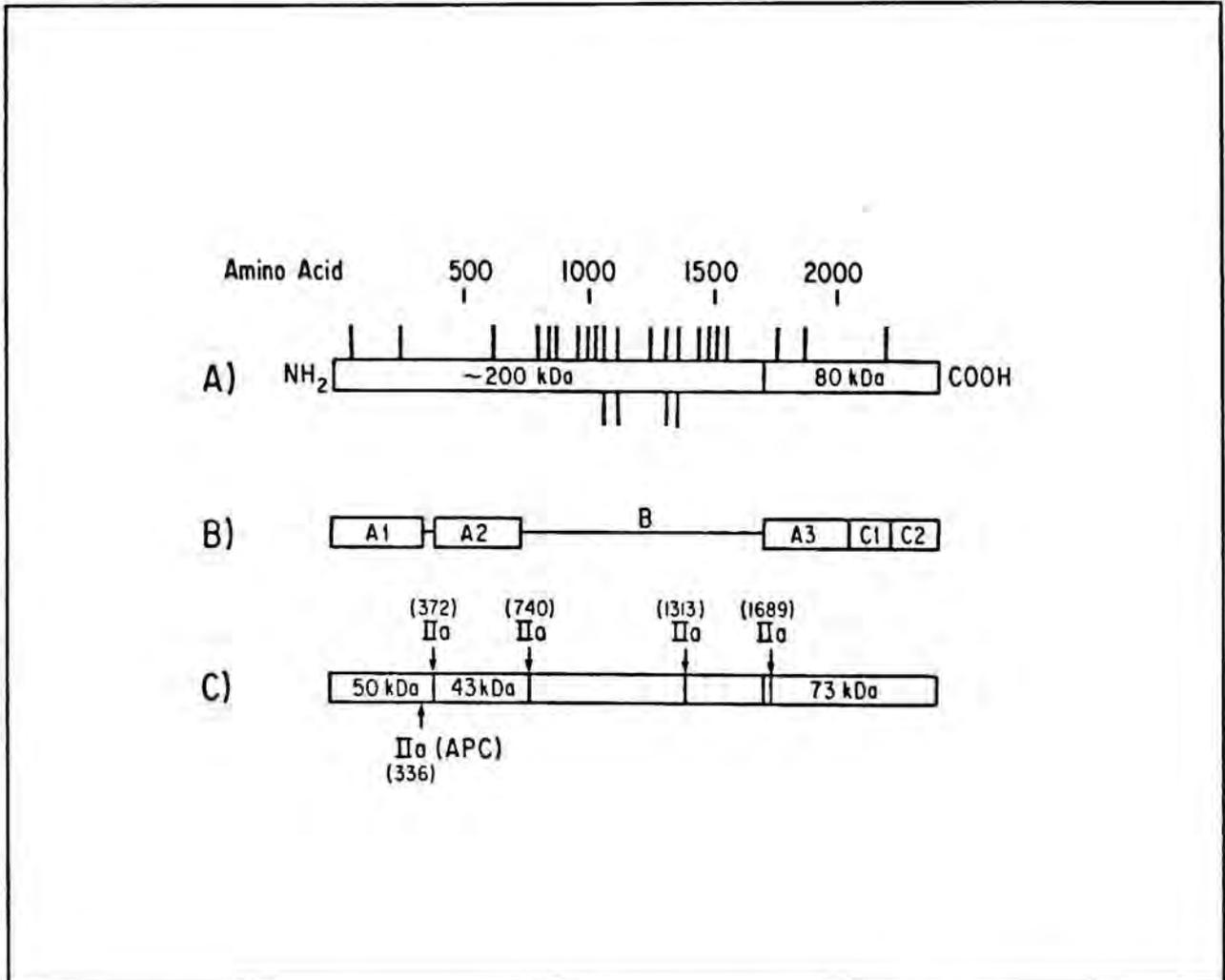


Figura 1.1.4-1. Formas estructurales del factor VIII. A) Posiciones relativas de las cadenas ligera y pesada. Las barras verticales representan lugares potenciales de N-glucosilación de la molécula intacta. B) Posiciones relativas de los dominios que componen el factor VIII. C) Posiciones de "clivado" de la trombina (IIa) y de la proteína C activada (APC) (64).

1.1.4.1-Relación estructura-actividad.

El dominio B de la molécula de factor VIII, delimitado por los aminoácidos 740 y 1648, es eliminado de la misma durante la activación proteolítica del factor VIII. Al comparar la secuencia de aminoácidos del dominio B en las moléculas de factor VIII humano y porcino se constata que la homología es del 50%, mientras que para los dominios A2 y A3 es del 80-85 por ciento. Teniendo en cuenta la considerable diferencia estructural entre ambos dominios B y que el factor VIII porcino corrige el déficit de coagulación en pacientes hemofílicos, se ha señalado que dicho dominio B no sería necesario para la actividad coagulante del factor VIII. Este hecho ha sido confirmado al observar que mutantes de la molécula de factor VIII sin el dominio B -obtenidos al manipular el cDNA del factor VIII y expresarlo en células de mamífero- eran capaces de generar factor Xa o coagular un plasma deficiente en factor VIII (59).

El significado funcional del dominio B es desconocido. Sin embargo, su longitud es demasiado elevada para ser un simple péptido de activación. Las únicas diferencias que se pueden establecer entre las moléculas sin el dominio B y las normales es una mayor sensibilidad frente a la digestión con trombina -lo cual sugiere que el dominio B protegería al factor VIII de la activación de la trombina-, y una menor capacidad para ser almacenado por las células, al no unirse con tanta afinidad a la proteína BiP (o

proteína fijadora de inmunoglobulinas) (64,65). Curiosamente, el factor V -una molécula con una función y estructura parecidas a la del factor VIII- también contiene un dominio B de estructura larga y altamente glucosilado que se pierde en el momento de la activación. La porción central de la molécula de factor V no es necesaria para la coagulación. Sin embargo, el dominio B de la molécula de factor V sí tiene un papel establecido ya que se ha comprobado que sirve como sustrato para la actividad transglutaminasa del factor XIII, al contrario que el dominio B del factor VIII cuya importancia funcional se desconoce (66-68).

Los datos procedentes del análisis de moléculas mutantes en los lugares de "clivado" ha permitido establecer un modelo de activación y posterior inactivación de la molécula de factor VIII, tal como muestra la Figura 1.1.4-2. La estructura de dos cadenas del factor VIII se halla estabilizada por un puente metálico. Para ser activo, el factor VIII necesita del concurso de las dos cadenas, ya que ninguna de las dos cadenas, separadas por EDTA, tiene actividad por sí sola. La activación requiere el "clivado" -por parte de la trombina o el factor Xa- del resto arginina 740 en la cadena pesada, para generar un polipéptido de 90 kDa, el cual es procesado a continuación en el aminoácido 372 para originar dos polipéptidos de 43 y 50 kDaltons. De forma simultánea, la cadena ligera de 80 kDa es "clivada" en el resto 1689 para generar un polipéptido de 73 kDaltons. La especie activa es el complejo metálico formado por las polipéptidos de 50 y 73 kDaltons. El complejo activo puede ser inactivado por dos vías distintas. Una consiste en la acción proteolítica de la proteína C

activada, la trombina o el factor Xa, en el resto 336, y que transforma el polipéptido de 50 kDa en otro de 45 kDaltons. El factor Xa actúa sobre el resto 1721 de la cadena ligera, que pasa de 73 a 67 kDaltons. La otra consiste en la simple disociación del puente metálico que une las dos especies activadas (69-71).

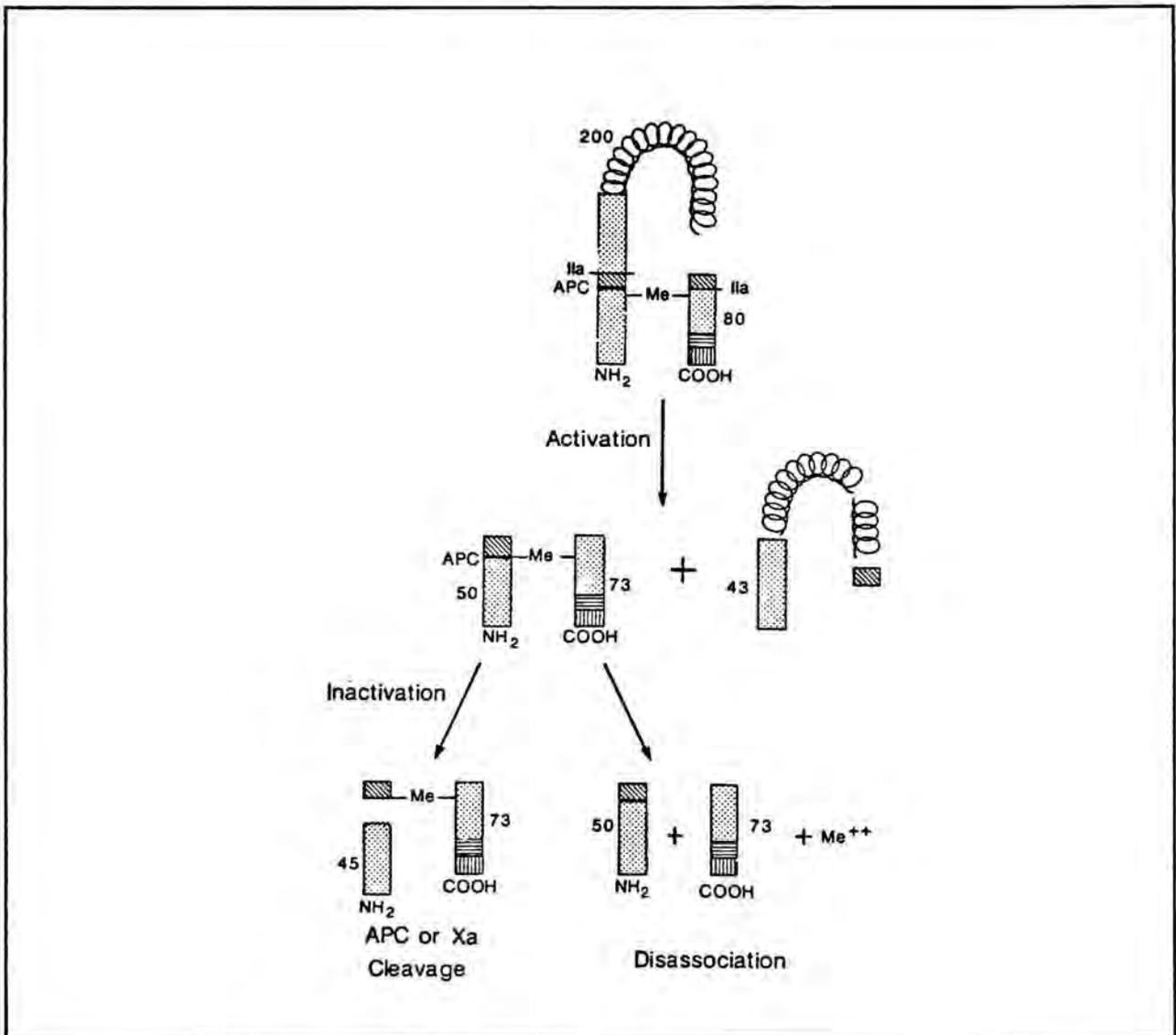


Figura 1.1.4-2. Esquema de la activación y la inactivación de la molécula de factor VIII. IIa representa los lugares de "clivado" por parte de la trombina y APC los correspondientes a la proteína C activada (72).

1.1.5.-CLINICA DE LA HEMOFILIA.

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico plasmopático -o hipo-coagulabilidad- congénito que se caracteriza por una deficiencia en la actividad coagulante del factor VIII (FVIII:C) en el plasma, presentándose el factor von Willebrand normal (17).

La gravedad de la hemofilia A está condicionada a la actividad o concentración plasmática del factor VIII deficitario. Basandose en este hecho se pueden establecer o definir tres tipos de hemofilia A: grave, moderada y leve o benigna (Tabla 1.1.5-1) (73).

En la hemofilia grave, el nivel plasmático de factor VIII es inferior al 1 % del valor medio en un sujeto normal. En estos pacientes, las hemorragias pueden producirse de forma espontánea, sin causa aparente, en particular en las articulaciones y músculos. Se considera que la hemofilia es moderada si el nivel de factor deficitario se sitúa entre el 1 y el 5 % del valor normal. Estos pacientes no suelen sangrar espontáneamente, pero incluso el menor traumatismo puede provocarles una fuerte hemorragia. Los pacientes con hemofilia leve tienen valores plasmáticos de factor VIII por encima del 5 % y, por lo general, sólo sangran con traumatismos, cirugía o exodoncias; éstos, raramente sufren hemartrosis (73,74).

1.1.5.1-Sintomatología clínica

El síntoma crucial en la hemofilia son las hemorragias. Estas

aparecen frecuentemente en el enfermo hemofílico por causas mínimas que en individuos normales pasan desapercibidas. Una vez han aparecido, no tienden a cesar espontáneamente y si el motivo de la hemorragia, aunque inaperente, persiste, existe una tendencia a las recidivas locales (17,75).

Las hemorragias pueden clasificarse en externas o internas según su localización. Entre las externas hay que distinguir entre las cutáneas y las mucosas. De estas últimas hay que citar las hemorragias de la cavidad bucal, las epistaxis, las digestivas -menos frecuentes- y las de origen vesical -traducidas en hematurias-.

Las hemorragias internas son aquellas en las que la sangre queda en una cavidad preformada o se infiltra en los tejidos determinando hematomas. Se dividen en hemorragias subcutáneas, del tejido conectivo, serosas y musculares. Este último tipo de hemorragias puede producirse por una herida externa, con frecuencia una inyección intramuscular, o por traumatismo cerrado. La sintomatología local de los hematomas musculares consiste, aparte de la tumefacción, en dolor debido a la compresión de nervios y vasos. Si la colección no puede abrirse camino hacia capas superficiales, se aprecia, por palpación, la tumefacción dolorosa con acentuada tensión de la piel, circulación colateral y elevación de la temperatura local. Los músculos más afectados son los psoas ilíacos, glúteos, gemelos, cuádriceps, femorales, bíceps y grandes dorsales. Entre los hematomas del tejido conectivo desta-

can por su importancia clínica los hematomas de la celda renal, del suelo de la boca y el hematoma retroorbitario. Entre las hemorragias serosas hay que considerar las hemorragias de la pleura y del peritoneo, y merecen especial comentario las hemartrosis. Las hemorragias intraarticulares constituyen una de las manifestaciones más características y frecuentes de las formas graves. Las articulaciones más afectadas son las del codo, tobillo, cadera y en particular de la rodilla. Las hemartrosis recurrentes conducen a una intensa proliferación de la membrana sinovial, que produce hemorragias más frecuentes y, finalmente, una sinovitis crónica. De modo progresivo, aparecen atrofia muscular y de ligamentos, estrechamiento de la articulación y destrucción del cartílago.

1.1.5.2-Diagnóstico de laboratorio

El alargamiento del tiempo de coagulación en tubo, con formación de un coágulo plasmático debido a que la sedimentación de la sangre es más rápida que la coagulación, son típicas del estado hemofílico grave. El tiempo de protrombina de Quick es normal en la hemofilia A, así como la exploración de los mecanismos vascular y plaquetario (resistencia capilar, tiempo de sangría, número y aspecto de las plaquetas, retracción del coágulo). La dosificación del factor von Willebrand, mediante la valoración del cofactor de la ristocetina, y su actividad antigénica mediante la técnica inmunolectroforética de Laurell, son normales, lo que la diferencia de la enfermedad de von Willebrand. La dosificación del factor VIII se lleva a cabo generalmente observando la cor-

rección del tiempo de cefalina (tiempo de tromboplastina parcial activada o TTPA) en plasmas carentes por el plasma problema y plasmas normales a distintas concentraciones (técnica de un tiempo). La dosificación del factor VIII permite la clasificación de la hemofilia A en grave, moderada o leve según la menor o mayor tasa del factor deficitario. Es de destacar, por otro lado, que el análisis de los antígenos del factor VIII en pacientes hemofílicos demuestra la presencia en plasma de concentraciones del mismo muy superiores a la actividad del factor VIII encontrada, con lo que puede asumirse que, en muchos casos, el defecto es básicamente de funcionalismo, presentandose en el plasma una proteína antigénicamente competente pero carente de actividad procoagulante (76).

Tabla 1.1.5-1 Actividad plasmática del factor y manifestación clínica de la hemofilia.

ACTIVIDAD PLASMÁTICA (%)	MANIFESTACION CLÍNICA
50 - 200	Individuo normal: Sin manifestación clínica
25 - 50	Portador asintomático: Hemorragia excesiva tras cirugía mayor
5 - 25	Hemofilia leve o benigna: Hemorragia excesiva tras traumatismo o cirugía
1 - 5	Hemofilia moderada: Hemorragias graves tras traumatismo o cirugía. Eventualmente, hemartrosis
0 - 1	Hemofilia grave: Hemorragias graves tras heridas triviales Hemartrosis espontáneas Hemorragias musculares

1.1.6-SITUACION ACTUAL

La hemofilia como enfermedad y, más concretamente el paciente hemofílico, se encuentra en una fase de transición o en lo que se ha venido a llamar un periodo de luces y sombras.

Sombras, en la medida que una parte muy importante de los pacientes hemofílicos se hallan, en virtud de los concentrados de factor VIII que les fueron administrados hace algunos años, infectados por algunos virus, como los de las hepatitis B y C y, sobre todo por el HIV, que condicionan de forma extrema sus expectativas tanto de supervivencia como de integración plena en la sociedad. Esto se produce, además, tras una fase inicial (últimos años 70 y primeros 80) en la que, tras la aparición de los concentrados de factor VIII, se abrían plenas expectativas para la normalización clínica y social de la población hemofílica.

Luces, en la medida en que la aparición de nuevos concentrados de factor VIII, seguros desde el punto de vista de la inactivación vírica, ha permitido relanzar tales esperanzas y situarlas en un plano de realidad perfectamente alcanzable. La próxima aparición y desarrollo de concentrados de factor VIII, obtenidos por recombinación genética, refuerza aún más esta posibilidad al librar al hemofílico de los riesgos de cualquier otro virus, conocido o desconocido, que pudiera ser transmisible por un factor VIII de origen plasmático humano. Hoy se puede afirmar que existe una nueva generación de pacientes hemofílicos, libres de

cualquier virus, y que gracias al tratamiento sustitutivo con factor VIII, se hallan a resguardo de los condicionantes -tanto de calidad de vida como de longevidad- que han caracterizado, durante siglos, a esta enfermedad.

1.1.7-TRATAMIENTO INTEGRAL DE LA HEMOFILIA

El tratamiento integral de la hemofilia es pluridisciplinar, e incluye distintas vertientes: quirúrgico, ortopédico, rehabilitador, sustitutivo, Aunque en la práctica el tratamiento específico de la hemofilia es el sustitutivo, ya que las otras opciones son únicamente paliativas de las lesiones -fundamentalmente articulares- secundarias al proceso hemorrágico, hoy en día no se puede concebir el tratamiento de la hemofilia sin el adecuado concurso de todas las especialidades implicadas.

Esta filosofía contempla, por otro lado, la aparición, en cada área sanitaria implicada, de profesionales "especialistas en hemofilia" encargados de llevar a la práctica adecuadamente el tratamiento integral de la hemofilia.

1.1.7.1-Unidad de Hemofilia

La Unidad de Hemofilia es el instrumento terapéutico destinado al tratamiento y al seguimiento del paciente afecto de hemofilia. La Unidad de Hemofilia plasma, estructuralmente, el concepto del tratamiento integral y reúne, físicamente, a los profesionales implicados.

La Unidad de Hemofilia del Hospital Vall d'Hebron forma parte de una red de Unidades de Hemofilia distribuidas por todo el mundo y se integra en el sistema hospitalario con un triple objetivo:

Asistencial, docente e investigacional. A su vez, actúa como centro de referencia en el estudio de las coagulopatías congénitas en Cataluña.

1.2-CONCENTRADOS DE FACTOR FVIII

1.2.1-TRATAMIENTO SUSTITUTIVO

1.2.1.1-Fuentes terapéuticas de factor VIII

El tratamiento sustitutivo de la hemofilia A se basa en la reposición o sustitución del déficit de factor VIII mediante un aporte exógeno del mismo. La mejor forma de conseguir la hemostasia, la formación del coágulo y permitir el desarrollo de fibroblastos para una curación adecuada, es la administración de dosis elevadas del factor carente (77).

Los materiales terapéuticos utilizados, historicamente y hasta la actualidad, para el tratamiento de la hemofilia A son la sangre total, el plasma fresco congelado, el crioprecipitado y los concentrados de factor VIII (Tabla 1.2.1-1) (78).

La sangre total fue el primer tratamiento que demostró ser mínimamente eficaz. En la actualidad, su utilización carece de sentido salvo, secundariamente, como aporte de células tras una hemorragia severa. En cualquier caso, la sangre -el plasma- es la fuente primaria fundamental de factor VIII de que se dispone en la actualidad.

El plasma fresco congelado contiene factor VIII a la concentración aproximada de 1 UI/ml y puede ser útil cuando las necesidades de factor son bajas. Tiene la ventaja de que, al provenir de un único donante -la mayoría de las veces conocido-, la posibilidad de transmisión de alguna enfermedad vírica es muy reduci-

da. El inconveniente está en que la actividad plasmática máxima de factor VIII que con su administración se consigue no es superior al 20-30 %, insuficiente para la preparación prequirúrgica de un paciente hemofílico severo (79).

El crioprecipitado se obtiene descongelando, en condiciones controladas a 4 C, el plasma fresco. Se consigue, de esta forma, una solución hasta 10 veces más concentrada en factor VIII que el plasma y que permite, tras su administración, incrementos en la actividad sérica del factor VIII de hasta el 60-80 por ciento. No es muy útil, sin embargo, en la práctica terapéutica rutinaria debido al gran volumen que todavía es necesario infundir -un mínimo de 200 ml para conseguir un incremento de actividad sérica del 25 %- y a la carga proteica residual que contiene, especialmente de fibrinógeno (3-4 g/100 ml) (80,81).

Los concentrados de factor VIII constituyen la gran innovación en este campo de la terapéutica y son los principales responsables del incremento que la calidad de vida del hemofílico ha experimentado en los últimos años. Se obtienen de grandes "pools" de plasma que se someten a un proceso de fraccionamiento y purificación que proporciona un producto con una alta concentración de factor (25-100 UI/ml), con una baja concentración de proteínas acompañantes (inferior a 2 mg proteína/UI factor) (82). Esta alta concentración y pureza permite administrar, en un volumen reducido, la dosis de factor VIII suficiente para alcanzar concentraciones plasmáticas máximas, con una incidencia mínima de efectos

adversos. Por otro lado, al reducirse el volumen a administrar, la administración misma del factor es más sencilla, con lo que no se requiere necesariamente personal o utillaje especializado. Este hecho, unido a que los concentrados se presentan liofilizados y a que su conservación únicamente requiere el mantenimiento en refrigerador, posibilitan su utilización a nivel ambulatorio o domiciliario.

El primer concentrado de factor VIII apareció en el mercado farmacéutico en 1967 en Estados Unidos (83). A partir de estos primeros preparados, y en función de la experiencia clínica adquirida y de la mejora en las técnicas de preparación, se han obtenido productos cada vez más puros (libres del resto de proteínas contenidas en el plasma de origen) y con menor capacidad de transmisión de virus patógenos (procedentes del plasma de los donantes).

1.2.1.2-Dosificación del factor VIII

La dosis de factor VIII o factor antihemofílico a administrar en un proceso hemorrágico se calcula en función del peso del paciente, el volumen plasmático y la gravedad del episodio a tratar.

Es conveniente considerar la administración de factor coagulante en términos de unidades internacionales (UI) por kg de peso corporal. Por definición, 1 UI de factor VIII es la cantidad de actividad coagulante que desarrolla 1 ml de plasma fresco citra-

tado normal, y 1 UI/ml en plasma es igual al 100% de actividad del factor de coagulación. Para cálculos simplificados, 1 UI de factor VIII por kg de peso elevará la actividad en el plasma del paciente un 2%. Así, por ejemplo, un paciente con 70 kg de peso, cuyo volumen plasmático aproximado será de 3500 ml, necesitará 3500 UI de factor VIII, o lo que es lo mismo 50 UI/kg de peso, para conseguir una actividad plasmática del 100% (17,73,77).

La actividad de factor VIII necesaria y el tiempo de mantenimiento de la misma dependen de la severidad del episodio a tratar, tal como muestra la Tabla 1.2.1-2.

Tabla 1.2.1-1 Materiales terapéuticos en la hemofilia A.

PRODUCTO	CONTENIDO (UI/ml)	NIVEL HEMATICO (% incremento)	VOLUMEN A ADMINISTRAR (ml para 25%)
Sangre total	0.3	4 - 6	2500
Plasma fresco	0.6 - 1	15 - 30	1000
Crioprecipitado	3 - 5	60 -80	200
Concentrado	20 - 30	sup. a 60	30

Tabla 1.2.1-2. Dosificación de factor según el episodio a tratar

EPISODIO HEMORRAGICO	NIVEL DE FACTOR NECESARIO (%)	PERIODO DE TRATAMIENTO
Hemartrosis	10 - 20	2 - 3 días
Hemorragias musculares	20 - 30	3 - 4 días
Heridas grandes		
Cirugía menor		
Hemorragias internas	30 - 50	4 - 14 días
Intervenciones quirúrgicas		o hasta cicatrización
Cirugía mayor	superior al 50	14 - 21 días o hasta cicatrización

1.2.2 OBTENCION DE LOS CONCENTRADOS DE FACTOR VIII

La obtención o preparación de los concentrados de factor VIII implica, independientemente de los procesos técnicos generales de la preparación de un fármaco en la forma farmacéutica de vial liofilizado, dos procesos tecnológicos particulares que tienen un especial interés y que son los que determinarán, en último extremo la calidad del concentrado de factor VIII obtenido. Estos procesos son el fraccionamiento o purificación del factor, en el que se concentra y se aísla el factor VIII lo más puro posible a partir del plasma, y la inactivación vírica, por la que se disminuye o minimiza el riesgo de transmisión de partículas víricas infectivas procedentes del plasma de origen.

Dada la importancia de cada una de estas fases, es necesario conocer cual es el proceso tecnológico en que se basan y cuales son las opciones metodológicas de que se dispone, con objeto de establecer unos criterios de selección adecuados para este tipo de preparados.

1.2.2.1 Métodos de purificación

Tal como se ha mencionado anteriormente, la única fuente natural, existente en la actualidad, de factor VIII es el plasma de donantes humanos sanos. El plasma, sin embargo, no tiene una utilidad terapéutica directa ya que el factor VIII se encuentra en muy baja concentración y, además, altamente impurificado por todo el resto de proteínas plasmáticas.

Se hace necesario, por lo tanto, someter el plasma a unas técnicas de preparación que permitan obtener un producto más concentrado y más puro, que pueda ser útil terapéuticamente.

1.2.2.1.1 Fraccionamiento del plasma

La purificación y concentración del factor VIII se entronca, a nivel industrial, dentro del proceso de fraccionamiento global del plasma, a partir del cual se obtienen, además de los concentrados de factor VIII, gammaglobulinas, concentrados de factores del complejo protrombínico, fibrinógeno, antitrombina III, albúmina, etc. La Figura 1.2.2-1 muestra, en esquema, el proceso de fraccionamiento del plasma según el método de Cohn modificado que, en la actualidad, es el método de fraccionamiento más utilizado por la industria. La separación del crioprecipitado, la absorción con resinas y las sucesivas precipitaciones con etanol a concentraciones crecientes ofrecen, en cada escalón, una fracción distinta.

Es importante considerar, en el contexto del fraccionamiento global del plasma, que de todos los hemoderivados obtenidos, los que en la actualidad están determinando la demanda de plasma, a nivel mundial, son los concentrados de factores de la coagulación, y muy especialmente el concentrado de factor VIII (85).

1.2.2.2 Purificación del factor VIII.

El fraccionamiento del factor VIII, propiamente dicho, comienza con la formación y separación del crioprecipitado, tal como muestra la Figura 1.2.2-2. El crioprecipitado se obtiene descongelando, en condiciones controladas a 4 C, plasma fresco congelado. Con esta operación, se obtiene, una vez redissuelto el crioprecipitado, una solución hasta diez veces más concentrada en factor VIII que el plasma, aunque el contenido en proteínas plasmáticas residuales es todavía considerable, especialmente de fibrinógeno y fibronectina (3-4 g/100 ml) (80,81).

A continuación hay una adsorción con hidróxido de aluminio -cuyo objetivo fundamental es eliminar los factores del complejo protrombínico que puedan quedar en el crioprecipitado-, y sucesivas precipitaciones con polietilenglicol, glicina, y/o sales minerales, según el método concreto -con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de fibrinógeno y fibronectina-. Posteriormente se somete a un proceso de inactivación vírica y, tras una última purificación, se dosifica y liofiliza.

En el ejemplo que muestra la Figura 1.2.2-2, la inactivación vírica tiene lugar en mitad del proceso de purificación; sin embargo, en otros métodos la inactivación puede realizarse al final del proceso, con el liofilizado, o incluso al principio, en el sobrenadante de la adsorción con hidróxido de aluminio (85-87).

Durante este proceso, el factor VIII se concentra 20-40 veces y

se purifica 50-1500 veces, dependiendo del método de fraccionamiento empleado (Tabla 1.2.2-3). Sin embargo, el factor VIII:C (la fracción coagulante del factor VIII, la que realmente tiene actividad) aún representa únicamente el 0.5% a lo sumo del total de la proteína presente en el liofilizado y administrada: Otras proteínas están presentes todavía en cantidades apreciables, tal como muestra la Tabla 1.2.2-4 (87-89).

1.2.2.3 Inmunofinidad

La aplicación, recientemente, de una nueva técnica basada en la utilización de anticuerpos monoclonales murinos frente al factor VIII, ha permitido la consecución de un concentrado de factor VIII mucho más purificado (90). Esta nueva técnica, descrita a pequeña escala por primera vez en 1979 (91), y mejorada posteriormente (92), ha sido finalmente adaptada a un modelo industrial a gran escala para la obtención de concentrados de factor VIII de alta pureza o ultrapuros.

El proceso consiste en hacer pasar el crioprecipitado por una columna de inmunofinidad -compuesta por una base de sefarosa que tiene unidos a su superficie, de forma covalente, los anticuerpos-, de manera que el factor VIII queda retenido mientras que el resto de las proteínas contaminantes son eliminadas. Tras algunos lavados de la columna, el factor VIII se eluye modificando las condiciones de elución (pH, carga iónica). Existen, básicamente, dos variantes del proceso, según se emplee un anticuerpo monoclo-

nal frente al factor VIII (93) o frente al factor von Willebrand (94).

Posteriormente, el factor VIII se pasa por una columna de intercambio iónico (amino-hexil-sefaroza). Este último proceso tiene por objeto eliminar posibles contaminantes, como por ejemplo trazas de inmunoglobulinas murinas, que hayan coeluido con el factor VIII.

Mediante este proceso se obtiene un concentrado de factor VIII con una actividad específica superior a las 2000 UI/mg proteína -el 30% o más de la proteína corresponde a FVIII:C-, 100 veces más puro que los concentrados convencionales y 100.000 veces más puro que el plasma. La concentración del factor VIII, una vez estabilizado el factor con albúmina, oscila entre 40 y 100 UI/mililitro (90,95).

1.2.2.4 Intercambio iónico

Un concentrado de factor VIII, ultrapuro también, se ha obtenido recientemente sometiendo el sobrenadante del crioprecipitado, tras la adsorción con hidróxido de aluminio, a una columna de intercambio iónico exclusivamente. El concentrado obtenido en este caso es 10-50 veces más puro que los concentrados convencionales, con una actividad específica de 100-300 UI/mg proteína. La ventaja, en este caso, respecto a los concentrados ultrapuros obtenidos por inmovinoafinidad es que el rendimiento del proceso (unidades de factor VIII obtenidas a partir del plasma de

origen) es superior (96).

Una consecuencia directa, y un problema añadido, de la aplicación de nuevas tecnologías en la preparación de los concentrados de factor VIII es el aumento en el precio del mismo: De un valor de 30-35 pta/UI del factor calentado en seco, se ha pasado a 43-47 pta/UI en el calentado en solución y a 57 pta/UI en los concentrados ultrapuros.

Figura 1.2.2-1 Esquema del proceso de fraccionamiento global del plasma, según el método de Cohn modificado.

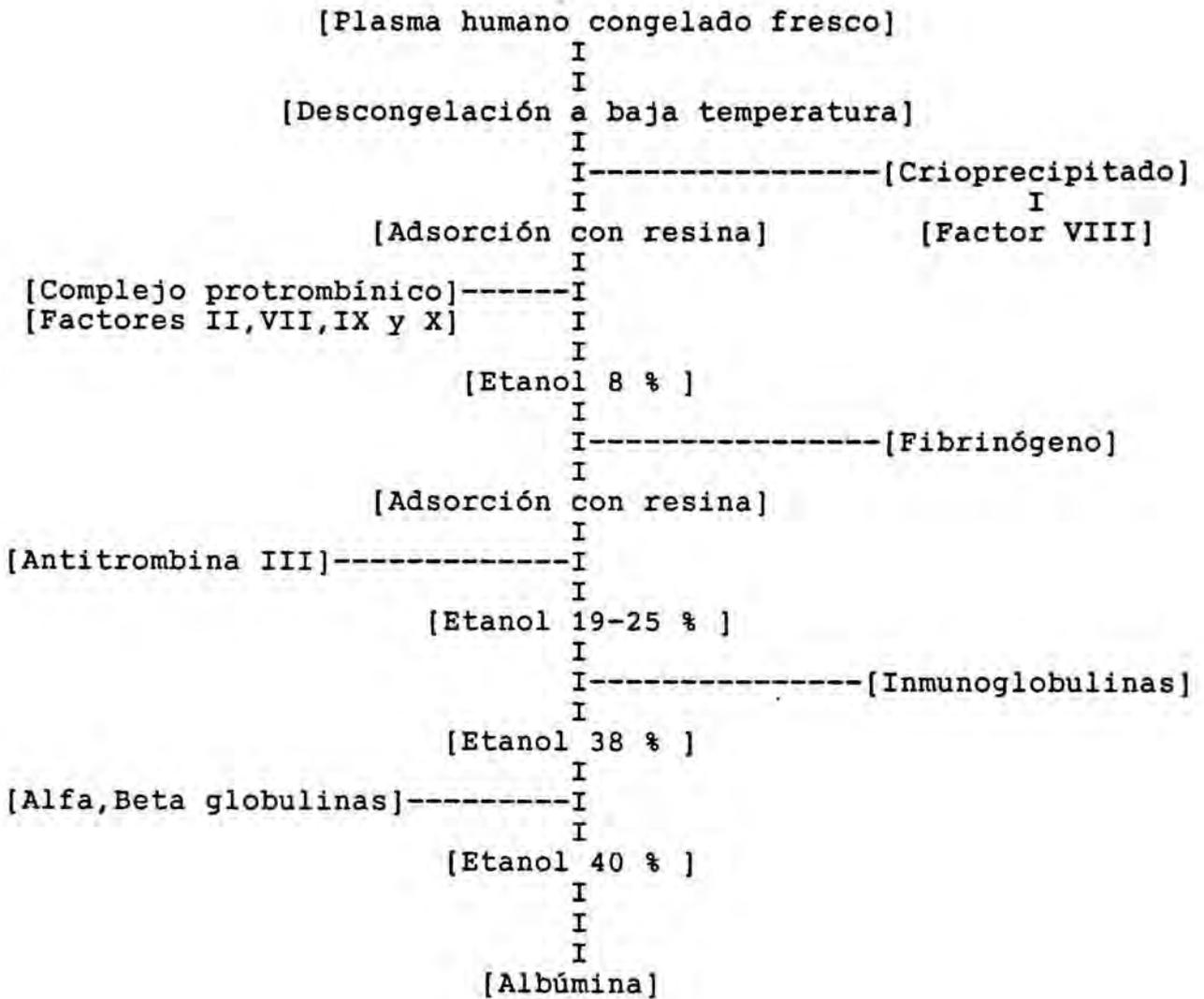


Figura 1.2.2-2 Esquema de fraccionamiento del FVIII.

Plasma humano congelado
I
I
I
Crioprecipitado
I
I [Solubilización]
I [Absorción con $Al(OH)_3$]
I
Crioprecipitado absorbido
I
I [Fraccionamiento con glicina]
I
Sobrenadante de glicina
I
I [Precipitación con NaCl]
I [Solubilización]
I
Solución de FVIII
I
I [Estabilización con sacarosa/glicina]
I [Calentamiento: 10 h, 60 C, en solución]
I
FVIII pasteurizado
I
I [Precipitación con NaCl]
I [Solubilización]
I [Diálisis]
I
FVIII pasteurizado, purificado
I
I [Adición de albúmina, estabilización]
I [Liofilización]
I
Concentrado de FVIII liofilizado

Tabla 1.2.2-3 Características técnicas de los concentrados de factor VIII.

Forma farmacéutica	Vial liofilizado
Forma de administración	Infusión intermitente (2.5 UI/kg/minuto)
Concentración (UI/ml)	20 - 100
Presentaciones comerciales (UI)	250, 500, 1000
Conservación	Nevera (+2 - +8 C)
Estabilidad	2 años --- (+2 - +8 C) 3 meses -- (+25 C)
Normas de prescripción	Especialidad de uso hospitalario
Precio (pta/UI)	FVIII ---- 30 - 57

Tabla 1.2.2-4 Concentración y pureza de los concentrados de factor VIII.

Actividad factor VIII (UI/ml)	20 - 100
Actividad específica (UI/mg proteína)	0.5 - 3000
Proteínas totales (mg proteína/UI)	(-) - 2
Fibrinógeno (mg/UI)	(-) - 0.5
Gammaglobulinas (mg/UI)	(-) - 0.25
Cociente FVIII R:Ag(*)/FVIII:C	1 - 3

(*) Factor von Willebrand antigénico

1.2.3-TRANSMISION VIRICA: METODOS DE INACTIVACION

Los concentrados de factor VIII no tratados específicamente, al igual que la sangre u otras fracciones plasmáticas, pueden ser vehículo de transmisión de virus humanos patógenos (97). Esto es debido básicamente a tres razones: Las técnicas de detección de que se dispone en la actualidad -si es que existen- no tienen la suficiente sensibilidad y especificidad como para descartar todas las muestras aparentemente normales contaminadas. Existe, en determinados casos, ausencia de marcadores en pacientes afectados (periodo ventana). La utilización, a nivel industrial, de "pools" de plasma de miles de donantes tiene un efecto multiplicador, ya que una sola bolsa contaminada, no detectada, es capaz de convertir en contaminante un "pool" de mil donantes (98).

La gravedad de la infección por alguno de estos virus, especialmente por los virus de la hepatitis y sobre todo por el HIV, ha obligado a someter a los concentrados de factor VIII a una serie de procesos de inactivación vírica con objeto de eliminar o, cuando menos, minimizar el riesgo de transmisión vírica.

La eficacia en la inactivación vírica, a excepción del HIV, para el que todos los métodos actuales son eficaces, varía según el método empleado, que es distinto para cada laboratorio (Tabla 1.2.3-1) (99). Los métodos de inactivación más eficaces son el calentamiento en solución (pasteurización), el calentamiento en atmosfera de vapor y el tratamiento con solvente/detergente (100-102). La purificación por inmunofinidad es un factor añadi-

do de seguridad (103). La utilización de concentrados de factor VIII tratados con otros métodos de inactivación está actualmente desaconsejada y únicamente debe considerarse en el caso de no disponer de otra alternativa (104).

1.2.3.1. Métodos de inactivación vírica

Los métodos de inactivación vírica existentes empleados en los concentrados de factor VIII utilizados en nuestro país son los siguientes (78):

1.2.3.1.1. Tratamiento por calor

Existen cuatro métodos o estrategias para el tratamiento por calor de los concentrados de factor VIII: El calentamiento en seco del preparado liofilizado, el calentamiento en suspensión en un disolvente orgánico, el calentamiento en atmósfera de vapor y sobrepresión y la pasteurización o calentamiento en solución acuosa.

1.2.3.1.1.1 Calor seco

El calentamiento en seco consiste en someter el liofilizado a 60 °C durante un intervalo de tiempo que oscila entre 72 y 144 horas. Es efectivo frente al virus HIV (105), aunque su eficacia es limitada frente a los virus de la hepatitis B y C (104,106,107). Presenta el inconveniente, además, de que al

realizarse el tratamiento en la fase final del proceso, cualquier alteración de la proteína del liofilizado quedará presente en el producto.

1.2.3.1.1.2 Calor en suspensión

Se basa en calentar durante 20 horas a 60 °C el producto en una suspensión con un disolvente orgánico (n-heptano). Con ello se persigue alterar la capa lipídica del virus para hacerlo más sensible al tratamiento térmico. Garantiza la ausencia del virus HIV aunque no asegura la no transmisión de los virus de la hepatitis (fundamentalmente hepatitis C) (108).

1.2.3.1.1.3 Pasteurización

Consiste el calentar el concentrado de factor en solución acuosa a 60 °C durante 10 horas, en presencia de estabilizadores como azúcares y glicina. Se aplica en una fase intermedia del proceso de purificación, lo que permite eliminar parte del material proteico alterado. Es, quizá, el método más efectivo tanto para la eliminación del virus HIV como para los de la hepatitis (109).

1.2.3.1.1.4 Calentamiento con vapor

El concentrado de factor VIII se calienta a 60 °C durante 10 horas en atmosfera de vapor a 1.2 bar y a 80 °C 4 horas en idéntica condición de presión. Es eficaz en la inactivación del virus HIV y de los virus de la hepatitis (110).

1.2.3.1.2 Tratamiento con solvente/detergente

Años atrás se observó que la combinación solvente-detergente formada por Tween 80 y éter era efectiva en la inactivación del virus de la hepatitis, aunque, en la práctica, la utilización de éter presentaba cierto riesgo, siendo, además, difícil la posterior separación del Tween 80 del concentrado (111).

Actualmente el sistema empleado utiliza el TNBP (tri-n-butilfosfato) al 0.3% que actúa como disolvente y ácido cólico (AC) -o Tween 80 o Triton 100- al 0.2% que actúa como detergente, se añaden al concentrado de factor durante un periodo de 6 horas. Con ello se produce un efecto sinérgico de ambos componentes que tiene como consecuencia la lisis de la pared lipídica del virus sin alterar la configuración proteica del concentrado de factor. El detergente y el solvente se extraen posteriormente con un disolvente orgánico y columnas de afinidad. Este sistema es efectivo en la inactivación del virus HIV y de los virus de la hepatitis B y C (112,113). No es eficaz frente a virus carentes de cubierta lipídica y potencialmente patógenos, como el parvovirus.

1.2.3.1.3 Cromatografía de inmunoafinidad

El método de purificación basado en el empleo de columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales murinos específicos

frente al factor VIII, separa la mayor parte de las proteínas plasmáticas acompañantes del factor VIII y por lo tanto separa, también, las partículas virales infectivas, aunque no se trate de un sistema de inactivación vírica propiamente dicho. Su empleo conjunto con un método de inactivación por calor o solvente-detergente se ha demostrado eficaz frente a los virus HIV y hepatitis B y C (114).

1.2.3.1.4 Ingeniería genética

La utilización de técnicas de ingeniería genética, en células de mamífero, permite obtener un factor VIII no humano eficaz clínicamente. Obviamente, este preparado estará libre de virus patógenos humanos (115).

1.2.3.2. Estudios clínicos

La valoración de la calidad de los concentrados de factor VIII, desde el punto de vista de la eficacia de los métodos de inactivación vírica, sólo ha podido efectuarse de forma concluyente mediante ensayos clínicos controlados. En el año 1984 el Comité Internacional de Trombosis y Hemostasis (ICTH), reunido en Miami, elaboró una normativa con el fin de uniformar y poder comparar los diferentes estudios, que se estaban iniciando sobre seguridad frente a virus. Las características básicas, según este protocolo, de los estudios de seguridad deben ser las siguientes (99): Estudio prospectivo y sin grupo control (no podría considerarse ético), ya que se considera que si a un paciente se le administra

un concentrado de factor sin inactivar, el riesgo de adquirir una hepatitis es del 100%, y a este respecto sirven los pacientes tratados años atrás (control histórico) (116,117); únicamente los pacientes vírgenes que no hayan recibido anteriormente factor plasma o crioprecipitados (los denominados PUPs, o Previously Untreated Patients) pueden ser incluidos; no pueden ser incluidos, sin embargo, pacientes hemofílicos que presenten enfermedad hepática o tengan marcadores séricos positivos a la hepatitis B -excepto vacunados-, con el fin de evitar confusiones diagnósticas; el diagnóstico de hepatitis no A no B se confirma cuando exista un incremento de transaminasas 2.5 veces superior al valor normal durante un periodo de quince días comprendido entre los días 14 y 180 tras la infusión del concentrado de factor (en la actualidad el diagnóstico de la hepatitis C se realiza mediante marcadores séricos positivos a la misma); el número de pacientes incluido en el estudio debe ser igual o superior a 20 con objeto de establecer una inferencia estadística adecuada.

La Tabla 1.2.3-2 (78) recoge los principales estudios clínicos llevados a cabo con métodos de inactivación empleados en concentrados de factor VIII utilizados en nuestro país. Los estudios iniciales, con métodos de calentamiento con calor seco o en suspensión, a pesar de no cumplir las normas ICTH demuestran la poca eficacia de dichos métodos en la inactivación del virus de la hepatitis C. En cambio, los estudios con métodos de inactivación con calor húmedo o en solución, o con solvente-detergente, más modernos, cumplen las normas ICTH y demuestran que son eficaces

frente al virus de la hepatitis C. Todos los estudios demuestran que cualquier método de inactivación empleado en la actualidad es eficaz frente al virus HIV. Respecto a la hepatitis B, la eficacia parece estar también garantizada. Aunque en un estudio apareció serología positiva, podría atribuirse a otras causas de transmisión (118). Sin embargo, en el caso de la hepatitis B la política a aplicar es la de la vacunación sistemática de todos los pacientes hemofílicos a tratar con concentrados de factor VIII.

Tabla 1.2.3-1 Métodos de inactivación vírica aplicados a concentrados de factores de coagulación.

LABORATORIO	NOMBRE COMERCIAL	METODO INACTIVACION
Hubber	Conc.FVIII Hubber	Calor seco, 60 C, 72h
Grifols	Criostat SD-2	Solvente-detergente, 0.3% TNBP/1.0%Triton X-100, 6h
	Hemofactor HT	Calor seco, suspensión en n-heptano, 60 C, 20h
Immuno	Kryobulin TIM-4, Bebulin TIM-4 y Feiba TIM-4	Calor húmedo, 60 C, 10h, 1.2 bar y 80 C, 4h, 1.2 bar
I.Behring	Haemate-P	Pasteurización, solución acuosa, 60 C, 10h
Baxter	Hemofil-M	Solvente-detergente, 0.3% TNBP/1.0%Triton X-100, 6h e inmunoafinidad
	Proplex T y Autoplex	Calor seco, 60 C, 144 h
Armour	Monoclata	Pasteurización, solución acuosa, 60 C, 10 h e inmunoafinidad

Tabla 1.2.3-2 Estudios clínicos sobre la eficacia de los métodos de inactivación vírica.

METODO	ICTH	HIV	HEPATITIS C
Calor seco 60 C 72 h	No	0/12	11/13
Calor en suspensión n-heptano 60 C 20 h	No	0/24	10/31 (5/16)
Calor vapor 60 C 10 h	Si	0/28	0/24
Pasteurización 60 C 10 h	Si	0/26	0/26
Solvente/Detergente	Si	0/20	0/20

Entre paréntesis, valores aplicando normas ICTH.

1.2.4-COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO

La utilización de concentrados de factor VIII -al igual que la mayor parte de medicamentos- no esta exenta de riesgos y complicaciones que, en este caso, abarcan desde reacciones anafilácticas a la aparición de inhibidores, pasando por la posibilidad de infecciones víricas (87,119). La aparición, sin embargo, en los últimos años de nuevos métodos de inactivación vírica, más seguros, y nuevos métodos de purificación (mediante anticuerpos monoclonales), más eficaces, han disminuido de forma evidente el riesgo de complicaciones, convirtiendo a los nuevos concentrados de factor VIII en productos seguros, con un índice beneficio/riesgo elevado.

Las complicaciones del tratamiento sustitutivo con concentrados de factor VIII se pueden dividir en leves, moderadas y graves, y su origen está relacionado fundamentalmente, a excepción de la aparición de inhibidores, con la carga proteica residual que acompaña al factor o con la transmisión de virus patógenos.

1.2.4.1-Complicaciones leves

Los concentrados de factor VIII pueden provocar, especialmente si la velocidad de administración es alta, rubefacción, taquicardia, hipotensión, confusión, hormigueo, cefaleas, alteraciones de la visión, nauseas, ... relacionados directamente con el incremento del volumen plasmático y el aumento de la presión oncótica que provoca la carga proteica residual contenida en los concentrados

de factor VIII (77). Es aconsejable que la velocidad de administración de los concentrados de factor VIII no sea superior a las 2.5 UI/kg peso y minuto. Raramente, se ha descrito la aparición de fiebre y escalofríos -relacionada con la administración de dosis altas de factor y la presencia de pirógenos-, al igual que el desarrollo de reacciones alérgicas o urticaria.

1.2.4.2-Complicaciones moderadas

Los concentrados de factor VIII pueden contener pequeñas cantidades de isohemaglutininas A y B (títulos entre 1/1 y 1/256). Si se hace necesaria la administración de dosis altas de factor de forma prolongada, pueden provocar, en individuos de los grupos sanguíneos A, B y AB, una hemólisis intravascular valorable clínicamente (17).

La administración de dosis altas de concentrados de factor VIII -especialmente los poco purificados- durante un tiempo prolongado puede llevar a un aumento de la concentración plasmática de fibrinógeno. Esto se debe a que el fibrinógeno tiene una semivida biológica de 80 horas, muy superior a las 14 horas del factor VIII, por lo que se produce, a la larga, un fenómeno de acumulación. Concentraciones plasmáticas de fibrinógeno superiores a 10 g/l -situación raramente alcanzable en la actualidad- hacen que el plasma se vuelva viscoso, los hematíes se aglutinen formando "pilas de monedas" y las plaquetas no se adhieran ni agreguen (77,120). La utilización de concentrados de factor VIII con

actividad superior a 10 UI/mg de proteína evita, en la práctica, la acumulación de fibrinógeno.

1.2.4.3-Complicaciones graves

1.2.4.3.1-Inmunomodulación

La administración continuada de concentrados de factor VIII -tal como ocurre en la hemofilia A- implica el aporte crónico de proteínas plasmáticas con capacidad aloantigénica, que provocan, a largo plazo, alteraciones de la función inmunitaria. Estas alteraciones incluyen disminución del número de linfocitos T-helper, aumento del número de linfocitos T-supresores, disminución de la proliferación linfocitaria con mitógenos, anergia cutánea, disminución de la fagocitosis y menor capacidad de presentación antigénica en la interacción monocito/linfocito (121). Ya que estas alteraciones no se han observado en hemofílicos no tratados, su origen se atribuye a alguna impureza de los concentrados. Se desconoce, en cualquier caso, el componente concreto responsable.

La función fagocítica de los monocitos disminuye tras la administración de factor VIII. La alteración se mantiene con la administración crónica de factor. Estudios "in vitro" han demostrado que hay, además, una menor formación de radicales oxígeno y una baja modulación de los receptores Fc de los monocitos. La separación cromatográfica de los componentes del concentrado ha permitido identificar una fracción, que contiene inmunoglobulinas e immuno-

complejos, responsable del efecto. Ninguno de estos dos componentes ha reproducido, aisladamente, el defecto, por lo que, finalmente, la acción se ha atribuido a inmunoagregados (122). Los concentrados más purificados, al parecer, no tienen ningún efecto sobre los monocitos (123).

Los concentrados de factor VIII provocan una inhibición, dependiente de la dosis, de la transformación de los linfocitos inducida por concanavalina-A, PHA o ésteres de forbol. El grado de inhibición depende del tipo de concentrado: Los concentrados de alta pureza tienen un efecto menos marcado, mientras que los concentrados de pureza intermedia tienen una influencia variable, pero más marcada (124,125). Al intentar identificar el componente específico responsable del efecto, se ha visto que, probablemente, es una sustancia que co-eluye con la fibronectina, aunque sin ser la fibronectina misma (121). La influencia de los concentrados de factor se debe fundamentalmente a una reducción de la secreción de interleucina-2 (IL-2) (125), y a una reducción de la expresión del receptor a la IL-2 (126).

1.2.4.3.1.1-Importancia clínica

La disfunción inmunológica causada por los concentrados de factor VIII, tal como muestran estudios de causa de muerte en hemofílicos antes de la infección por el HIV, podría ser significativa en términos clínicos, pero es difícil de interpretar. Se ha descrito una incidencia superior de neumonía y cancer de colon, aunque,

por el contrario, no se aprecia una mayor incidencia de linfomas (127,128).

Un aspecto que reviste especial interés es la influencia de los concentrados de factor VIII en relación a la progresión de la enfermedad, en pacientes hemofílicos HIV+. Un primer estudio, con 69 pacientes no encontró, al cabo de 24 meses de seguimiento, diferencias significativas en la disminución del número de linfocitos CD4 entre el grupo tratado con concentrados de pureza intermedia y el grupo tratado con concentrados ultra puros, aunque el descenso fué más acentuado en el primer grupo (129). Por el contrario, un segundo estudio -con un diseño similar al anterior- encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.0007$) en la evolución de 20 pacientes, a favor del grupo tratado con concentrados altamente purificados (130). Finalmente, un último estudio, de diseño idéntico al anterior, no encontró diferencias significativas, aunque el descenso fué más acentuado en el grupo tratado con concentrados de pureza intermedia (131).

1.2.4.3.2-Aparición de inhibidores

Aproximadamente un 5 % de los hemofílicos tratados con concentrados de factor desarrollan inhibidores frente al factor que se les administra. Esta proporción es mayor -un 10 %- en el caso de los hemofílicos severos (con un nivel de factor deficitario basal inferior al 1 % del normal) (131). La naturaleza del inhibidor es la de una inmunoglobulina, concretamente una IgG del subtipo 4 o

kappa, y se desarrolla específicamente contra el factor VIII, sin afectar al resto de factores de la coagulación (132).

Los pacientes con inhibidor se clasifican en dos tipos: a) los individuos con inhibidores de alta respuesta, que generan niveles de inhibidor superiores a 5 Unidades Bethesda (una UB es la cantidad de inhibidor que neutraliza 0.5 UI de factor VIII, tras 2 horas de incubación a 37 °C) y que llegan incluso a cientos de UB, y b), los individuos con inhibidores de baja respuesta, que difícilmente superan aquel valor.

El problema del tratamiento del paciente con inhibidor es fundamentalmente el control de las hemorragias cuando éstas se producen: a causa de la neutralización del factor por el inhibidor, el tratamiento sustitutivo a las dosis habituales resulta ineficaz. Los pacientes de baja respuesta presentan relativamente pocos problemas, aunque se precisan dosis de factor VIII superiores a las normales (133). Los pacientes de alta respuesta se tratan, básicamente, con concentrados de complejo protrombínico activado (CPA), que contienen los factores VII, IX y X activados (134). Otras opciones empleadas son la plasmaféresis (135), el complejo protrombínico (136), el factor VIII de origen porcino (137) y el factor VIIa humano de alta pureza (138). Megadosis de factor VIII durante un tiempo prolongado pueden crear una tolerancia inmunológica, erradicándose el inhibidor (139,140). También se ha estudiado el tratamiento con inmunosupresores (corticoides y ciclofosfamida) y/o la inmunomodulación con dosis altas de inmunoglobulinas (141).

1.2.4.3.3-Infecciones víricas

Los concentrados de factor VIII no tratados específicamente, al igual que la sangre u otras fracciones plasmáticas, podrían ser vehículo de transmisión de virus humanos patógenos como el virus de la hepatitis B, el de la C, el agente delta, el HIV, parvovirus y citomegalovirus (97). Esto es debido, por un lado, a que las técnicas de detección de que se dispone en la actualidad no tienen la suficiente sensibilidad y especificidad como para descartar todas las muestras, aparentemente normales, contaminadas y, por otro lado, al efecto multiplicador que tiene la utilización, a nivel industrial, de "pools" de plasma de miles de donantes (98). La realidad es que un porcentaje muy elevado de los pacientes, que recibieron concentrados hasta hace algunos años, presentan hoy marcadores séricos positivos -signo de un contacto o enfermedad previos- a la mayoría de los virus potencialmente transmisibles (Tabla 1.2.4-1) (87,97).

La gravedad de la infección por alguno de estos virus, especialmente por los virus de la hepatitis y sobre todo por el HIV, ha obligado a someter a los concentrados de factor VIII a una serie de procesos de inactivación vírica con objeto de eliminar o, cuando menos, minimizar el riesgo de transmisión vírica.

Tabla 1.2.4-1. Incidencia de marcadores víricos en la población hemofílica. Datos procedentes de (97) y actualizados. La tendencia va hacia la disminución en la incidencia de marcadores -fundamentalmente para el HIV y las hepatitis- al incorporarse nuevos hemofílicos tratados con los nuevos CFA, más seguros.

VIRUS	ENFERMEDAD	MARCADORES
Hepatitis B	Hepatitis aguda y crónica	HBsAc 60% HBsAg 10%
Hepatitis no-A no-B (Hepatitis C)	Hepatitis aguda y crónica	Elev.persist. ALT y AST 70% HCac 60%
Agente Delta	Hepatitis aguda y crónica	Ac > 40%
HIV	SIDA y ARS	HIVac 60-80%
Parvovirus	Depresión medular (¿)	Ac > 90%

2-PARTE EXPERIMENTAL

2.1-PARAMETROS FARMACOTECNICOS

2.1.1-INTRODUCCION

Las características farmacotécnicas constituyen un aspecto importante dentro de la caracterización y definición de la calidad de cualquier especialidad farmacéutica, en general, y de los concentrados de factor VIII en particular. El carácter proteico del factor VIII, así como el elevado contenido de proteína (200-1000 mg/1000UI FVIII) en general, que caracteriza a los concentrados constituyen una particularidad en los liofilizados medicamentosos.

El conocimiento y definición de las características farmacotécnicas puede facilitar, junto con otros factores, la adecuada selección del tipo de preparado necesario para cada circunstancia. Por otro lado, la farmacotécnica podría influir en la respuesta farmacocinética y/o farmacológica del factor VIII, siendo imprescindible, para estudiar este proceso, el establecimiento de dichas características.

En este estudio, se analizan las características estructurales, presencia de elementos traza y tiempo de reconstitución del liofilizado de factor VIII, así como osmolaridad, aspecto y pH de la solución reconstituida, de las especialidades de concentrados de factor VIII empleadas en la práctica terapéutica en España.

Para la valoración de las características estructurales y contenido de elementos traza, en los liofilizados de los concentrados de factor VIII, se han empleado, por primera vez en un liofiliza-

do medicamentoso, técnicas de difracción de Rx y espectrometría de emisión de plasma (142).

2.1.2-METODOS

2.1.2.1-Concentrados de factor VIII

Las especialidades de concentrados de factor VIII estudiadas han sido las siguientes: Haemate-P (I.Behring), Criostat-SD (Grifols), Kryobulin TIM-3 (Immuno), Conc. FVIII Hubber (Hubber) y Hemofil M (Baxter).

2.1.2.2-Características estructurales

La caracterización estructural de cada uno de los liofilizados se realizó mediante difracción de rayos X, directamente sobre el producto liofilizado. Para cada concentrado de factor VIII, se obtuvo un difractograma con un Difractómetro de Rayos X de polvo Siemens, modelo D-500, que consta de un generador Kristalloflex 710H, detector de centelleo, monocromador secundario y anticátodo de cobre. Las muestras se preparan por compactación del liofilizado en cámara blanca, con el fin de evitar posibles contaminaciones externas. El registro de los difractogramas se realizó a una velocidad de 2 grados/minuto.

2.1.2.3-Elementos traza

La determinación de los elementos traza se efectuó mediante un Espectrómetro de plasma de inducción Jobin-Yvon JY 38-VHR, equipado con monocromador Czesny-Turner (purgado con N₂), red holográfica de 3600 líneas/mm y generador Plasma-Therm HPF 1500D.

Para su análisis, las muestras se prepararon mediante un ataque con ácido nítrico concentrado, en bomba de teflón y en caliente, durante 1 hora. Se utilizó 0.1 g de muestra, a la que se añadieron 3 ml de ácido nítrico concentrado. Tras enfriar, se enrasaron a 10 ml, procediendo directamente a su análisis. Los elementos determinados fueron calcio, azufre, magnesio, hierro, aluminio, fósforo, cinc, cadmio, plomo y silicio. Las longitudes de onda de lectura de las intensidades de emisión de cada elemento se indican en la Tabla 2.1-1.

Tabla 2.1-1. Longitudes de onda (nm) seleccionadas para cada elemento en la espectroscopía de plasma de inducción atómica.

	Ca	S	Mg	Fe	Al
lambda (nm)	317.9	182.0	279.1	259.9	308.2
	P	Zn	Cd	Pb	Si
lambda (nm)	178.3	213.8	228.8	220.3	288.2

La determinación de las características estructurales y elementos traza se realizaron en los servicios científico-técnicos de Rayos X y espectrometría de emisión de plasma de la Universidad de Barcelona.

2.1.2.4-Tiempo de reconstitución

Cada vial liofilizado se reconstituyó con el volumen de disolvente acompañante (agua para inyección). El disolvente se atemperó previamente a 37 °C y la disolución se facilitó con una agitación manual suave, de forma idéntica al proceso rutinario.

2.1.2.5-Determinación de la osmolaridad

Cada vial liofilizado se reconstituyó con el volumen de disolvente acompañante (agua para inyección), siguiendo la misma sistemática empleada para la observación del tiempo de disolución. La disolución obtenida se llevó directamente al osmómetro tipo Fiske One-Ten Osmometer (determinación a través del descenso crioscópico) para su lectura.

2.1.2.6-pH

La valoración del pH se realizó a partir de la solución reconstituida de los concentrados de factor VIII, con un pH-metro digital modelo CORNING-130.

2.1.2.7-Aspecto

Las soluciones reconstituidas de los concentrados de factor VIII se analizaron visualmente, con objeto de determinar la presencia de color y/o aparición de precipitado.

2.1.3-RESULTADOS

La aplicación de la técnica de difracción de rayos X, directamente sobre el polvo liofilizado, ha permitido obtener los difractogramas correspondientes a cada una de las especialidades analizadas (Figuras 2.1-1 a 2.1-5). En cada difractograma se indican como referencia los máximos de difracción de la glicina y del cloruro sódico, mediante líneas de colores diferenciados, ubicadas en las posiciones de dichos máximos, permitiendo establecer la composición cualitativa de los distintos liofilizados.

Para cada difractograma y especialidad, se indican los espacios interreticulares del material cristalino liofilizado obtenidos a partir de los ángulos de difracción 2θ (eje de abscisas) mediante la fórmula de Braggs ($d = \lambda / 2 \sin \theta$), siendo λ la longitud de onda correspondiente al anticátodo de cobre ($\lambda_{\text{Cu}} = 1.54060$) e intensidades relativas (I/I_0) de los máximos de difracción (eje de ordenadas) (Tabla 2.1-2).

Los resultados cuantitativos del análisis de elementos traza se

muestran en la Tabla 2.1-3. Se emplea como unidad de expresión mcg/UI de factor VIII.

La Tabla 2.1-4 muestra los valores de osmolaridad, tiempo de reconstitución pH y aspecto de los concentrados de factor VIII analizados. La Tabla incluye, además, el peso y la presencia o ausencia de glicina y/o cloruro sódico en el liofilizado.

Tabla 2.1-2. Espacios interreticulares (D) del material cristalino liofilizado obtenidos a partir de los ángulos de difracción 2 theta.

Haemate-P					Hemolil-M					Crostat-SD				
#	Position	D/-	Height	%H.P.	#	Position	D/-	Height	% H.P.	#	Position	D/-	Height	% H.P.
1	17,961	4,9346	3407.	100,0	1	27,528	3,2376	720.	16,1	1	17,948	4,9381	2957,	100,0
2	19,024	4,6614	765.	22,5	2	31,890	2,8040	4481.	100,0	2	18,982	4,6715	620.	21,0
3	20,385	4,3530	523.	15,4	3	45,619	1,9870	2106.	47,0	3	20,372	4,3557	464.	15,7
4	23,739	3,7451	2558.	75,1	4	54,011	1,6964	170.	3,8	4	23,351	3,8064	829.	28,0
5	27,438	3,2480	521.	15,3	5	56,613	1,6245	644.	14,4	5	23,760	3,7418	1147.	38,8
6	28,453	3,1344	1846.	54,2						6	28,526	3,1265	622.	21,0
7	31,201	2,8643	1224.	35,9						7	31,081	2,8751	703.	23,8
8	31,721	2,8186	1824.	53,5						8	33,793	2,6503	448.	15,2
9	33,783	2,6511	829.	24,3						9	36,544	2,4569	962.	32,5
10	34,405	2,6045	576.	16,9						10	39,213	2,2956	332.	11,2
11	35,269	2,5427	515.	15,1						11	41,289	2,1848	274.	9,3
12	36,615	2,4523	1450.	42,6						12	43,963	2,0579	204.	6,9
13	39,162	2,2985	529.	15,5						13	47,813	1,9008	169.	5,7
14	41,183	2,1902	482.	14,1						14	53,241	1,7191	178.	6,0
15	42,588	2,1211	259.	7,6						15	55,955	1,6420	130.	4,4
16	43,907	2,0604	324.	9,5						16	57,885	1,5918	167.	5,6
17	45,497	1,9920	916.	26,9										
18	47,872	1,8986	267.	7,8										
19	49,265	1,8481	231.	6,8										
20	53,112	1,7230	250.	7,3										
21	54,028	1,6959	173.	5,1										
22	56,508	1,6272	343.	10,1										
23	57,821	1,5934	292.	8,6										

Kryobulin - TIM 4					F. VIII - Hubber					Monoclata				
#	Position	D/-	Height	%H.P.	#	Position	D/-	Height	% H.P.	#	Position	D/-	Height	% H.P.
1	27,407	3,2516	957.	48,6	1	11,719	7,5455	702.	23,9	1	27,428	3,2492	1207.	12,2
2	31,758	2,8153	1971.	100,0	2	19,001	4,6669	552.	18,8	2	31,737	2,8172	9890.	100,0
3	45,510	1,9915	1056.	53,6	3	25,279	3,5204	546.	18,6	3	45,496	1,9921	4919.	49,7
4	56,546	1,6262	420.	21,3	4	27,430	3,2489	700.	23,8	4	53,948	1,6983	234.	2,4
					5	31,784	2,8131	2936.	100,0	5	56,510	1,272	1269.	12,8
					6	45,539	1,9903	1415.	48,2					
					7	53,832	1,7016	196.	6,7					
					8	56,574	1,6255	457.	15,6					

Tabla 2.1-3. Elementos traza en los concentrados de factor VIII (gI FVIII).

Marca	Ca	S	Mg	Fe	Al
Haemate-P	4.33	4.51	0.02	0.04	<0.01
Hemofil M	2.12	2.17	<0.01	<0.01	<0.01
Criostat SD	0.17	3.40	0.04	0.01	<0.01
Kryobulin Tim-3	0.39	10.2	0.03	0.05	<0.01
C.FVIII Hubber	0.17	3.28	0.01	<0.01	0.04
	P	Zn	Cd	Pb	Si
Haemate-P	<0.03	<0.01	<0.01	<0.01	0.18
Hemofil M	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Criostat SD	0.02	0.02	<0.01	<0.01	0.11
Kryobulin Tim-3	0.10	0.02	<0.01	<0.01	0.26
C.FVIII Hubber	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	0.11

Figura 2.1-1. Difractograma del Haemate-P.

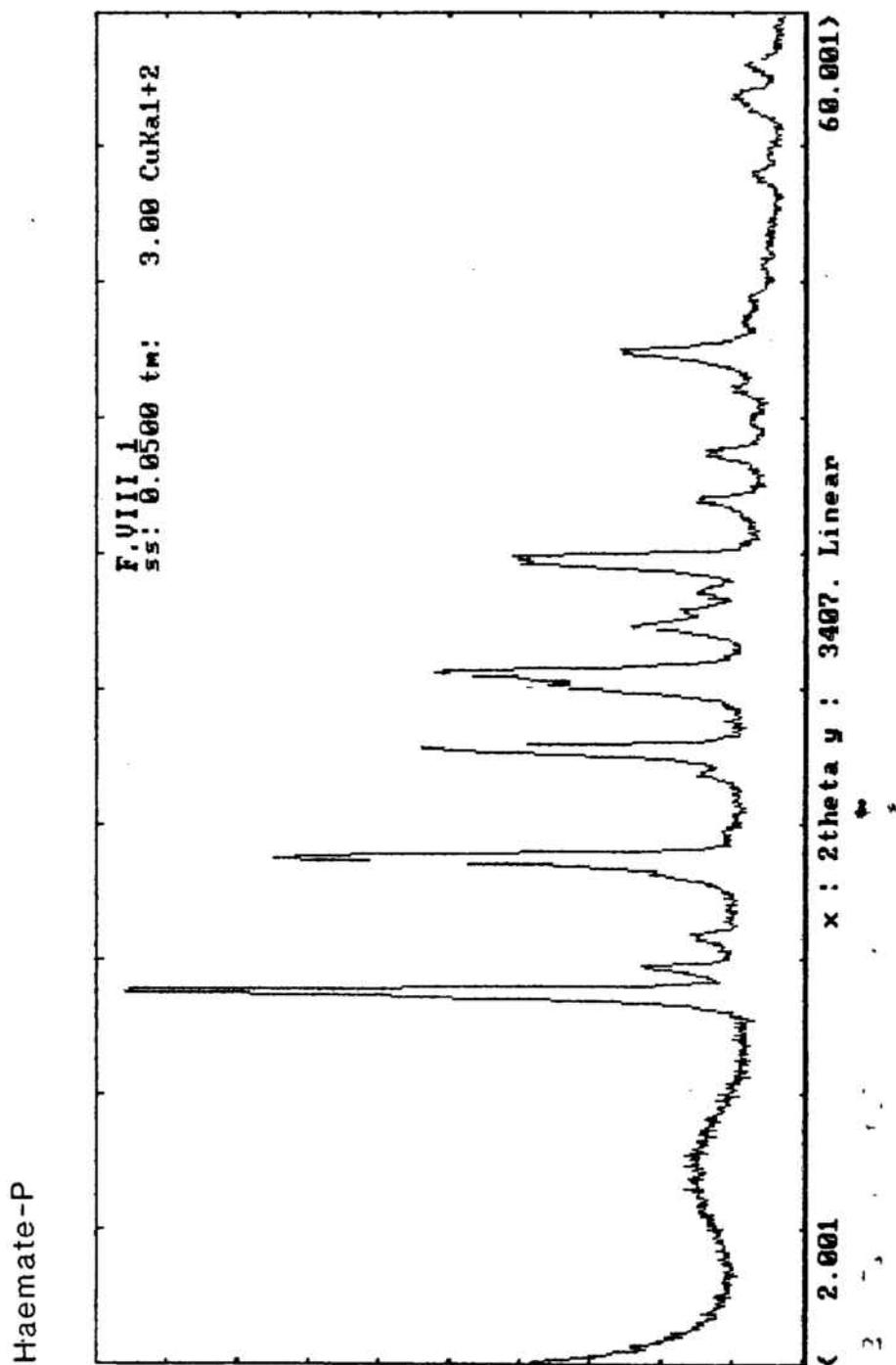


Figura 2.1-2. Difractograma del Hemofil M.

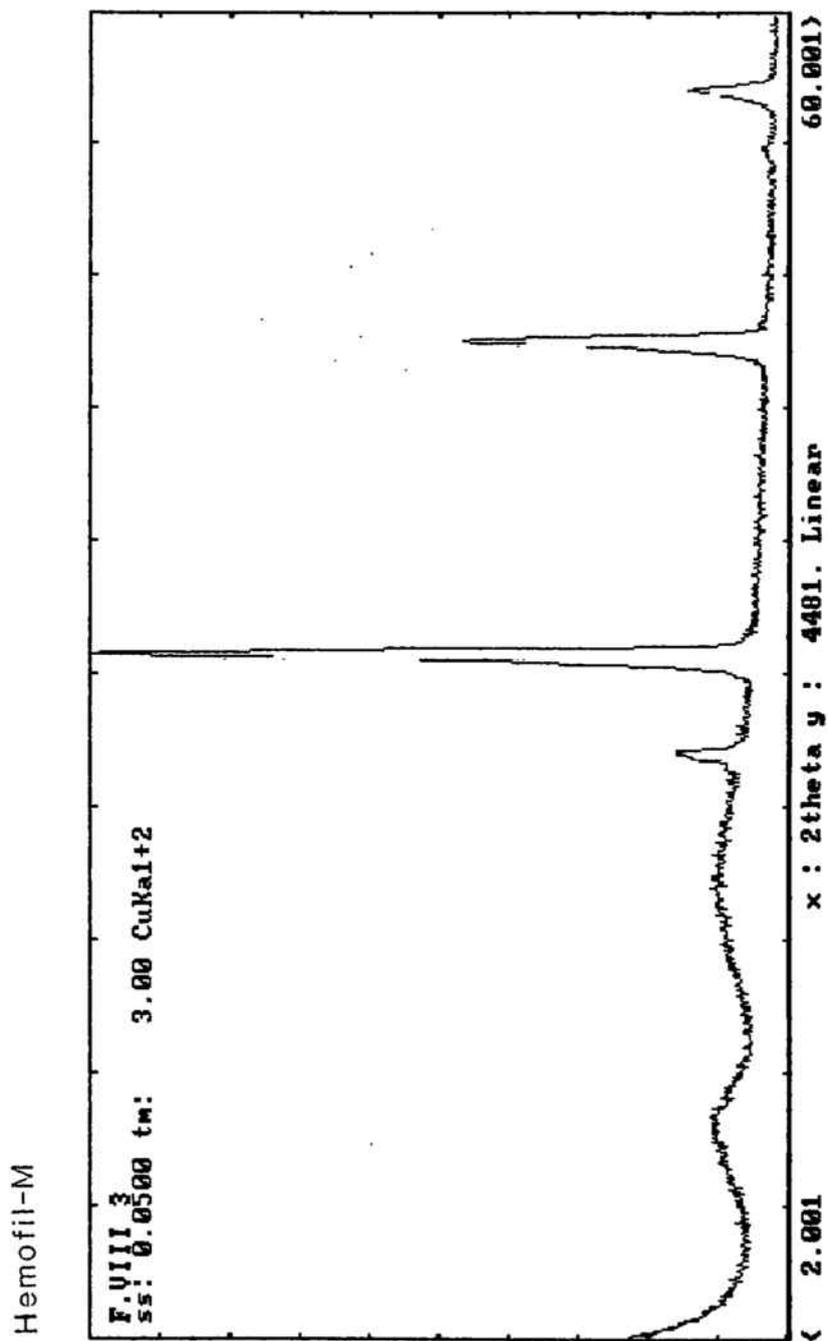


Figura 2.1-3. Difractograma del Criostat SD.

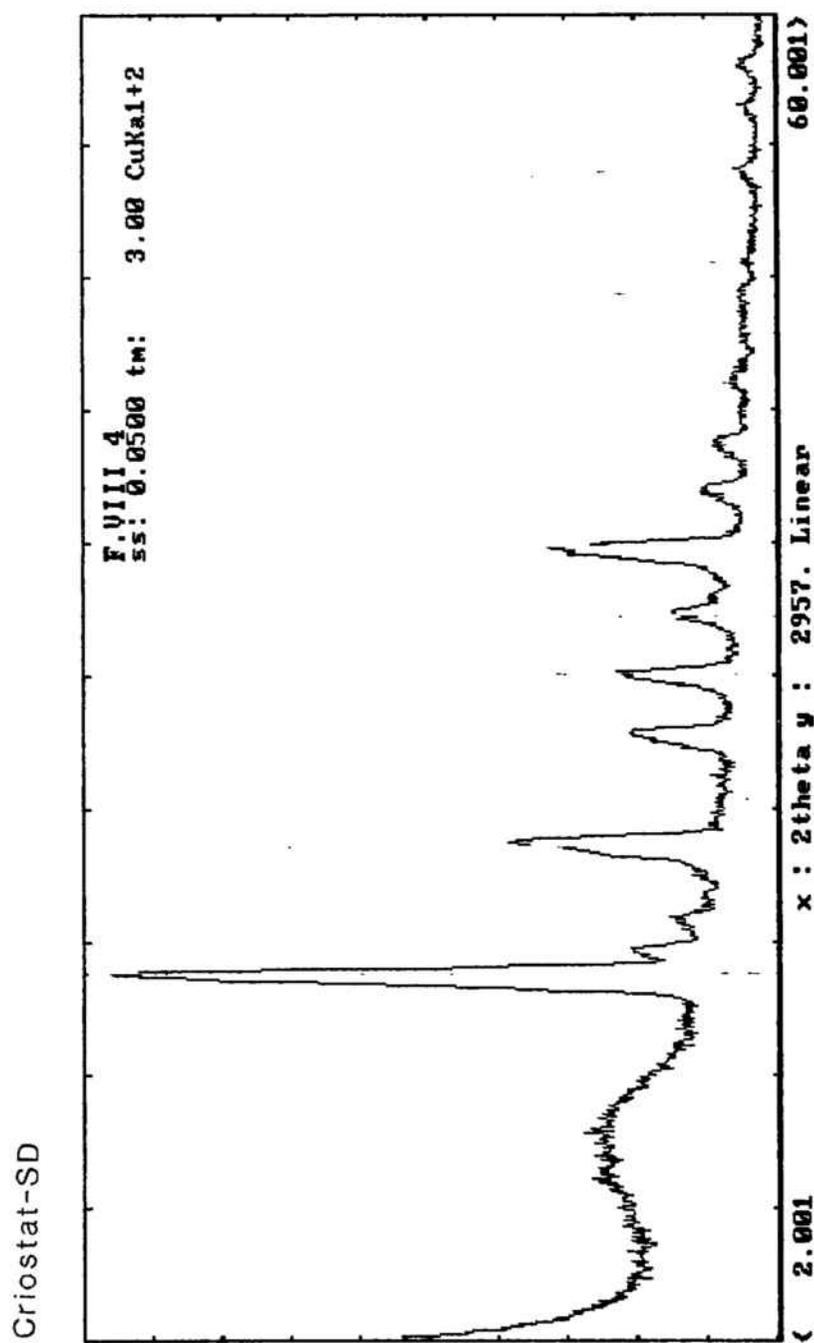


Figura 2.1-4. Difractograma del Kryobulin Tim-3.

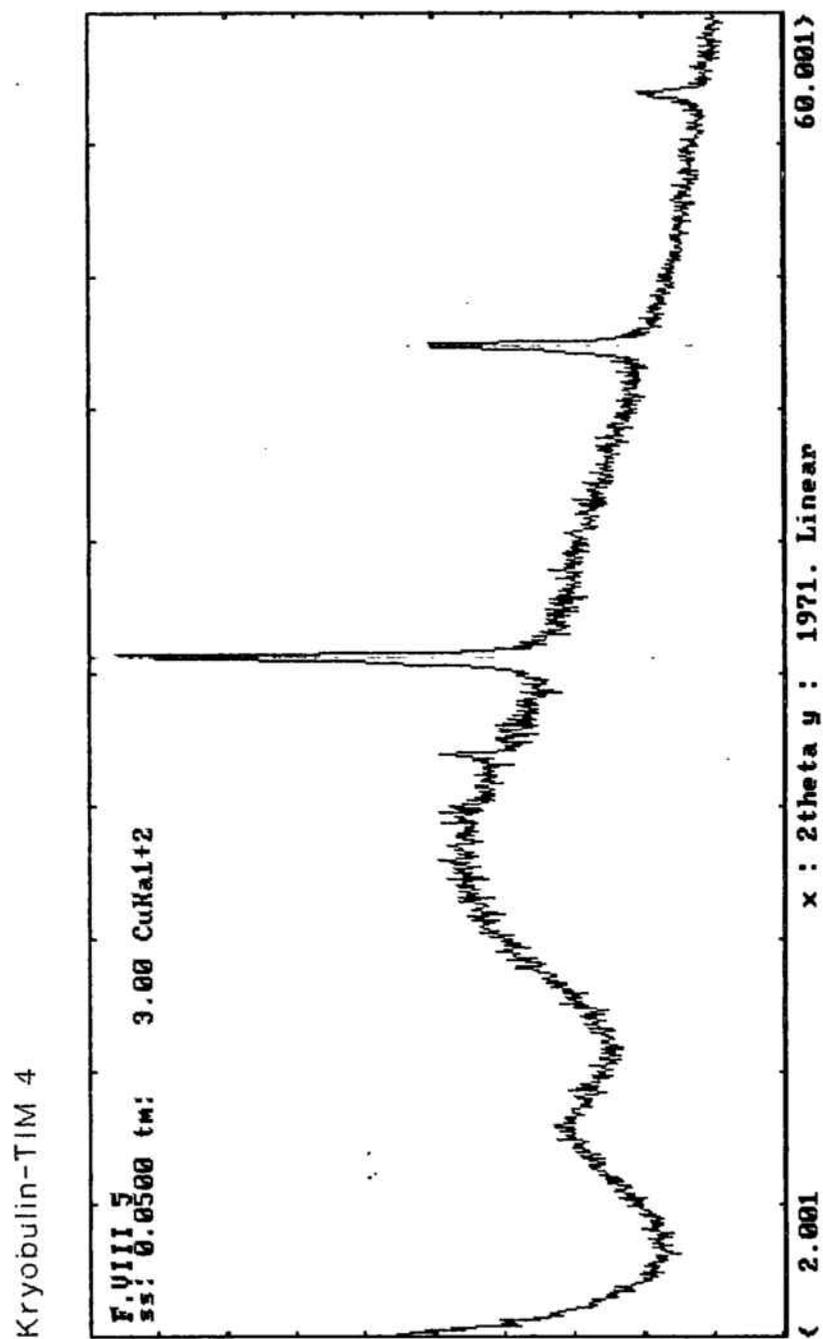


Figura 2.1-5. Difractograma del C.FVIII Hubber.

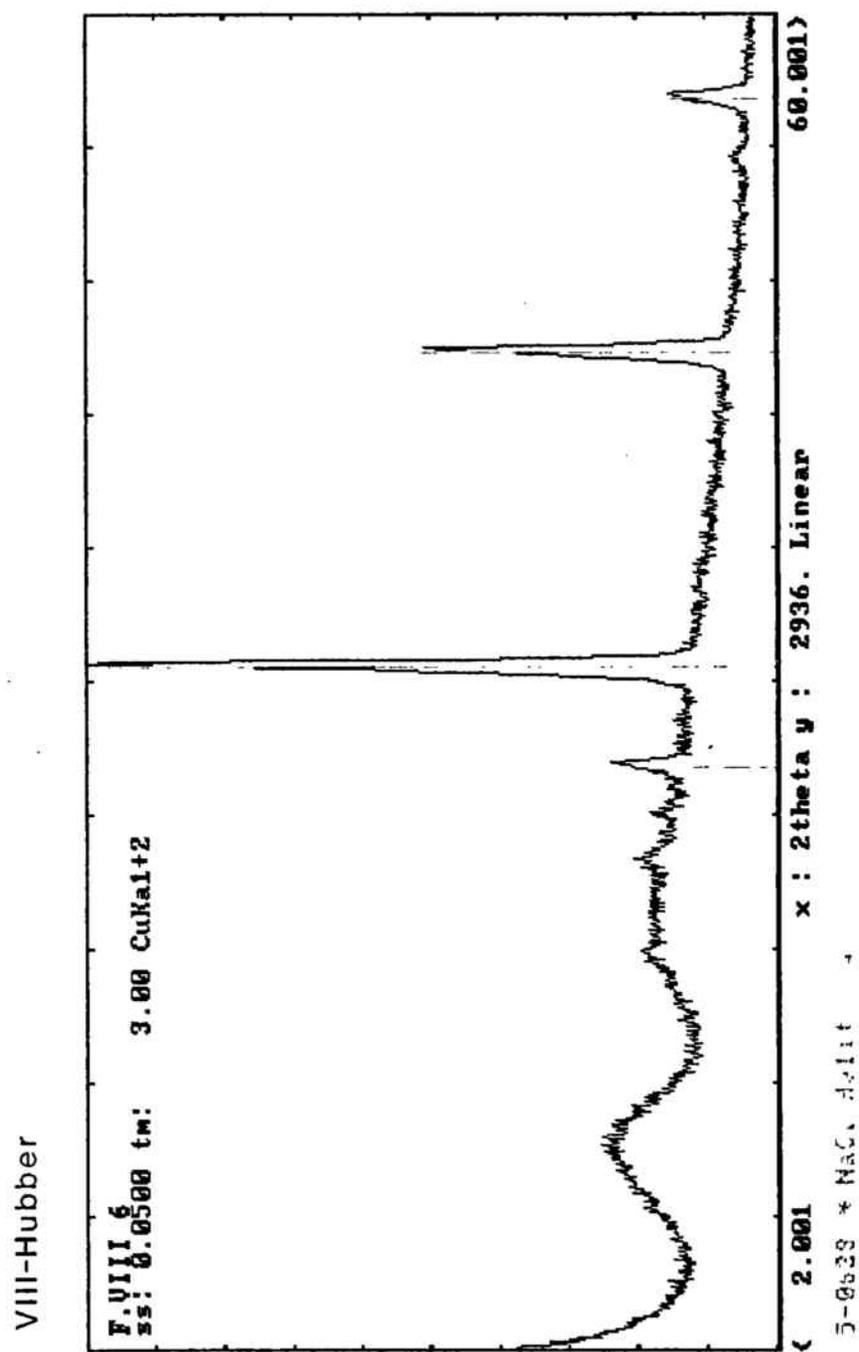


Tabla 2.1-4. Osmolaridad, pH, tiempo de reconstitución, aspecto, peso y excipientes cristalinos.

Marca	Osmolaridad (mOsm/l)	pH	T.Rec. (s)
Haemate-P	451	6.9	45
Hemofil M	151	7.0	30
Criostat SD	310	7.0	60
Kryobulin Tim-3	406	6.8	90
C.FVIII Hubber	198	7.0	75

	Aspecto	Peso (g/500UI)	Excipientes
Haemate-P	OI	1.60	GS
Hemofil M	OI	0.20	S
Criostat SD	OI	0.75	G
Kryobulin Tim-3	OI	1.64	S
C.FVIII Hubber	OI	0.40	S

OI, opalescente-incoloro; G, glicina; S, cloruro sódico

2.1.4-DISCUSSION

El estudio de los difractogramas, así como de los espaciados interreticulares e intensidades, indica que los liofilizados estudiados están compuestos por una fase amorfa y una fase cristalina, correspondiendo la primera al factor VIII y proteínas acompañantes, y la segunda a los excipientes empleados para la consecución de la forma farmacéutica liofilizado. Estos excipientes son la glicina y el cloruro sódico, dado que los máximos de absorción que producen los productos liofilizados se superponen con los correspondientes a dichas sustancias en estado puro y cristalizado.

Los liofilizados analizados pueden clasificarse en tres grupos según sus constituyentes: Haemate-P contiene simultáneamente glicina y cloruro sódico; Criostat SD contiene glicina pero no cloruro sódico; el resto de especialidades consideradas contienen cloruro sódico, pero no glicina. La presencia de glicina puede explicarse dada su función de sustancia de carga en formulaciones para liofilizados, lo que coincide con el hecho de que las especialidades con glicina son las que presentan un mayor volumen y peso de producto. El cloruro sódico suele emplearse como estabilizante para esta forma farmacéutica, lo que debería traducirse en un aumento de la estabilidad del producto reconstituido.

La zona sin máximos claros y/o diferenciados de los difractogramas parece corresponder con la fracción amorfa de los liofiliza-

dos constituida por el factor VIII y proteínas acompañantes.

La difracción de Rx se demuestra como un método analítico válido para la caracterización de liofilizados, proporcionando datos fiables y concretos para el mejor conocimiento de la formulación empleada en cada caso.

Los elementos traza detectados en cantidades valorables son fundamentalmente calcio y azufre. La presencia de estos elementos puede explicarse por distintas razones: El calcio se emplea en la tecnología de fraccionamiento del factor VIII como estabilizante, en determinadas fases, del mismo. El azufre forma parte de la molécula de distintos aminoácidos, por lo que cabría considerarlo, más que como elemento traza, como azufre orgánico.

El aluminio es un contaminante habitual, ya descrito (143), en hemoderivados, y procede de la cesión de filtros y/o recipientes del proceso tecnológico. Sin embargo, los valores de aluminio detectadas son muy inferiores a las obtenidas en un estudio anterior, lo que habla del interés por eliminar este contaminante de los concentrados de factor VIII, por parte de los fabricantes (143).

La importancia de los elementos traza en la estabilidad del factor VIII puede quedar solapada, en principio, por la influencia de otros factores, como el contenido en factor von Willebrand, calcio y cloruro sódico, y su evaluación concreta requeriría un análisis estadístico multivariante más complejo.

La osmolaridad de los concentrados reconstituidos no varía sensiblemente de los límites fisiológicos. Los valores superiores corresponden a Haemate-P y Kryobulin Tim-3 (451 y 406 mOsm/l respectivamente), muy lejos, sin embargo, de los límites tolerables aceptados para un preparado endovenoso (600 mOsm/l). El pH de todos los concentrados es próximo al fisiológico. El aspecto, en todos los casos, es de una solución incolora opalescente. La tiempo de reconstitución oscila alrededor del minuto, sin grandes diferencias entre los concentrados. El peso del liofilizado varía, según la especialidad, entre 0.2 g/500UI FVIII (Hemofil M) y 1.64 g/500UI FVIII (Kryobulin Tim-3).

Finalmente, a modo de resumen, se puede establecer que en función de los parámetros estudiados se pueden definir unas diferencias cualitativas entre los concentrados de factor VIII analizados, si bien pueden considerarse correctos en cuanto a su elaboración y aceptables para su empleo y administración.

2.2-CONTENIDO PROTEICO DE LOS CONCENTRADOS DE FACTOR VIII

2.2.1-INTRODUCCION

En relación al contenido total de proteína del plasma (70-80 mg/ml), el factor VIII puede considerarse una proteína marginal dada su baja concentración (0.1-0.2 mcg/ml) (144). Los sucesivos procesos de fraccionamiento, concentración y purificación del plasma, para la obtención de los concentrados de factor VIII, eliminan la mayor parte de la proteína acompañante; sin embargo ésta representa todavía un porcentaje muy elevado del total de proteína presente en los concentrados.

Los concentrados de factor VIII convencionales tienen, teóricamente, entre 0.2 y 1 mg de proteína/UI de factor VIII (1-5 UI factor VIII/mg proteína). Esto significa que el factor VIII representa un valor inferior al 1% del total de la proteína presente. Los concentrados más purificados (por inmunoafinidad) tienen 1000-3000 UI/mg proteína, lo que, en el mejor de los casos, representa todavía un porcentaje de factor VIII inferior al 50%, si se tiene en cuenta que el factor VIII puro tiene un valor de 7000 UI/mg proteína.

La presencia de proteína -no factor VIII- en los concentrados de factor representa, en la mayor parte de los casos, un inconveniente, ya que su administración se ha relacionado con la aparición de complicaciones como, por ejemplo, alteraciones inmunológicas en los pacientes hemofílicos sometidos a tratamiento crónico con tales concentrados (ver capítulo 1.2.4) (145-147).

Las principales proteínas presentes en los concentrados de factor VIII son, desde el punto de vista cuantitativo, fibrinógeno (Fg), fibronectina (Fn), inmunoglobulinas y albúmina; y desde el punto de vista cualitativo, factor von Willebrand (FvW) y, lógicamente factor VIII. La presencia, casi exclusiva, de estas proteínas se explica porque son las que constituyen el crioprecipitado -primera fase del fraccionamiento de los concentrados de factor VIII- (Fg, Fn, FvW y factor VIII), o por su elevada concentración en plasma (inmunoglobulinas y albúmina). La albúmina puede ser añadida "a posteriori", en algunos procesos de fabricación, como estabilizante del factor VIII, sobre todo en especialidades de alta pureza (obtenidas por purificación con anticuerpos monoclonales o por cromatografía de intercambio iónico).

La presencia de cada una de estas proteínas tiene distinto interés. El Fg, la Fn y las inmunoglobulinas no juegan ningún papel positivo, son contaminantes puros, y sólo representan una carga proteica administrada al paciente que podría alterar sus parámetros inmunológicos. Se han descrito, incluso, procesos de hemólisis relacionados con la presencia de isohemaglutininas.

La albúmina, en muchos casos la proteína más abundante en los concentrados, tiene un interés patológico mucho menor, ya que es una proteína muy estable y tiene un mínimo poder aloantigénico. De hecho, al expresar la pureza de un concentrado de factor VIII (actividad específica o UI/mg proteína), usualmente se excluye la fracción proteica que corresponde a la albúmina.

La presencia de FvW tiene mucho más interés, ya que esta proteína se encuentra cuantitativamente en una proporción muy baja (del orden del factor VIII), pero cualitativamente tiene mucha importancia, ya que es la proteína estabilizadora natural del factor VIII. Por otro lado, la presencia de FvW funcional en los concentrados de factor VIII podría hacerlos útiles en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW). Pocos concentrados de factor VIII, sin embargo, mantienen íntegro el patrón multimérico plasmático (los multímeros de alto peso molecular, sobre todo) tras el fraccionamiento, por lo que la mayor parte del FvW no es funcional (148).

El estado de alteración química de la proteína presente puede tener un interés añadido, ya que se ha apuntado la posibilidad de que a mayor grado de alteración, ésta presente un carácter más antigénico e inmunodepresor (149).

En este estudio se ha analizado el contenido en proteínas de los concentrados de factor VIII registrados y/o empleados en España. Las proteínas valoradas han sido Fg, Fn, inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), albúmina y FvW, así como la proteína total. Se ha valorado fundamentalmente la cantidad absoluta (antigénica) de estas proteínas. Únicamente se ha determinado la actividad funcional del Fg, con objeto de definir el cociente funcional/total que podría ser indicativo del grado de alteración proteica, dado que el Fg es una proteína lábil a la manipulación y/o calentamiento. Se ha valorado, además la actividad funcional del FvW con

objeto de establecer aquellos concentrados de factor VIII que podrían ser útiles en el tratamiento de la EvW.

Es necesario destacar que, en la actualidad, no se dispone de datos sobre el contenido en proteínas de los concentrados empleados en España. Únicamente se conocen las referencias de los concentrados, registrados en otros países, que pueden ser considerados equivalentes. Por otro lado, no existe ningún concentrado de factor VIII -de los estudiados- que incluya, en las indicaciones oficialmente reconocidas, su empleo en el tratamiento de la EvW.

2.2.2-METODOS

2.2.2.1-Concentrados de factor VIII

Los concentrados de factor VIII estudiados han sido Kryobulin TIM-3 (Immuno), Haemate-P (I.Behring), Conc.FVIII Hubber T (Hubber), Hemofil M (Baxter) y Criostat SD (Grifols). El número de lotes analizados para cada marca de concentrado de factor VIII ha sido de tres.

Los concentrados de factor se han reconstituido, siguiendo las instrucciones del fabricante, en el volumen de disolvente (agua para inyección, API) acompañante. La concentración final ha oscilado entre 25 y 100 UI de factor VIII/ml, según la especialidad.

2.2.2.2-Análisis de proteínas

El análisis de proteínas ha abarcado el estudio de las siguientes proteínas individuales o conjuntos de ellas: Fibrinógeno (Fg) -tanto antigénico como funcional-, fibronectina (Fn), inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM), factor von Willebrand (FvW) -antigénico, funcional y distribución multimérica- y albúmina, además del contenido en proteína total.

2.2.2.2.1-Fibrinógeno

La valoración del Fg se ha llevado a cabo a partir de dos puntos de vista diferentes: Por un lado se ha analizado el Fg antigénico, que indica la cantidad total de Fg existente y, por otro lado el Fg funcional, que indica la cantidad del mismo que retiene todavía actividad. El cociente entre ambos valores es indicativo del grado de alteración de la proteína durante el proceso de fraccionamiento y purificación.

El Fg antigénico se ha valorado por la técnica de inmunodifusión radial simple (IDRS). La concentración de Fg se determina a partir del diámetro del halo de precipitación tras la difusión de la muestra en una placa de agarosa que contiene un antisuero específico contra el Fg, obtenido por inmunización de conejos. El diámetro del halo de la muestra problema se compara con los valores obtenidos con un estándar a distintas diluciones.

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Placas de IDR LC-Partigen (I.Behring) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante una lupa reglada TCT-03 (precisión 0.1 mm) (I.Behring).

La metodología detallada fué la siguiente: El estándar de Fg se reconstituyó a una concentración de 0.25g/100 ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40. En cada pocillo de la placa se colocaron 5 mcl de los duplicados de cada dilución y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado este plazo se efectuó la lectura del diámetro de los halos de precipitación mediante lupa graduada sobre fondo oscuro e iluminación lateral. La correlación se estableció entre el cuadrado del diámetro y la concentración de Fg correspondiente. Las muestras problema de los concentrados de factor VIII se leyeron sobre la recta de calibración correspondiente. El coeficiente de variación de la técnica fué, en este caso, del 7.2%.

El Fg funcional se ha valorado mediante la técnica coagulométrica de Clauss. Esta técnica se basa en la observación de que a altas concentraciones de trombina y bajas de fibrinógeno, el tiempo de formación del coágulo es proporcional a la concentración de fibrinógeno.

Cada muestra de concentrado de factor se analizó por duplicado, a dos concentraciones distintas. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Kit reactivo fibrinógeno (Boehringer Mannheim) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante un coagulómetro BE Coagulator (Benk Electronic).

La metodología detallada fué la siguiente: El estándar de Fg se reconstituyó y diluyó hasta una concentración de 0.25 g/100 ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16, en solución reguladora. En cada pocillo del coagulómetro se colocaron 0.2 ml de los duplicados de cada dilución y se incubaron 60 s a 37 °C; posteriormente se añadieron 0.2 ml del reactivo fibrinógeno. En este momento, el cronómetro se dispara automáticamente, parándose en el momento en que se forma el coágulo. Los tiempos de cada muestra duplicada deberían coincidir en un $\pm 4\%$ para ser considerados válidos. Para las muestra problema, la metódica fué idéntica con la salvedad de emplear únicamente tres diluciones (1/2, 1/4 y 1/8). Las muestras de los concentrados de factor VIII se leyeron sobre la recta de calibración correspondiente. El coeficiente de variación de la técnica fué, en este caso, del 9.3%.

2.2.2.2.2-Fibronectina

La valoración de la Fn se ha llevado a cabo por la técnica de inmunodifusión radial simple (IDRS). La concentración de Fn se determina a partir del diámetro del halo de precipitación tras la difusión de la muestra en una placa de agarosa que contiene un

antisuero específico contra la Fn, obtenido por inmunización de conejos. El diámetro del halo de la muestra problema se compara con los valores obtenidos con un estándar a distintas diluciones.

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Placas de IDR LC-Partigen (I.Behring) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante una lupa reglada TCT-03 (precisión 0.1 mm) (I.Behring).

La metodología se detalla a continuación: El estándar de Fn se reconstituyó a una concentración de 33 mg/100 ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. En cada pocillo de la placa se colocaron 20 mcl de los duplicados de cada dilución y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 72 h. Pasado este plazo se efectuó la lectura del diámetro de los halos de precipitación mediante lupa graduada sobre fondo oscuro e iluminación lateral. La correlación se estableció entre el cuadrado del diámetro y la concentración de Fn correspondiente. Las muestras problema de los concentrados de factor VIII se leyeron sobre la recta de calibración correspondiente. El coeficiente de variación de la técnica fué, en este caso, del 8.3%.

2.2.2.2.3-Inmunoglobulinas

La valoración de las inmunoglobulinas se ha llevado a cabo por la técnica de inmunodifusión radial simple (IDRS), de forma análoga a la valoración del Fg y de la Fn.

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Placas de IDR LC-Partigen (I.Behring) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante una lupa reglada TCT-03 (precisión 0.1 mm) (I.Behring).

La metodología detallada fue prácticamente idéntica a la empleada con el Fg y la Fn. El coeficiente de variación de la técnica osciló entre el 7.2 % para la IgG y el 8.3% para la IgM.

2.2.2.2.4-Factor von Willebrand (FvW)

La valoración del FvW se ha llevado a cabo, al igual que la del Fg, a partir de dos puntos de vista diferentes: Por un lado el FvW total, o FvW antigénico y, por otro lado, el FvW funcional. Este último se ha valorado mediante dos técnicas distintas, aunque complementarias: La actividad cofactor de la ristocetina (FvW:CoR) y el análisis del patrón multimérico.

El FvW antigénico se ha analizado por la técnica de inmunoelectrodifusión (IED), o técnica de Laurell (150). La técnica de Laurell se basa en la migración del FvW en un campo eléctrico sobre un gel de agarosa que contiene un antisuero específico del

FvW, obtenido por inmunización de conejos. A pH 8.8, el FvW cargado negativamente migra hacia el ánodo. En la migración el FvW es precipitado por los anticuerpos contenidos en el gel. El FvW migra hasta que todo el antígeno ha sido precipitado. Al final del proceso, la altura del pico es proporcional a la concentración de FvW contenido en la muestra. La altura del pico de la muestra problema se compara con los valores obtenidos con un estándar a distintas diluciones.

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Kit Assera Plate FvW (Diagnóstica Stago), que incluye placa de migración, solución reguladora pH 8.8 y solución reveladora (Azul de Coomasie R-250) y plasma referencia (Dade-Grifols).

La metodología detallada fué la siguiente: El estándar de FvW se reconstituyó a una concentración de 1 UI/ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. En cada pocillo de la placa se colocaron 7 mcl de los duplicados de cada dilución y se sometieron a una intensidad de 15 mA; a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este plazo se efectuó, tras el revelado, la lectura del pico de migración. La correlación se estableció entre la longitud del pico y la concentración de FvW correspondiente. Las muestras problema de los concentrados de factor VIII se leyeron sobre la recta de calibrado correspondiente. El coeficiente de variación de la técnica

fué, en este caso, del 6.1%.

La técnica de la actividad FvW:CoR se fundamenta en la capacidad del FvW de agregar plaquetas humanas estabilizadas, en presencia del antibiótico ristocetina A (151). La última dilución de una muestra que provoca aglutinación, comparado con la última dilución positiva de una muestra estándar, da la actividad FvW:CoR.

Los reactivos empleados fueron los siguientes: Reactivo von Willebrand (I.Behring) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante una lupa con iluminación incorporada (I.Behring).

La metodología empleada se detalla a continuación: El estándar de FvW se reconstituyó a una concentración de 0.1 UI/ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/8, 1/9, 1/10, 1/11, etc, con solución salina fisiológica. En una placa vidrio se colocaron 50 mcl de cada dilución y 50 mcl del reactivo, y se sometieron a agitación durante un minuto. Pasado este plazo, se efectuó la lectura sobre fondo negro satinado y luz tangencial. El cociente entre la última dilución positiva del problema y del estándar indica la actividad FvW:CoR. El coeficiente de variación de la técnica fue, en este caso, inferior al 10%.

El análisis del patrón multimérico del FvW se llevó a cabo mediante una electroforesis sobre gel de agarosa-SDS discontinuo (152). El revelado se practicó, tras una transferencia a membrana de nitrocelulosa, con un segundo anticuerpo marcado con fosfatasa

alcalina, empleando como sustrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) y NBT (nitroazul-betrazol).

La técnica empleada es la descrita por Budde y col. (153), con pequeñas modificaciones. El plasma estándar y las muestras de concentrados de factor VIII se reconstituyeron a una concentración de 0.1 UI/ml (teórica). En cada pocillo de un gel de agarosa-SDS 1.4% discontinuo se colocaron 20 mcl de cada muestra y se sometieron a 60 V durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una transferencia a un filtro de nitrocelulosa, sobre el que se practicó el revelado. El revelado se llevo a cabo con dos anticuerpos: En primer lugar con anticuerpo policlonal anti-FvW de conejo, y en segundo lugar con un anticuerpo de cabra anti-globulina de conejo marcado con fosfatasa alcalina. El sustrato empleado fue BCIP y NBT. Las muestras de los concentrados de factor VIII se compararon con las de un plasma estándar. La integridad del patrón multimérico del FvW viene dada por la presencia de las bandas correspondientes a los multímeros de mayor peso molecular.

2.2.2.2.5-Albúmina

La valoración de la albúmina se ha llevado a cabo por la técnica de inmunodifusión radial simple (IDRS), de forma análoga a la valoración del Fg, Fn e inmunoglobulinas.

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres

concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Placas de IDR LC-Partigen (I.Behring) y plasma referencia (Dade-Grifols). La lectura de los resultados se realizó mediante una lupa reglada TCT-03 (precisión 0.1 mm) (I.Behring).

La metodología detallada fue prácticamente idéntica a la empleada con las proteínas antes citadas. El coeficiente de variación de la técnica fue, en este caso, del 7.6%.

2.2.2.2.6-Proteína total

El análisis de la proteína total se ha llevado a cabo a partir de la determinación de nitrógeno según el método Kjeldahl. La ejecución de la técnica se ha realizado en un aparato Vapodest 6 (Gerhardt).

Las muestras de concentrados de factor VIII se han analizado por duplicado para cada lote. Como control, se ha utilizado una solución estándar de nitrógeno de 4 mg/ml.

2.2.3-RESULTADOS

La Tabla 2.2-1 muestra la concentración de Fg antigénico o total que presentan los concentrados de factor VIII analizados. Los resultados se expresan en mg/100ml y también en mg/100UI FVIII, con el fin de que sean más comparables. La cantidad de Fg:Ag es muy variable en relación a las marcas, oscilando entre 1180

mg/100ml (47 mg/100UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y valores inferiores a 40 mg/100ml (< 1.6 mg/100UI FVIII) (Hemofil M).

Tabla 2.2-1. Fibrinógeno antigénico (Fg:Ag) en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	64.00 \pm 18.68	2.560 \pm 0.747
Hemofil M	< 40	< 1.6
Kryobulin Tim-3	1180.00 \pm 71.19	47.200 \pm 2.848
Criostat SD	127.57 \pm 49.56	5.103 \pm 1.982
C.FVIII Hubber	187.00 \pm 15.21	7.480 \pm 0.608
Media \pm Desviación Estándar		

La concentración de Fg funcional se presenta en la Tabla 2.2-2. En este caso existen dos grupos de marcas claramente diferenciadas, las que presentan cantidades apreciables de Fg funcional (116 y 914 mg/100ml) (Kryobulin Tim-3 y C.FVIII Hubber) y las que presentan concentraciones no detectables (< 8.4 mg/100ml).

La relación entre el Fg funcional y el total (Tabla 2.2-3) define tres grupos de concentrados: Los que presentan un porcentaje de Fg funcional elevado (62 y 78% del total) (Kryobulin Tim-3 y C.FVIII Hubber), los que presentan la mayor parte del Fg no

activo (Fg funcional < 13.1%) (Haemate-P y Criostat SD), y un concentrado en el que no puede definirse el cociente ya que no contiene prácticamente Fg (Hemofil M).

Tabla 2.2-2. Fibrinógeno funcional (Fg) en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	< 8.4	< 0.336
Hemofil M	< 8.4	< 0.336
Kryobulin Tim-3	914.67 \pm 67.57	36.587 \pm 2.703
Criostat SD	< 8.4	< 0.336
C.FVIII Hubber	116.35 \pm 9.50	4.653 \pm 0.380
Media \pm Desviación Estándar		

La Tabla 2.2-4 recoge la concentración de Fn antigénica o total. Los valores de Fn obtenidos oscilan entre 197 mg/100ml (7 mg/100UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y concentraciones no detectables (< 1.62 mg/100ml) (Hemofil M).

Tabla 2.2-3. Contenido de fibrinógeno en los concentrados de factor VIII. Cociente entre fibrinógeno funcional y fibrinógeno

antigénico (Fg/Fg:Ag).

Marca	(mg Fg/Fg:Ag)
Haemate-P	< 0.131
Hemofil M	-
Kryobulin Tim-3	0.778 _± 0.085
Criostat SD	< 0.066
C.FVIII Hubber	0.622 _± 0.030

Media _± Desviación Estándar

Tabla 2.2-4. Fibronectina (Fn) en los concentrados de factor VIII.

Marca	Fn (mg/100ml)	Fn (mg/100UI FVIII)
Haemate-P	14.95 _± 8.02	0.598 _± 0.321
Hemofil M	< 1.62	< 0.065
Kryobulin Tim-3	197.88 _± 22.42	7.915 _± 0.897
Criostat SD	177.22 _± 56.47	7.089 _± 2.258
C.FVIII Hubber	50.53 _± 12.42	2.021 _± 0.497

Media _± Desviación estándar

Las Tablas 2.2-5 a 2.2-8 muestran el contenido de IgG, IgA e IgM, así como el de inmunoglobulinas totales, de los concentrados

estudiados. La concentración de inmunoglobulinas totales oscila entre 85 mg/100ml (3 mg/100UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y valores no detectables (< 2.73 mg/100ml) (Hemofil M). La proporción de cada una de las inmunoglobulinas varía con la marca, aunque por regla general se presentan en concentraciones más o menos equivalentes.

Tabla 2.2-5. IgG en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	1.88 _± 0.46	0.075 _± 0.018
Hemofil M	< 0.93	< 0.037
Kryobulin Tim-3	29.23 _± 11.21	1.169 _± 0.448
Criostat SD	14.78 _± 7.48	0.591 _± 0.299
C.FVIII Hubber	7.82 _± 1.93	0.313 _± 0.077
Media _± Desviación Estándar		

Tabla 2.2-6. IgA en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	1.19 \pm 0.14	0.048 \pm 0.005
Hemofil M	< 1.11	< 0.044
Kryobulin Tim-3	34.40 \pm 8.06	1.376 \pm 0.322
Criostat SD	19.37 \pm 7.95	0.775 \pm 0.318
C.FVIII Hubber	2.09 \pm 0.36	0.084 \pm 0.014
Media \pm Desviación Estándar		

Tabla 2.2-7. IgM en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	2.55 \pm 0.61	0.102 \pm 0.024
Hemofil M	< 0.69	< 0.028
Kryobulin Tim-3	21.33 \pm 5.48	0.853 \pm 0.219
Criostat SD	15.56 \pm 8.02	0.622 \pm 0.321
C.FVIII Hubber	2.31 \pm 0.38	0.093 \pm 0.015
Media \pm Desviación Estándar		

Tabla 2.2-8. Inmunoglobulinas totales en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	5.62 _± 1.15	0.225 _± 0.046
Hemofil M	< 2.73	< 0.109
Kryobulin Tim-3	84.97 _± 24.59	3.399 _± 0.983
Criostat SD	49.71 _± 23.44	1.991 _± 0.934
C.FVIII Hubber	12.23 _± 2.68	0.489 _± 0.107

Media _± Desviación Estándar

La Tabla 2.2-9 muestra la concentración de FvW:Ag. La cantidad de FvW oscila entre 119 UI/ml (4.77 UI/UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y 13 UI/ml (0.5 UI/UI FVIII) (Hemofil M). La actividad FvW:CoR (Tabla 2.2-10) oscila entre 2.2 UI/UI FVIII (Haemate-P) y valores indetectables (< 0.05 UI/UI FVIII) (Hemofil M). El análisis del patrón multimérico (Tabla 2.2-10 y Figuras 2.2-1 y 2.2-2) muestra que únicamente una especialidad (Haemate-P) presenta un patrón multimérico cercano al plasmático. En el resto, se aprecia una menor presencia de multímeros de alto peso molecular (las formas activas del FvW).

Tabla 2.2-9. Factor von Willebrand antigénico (FvW:Ag) en los concentrados de factor VIII.

Marca	FvW:Ag (UI/ml)	FvW:Ag (UI/UI FVIII)
Haemate-P	63.97 \pm 13.00	2.558 \pm 0.520
Hemofil M	13.09 \pm 3.72	0.523 \pm 0.149
Kryobulin Tim-3	119.27 \pm 3.72	4.771 \pm 0.329
Criostat SD	70.62 \pm 7.81	2.825 \pm 0.312
C.FVIII Hubber	81.48 \pm 33.95	3.259 \pm 1.359

Media \pm Desviación Estándar

Tabla 2.2-10. Actividad FvW:CoR y patrón multimérico del FvW en los concentrados de factor VIII.

Marca	FvW:CoR (UI/UI FVIII)	Patrón Multi.
Haemate-P	2.20 \pm 0.12	N
Hemofil M	< 0.05	A
Kryobulin Tim-3	1.30 \pm 0.04	A
Criostat SD	1.29 \pm 0.03	A
C.FVIII Hubber	1.15 \pm 0.03	A

Media \pm Desviación Estándar

N, Patrón normal. A, Ausencia de multímeros de alto peso molecular.

Figura 2.2-1. Electroforesis sobre gel de SDS-agarosa de los multímeros del FvW, en los concentrados de factor VIII.

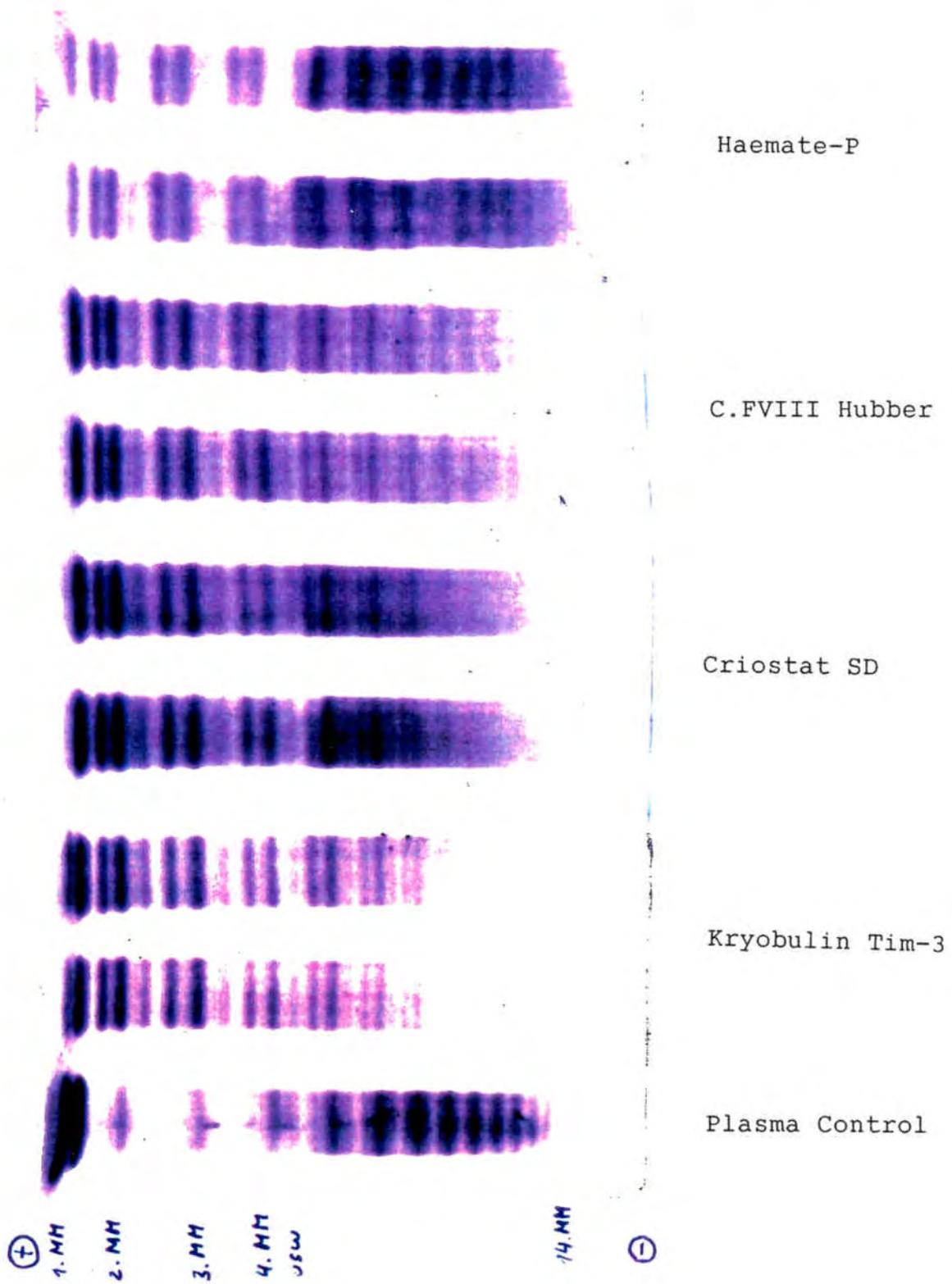
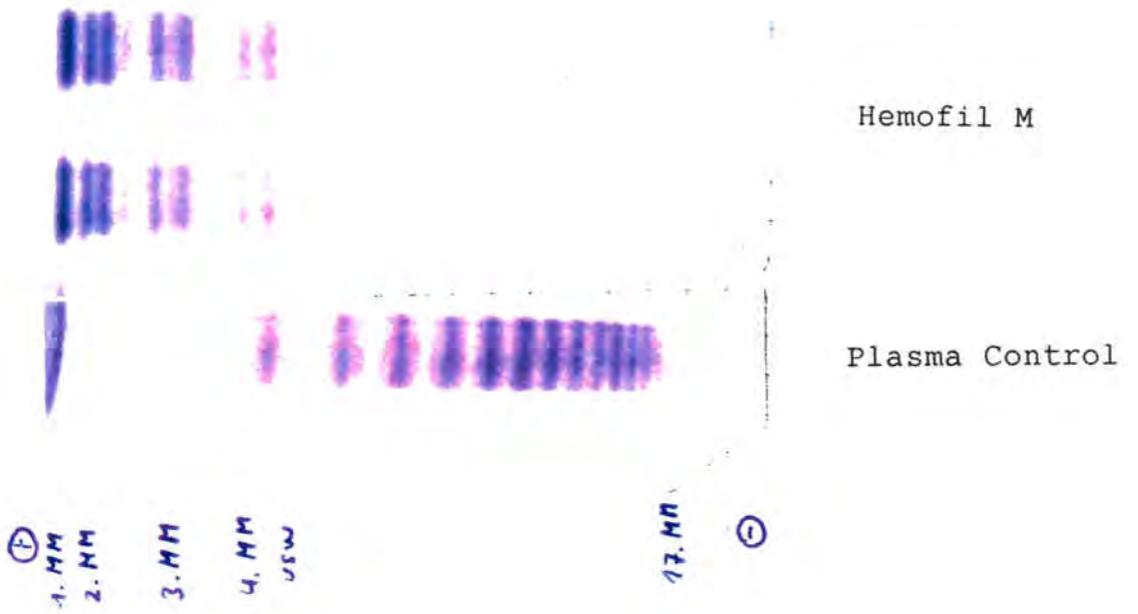


Figura 2.2-2. Electroforesis sobre gel de SDS-agarosa de los multímeros del FvW, en los concentrados de factor VIII.



La Tabla 2.2-11 muestra la concentración de albúmina en las especialidades analizadas. Los valores oscilan entre 943 mg/100ml (0.4 mg/100UI FVIII) (Hemofil M) y valores inferiores a 12 mg/100ml (< 0.005 mg/100UI FVIII) (Criostat SD). La proteína total (Tabla 2.2-12) oscila entre 18 mg/ml (0.7 mg/UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y 4 mg/ml (0.15 mg/UI FVIII) (Criostat SD). La actividad específica, entendida como el cociente entre UI FVIII y mg proteína total (Pt) (Tabla 2.2-13), oscila entre 6.62 UI/mg Pt (Criostat SD) y 1.34 UI/mg Pt (Kryobulin Tim-3). La actividad específica, referida a la proteína total una vez descontada la albúmina (Pa), tiene mucho más interés y oscila ampliamente entre valores superiores a 1070 UI/mg Pa (Hemofil M) y 1.45 UI/mg Pa (Kryobulin Tim-3). Destaca el elevado valor del Hemofil M, ya que el resto de especialidades no supera el valor de 25 UI/mg Pa.

Tabla 2.2-11. Albúmina en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/100 ml)	(mg/100UI FVIII)
Haemate-P	449.00 _± 74.85	0.180 _± 0.029
Hemofil M	943.02 _± 171.20	0.377 _± 0.069
Kryobulin Tim-3	138.70 _± 17.79	0.055 _± 0.007
Criostat SD	< 11.84	< 0.005
C.FVIII Hubber	416.10 _± 70.71	0.166 _± 0.028
Media _± Desviación Estándar		

Tabla 2.2-12. Proteína total en los concentrados de factor VIII.

Marca	(mg/ml)	(mg/UI FVIII)
Haemate-P	5.47 \pm 1.44	0.213 \pm 0.048
Hemofil M	9.34 \pm 2.92	0.373 \pm 0.137
Kryobulin Tim-3	18.58 \pm 2.28	0.743 \pm 0.091
Criostat SD	3.77 \pm 1.48	0.151 \pm 0.059
C.FVIII Hubber	6.66 \pm 0.26	0.266 \pm 0.010

Media \pm Desviación Estándar

Tabla 2.2-13. Actividad específica (UI FVIII/mg proteína) de los concentrados de factor VIII.

Marca	(UI FVIII/mg Pt ¹)	(UI FVIII/mg Pa ²)
Haemate-P	4.69 \pm 0.86	25.51 \pm 4.68
Hemofil M	2.68 \pm 1.04	> 1070
Kryobulin Tim-3	1.34 \pm 0.08	1.45 \pm 0.09
Criostat SD	6.62 \pm 1.86	6.62 \pm 1.86
C.FVIII Hubber	3.76 \pm 0.14	10.00 \pm 0.34

¹ Pt, proteína total. ² Pa, proteína excepto albúmina.

Media \pm Desviación Estándar

2.2.4-DISCUSSION

Uno de los objetivos más importantes, dentro de la terapéutica de la hemofilia, es la obtención de concentrados de factor VIII lo más puros posibles. La presencia de otras proteínas plasmáticas acompañantes, no eliminadas en el proceso de preparación, no representa en principio ventajas y sí algunos inconvenientes (ver capítulo 1.2.4). No todas las proteínas acompañantes tienen igual interés desde el punto de vista de las complicaciones del tratamiento. En algún caso, su presencia estabiliza al factor VIII, sin que, por otro lado, provoque complicaciones. Incluso puede ser deseable la presencia de alguna proteína con interés terapéutico por sí misma.

El Fg es cuantitativamente el principal contaminante, pudiendo llegar a representar el 64% del total de la proteína presente. En los concentrados ultra-puros (purificados por columnas de inmu-noafinidad) (Hemofil M) está prácticamente ausente. Su presencia se justifica por ser el componente fundamental del crioprecipitado. A pesar de tener una semivida plasmática superior al factor VIII, es difícil, sin embargo, que puedan producirse fenómenos de acumulación, aún con los concentrados menos puros (47 mg/100UI FVIII) y en tratamientos prolongados. La proporción de Fg que retiene actividad fisiológica es variable (desde el 78% hasta < 13%), dependiendo, probablemente, de lo enérgico que haya sido el proceso de preparación. No obstante, en el mejor de los casos, la concentración disponible (37

mg/100UI FVIII) es muy baja para uso terapéutico.

La Fn es el segundo contaminante más importante en cuanto a concentración y por idénticas razones que el Fg. En algún caso (Criostat SD), representa el 45% de la proteína total presente. En los concentrados ultra-puros está, también, prácticamente ausente. A pesar de ser una proteína muy ligada al Fg, desde la perspectiva de la purificación del factor VIII, no existe una relación significativa en la concentración de ambas en los distintos concentrados, de lo que se deduce que los métodos de purificación de los distintos concentrados son, en cierta medida, más selectivos para una u otra proteína.

Las inmunoglobulinas se encuentran en cantidades apreciables en los concentrados de factor VIII, a excepción de los preparados ultra-puros. En algún caso (Criostat SD), su concentración representa el 13% del total de proteína presente. Las inmunoglobulinas, junto con el Fg y la Fn, representan el grueso de las proteínas acompañantes con carácter aloantigénico. En el caso de las inmunoglobulinas existe, además, el riesgo de hemólisis valorable -por la presencia de isohemaglutininas- tras la administración de dosis altas de factor VIII de forma prolongada. No existe una proporción constante entre las distintas inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM). Globalmente, se encuentran en concentraciones comparables, sin embargo, en cada concentrado predomina unas u otras: En el Haemate-P predomina la IgM (45% del total), en el Kryobulin Tim-3 predomina la IgA (40%), y en caso del C.FVIII Hubber predomina la IgG (64%).

No está claro que el efecto inmunosupresor causado por los concentrados de factor VIII sea debido directamente a alguna de estas proteínas: Se ha visto que, probablemente, es una sustancia que co-eluye con la fibronectina, aunque sin ser la fibronectina misma (121). Lo que parece claro es que la ausencia de éstas priva a los concentrados del carácter inmunosupresor, tal como se ha visto en los concentrados ultra-puros (121,149).

El análisis comparativo de los datos de concentración de proteínas obtenidos, con los descritos en la literatura referidos a especialidades comercializadas en otros países, no ofrece grandes diferencias (154-157). Los concentrados presentan unos estándares globales muy similares, entre otras cosas porque, en algunos casos, las especialidades registradas son las mismas o equivalentes (idéntica tecnología). Sin embargo, en algún caso (Haemate-P), el contenido en Fg, Fn e inmunoglobulinas es sensiblemente menor: 10.0 mg/100UI FVIII por 2.6, 24 mg/100ml por 15, y 12.0 mg/100ml por 5.6, respectivamente (157). Puede observarse, además, que concentrados comercializados hace una década eran hasta cinco veces más impuros que los concentrados convencionales empleados en la actualidad.

El FvW es una proteína compleja, de estructura multimérica, que actúa como transportador fisiológico del factor VIII formando un complejo molecular. Su deficiencia provoca la EvW. El FvW (antigénico o total) se encuentra, en los concentrados de factor VIII,

en cantidades variables, oscilando entre 4.8 UI/UI FVIII (Kryobulin Tim-3) y 0.5 UI/UI FVIII (Hemofil M). En realidad, sólo tiene interés la fracción del FvW que retiene su función (FvW:CoR): El Haemate-P mantiene un 85% (2.2 UI/UI FVIII) del FvW activo. Este fenómeno es único, ya que el resto de especialidades no superan el 45% (1.3 UI/UI FVIII). La actividad del FvW está basada en su estructura multimérica y, más concretamente, en los multímeros de alto peso molecular (158). La ausencia de éstos provoca una disminución clara en la actividad del FvW. El análisis del patrón multimérico, en electroforesis sobre gel de SDS-agarosa, demuestra que únicamente el Haemate-P retiene un patrón de multímeros de alto peso molecular comparable al plasmático. En el resto de especialidades, el proceso de purificación ha eliminado la mayor parte del FvW (Hemofil M), o durante la preparación se han empleado técnicas inadecuadas para mantener la natividad del FvW. Estos resultados son sustancialmente idénticos a los ofrecidos por la literatura (148,159). En el caso del Haemate-P, se describen 2.9 UI FvW:CoR/UI FVIII y un 83.3% de funcionalidad del FvW (156).

La presencia de FvW nativo -no alterado- en un concentrado de factor VIII (Haemate-P) reviste un especial interés, ya que permite su empleo en el tratamiento de algunas formas de la EvW, en lugar del crioprecipitado, tal como se ha descrito en algunos estudios clínicos (148,160-162). Cabe comentar, sin embargo, que el tratamiento de la EvW, es una indicación no reconocida, por el momento, para cualquier concentrado de factor VIII por parte del Ministerio de Sanidad.

La albúmina es la proteína más abundante en los concentrados ultra-puros (Hemofil M): La práctica totalidad de la proteína es albúmina (99% o más, 943 mg/100ml). En las demás especialidades su presencia es variable, oscilando entre 449 mg/100ml (0.18 mg/100UI FVIII) (Haemate-P) y valores inferiores a 12 mg/100ml (< 0.005 mg/100UI FVIII) (Criostat SD). La albúmina presente, en la mayor parte de los casos, no procede del plasma de partida sino que se añade en el proceso tecnológico como elemento estabilizante del factor VIII. Por esta razón su presencia es más acusada en los concentrados más purificados.

La carga proteica total, finalmente, oscila entre 18.58 mg/ml (0.74 mg/UI FVIII) (Kryobulin Tim-3) y 3.77 mg/ml (0.15 mg/UI FVIII) (Criostat SD). El cociente entre las UI de factor VIII y la proteína total, definido como actividad específica, es el parámetro de pureza de un concentrado de factor VIII más empleado. El valor de la actividad específica oscila, pues, entre 6.62 UI/mg Pt (Criostat SD) y 1.34 UI/mg Pt (Kryobulin Tim-3). Sin embargo, considerando el carácter mínimamente aloantigénico de la albúmina (163), la actividad específica tiene más interés comparativo cuando a la proteína total se le sustrae el valor de la albúmina. En este caso, la actividad específica varía entre valores superiores a 1070 UI/mg Pa (Hemofil M) y 1.45 UI/mg Pa (Kryobulin Tim-3). Destaca la enorme diferencia de pureza entre el Hemofil M (purificado por inmunoafinidad) y el resto de concentrados que, en el mejor de los casos, presentan una actividad

específica de 25.51 UI/mg Pa (Haemate-P).

2.3-ESTABILIDAD DEL FACTOR VIII RECONSTITUIDO

2.3.1-INTRODUCCION

La administración de los concentrados de factor VIII se realiza rutinariamente antes de las 2-4 horas de la reconstitución del liofilizado. Esta práctica se basa, generalmente, en las recomendaciones que los laboratorios farmacéuticos fabricantes establecen en sus monografías científicas sobre el producto o en los prospectos de la especialidad, sobre la correcta administración del concentrado de factor VIII. De este hecho se presupone que, en el mejor de los casos, la estabilidad del factor VIII en solución no es superior a las 2-4 horas definidas anteriormente. Sin embargo, un análisis no demasiado exhaustivo del proceso de fabricación (fraccionamiento y purificación) permite comprobar que el factor VIII permanece en solución, en las distintas fases, durante un tiempo más prolongado, sin una pérdida evidente en el rendimiento del proceso (ver capítulo 1.2.2).

Este análisis permite aventurar que la estabilidad del factor VIII en solución, una vez reconstituido, no está, cuando menos, bien establecida, y en el mejor de los casos simplemente no se ha estudiado. La recomendación de los fabricantes en el sentido de administrar el preparado lo antes posible, tras su reconstitución, no es la afirmación de una inestabilidad sino el reconocimiento prudente de su desconocimiento.

Todo ello resulta lógico se se considera que los concentrados de factor VIII son, por su presentación galénica, de preparación extemporánea que, por definición, debe ser administrada al pa-

ciente en las horas inmediatas a la reconstitución. La presentación farmacéutica en forma de liofilizado de preparación extemporánea es indicativa de la inestabilidad del principio activo medicamentoso en solución, lo que impide su comercialización en forma líquida, con una fecha de caducidad lo suficientemente amplia como para permitir una estancia mínima en los canales de distribución, almacenamiento y dispensación.

La determinación o establecimiento de la estabilidad del factor VIII una vez reconstituido tiene, sin embargo, un gran interés. Cada vez está más extendida la práctica de la administración de los concentrados de factor VIII en perfusión continua debido, fundamentalmente, al mejor control del enfermo y a un ahorro en la dosis total de factor VIII administrada. Por otro lado, la dosis terapéutica a administrar no siempre coincide con las de las presentaciones comerciales (250, 500 y 1000 UI), por lo que no es infrecuente la pérdida de unidades de factor VIII, desechadas.

En este apartado se estudia la estabilidad química, a tiempo y temperatura reales, del factor VIII en los concentrados de factor liofilizados, tras la reconstitución y disolución del mismo. En cualquier estudio de estabilidad de un medicamento -entendiendo por medicamento la conjunción fármaco/forma farmacéutica- debe tenerse en cuenta que la alteración del mismo puede manifestarse sobre sus características físicas, sobre la integridad química de su principio activo medicamentoso, y sobre su estado biológico.

El estudio del primer y tercer punto ofrece información sobre el medicamento en su conjunto y puede ser útil para una mejora hipotética de la formulación y una prolongación de su fecha de caducidad. El estudio de estos dos puntos, en nuestro caso, carece de interés, por lo que el estudio de estabilidad se centra en la evolución de la concentración del fármaco, en solución, a lo largo del tiempo, es decir en la estabilidad química del producto reconstituido. Con ello, se pretende conocer el tiempo límite en que puede ser administrado el preparado con plenas garantías de poder desarrollar una acción terapéutica segura y eficaz.

Para expresar la estabilidad química de un producto, se recurre normalmente en físico-química, a su tiempo de vida 50% (T50), definido como el tiempo en que su concentración se reduce, por descomposición, a la mitad de la inicial. Sin embargo, el T50 no es el módulo más conveniente para expresar la estabilidad química de sustancias farmacológicamente activas, tanto en su estado aislado como contenidas en formas farmacéuticas: Tratándose de medicamentos, deben tomarse en consideración degradaciones del 10%, por lo que debe expresarse la estabilidad del fármaco mediante el denominado tiempo de vida 90% (T90), equivalente al tiempo requerido para que el principio activo se reduzca, por descomposición, al 90% de su concentración inicial. Si para todos los productos, el T50 fuera proporcional siempre al T90 respectivo, existiría poca base para mantener la supremacía del segundo frente al primero; pero los estudios de cinética química indican que para un mismo valor de T50 pueden existir dos o más

T90 diferentes si las reacciones químicas de degradación, en cada caso considerado, son de orden cinético distinto. En consecuencia, la comparación de estabilidad con fines galénicos es preferible hacerla con los T90, en cada caso (164).

Por otro lado, las diferentes farmacopeas establecen las especificaciones de riqueza en principio activo y de algunas características farmacotécnicas con que un medicamento debe cumplir para ser considerado como tal. Por ello, se definió (165) el periodo de validez de un medicamento como "el periodo de tiempo comprendido entre la fecha de elaboración -reconstitución en este caso- y el momento en que ya no cumple con las especificaciones de la farmacopea".

La Farmacopea Europea admite, en su monografía referente a los concentrados de factor VIII unos límites inferior y superior en contenido de factor VIII, expresado en actividad, del 80 y del 125%, respectivamente (166); además, establece unos límites de confianza de la actividad ($P=0.05$) entre el 64 y el 156%. La amplitud de estos límites puede explicarse si se considera que se trata de un producto biológico y, por tanto, con una variabilidad intrínseca importante; además, debe tenerse en cuenta el relativamente elevado coeficiente de variación de la técnica analítica, como es común en toda técnica de valoración de una actividad biológica.

Si se sigue lo indicado por la Farmacopea, debería admitirse como

válido el tiempo en que tarde en perderse hasta un 20% de la actividad biológica del factor VIII. A pesar de ello, y con el fin de asegurar al máximo la eficacia y seguridad del medicamento, se opta por establecer el límite T90 antes mencionado; con esta medida se obvia, además, la posibilidad de una poco probable infradosificación de los productos estudiados.

Por otra parte, para medicamentos no incluidos en farmacopeas, las Administraciones Sanitarias de diferentes países (incluyendo el Estado Español) admiten, para el límite inferior de la especificación de riqueza, el -10% del valor declarado. En base a esto, Franquesa establece, en general, el plazo de validez de un medicamento como el periodo durante el cual mantiene, por lo menos, el 90% de la actividad terapéutica que cabe esperar de la fórmula declarada (164).

De esta manera, el objetivo principal de este estudio es definir cuál es el T90 (es decir el tiempo en el que la degradación del fármaco es igual al 10% de la concentración inicial, o en otras palabras, el tiempo en que el 90% del fármaco permanece inalterado) del factor VIII en los concentrados de factor empleados en la práctica terapéutica. Se estudian, además, la C12 y la C24 (concentración remanente a las 12 y 24 horas, respectivamente), y el T50 (tiempo en que la degradación alcanza el 50% de la concentración inicial). Este último parámetro tiene más relación con la cinética de degradación, un factor que también se ha considerado en este estudio.

2.3.2-METODOS

2.3.2.1-Concentrados de factor VIII

El estudio se ha llevado a cabo en las cinco especialidades comerciales de concentrados de factor VIII registradas y/o utilizadas en España. Los concentrados de factor VIII estudiados han sido Kryobulin TIM-3 (Immuno), Haemate-P (I.Behring), Conc.FVIII Hubber T (Hubber), Hemofil M (Baxter) y Criostat SD (Grifols). El número de lotes analizados para cada marca de concentrado de factor VIII ha sido de cuatro.

Los concentrados de factor se han reconstituido, siguiendo las instrucciones del fabricante, en el volumen de disolvente (agua para inyección, API) acompañante. La concentración final ha oscilado entre 25 y 100 UI de factor VIII/ml, según la especialidad. Una vez disueltos, los concentrados de factor VIII se han mantenido a temperatura ambiente (21-23 °C) y en condiciones de luz ambiental.

Los tiempos de muestreo han sido los siguientes: 0 (a partir de la completa disolución del concentrado), 24, 48, 72, 144 y 264 horas. Para cada tiempo de muestreo, se ha extraído 1 ml de solución con una jeringa de insulina. Las muestras se han depositado en tubos Eppendorf de plástico (polipropileno) y, posteriormente, se han congelado a -40 °C, manteniéndolas en estas condiciones hasta su posterior procesado, con el fin de mantener

invariables sus características debido al largo y complejo proceso analítico del factor VIII.

2.3.2.2-Análisis del factor VIII

La valoración del factor VIII se realizó, fundamentalmente, mediante la técnica de un tiempo estándar (167). La actividad del factor VIII se calcula, según este método, a partir del grado de corrección obtenido al añadir la muestra a un plasma deficiente en factor VIII; este valor se compara con el grado de corrección obtenido con un estándar, que proporciona una corrección del 100%. El grado de corrección se determina por la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), que consiste en la recalcificación del plasma en presencia de un reactivo sustituto plaquetar y un activador plasmático.

Existen tres métodos universales para la valoración del factor VIII, mediante las técnicas de un tiempo, dos tiempos y sustrato cromogénico. En este estudio se ha escogido la técnica de un tiempo dada su relativamente sencilla ejecución y la buena correlación existente con el método del sustrato cromogénico. El método en dos tiempos es menos reproducible (168).

Cada muestra de concentrado de factor VIII se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Reactivo tromboplastina parcial activada (Teknika), plasma deficiente en factor VIII (Immuno), cloruro cálcico 0.025 M (I.Behring) y plasma referencia 100%

(Dade-Grifols) calibrado frente al plasma referencia humano internacional (IHRP), así como un estándar nacional de concentrado de factor VIII (CNF/89). La lectura de los resultados se realizó mediante un coagulómetro BE Coagulator (Benk Electronic).

La metodología seguida fue la siguiente: El estándar de factor VIII (plasmático o de concentrado) se reconstituyó y diluyó hasta una concentración de 1 UI/ml. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40 que corresponden a las concentraciones 1, 0.5, 0.25 y 0.125 UI/ml, en solución reguladora Michaelis. En cada pocillo del coagulómetro se colocaron 0.1 ml de los duplicados de cada dilución, y se tuvieron 60 s a 37 °C, posteriormente se añadieron 0.1 ml de plasma deficiente en factor VIII, incubando también 60 s, y finalmente 0.1 ml de cefaloplastina. A los 120 s se añadieron 0.1 ml de cloruro cálcico 0.02 M. En este momento, el cronómetro se dispara automáticamente, parándose en el momento en que se forma el coágulo. Los tiempos de cada muestra duplicada deberían coincidir en un $\pm 4\%$ para ser considerados válidos. Para las muestra problema, la metódica fué idéntica con la salvedad de emplear únicamente tres diluciones (1/5, 1/10 y 1/40). La predilución hasta 1 UI/ml se realizó con API y solución reguladora Michaelis en los concentrados de pureza intermedia y con plasma deficiente en factor VIII y tampón Michaelis para los de alta pureza.

Todo el material empleado para el procesado y/o dilución de las

muestras fué de plástico o vidrio siliconado, con objeto de evitar la activación de la vía extrínseca de la cascada de la coagulación, lo que falsearía los resultados.

Los cálculos se llevaron a cabo mediante un programa informático basado en el método de la línea paralela. El coeficiente de variación de la técnica, para idéntica muestra en mediciones repetidas, fue del 13%.

2.3.2.3-Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado empleando técnicas estándar (test t Student-Fisher, análisis de correlación). El análisis de regresión y el análisis de la varianza se ha efectuado mediante el programa informático estadístico STATGRAF 2.1, con objeto de relacionar los parámetros concentración y tiempo, por un lado, y concentración, tiempo y marca comercial, por otro.

2.3.3-RESULTADOS

La Tablas 2.3-1 a 2.3-5 muestran la evolución de la concentración de factor VIII para los distintos puntos de muestreo. Los resultados se expresan en porcentaje, considerando que a T=0 la concentración es del 100%. Por cada tiempo muestreado, se indican los porcentajes medios de los lotes analizados, junto a la desviación estándar menos uno correspondiente, y los valores máximo y mínimo, todo ello expresado en tanto por ciento.

El porcentaje de factor VIII inalterado al final del estudio (264 h) varía claramente con la marca, y oscila entre el 13.59% (Criostat SD) y el 61.13% (Hemofil M). Ello indica claramente que se está ante un fármaco muy poco estable en disolución, tal como se encuentra comercializado actualmente, ya que a las 264 h se produce una disminución considerable en la concentración de principio activo, lo que hace al preparado no apto para su administración al cabo de 10 días. Se comprueba, por tanto, que las formulaciones comercializadas en la actualidad deben necesariamente estar en una forma farmacéutica de preparación extemporánea.

Por otro lado, se obtiene una variabilidad acusada también para cada especialidad: En el caso del Criostat SD -por seguir con las dos especialidades citadas anteriormente- se obtiene un valor experimental máximo del 27.9% y un mínimo del 1.47%, y en el caso del Hemofil M, un valor experimental máximo del 86.9% y un mínimo del 34.6%. Se obtienen unas dispersiones elevadas en todos los casos (4.87 la menor y 28.38 la mayor), debidas probablemente al carácter biológico del producto y a la propia dispersión aportada por la técnica analítica. Este hecho ya se contempla en la Farmacopea Europea, al admitir unos límites de confianza elevados para la actividad del factor VIII.

Con el fin de establecer con rigor estadístico el T90 para los productos estudiados, se calculan los parámetros correspondientes a la regresión lineal (cinética de orden cero) y logarítmica

(cinética de orden uno) para cada especialidad, los cuales se indican en las Tablas 2.3-6 a 2.3-10. De esta forma se pretende establecer la cinética que mejor ajusta a los datos experimentales obtenidos y, a partir de ella, establecer el T90 global con mayor fiabilidad. Para ello, se calculan los coeficientes de determinación (r^2) que indicarán qué parte de la variación total se explica mediante la regresión; asimismo, también se indican la suma de los cuadrados residuales (SSR).

Tabla 2.3-1. Estabilidad del Haemate-P tras la reconstitución. Los resultados se expresan en porcentaje de factor VIII remanente respecto a la concentración inicial.

Tiempo (h)	Media	D. Estándar	Máximo	Mínimo
0	100	-	-	-
24	86.30	6.49	95.60	80.50
48	81.28	6.08	87.80	75.20
72	75.88	7.41	82.70	66.70
144	68.43	7.25	77.80	60.10
264	45.00	22.38	78.10	30.90

Tabla 2.3-2. Estabilidad del Criostat SD tras la reconstitución. Los resultados se expresan en porcentaje de factor VIII remanente respecto a la concentración inicial.

Tiempo (h)	Media	D. Estándar	Máximo	Mínimo
0	100	-	-	-
24	84.73	12.67	98.40	70.20
48	71.00	15.02	90.50	53.90
72	53.80	19.11	81.00	36.30
144	34.25	18.39	53.00	16.30
264	13.59	11.57	27.90	1.47

Tabla 2.3-3. Estabilidad del Kryobulin Tim-3 tras la reconstitución. Los resultados se expresan en porcentaje de factor VIII remanente respecto a la concentración inicial.

Tiempo (h)	Media	D. Estándar	Máximo	Mínimo
0	100	-	-	-
24	101.47	9.24	113.20	93.50
48	93.60	5.14	99.70	89.20
72	86.53	9.51	98.50	75.50
144	73.03	16.06	89.50	53.90
264	59.75	28.38	89.00	31.60

Tabla 2.3-4. Estabilidad del Conc. FVIII Hubber tras la reconstitución. Los resultados se expresan en porcentaje de factor VIII remanente respecto a la concentración inicial.

Tiempo (h)	Media	D. Estándar	Máximo	Mínimo
0	100	-	-	-
24	99.80	6.33	109.00	94.70
48	91.88	10.78	103.80	77.60
72	78.63	4.87	85.60	74.90
144	59.13	6.17	67.50	52.90
264	33.83	7.33	44.00	27.40

Tabla 2.3-5. Estabilidad del Hemofil M tras la reconstitución. Los resultados se expresan en porcentaje de factor VIII remanente respecto a la concentración inicial.

Tiempo (h)	Media	D. Estándar	Máximo	Mínimo
0	100	-	-	-
24	93.95	5.01	100.90	89.50
48	86.63	11.32	98.20	71.20
72	84.68	18.23	106.40	62.30
144	73.55	17.07	90.70	52.80
264	61.13	23.96	86.90	34.60

Los valores de R cuadrado para la regresión lineal (degradación de orden 0) oscilan entre 0.952 y 0.696. Los valores equivalentes para la regresión logarítmica (degradación de orden 1) oscilan, a su vez, entre 0.948 y 0.706 (Tabla 2.3-6). Por tanto, los resultados experimentales parecen ajustarse con semejante precisión a las dos regresiones calculadas, si bien este hecho debe confirmarse mediante el correspondiente análisis estadístico. Para ello, se efectúa el cociente entre los valores de R cuadrado en la misma especialidad, resultando ser siempre, para los dos modelos de regresión, un valor cercano a 1, por lo que no hay significación estadística entre ambos (test F de Snedecor-Fisher). Al explicar ambos modelos las cinéticas obtenidas con igual significación, se opta por trabajar con el modelo de degradación más simple (orden 0, regresión lineal) (Tabla 2.3-7). Los elevados valores de R cuadrado indican una buena relación entre las dos variables concentración-tiempo, con una significación estadística alta ($P < 0.0001$).

Los parámetros, correspondientes a las rectas de regresión lineales de cada concentrado, oscilan entre 101.68 y 88.57, según la especialidad, para la intercepción con el eje Y, y entre -0.266 y -0.142 para la pendiente (Tabla 2.3-8). La concentración de factor VIII disminuye, por lo tanto con el tiempo ($P < 0.0001$).

Los valores de T90 y de T50, calculados sobre las rectas de regresión correspondientes, agrupados por especialidades, oscilan entre 27.93 y 84.97 horas, y entre 424 y 138 horas, respectiv-

amente, con un valor medio global, para el conjunto del factor VIII de 50.06 y de 279 horas (Tabla 2.3-9). En el peor de los casos, la media más baja se sitúa en 27.93 horas, con unos intervalos fiduciales de ± 3.787 (para una $P=0.05$), muy inferior a los admitidos como intervalos extremos por la Farmacopea Europea. Ello quiere decir que la media se encontrará, al menos en un 95% de los casos, entre 24.35 h y 31.51 h; el límite inferior se sitúa precisamente en el límite de las 24 h, lo que representa que los preparados, una vez reconstituidos, presentan la suficiente estabilidad como para poder ser administrados al cabo de 24 h, con la garantía de que llevarán a cabo la actividad terapéutica que se espera de ellos. En la especialidad (Kryobulin Tim-3), que presenta una desviación estándar más acusada, se obtienen unos intervalos fiduciales ($P=0.05$) de ± 56.15 h, lo que sitúa el límite inferior en 28.80 h, por encima de las 24 h establecidas como necesarias, idealmente, para el uso clínico que se propone.

Los valores de C12 y C24, agrupados también por especialidades, oscilan entre el 98.30 y el 96.22%, y entre el 96.60 y el 92.43%, respectivamente, con un valor global, para el conjunto del factor VIII del 97.42 y del 94.85% (Tabla 2.3-10). Para la obtención de estos cuatro parámetros se ha forzado el paso de la curva por el punto $T=0$, $C=100\%$, por lo que los valores obtenidos son ligeramente superiores a los obtenidos experimentalmente, ya que el corte de la recta de regresión con el eje Y tiene, en la mayoría de los casos, un valor inferior al 100%. Estos datos

confirman lo expresado anteriormente en el análisis de la T90.

El análisis de la varianza indica que la concentración de factor VIII depende del tiempo, de acuerdo con los resultados obtenidos en la regresión lineal ($P < 1.0 \times 10^{-13}$). Asimismo, la marca de factor VIII es también una variable significativa ($P < 1.8 \times 10^{-11}$), por lo tanto, la estabilidad del factor VIII reconstituido depende la especialidad comercial analizada. Por otro lado, considerando la amplitud del intervalo de confianza, para cada parámetro considerado, cabe destacar la gran variabilidad que existe entre lotes de una misma especialidad.

Tabla 2.3-6. Relación concentración/tiempo para cada especialidad estudiada. Regresión lineal y logarítmica (Degradación de orden cero y orden uno, respectivamente).

Marca	R cuadrado (0/1)	S.S.R. (0/1)
Haemate-P	0.833 _± 0.217/0.833 _± 0.207	158.3 _± 100.3/167.4 _± 117.2
Criostat SD	0.850 _± 0.132/0.848 _± 0.085	780.7 _± 636.3/795.8 _± 466.1
Hemofil M	0.849 _± 0.134/0.867 _± 0.147	127.6 _± 152.6/079.1 _± 075.3
Kryobulin	0.851 _± 0.123/0.857 _± 0.121	120.2 _± 094.7/114.2 _± 011.5
C.FVIII Hub.	0.952 _± 0.025/0.948 _± 0.029	176.7 _± 117.9/185.5 _± 115.2
Total	0.696 _± 0.177/0.706 _± 0.183	3424.8 _± 1696.4/3164.3 _± 1346.0

Media _± Desviación Estándar

Tabla 2.3-7. Regresión lineal y logarítmica (Degradación de orden cero y orden uno, respectivamente). Cociente (orden 0/ orden 1) de R-cuadrado y S.S.R., y significación estadística.

Marca	R-cuadrado	S.S.R.	Sig.Est. (P)
Haemate-P	1.000	0.946	n.s.
Criostat SD	1.002	0.981	n.s.
Hemofil M	0.979	1.613	n.s.
Kryobulin	0.993	1.053	n.s.
C.FVIII Hub.	1.004	0.953	n.s.
Total	0.986	1.082	n.s.

Tabla 2.3-8. Estimación de la recta de regresión lineal para cada concentrado de factor.

Marca	Intercepción	Pendiente
Haemate-P	93.24 \pm 3.06	-0.186 \pm 0.024
Criostat SD	88.57 \pm 4.61	-0.315 \pm 0.036
Hemofil M	96.35 \pm 4.05	-0.142 \pm 0.031
Kryobulin	100.91 \pm 3.95	-0.165 \pm 0.031
C.FVIII Hub.	101.68 \pm 2.07	-0.266 \pm 0.016

Valor \pm Error estándar

Tabla 2.3-9. T90 y T50 para cada concentrado de factor VIII y total. Los valores se expresan como media y desviación estándar.

Marca	T90	T50
Haemate-P	52.68 (19.75)	263.48 (98.73)
Criostat SD	27.93 (4.29)	138.05 (23.81)
Hemofil M	77.63 (39.41)	387.97 (196.80)
Kryobulin	84.97 (67.18)	424.74 (335.79)
C.FVIII Hub	37.10 (4.35)	185.45 (21.72)
Total	56.06 (39.28)	279 (196.64)

Tabla 2.3-10. C12 y C24 para cada concentrado de factor VIII y total. Los valores se expresan como media y desviación estándar.

Marca	C12	C24
Haemate-P	97.72 (1.01)	95.43 (2.01)
Criostat SD	95.74 (0.85)	91.47 (1.73)
Hemofil M	98.20 (1.14)	96.40 (2.28)
Kryobulin	98.05 (1.35)	96.11 (2.69)
C.FVIII Hub.	98.86 (0.35)	93.72 (0.69)
Total	97.30 (1.30)	94.62 (2.58)

2.3.4-DISCUSSION

El establecimiento de la estabilidad del factor VIII liofilizado, tras la reconstitución, tiene un gran interés en la práctica terapéutica rutinaria de la hemofilia A. Su conocimiento permitiría un mejor manejo -y más rentable- de los concentrados de factor, y si su valor fuera lo suficientemente elevado facilitaría, además, su administración en perfusión continua, con las ventajas que esta práctica implica.

De hecho, recientemente han aparecido estudios -si bien provisionales- en los que se ha valorado la estabilidad de determinados concentrados de factor VIII (169-170). Otros autores, que describen la administración de factor VIII en perfusión continua (ver capítulo 2.4.3) afirman que el factor VIII liofilizado, una vez reconstituido, permanece estable durante el tiempo que dura la perfusión, aunque no citan explícitamente más datos. Existe, incluso, una especialidad comercializada de factor VIII en jeringas precargadas, en la que el factor VIII, en solución, es estable durante un tiempo prolongado (171). En nuestro país, únicamente se ha publicado un estudio en relación a la estabilidad del factor VIII en los concentrados comerciales tras su reconstitución (172).

En la práctica rutinaria de los medicamentos reconstituidos o en mezclas de los mismos, un fármaco se considera estable mientras retenga el 90% de su potencia inicial, y el tiempo de estabilidad (T90) es aquel en que alcanza dicha potencia (173). El T90 del

factor VIII globalmente es de 56.06 horas, con un valor máximo de 84.97 h para el Kryobulin Tim-3 y un valor mínimo de 27.93 h para el Criostat SD. La estabilidad varía, por lo tanto, sustancialmente según el concentrado de factor VIII analizado: Al final del estudio (264 h) la concentración remanente oscila según la especialidad entre el 61.13 y el 13.59%.

Destaca también la variación de la estabilidad para cada lote, en una especialidad dada. Este hecho puede apreciarse en el valor elevado que tiene la desviación estándar para cada parámetro considerado, en cada especialidad, o en la diferencia entre valores máximos y mínimos: A las 264 h, la concentración remanente de Criostat SD oscila, según el lote entre el 27.9 y el 1.47%, en el caso del Kryobulin Tim-3 oscila entre el 89.00 y el 31.60%, y en el caso del Hemofil M entre el 86.9 y el 34.6%.

El factor VIII liofilizado se descompone progresivamente una vez reconstituido y disuelto. Este hecho puede confirmarse a partir del análisis de regresión, en el que se observa que el tiempo explica entre el 69.6 y el 95.2% de la variación de la concentración. La cinética de degradación (orden 0 u orden 1) que sigue este proceso no está clara, desde el momento en que la regresión lineal y la regresión logarítmica ofrecen resultados, en cuanto a exactitud del ajuste, muy similares: El cociente de la suma de cuadrados residuales por ambos métodos es en todos los casos cercano a uno, sin que haya diferencias estadísticamente significativas entre ambos (test F de Snedecor-Fisher n.s.). En

estas condiciones, el modelo de degradación escogido es el más sencillo, orden 0. Todas las estimaciones de concentración expuestas en los resultados se refieren, por lo tanto, a una regresión lineal.

La estabilidad del factor VIII varía, según el preparado comercial, debido probablemente a la composición del excipiente o al contenido en distintas sustancias que son estabilizantes "in vivo" o "in vitro" del factor VIII. La presencia de factor von Willebrand (FvW), la proteína transportadora "in vivo" del factor VIII (174), es fundamental. Asimismo, la presencia de albúmina, heparina o iones calcio, puede ser decisiva también (175). La variabilidad entre lotes se explicaría también por esta misma razón, ya que la homogeneidad entre lotes, en un hemoderivado, es difícil de conseguir.

La existencia de sustancias que estabilizan el factor VIII permite obtener preparados, comercializados en forma de solución lista para administrar (jeringas precargadas), en los que el factor VIII es estable durante, al menos, seis meses (171). Este valor contrasta sensiblemente con los resultados obtenidos en las especialidades analizadas en este estudio.

La vida media del factor VIII se sitúa, en las especialidades registradas en nuestro país, en 279 h, con un valor máximo de 425 y un valor mínimo de 138 horas. La C12 es del $97.30 \pm 1.30\%$, con un valor máximo del 98.86% y un valor mínimo del 95.74%. La C24 es del $94.62 \pm 2.58\%$, con un valor máximo del 96.40% y un valor mínimo

del 91.47%. En todos los casos, la concentración obtenida a las 12 h es superior al 90% designado como valor de referencia en cuanto a la estabilidad, con significación estadística (test t de Student-Fisher, $P < 0.01$). A las 24 h la concentración obtenida es superior significativamente ($P < 0.05$) al 90%, en todos los casos excepto para el Criostat SD, cuyo intervalo de confianza (93.03-89.91, alfa 0.05) roza el límite aceptado.

Por lo tanto, todas las soluciones reconstituidas de los concentrados de factor VIII, conservadas a temperatura ambiente (21-23 °C), pueden ser empleadas terapéuticamente durante las primeras 24 horas, lo cual representa una ventaja sustancial en su utilización y permite su empleo en sistemas de perfusión continua. Sin embargo, sería de desear que una adecuación de los excipientes permitiera intervalos más amplios de utilización.

El único inconveniente que podría objetarse al empleo de las soluciones reconstituidas de los concentrados de factor VIII es el de la seguridad microbiológica, ya que dado su carácter de solución proteica, constituyen un "medio de cultivo" más adecuado para el desarrollo de microorganismos que una solución puramente química. En un estudio reciente, no obstante, se demuestra que con una manipulación aséptica convencional, las soluciones reconstituidas de factor VIII no permiten el desarrollo de microorganismos, al menos durante las primeras 24 horas. De 30 muestras ensayadas, en ninguna de ellas se pudo detectar ningún microorganismo (riesgo de contaminación 0-10%, alfa 0.05) tras

una manipulación estándar. El resultado fué idéntico al obtenido con una solución de infusión concencional (solución salina fisiológica), manipulada de igual forma (176).

2.4-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII

Aunque los datos publicados en los últimos años sobre la farmacocinética del factor VIII han arrojado luz sobre aspectos fundamentales de la misma, un análisis cuidadoso de la literatura indica que se requiere, todavía, mucha más información (177). No está claro aún si la gran variabilidad inter-estudios que se detecta en la "respuesta farmacocinética" refleja diferencias inter-pacientes o inter-productos verdaderas o es consecuencia de los distintos métodos de análisis farmacocinético empleados (178).

Para el análisis de curvas en dosis única se ha descrito una amplia gama de métodos que incluyen los modelos mono y bicompartimental, el análisis amodelístico e, inicialmente, técnicas gráficas en papel semilogarítmico. En regímenes de dosis múltiple, es todavía muy escasa la información de que se dispone, cuando, por otro lado, desde un punto de vista clínico, es la situación que con más frecuencia se repite (177).

Recientemente, se ha propuesto, por parte del Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia (ICTH), un modelo estandarizado para el análisis farmacocinético del factor VIII basado en el denominado método modelo-independiente. Este método de análisis farmacocinético está basado en el cálculo de tres parámetros farmacocinéticos: El aclaramiento plasmático (Cl), el volumen de distribución (V_d área) y el tiempo medio de residencia (MRT) o vida media evaluada como $MRT/1.443$. Estos parámetros poseen la ventaja de su alta reproducibilidad ya que están menos afectados por pequeñas variaciones individuales en los puntos de una curva,

causados por errores en la manipulación de las muestras, errores de laboratorio en el análisis de la actividad del factor VIII, etc. El análisis modelo-independiente presenta, básicamente, dos ventajas: Una evaluación farmacocinética correcta del factor VIII independientemente de si la curva plasmática de descenso de la concentración es bifásica o monofásica (ya que ambas circunstancias pueden darse en el factor VIII) y unos resultados, expresados en parámetros farmacocinéticos modelo-independientes, que permiten la comparación homogénea de cualquier concentrado de factor VIII con amplias series de datos históricos analizados siguiendo la misma metodología (179,180).

Por otro lado, el modelo monocompartimental lineal estándar es el medio más generalmente aplicable para evaluar procesos de dosis múltiple, ya que se ha demostrado que describe bien el fenómeno de acumulación de factor VIII que se produce (178).

Independientemente de las consideraciones metodológicas que pudieran plantearse, o del volumen de información sobre los valores de los parámetros farmacocinéticos que se hayan descrito, es importante tener en cuenta que, hoy por hoy, no se dispone prácticamente de información referente a la "respuesta farmacocinética" tanto en los pacientes hemofílicos españoles como de los concentrados de factor VIII registrados o utilizados en España. Aportar urgentemente datos que puedan arrojar luz en este campo, identificando y cuantificando las diferencias, es fundamental, máxime cuando se trata de un fármaco cuya moni-

torización terapéutica, en el ejercicio clínico rutinario, es prácticamente obligada.

La farmacocinética del factor VIII se ha evaluado, en este estudio, desde tres puntos de vista: Análisis de curvas plasmáticas del factor VIII tras administración de una dosis única, análisis de regímenes de administración de dosis múltiple y análisis de regímenes de administración en perfusión contiuua.

El objetivo último es establecer los parámetros farmacocinéticos en la población hemofílica española, así como las características de dichos parámetros farmacocinéticos en los concentrados de factor VIII registrados o utilizados en el Estado Español.

2.4.1-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII EN DOSIS UNICA

2.4.1.1-Introducción

La farmacocinética en dosis única del factor VIII se ha evaluado mediante el análisis con modelos matemáticos de 12 curvas concentración-tiempo en 12 pacientes con hemofilia A severa (factor VIII plasmático basal < 0.01 UI/ml). El estudio se ha realizado con las marcas de concentrados de factor VIII registradas o empleadas en España, en un número proporcional para cada marca.

2.4.1.2-Métodos

2.4.1.2.1-Pacientes

Los sujetos incluidos en el estudio han sido 12 pacientes afectos de hemofilia A severa. Los datos demográficos de estos pacientes son: edad 25.3 años (intervalo 7-54), peso 54.8 kg (intervalo 20-89) y concentración basal de factor VIII < 0.01 UI/ml. Todos los sujetos recibieron la dosis de factor VIII para el tratamiento de episodios hemorrágicos menores o profilaxis, y en ningún caso recibieron dosis alguna de factor, al menos, una semana antes del estudio.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: Presencia de inhibidores circulantes del factor VIII (pacientes con inhibidor), diagnóstico de coagulopatía adicional a la hemofilia A o enfermedad crónica, excepto la hepatitis crónica, y uso de

antiagregantes plaquetarios (por ejemplo, ácido acetil salicílico) hasta diez días antes del estudio.

2.4.1.2.2-Administración del factor VIII

Los concentrados de factor VIII empleados han sido Kryobulin TIM-3 (Immuno) (n=2), Haemate-P (I.Behring) (n=3), Conc.FVIII Hubber T (Hubber) (n=1), Criostat HT (Grifols) (n=2), Hemofil M (Baxter) (n=2) y Criostat SD (Grifols) (n=2).

La cantidad de factor VIII administrada se ha calculado para obtener un pico máximo de concentración superior a 0.4 UI/ml, asumiendo un volumen plasmático de 0.45 ml/kg. La dosis media administrada ha sido de 34.7 UI/kg (intervalo 19.3-50.0).

La administración del concentrado se realizó mediante infusión endovenosa corta, a una velocidad constante de 2.5 UI/kg/minuto.

2.4.1.2.3-Análisis del factor VIII

Las muestras de sangre se extrajeron por venopunción limpia contralateral y se transfirieron a tubos de vidrio siliconado conteniendo una solución de citrato sódico 3.8% P/V (relación 9/1). Las muestras se centrifugaron y se congelaron a -30 °C hasta su procesado. Los tiempos teóricos de muestreo, a partir del final de la infusión, fueron: 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 y 28 horas. Asimismo, se congelaron muestras de las soluciones recons-

tituidas de los concentrados de factor VIII, para la fijación exacta de la dosis de factor administrada.

La valoración del factor VIII se realizó mediante la técnica de un tiempo estándar (168). La actividad del factor VIII se calcula, según este método, a partir del grado de corrección obtenido al añadir la muestra a un plasma deficiente en factor VIII; este valor se compara con el grado de corrección obtenido con un estándar, que proporciona una corrección del 100%. El grado de corrección se determina por la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), que consiste en la recalcificación del plasma en presencia de un reactivo sustituto plaquetar y un activador plasmático. Cada muestra se valoró a tres concentraciones distintas y por duplicado. Los reactivos empleados fueron los siguientes: Reactivo tromboplastina parcial activada (Teknika), plasma deficiente en factor VIII (Immuno), cloruro cálcico 0.025 M (I.Behring) y plasma referencia 100% (Dade-Grifols) calibrado frente al plasma referencia humano internacional (IHRP). Los cálculos se llevaron a cabo mediante un programa informático basado en el método de la línea paralela (182). El coeficiente de variación de la técnica, para idéntica muestra en mediciones repetidas, fue del 13%.

2.4.1.2.4-Análisis farmacocinético

Las curvas en dosis única se han analizado de acuerdo tanto al método compartimental como al método no compartimental o amodelístico. Asimismo se ha calculado, para cada curva, la recupe-

ración "in vivo" del factor VIII.

2.4.1.2.4.1-Modelo compartimental

El análisis compartimental se ha llevado a cabo asumiendo un modelo monocompartmental abierto (181,183) y un modelo bicompartimental (178,183) en dosis única a partir de una administración endovenosa "en bolus". El ajuste de los datos se ha realizado mediante un método iterativo de regresión no lineal por mínimos cuadrados con compensación estadística del peso de los datos equivalente al recíproco de la concentración ($1/C$) (184). El comportamiento del factor VIII se ha asumido como lineal, ya que los modelos farmacocinéticos lineales siempre han sido válidos para describir la cinética del factor VIII cuando no existe sangrado importante o cirugía -en cuyo caso el aclaramiento parece aumentar con la dosis (185,186)-, por lo que se ha aplicado el principio de superposición (181,183).

Los parámetros valorados para el modelo monocompartmental son la constante de eliminación (K) y el volumen de distribución (V). La vida media se obtiene a partir de $0.693/k$. En el caso del modelo bicompartimental, los parámetros valorados son las macroconstantes K_{α} y K_{β} , las microconstantes K_{10} , K_{21} y K_{12} , y los volúmenes de distribución de los compartimentos central (V_c) y periférico (V_p). Las correspondientes vidas medias (K_{α} , K_{β} , K_{el} .) se obtienen por la ecuación antes citada. El volumen de distribución en el estado estacionario (V_{ss}) es la suma de V_c y

Vp.

Cada curva se ha ajustado a ambos modelos y la elección del modelo más adecuado se ha realizado mediante el test F de Snedecor-Fisher (cociente entre la suma de cuadrados residuales (SSR) entre las curvas mono y bifásica) con un nivel de significación del 5% ($P < 0.05$) (187).

La desviación de las concentraciones de factor VIII sobre la curva ideal predicha por el modelo se ha evaluado, para cada curva, mediante el error cuadrado medio de la raíz (RMSE) o error relacionado a la curva (CRE) que se expresa matemáticamente como la raíz cuadrada del SSR/n , donde SSR es la suma de cuadrados residual y n el número de pares concentración/tiempo experimentales de la curva. El coeficiente de variación global -que incluye la variabilidad intraindividual y la del modelo- de la población (CV_{pob}) se ha calculado de acuerdo con el método estándar de dos fases (STS) (188,189).

2.4.1.2.4.2-Análisis modelo independiente

El análisis modelo independiente es especialmente útil en casos farmacocinéticos problemáticos, como pueden ser la cinética de proteínas, en los cuales el análisis de la sustancia no es lo suficientemente preciso y las curvas concentración-tiempo no siempre se ajustan a soluciones modelo dependientes (190).

Los parámetros farmacocinéticos que se valoran en el análisis

modelo independiente son los siguientes: El aclaramiento total (Cl), el volumen de distribución ($Vd_{\text{área}}$) y el tiempo medio de residencia (MRT). La estimación del Cl, $Vd_{\text{área}}$ y MRT se basa en el cálculo del área bajo la curva (AUC) y del área bajo el momento estadístico de la curva (AUCM). El AUC es el área bajo la curva concentración-tiempo, mientras que el AUCM es el área bajo la curva de una representación del producto concentración-tiempo frente al tiempo. Ambos parámetros se han calculado desde cero hasta infinito, siguiendo un método ya descrito (183,185). El MRT, cociente entre AUCM y AUC, es el tiempo para la eliminación del 63.2% de las moléculas, en contraste con la vida media que corresponde al 50%. Por lo tanto, en un modelo farmacocinético monocompartimental ideal, con absorción instantánea y pares de valores concentración-tiempo sin error, el MRT es, por definición, superior a la vida media. Para estudios comparativos con valores de vida media ya descritos, la vida media se calcula a partir del MRT_{iv} (MRT ajustado al caso endovenoso: $MRT_{iv}-T/2$, siendo T el tiempo de la infusión continua a velocidad constante), por la ecuación $t_{1/2}=MRT_{iv}/1.443$ (184,185,190).

2.4.1.2.4.3-Recuperación "in vivo"

La recuperación "in vivo" (RIV) del factor VIII es un parámetro de distribución que se describe en la mayor parte de la literatura referente a la farmacocinética del factor VIII (177). La RIV no es un parámetro riguroso, desde un punto de vista farmacocinético, ya que conceptualmente es poco claro y matemáti-

camente está sujeto a numerosos errores, como son la determinación de la concentración máxima de factor y del volumen plasmático de cada paciente. Sin embargo, la RIV se explicita, en este estudio, dado que tradicionalmente -tal como se ha indicado- se describe.

El volumen plasmático (VP) de cada paciente se calcula multiplicando el peso (kg) por 45 (ml). La RIV se ha calculado como el cociente entre la actividad del factor VIII obtenida experimentalmente (pico obtenido) tras el final de la infusión y la actividad del factor VIII esperada teórica (pico esperado). El pico obtenido es el valor de concentración máximo de las muestras extraídas hasta una hora tras el final de la infusión, y el pico esperado es el valor teórico obtenido dividiendo la dosis administrada por el VP (193).

2.4.1.2.5-Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado empleando técnicas estándar (test t Student-Fisher, análisis de correlación). El análisis de regresión se ha efectuado mediante el programa informático estadístico STATGRAF 2.1, con objeto de relacionar los parámetros de eliminación y distribución obtenidos a partir de los distintos modelos de análisis farmacocinético.

2.4.1.3-Resultados

La Tabla 2.4.1-1 y -2 muestran los resultados del estudio farma-

cocinético, compartimental y amodelístico respectivamente, para el total de los pacientes estudiados.

Desde el punto de vista del análisis compartimental, dos curvas son monofásicas, seis curvas son bifásicas con significación estadística ($P < 0.05$) (test F de comparación de varianzas) y cuatro son bifásicas sin significación estadística (Tabla 2.4.1-3). Las Figuras 2.4.1-1 y 2.4.1-2 muestran ejemplos de curvas mono y bifásicas.

La Tabla 2.4.1-4 muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos compartimentales pero, a diferencia de la Tabla 2.4.1-1, incluyendo para cada modelo, mono o bicompartimental, únicamente las curvas que mejor ajustan, de acuerdo a la Tabla 2.4.1-3.

El error relacionado a la curva (CRE) -expresado en porcentaje- fue, para las curvas monofásicas del 25.46 ± 8.49 , y para las curvas bifásicas del 12.38 ± 1.94 . El coeficiente de variación global (CV_{pop}) fue del 30.55 ± 10.19 y del 14.86 ± 2.32 , respectivamente, de acuerdo con el CRE, que por definición es menor.

Las Tablas 2.4.1-5 y -6 muestran la relación existente entre los distintos parámetros de eliminación, en un caso, y los de eliminación, en el otro.

La recuperación "in vivo" fué del $111.9\% \pm 31.6$, con un valor

máximo del 174.9% y un mínimo del 58.0%.

Tabla 2.4.1-1 Parámetros farmacocinéticos del factor VIII considerando un análisis compartimental, para el total de pacientes estudiados.

Parámetro	Media	D.E.	Máximo	Mínimo
Monocompartimental				
T _{1/2} (h)	10.41	2.71	15.58	6.64
V _d (ml/kg)	47.11	14.07	78.95	26.86
Bicompartimental				
T _{1/2} alfa (h)	2.49	1.69	6.19	0.84
T _{1/2} beta (h)	16.30	4.86	24.10	8.56
V _c (ml/kg)	41.34	14.41	75.28	21.99
V _p (ml/kg)	17.81	10.53	38.62	1.15
V _{ss} (ml/kg)	59.16	13.97	90.22	34.20
K ₁₀ (h ⁻¹)	0.073	0.019	0.113	0.041
K ₂₁ (h ⁻¹)	0.243	0.141	0.572	0.103
K ₁₂ (h ⁻¹)	0.128	0.093	0.247	0.003
D.E., desviación estándar				

Tabla 2.4.1-2 Parámetros farmacocinéticos del factor VIII considerando un análisis amodelístico, para el total de pacientes estudiados.

Parámetro	Media	D.E.	Máximo	Mínimo
Cl (ml/kg/h)	3.10	1.27	5.52	1.33
MRT (h)	19.25	4.97	26.79	12.03
Vss (ml/kg)	54.89	12.37	78.50	32.78
Vd área (ml/kg)	59.90	15.35	94.80	34.29
Kel (h ⁻¹)	0.051	0.015	0.086	0.037
T1/2 (h)	14.45	3.46	18.69	8.04

D.E., desviación estándar

Tabla 2.4.1-3 Análisis compartimental. Distribución de los pacientes según curvas mono o bifásicas.

Tipo de curva	S.S.R. (\bar{X} +S.D.)	Significación (P)
Curvas monofásicas		
2	2.088 \pm 0.919	
Curvas bifásicas no significativas		
4	5.756 \pm 2.930	NS
Curvas bifásicas significativas		
6	1.001 \pm 0.322	<0.05

S.S.R., suma de cuadrados residuales
 $(\bar{X}$ +S.D.), media+ desviación estándar

Tabla 2.4.1-4 Parámetros farmacocinéticos del factor VIII considerando un análisis compartimental. Para cada paciente se considera únicamente el modelo al que mejor se ajusta.

Parámetro	Media	S.D.	Máximo	Mínimo
Monocompartimental (n=6)				
T1/2 (h)	10.52	2.95	15.58	7.44
Vd (ml/kg)	52.03	17.31	78.95	33.45
SSR	4.53	2.99	9.63	1.44
Bicompartimental (n=6)				
T1/2 alfa (h)	1.45	0.31	1.80	1.00
T1/2 beta (h)	17.84	4.47	22.04	9.91
Vc (ml/kg)	34.38	7.80	43.42	21.99
Vp (ml/kg)	24.65	8.73	38.62	12.21
Vss (ml/kg)	59.03	13.47	73.77	34.20
K10 (h ⁻¹)	0.077	0.022	0.113	0.051
K21 (h ⁻¹)	0.275	0.092	0.424	0.171
K12 (h ⁻¹)	0.187	0.048	0.247	0.123
SSR	1.00	0.32	1.54	0.70

S.D., desviación estándar

Tabla 2.4.1-5. Relación entre los parámetros de eliminación según el tipo de análisis. Regresión sobre el MRT.

PARAMETRO	CONSTANTE	r CUADRADO	P
T1/2	0.4369	0.6425	0.0017
T1/2 beta	0.9263	0.8986	<0.000001
T1/2 (amodel.)	0.6732	0.9342	<0.000001
Clearance	-0.3061	0.6989	0.0007

Tabla 2.4.1-6. Relación entre los parámetros de distribución según el tipo de análisis. Regresión sobre el Vd área.

PARAMETRO	CONSTANTE	r CUADRADO	P
Vd	0.7512	0.6722	0.00109
Vdss	0.8770	0.9291	<0.000001
Vdss (amodel.)	0.7715	0.9160	<0.000001

Figura 2.4.1-1. Ejemplo de curva monoexponencial.

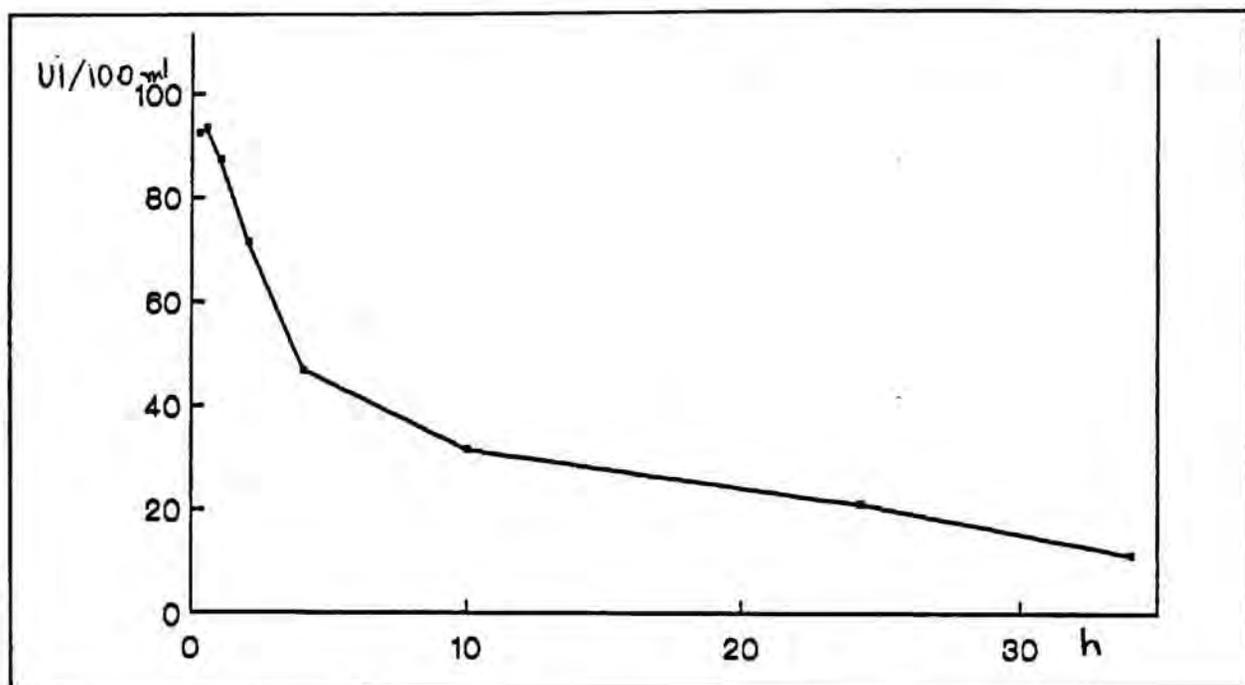
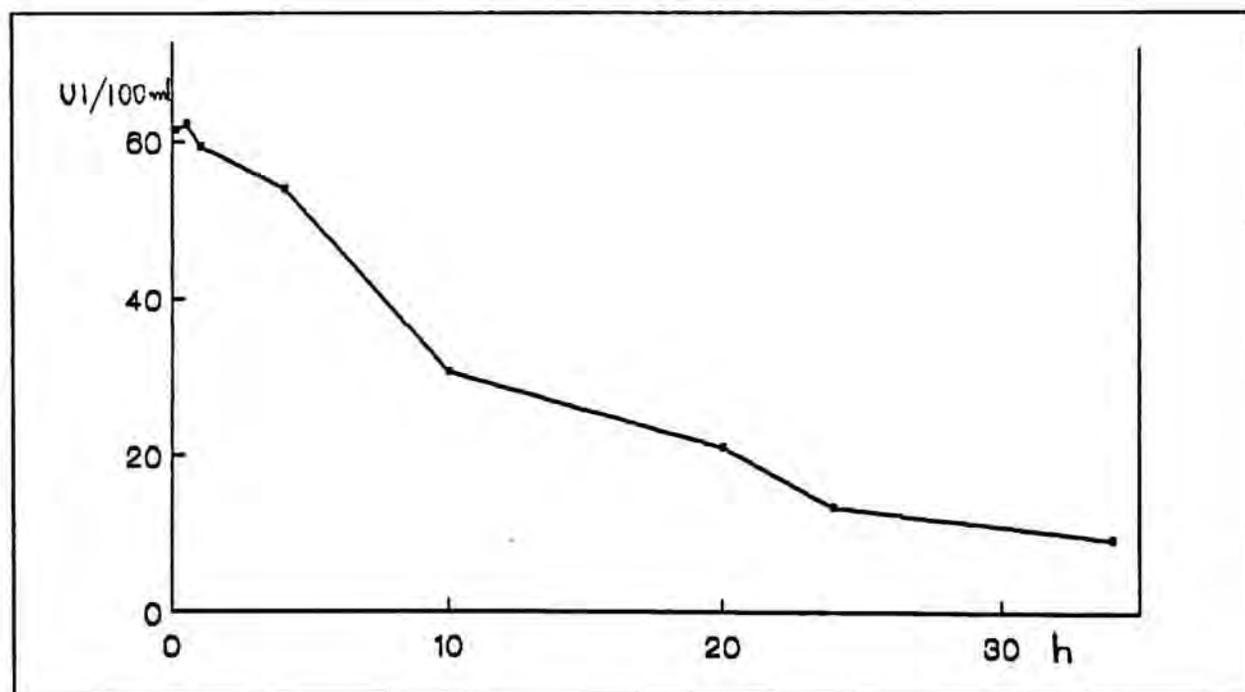


Figura 2.4.1-2. Ejemplo de curva biexponencial.



2.4.1.4-Discusión

La farmacocinética del factor VIII tiene peculiaridades especiales. La valoración del factor VIII se realiza mediante un ensayo biológico: Se mide la actividad, no la concentración. Normalmente, el efecto de un fármaco como función del tiempo se explica mediante un modelo farmacocinético/farmacodinámico que toma en consideración un equilibrio entre la concentración del fármaco en plasma (es decir, el lugar de la toma de muestra) y el lugar de acción (192). Para el factor VIII, el plasma es, a la vez, el lugar de la toma de muestra y el lugar de acción. Por lo tanto, para el factor VIII, se dispone de un modelo farmacocinético puro para describir la evolución con el tiempo del efecto, ya que se relaciona la actividad en el lugar de acción, con el tiempo.

El análisis farmacocinético compartimental de los doce casos estudiados demuestra que la elección del modelo compartimental más adecuado (mono o bicompartimental), para el factor VIII, es realmente complejo, ya que la evolución de la actividad plasmática del mismo con el tiempo, tras una dosis única, únicamente es bifásica claramente en un número limitado de pacientes. Este hecho ya ha sido destacado anteriormente en otros trabajos (177). La proporción de curvas bifásicas oscila entre el 60-80% (184). En nuestro caso, la proporción de curvas bifásicas, valoradas mediante el test F con un nivel de significación del 5%, es del 50%. El número total de curvas bifásicas representa el 83%, por lo que se puede considerar que los valores obtenidos en este estudio son similares a los ya descritos.

Los parámetros farmacocinéticos monocompartimentales obtenidos en nuestro estudio (Cl -definido por el producto $Kel \cdot Vd$ - 3.59 ± 1.34 ml/kg/h, Vd 52.03 ± 17.31 ml/kg y $T_{1/2}$ 10.52 ± 2.95 h (n=6)) son coincidentes básicamente con los valores descritos en la bibliografía para series más largas: Cl 4.14 ± 2.16 , Vd 53.8 ± 15.8 , y $T_{1/2}$ 10.3 ± 3.7 (n=87) (178).

En relación a los parámetros bicompartimentales, los datos descritos en la literatura -condensados en los parámetros $T_{1/2}$ alfa y beta- son 1.33 ± 1.29 h y 12.64 ± 5.02 h (n=21), respectivamente (185). Comparando estos datos con los obtenidos en nuestra serie (1.47 ± 0.31 h y 17.84 ± 4.47 h (n=6)) se observa que, si bien para la $T_{1/2}$ alfa no hay prácticamente diferencias, para la $T_{1/2}$ beta la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.01$). Esta diferencia podría ser debida, sin embargo, más a diferencias en las características de los concentrados de factor VIII estudiados que a diferencias de respuesta en la población hemofílica, tal como se comentará más adelante.

El hecho de que no pueda asumirse, en principio, si una curva plasmática concentración/tiempo de factor VIII es mono o bifásica, asigna una mayor importancia al análisis modelo-independiente. Los parámetros modelo-independientes están menos influenciados, además, por variaciones inesperadas en los primeros puntos de la curva: Para el factor VIII, la concentración máxima no siempre se obtiene en la primera muestra, tal como se ha compro-

bado en este estudio y en otros (185). El elevado coeficiente de variación de la técnica provoca, por otro lado, dificultades en la asignación de los puntos experimentales a un modelo de curva teórico. El cálculo del AUC y del AUCM está menos influenciado por este fenómeno.

Los resultados del análisis amodelístico en nuestra serie (Cl 3.10 ± 1.27 ml/kg/h, Vss 54.89 ± 12.37 ml/kg y MRT 19.25 ± 4.97 h (n=12)) son comparables a los obtenidos en otras series. En general, el Cl oscila entre 3.3 y 3.9 ml/kg/h (185,190,193). El Vss descrito en la literatura oscila entre 44 y 58 ml/kg (177,193), aunque hay descritos valores sensiblemente superiores (80 ml/kg) (194). El MRT varía según los estudios entre 13.2 y 19.8 h (6,11,16). Comparando con series más largas (Cl 3.85 ± 1.94 ml/kg/h, Vss 58.2 ± 21.3 ml/kg y MRT 15.9 ± 7.1 h (n=87)) (178), no hay diferencias significativas en los parámetros considerados.

Los datos descritos anteriormente corresponden a estudios en los que la actividad del factor VIII se valoró mediante el método de un tiempo. Esporádicamente, se han descrito resultados valorando el factor VIII mediante sustratos cromogénicos (195). Las diferencias entre ambos métodos estriban en que el de un tiempo valora actividades superiores de factor VIII por debajo de 0.2 UI/100 ml e inferiores por encima de este valor, respecto al cromogénico (168). Esto repercute en que los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este caso varían ligeramente: El Vss es superior y el MRT inferior (194).

Existen discrepancias, también, al considerar la dosis administrada: Asumir la dosis teórica indicada por el fabricante o valorar la dosis real. Parece más apropiado el uso, desde un punto de vista farmacocinético riguroso -para obtener parámetros reales-, el empleo de la dosis real. Sin embargo, en la práctica clínica se emplea la dosis teórica, lo que provoca discrepancias de resultados: No se puede emplear un concepto de dosis para los estudios farmacocinéticos y otro para la práctica clínica rutinaria. La mayor parte de los estudios farmacocinéticos del factor VIII emplean la dosis teórica en sus cálculos, por lo que en este estudio, los resultados vienen expresados bajo esta condición. Un análisis comparativo de ambas condiciones muestra que, empleando dosis reales, el Vss es superior. El Cl, por lo tanto es superior también (4.24 ± 1.19 frente a 2.91 ± 0.86 ml/kg/h) (194). El MRT y el T_{1/2}, evidentemente, no se modifican.

Comparando los parámetros farmacocinéticos, obtenidos a partir de los distintos análisis efectuados mediante una correlación, se observa una clara relación entre los mismos. En el caso de los parámetros de distribución, asignando arbitrariamente como variable independiente el Vd área, existe una buena correlación entre éste y el Vss (tanto bicompartimental como amodelístico), y menor, aunque significativa, con el Vd (monocompartimental). Para los parámetros de eliminación, asignando como variable independiente el MRT, existe, también, una buena correlación entre éste y la T_{1/2} (monocompartimental), la T_{1/2} beta y la T_{1/2} (amodelístico); especialmente con las dos últimas. En este caso,

la relación entre el MRT y la $T_{1/2}$ (amodelístico) es de 1.485, muy próxima al valor teórico de 1.443.

2.4.2-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII EN DOSIS MULTIPLE

2.4.2.1-Introducción

La farmacocinética del factor VIII en regimen de dosis múltiple se ha evaluado mediante el análisis matemático de 80 cursos de tratamiento en pacientes con hemofilia A severa o moderada (factor VIII plasmático basal < 0.05 UI/ml). El estudio se ha realizado con las marcas de concentrados de factor VIII registradas o empleadas en España.

2.4.2.2-Métodos

2.4.2.2.1-Pacientes

Los sujetos incluidos en el estudio han sido 57 pacientes afectos de hemofilia A severa o moderada, en 80 cursos de tratamiento. Los datos demográficos de estos pacientes son 26.7 años (intervalo 5-67), peso 50.2 kg (intervalo 18-91) y concentración basal de factor VIII < 0.05 UI/ml. Todos los pacientes incluidos en el estudio estaban sometidos a una pauta de tratamiento con factor VIII para corregir un episodio hemorrágico menor o para profilaxis. Ningún valor concentración-tiempo se consideró, para el estudio, antes de los tres días del inicio de la pauta de tratamiento. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: Presencia de inhibidores circulantes frente al factor VIII (pacientes con inhibidor), diagnóstico de coagulopatía adicional a la hemofilia A o enfermedad crónica excepto la hepatitis crónica.

2.4.2.2.1.2-Administración del factor VIII

Los concentrados de factor VIII empleados han sido Kryobulin TIM-3 (Immuno) (n=13), Haemate-P (I.Behring) (n=25), Conc.FVIII Hubber T (Hubber) (n=5), Hemofil M (Baxter) (n=17) y Criostat SD (Grifols) (n=20).

La dosis de factor VIII y el intervalo de dosificación fueron calculados según el episodio hemorrágico a tratar. El estudio no excluye aquellos cursos de tratamiento que en razón de la clínica o datos analíticos sufrieran modificaciones en la pauta de tratamiento.

La administración del concentrado se realizó mediante infusión endovenosa corta, a una velocidad constante de 2.5 UI/kg/minuto.

2.4.2.2.3-Análisis del factor VIII

Las muestras de sangre se extrajeron por venopunción limpia contralateral y se transfirieron a tubos de vidrio siliconado con citrato sódico 3.8% P/V (relación 9/1). Las muestras se centrifugaron y se congelaron a -30°C hasta su procesado analítico. La extracción de las muestras se realizó atendiendo a las necesidades clínicas o analíticas del paciente, o a la disponibilidad de personal, sin unos tiempos de muestreo teóricos prefijados. La condición mínima de inclusión en el estudio fue

la de disponer de, al menos, tres valores de concentración-tiempo, y tres dosis de factor VIII, para cada curso de tratamiento.

La valoración del factor VIII se realizó mediante la técnica de un tiempo estándar (168), de forma idéntica a la descrita en el apartado 2.4.1.2.3.

2.4.2.2.4-Análisis farmacocinético

Las curvas en dosis múltiple del factor VIII se han analizado de acuerdo a un modelo monocompartimental, endovenoso en "bolus", estándar de dosis múltiple basado en los parámetros farmacocinéticos constante de eliminación (K) y volumen de distribución (V) (178,183,188). El aclaramiento (Cl) se ha calculado a partir del producto $K \cdot V$. La estimación de los parámetros se ha realizado mediante una regresión no lineal por mínimos cuadrados con compensación estadística del peso de los datos equivalente al recíproco de la concentración ($1/C$) (188,196).

La bondad del ajuste se ha evaluado, para cada curva, a partir del CRE, tal como se describe en el apartado 2.4.1.2.4.1. La estimación del valor poblacional de los parámetros farmacocinéticos se ha efectuado a partir de los valores individuales. El CV_{pob} , se ha calculado, asimismo, tal como se ha descrito anteriormente (apartado 2.4.1.2.4.1).

2.4.2.2.5-Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado empleando técnicas estándar (test t Student-Fisher, análisis de correlación). El análisis de la varianza se ha efectuado mediante el programa informático estadístico STATGRAF 2.1, con objeto de relacionar los parámetros de eliminación y distribución obtenidos para las distintas especialidades de concentrados de factor VIII.

2.4.2.3-Resultados

La Tabla 2.4.2-1 muestra los resultados del estudio farmacocinético para el total de pacientes y concentrados de factor analizados, considerando tanto el ajuste por mínimos cuadrados como el ajuste por el método Bayesiano. Los valores medios obtenidos por ambos métodos son muy similares, destacando únicamente como factor diferenciador la mayor variabilidad obtenida por el método de mínimos cuadrados.

Agrupando los valores obtenidos de cada parámetro farmacocinético en función del concentrado de factor administrado (Tablas 2.4.2-2 y -3), puede comprobarse que existen diferencias sustanciales, en los resultados obtenidos, para dichos concentrados. Los resultados del Conc. FVIII Hubber deben ser considerados con precaución si se tiene en cuenta el número reducido de cursos de tratamiento analizados (n=5).

El análisis de la varianza (Tabla 2.4.2-4) demuestra que, en cuatro de los seis parámetros farmacocinéticos evaluados, existen

diferencias significativas en los resultados en relación al contrato de factor VIII administrado. El Cl es el parámetro más claramente diferenciador, ya que da diferencias altamente significativas, independientemente del método de ajuste farmacocinético. El Vd es, quizá, el parámetro más homogéneo. La T1/2 ofrece resultados contradictorios, probablemente por el elevado -y sorprendente- valor que adquiere el Conc. FVIII Hubber.

El error relacionado a la curva (CRE) -expresado en porcentaje- fué del 21.42 ± 5.25 . El coeficiente de variación global (CV_{pop}) fué del 24.35 ± 6.22 , de acuerdo con el CRE, que por definición es menor.

Tabla 2.4.2-1. Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por mínimos cuadrados y según el método Bayesiano.

Parámetro	N	Media	S.D.	Mínimo	Máximo
M. Bayesiano					
Cl (ml/kg/h)	80	3.254	1.368	0.653	6.561
Vd (ml/kg)	80	59.159	13.032	19.597	97.685
T1/2 (h)	80	15.054	7.641	4.850	41.770
M. Cuadrados					
Cl (ml/kg/h)	80	3.320	1.390	0.742	7.732
Vd (ml/kg)	80	60.126	25.078	19.574	146.705
T1/2 (h)	80	14.432	7.315	4.110	40.130

S.D., Desviación estándar

Tabla 2.4.2-2. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por mínimos cuadrados, en regimen de dosis múltiple, agrupados según el tipo de concentrado de factor VIII.

Marca	Cl (ml/kg/h)	Vd (ml/kg)	T1/2 (h)
Hemofil M	4.27 _± 1.63	60.45 _± 20.27	10.51 _± 3.60
C. FVIII Hubber T	2.17 _± 1.89	63.60 _± 40.43	26.25 _± 13.96
Criostat SD	3.51 _± 1.12	74.47 _± 29.90	16.42 _± 7.00
Kryobulin Tim-3	3.14 _± 1.26	52.45 _± 22.25	13.03 _± 5.94
Haemate-P	2.70 _± 1.05	50.92 _± 17.63	14.29 _± 6.53
Media _± Desviación estándar			

Tabla 2.4.2-3. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por el método Bayesiano, en regimen de dosis múltiple, agrupados según el tipo de concentrado de factor VIII.

Marca	Cl (ml/kg/h)	Vd (ml/kg)	T1/2 (h)
Hemofil M	4.08 _{+1.33}	59.92 _{+13.76}	11.00 _{+3.66}
C. FVIII Hubber T	2.82 _{+1.67}	48.78 _{+19.62}	14.30 _{+5.21}
Criostat SD	3.42 _{+1.26}	64.13 _{+11.08}	15.14 _{+7.79}
Kryobulin Tim-3	3.31 _{+1.55}	58.72 _{+15.01}	14.66 _{+6.43}
Haemate-P	2.60 _{+1.05}	56.56 _{+11.03}	18.07 _{+9.34}
Media _± Desviación estándar			

Tabla 2.4.2-4. Análisis de la varianza de los concentrados de factor VIII estudiados, considerando cada parámetro farmacocinético.

Parámetro	Valor de P	Signif. Estadís.
Mínimos cuadrados		
Clearance	0.0022	Sí
V. distribución	0.0382	Sí
Vida media	0.0009	Sí
M. Bayesiano		
Clearance	0.0096	Sí
V. distribución	0.1625	No
Vida media	0.0628	No

2.4.2.4-Discusión

El análisis farmacocinético del factor VIII en regimen de dosis múltiple se realiza, preferentemente, por un modelo monocompartmental lineal estándar, ya que se ha visto que este modelo describe bién la acumulación del factor VIII tras la administración de dosis repetidas (197-199).

Los resultados obtenidos en este estudio son comparables a los obtenidos en otra serie, igualmente larga, aunque con un número de pacientes inferior (n=40) (178). En este caso, los parámetros farmacocinéticos, obtenidos a partir del mismo modelo de análisis, fueron Cl 3.93 ± 1.95 ml/kg/h, Vd 61.8 ± 30.30 ml/kg y T1/2 12.2 ± 5.7 horas. Si bien el Vd es prácticamente idéntico (61.8 frente a 60.1), en relación a los otros dos parámetros existen diferencias significativas: El Cl es superior (3.93 frente a 3.32) (P<0.01) y, consiguientemente, la T1/2 es inferior (12.2 frente a 14.43) (P<0.05). La naturaleza de estas diferencias puede ser debida tanto a diferencias en la respuesta de la población de estudio, como a diferencias en la respuesta de los concentrados de factor VIII estudiados, de forma idéntica a como ocurría con los resultados en dosis única, ya que metodológicamente no hay diferencias entre ambos estudios.

En otro estudio (200), realizado con un número inferior de pacientes (n=20), los resultados son mucho más discrepantes (Cl 5.67 ± 2.91 ml/kg/h, Vd 64.7 ± 14.8 ml/kg y T1/2 9.60 ± 4.80 h). Sin embargo, en este caso, los resultados no son comparables, ya que

este estudio se realizó en pacientes sometidos a cirugía, y es clásicamente conocido que las necesidades de factor VIII aumentan en el caso de sangrado mayor o cirugía (186,201), por lo que los parámetros farmacocinéticos de eliminación son superiores. Hay que señalar, no obstante, la similitud entre los valores de V_d , por lo que podemos afirmar que los parámetros de distribución no sufren modificaciones apreciables en los procesos antes comentados. Es interesante que el Cl obtenido en estos pacientes al final del tratamiento tenga un valor prácticamente equivalente (3.05 ± 1.30 ml/kg/h) al obtenido en nuestro caso, lo cual es indicativo de que los parámetros de eliminación se normalizan cuando remite la fase aguda o sangrado.

La Tabla 2.4.2-1 muestra los resultados del estudio farmacocinético, considerando tanto el ajuste por mínimos cuadrados como el ajuste por el método Bayesiano. Los valores medios de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por ambos métodos son muy similares, destacando únicamente como factor diferenciador la mayor variabilidad obtenida por el método de mínimos cuadrados.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos a partir del estudio de curvas de dosis única y de dosis múltiple permite observar que éstos son similares, especialmente cuando el análisis de dosis única se realiza por los modelos bicompartimental y amodelístico (ver Tablas 2.4.1-1 y -2). En el caso del análisis bicompartimental, no hay diferencias estadísticamente significativas entre V_{ss} y V_d y entre $T_{1/2}$ beta y $T_{1/2}$; en el caso del

análisis amodelístico, no hay diferencias estadísticamente significativas tampoco entre V_d área y V_d y entre los valores de Cl . Sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos con el análisis monocompartimental -el mismo modelo farmacocinético que se ha empleado en análisis de dosis múltiple-, existen diferencias significativas entre los valores de $T_{1/2}$ ($P < 0.01$) y entre los valores de V_d ($P < 0.01$). En otros estudios, en que se han valorado simultáneamente curvas de dosis única y de dosis múltiple, no se han encontrado diferencias entre los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por un análisis amodelístico (dosis única) y monocompartimental (dosis múltiple) (178).

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el régimen de dosis múltiple, agrupados según la marca de concentrado de factor VIII ensayada, presentan una amplia variabilidad (Tabla 2.4.2-2 y -3). Así, el Cl oscila entre 2.60 y 4.08 ml/kg/h, el V_d entre 48.78 y 64.13 ml/kg y la $T_{1/2}$ entre 11.00 y 18.07 horas. El análisis de la varianza para cada uno de estos parámetros (Tabla 2.4.2-4) revela que hay diferencias estadísticamente significativas entre los concentrados de factor VIII en relación al Cl (mínimos cuadrados y Bayesiano) y en relación al V_d y la $T_{1/2}$ (mínimos cuadrados). Estas diferencias se han observado, también, en el análisis de las curvas en dosis única (datos no mostrados), pero el número limitado de curvas para cada especialidad no han permitido extraer conclusiones. En otros estudios, se han podido contrastar, también, diferencias entre distintos concentrados en relación a los parámetros farmacocinéticos (184,190). Las razones

que podrían justificar una distinta respuesta farmacocinética del factor VIII, en relación al tipo de concentrado, son poco claras pero, probablemente existe una relación con el tratamiento a que es sometido el factor VIII en los procesos de fraccionamiento y fabricación (concentración y purificación), típico y diferencial para cada marca registrada. Esto, además, adquiere sentido cuando se considera que el factor VIII no tiene una estructura química sencilla, sino que es una molécula proteica de entidad que puede sufrir pequeñas modificaciones durante los procesos expresados anteriormente. A modo de resumen, el Hemofil M (purificado a partir de columnas de inmunoafinidad) es el que presenta unos parámetros de eliminación menos favorables (Cl 4.08 ± 1.33 ml/kg/h, T_{1/2} 11.00 ± 3.66 h). El Haemate-P es el que presenta valores de eliminación más sostenidos (Cl 2.60 ± 1.05 ml/kg/h y T_{1/2} 18.07 ± 9.34 h). Los parámetros de distribución son más homogéneos, con la excepción del Conc.FVIII Hubber que presenta un valor inferior de V_d (48.78 ± 19.62 ml/kg), aunque este dato, y los restantes correspondientes a esta especialidad, deben ser considerados con precaución dado el reducido número de curvas analizadas (n=5).

2.4.3-FARMACOCINETICA DEL FACTOR VIII EN PERFUSION CONTINUA

2.4.3.1-Introducción

La administración del factor VIII en perfusión continua ha sido, en los últimos años, una práctica poco frecuente, a pesar de que poco tiempo más tarde de la aparición de los concentrados de factor VIII ya se hicieron los primeros intentos (202). Las razones de su poca aplicación habría que buscarlas, probablemente, en la falta de información respecto a la estabilidad del factor VIII en los concentrados tras la reconstitución, en la falta de mecanismos precisos que garanticen un ritmo de perfusión constante y, consiguientemente, en la falta de hábito en general, traducida en la ausencia de pautas de tratamiento y dosificación por esta vía en la bibliografía de consulta.

La perfusión continua, mientras no existan mecanismos tecnológicos adecuados, debe reducirse al tratamiento de aquellos episodios hemorrágicos que impliquen el ingreso hospitalario o inmovilización del paciente. Sin embargo, aún en estos casos, la administración de factor VIII se realiza usualmente mediante infusión intermitente.

No obstante, existen intentos descritos en la literatura de grupos de trabajo que han tratado series de hemofílicos mediante factor VIII en perfusión continua (203-205). En todos estos trabajos la respuesta al tratamiento fué segura y eficaz, y la administración fácil.

En ninguno de estos estudios, sin embargo, se ha realizado un análisis farmacocinético del comportamiento del factor VIII en estas condiciones de administración.

En la presente memoria, la farmacocinética en perfusión continua del factor VIII se ha evaluado mediante el análisis, con un modelo matemático, de 38 cursos de tratamiento en 24 pacientes con hemofilia A severa, leve o moderada (factor VIII plasmático basal entre <0.01 y 0.24 UI/ml). El estudio se ha realizado con las marcas de concentrados de factor VIII registradas o empleadas en España.

2.4.3.2-Métodos

2.4.3.2.1-Pacientes

Los sujetos incluidos en el estudio han sido 27 pacientes afectados de hemofilia A severa o moderada, en 38 cursos de tratamiento. Los datos demográficos de estos pacientes son 34.9 años (intervalo 14-62), peso 61.8 kg (intervalo 45-90) y concentración basal de factor VIII entre < 0.01 y 0.24 UI/ml. Todos los pacientes estaban sometidos a una pauta de tratamiento con factor VIII para corregir un episodio hemorrágico que requería ingreso hospitalario. Ningún valor concentración-velocidad de perfusión se consideró, para el estudio, antes de los dos días del inicio de la pauta de tratamiento. Los criterios de exclusión fueron los

siguientes: Presencia de inhibidores circulantes frente al factor VIII (pacientes con inhibidor), diagnóstico de coagulopatía adicional a la hemofilia A o enfermedad crónica excepto la hepatitis crónica. En el caso de aparición de flebitis, el tratamiento en perfusión continua se suspendió, pasando a tratamiento intermitente.

2.4.3.2.1.2-Administración del factor VIII

Los concentrados de factor VIII empleados han sido Kryobulin TIM-3 (Immuno) (n=5), Haemate-P (I.Behring) (n=15), Hemofil M (Baxter) (n=5) y Criostat SD (Grifols) (n=13). La estabilidad de los concentrados de factor VIII empleados fué estudiada previamente (ver apartado 2.3). En ningún caso se empleó un concentrado de factor VIII con una T90 (estabilidad del 90% de la concentración inicial) inferior a 12 horas.

La dosis diaria de factor VIII fue calculado según el episodio hemorrágico a tratar y según los parámetros farmacocinéticos individuales del paciente. El estudio no excluye aquellos cursos de tratamiento que en razón de la clínica o datos analíticos sufrieran modificaciones en la pauta de tratamiento.

La administración del concentrado se realizó mediante perfusión endovenosa, con un ritmo de perfusión (ml/h) dependiente de la dosis diaria de factor a administrar y de la concentración del factor VIII (UI/ml) en la especialidad, una vez reconstituido el vial (entre 25-100 UI/ml).

La perfusión se realizó con una bomba de perfusión continua de jeringa Secura-Perfusor (Laboratorios Braun-Palex, Barcelona), con jeringas adaptables de 50 ml, conectada a un acceso venoso periférico o central.

2.4.3.2.3-Análisis del factor VIII

Las muestras de sangre se extrajeron por venopunción limpia contralateral y se transfirieron a tubos de vidrio siliconado con citrato sódico 3.8% P/V (relación 9/1). Las muestras se centrifugaron y se congelaron a -30°C hasta su procesado analítico. La extracción de las muestras se realizó según necesidades clínicas o analíticas, o disponibilidad de personal, sin unos tiempos de muestreo teóricos prefijados. La condición mínima de inclusión en el estudio fue la de disponer de, al menos, tres valores de concentración-velocidad de perfusión, para cada curso de tratamiento.

La valoración del factor VIII se realizó mediante la técnica de un tiempo estándar (168), de forma idéntica a la descrita en el apartado 2.4.1.2.3.

2.4.3.2.4-Análisis farmacocinético

Los cursos de tratamiento del factor VIII en perfusión continua se han analizado de acuerdo a un modelo monocompartimental endo-

venoso estándar basado en el parámetro farmacocinético aclaramiento (Cl).

El cálculo del Cl se ha llevado a cabo a partir de la ecuación siguiente:

$$Cl(\text{ml/kg/h}) = (\text{Ritmo de infusión}(\text{UI/h}) / \text{Peso}(\text{kg})) / C_{ss}(\text{UI/ml})$$

(Siendo C_{ss} , la concentración plasmática en el estado estacionario).

Para cada paciente, el Cl se ha establecido como la media de tres determinaciones independientes.

La estimación del valor poblacional de los parámetros farmacocinéticos se ha efectuado a partir de los valores individuales. El CV_{pob} , se ha calculado, asimismo, a partir de los valores individuales y de su desviación estándar.

2.4.3.2.5-Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado empleando técnicas estándar (test t Student-Fisher, análisis de correlación). El análisis de la varianza se ha efectuado mediante el programa informático estadístico STATGRAF 2.1, con objeto de relacionar el parámetro de eliminación Cl, obtenido para las distintas especialidades de concentrados de factor VIII.

2.4.3.3-Resultados

En la Tabla 2.4.3-1 se indican los valores de Cl obtenidos para los 38 cursos de tratamiento, agrupados por concentrado comercial de factor VIII. Los valores de Cl se mantienen en el intervalo 2.14-2.68 ml/kg/h, con la excepción del Hemofil M, con un valor de 3.94 ml/kg/h. El valor medio total del Cl fué de 2.68 ml/kg/h.

El análisis de la varianza demuestra que existen diferencias significativas entre los distintos concentrados de factor VIII, en relación al Cl obtenido a partir de la administración del factor en perfusión ($P=0.00016$).

El CV_{pob} ha sido del 5.3%, inferior al registrado en el estudio de dosis única y dosis múltiple.

Tabla 2.4.3-1. Parámetros farmacocinéticos (Cl, ml/kg/h) del factor VIII en perfusión continua, considerando un modelo mono-compartimental, para cada concentrado de factor VIII y para el total de pacientes estudiados.

Marca	Media	S.D.	Máximo	Mínimo
Haemate-P	2.14	0.52	3.32	1.24
Hemofil M	3.94	1.27	5.97	2.49
Criostat SD	2.69	0.62	4.10	2.06
Kryobulin Tim-3	2.68	0.39	3.05	2.16
Total	2.63	0.86	5.97	1.24

S.D., Desviación estándar

2.4.3.4-Discusión

El análisis farmacocinético del factor VIII, en régimen de perfusión continua, se ha llevado a cabo siguiendo un modelo similar al adoptado para el estudio en régimen de dosis múltiple (apartado 2.4.2).

La administración de factor VIII en perfusión continua, a pesar de sus ventajas (mejor control hemostático del paciente, ahorro en la cantidad de factor VIII administrada), no ha gozado de una amplia distribución. Ultimamente, sin embargo, aparecen en la literatura comunicaciones que parecen indicar una expansión inminente, de esta forma de administración, en la práctica clínica rutinaria (205,206-209).

En ninguno de estos estudios, o de los anteriores (202-204), el tratamiento en perfusión continua se acompañó de un estudio de las características farmacocinéticas del factor VIII, en estas condiciones de administración.

El valor del aclaramiento obtenido, así como el valor particular obtenido para cada concentrado concreto, no puede ser contrastado con el obtenido en otros estudios, dada la ausencia de datos en la bibliografía. El único estudio que aporta datos farmacocinéticos no puede ser considerado, a efectos comparativos, ya que corresponde a una primera evaluación (con un número inferior de casos) del estudio que aquí se presenta (209).

El análisis comparativo del valor del Cl, respecto al obtenido a partir del estudio de curvas en dosis única y de dosis múltiple, permite observar que existen claras diferencias en los resultados entre el primero y los dos segundos. El Cl del factor VIII, en perfusión continua, tiene un valor de 2.63 ± 0.86 ml/kg/h, frente a los valores de 3.10 ± 1.27 , en dosis única, y de 3.32 ± 1.39 ml/kg/h, en dosis múltiple. En el primer caso, la diferencia no es estadísticamente significativa, pero en el segundo sí ($P < 0.01$).

El descenso del valor del Cl, respecto al régimen de dosis múltiple, podría ser debido a un fenómeno de acumulación del factor VIII en el endotelio vascular, tal como han sugerido algunos autores, que han cuantificado la diferencia en un 25% de descenso (210). En nuestro caso, el descenso porcentual del Cl ha sido del 20.8%, de acuerdo con esta apreciación.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos a partir del estudio de cursos de tratamiento en perfusión continua, agrupados según la marca de concentrado de factor VIII empleada, muestra que existe una amplia variabilidad (Tabla 2.4.3-1). Así, el Cl oscila entre 2.14 y 3.94 ml/kg/hora. El análisis de la varianza para este parámetro revela que existen diferencias estadísticamente significativas entre las marcas de concentrados en relación a este parámetro ($P = 0.00016$). Estos datos coinciden sustancialmente con los observados en el estudio de dosis múltiple (apartado 2.4.2). Las razones que podrían justificar una respuesta farmacocinética distinta están, probablemente, rela-

cionadas con el método de fabricación del concentrado, y ya se han argumentado anteriormente. El Hemofil M es aquí, de nuevo, el que presenta un parámetro de eliminación menos favorable (Cl 3.94 ± 1.27 ml/kg/h). El Haemate-P, de nuevo, el que presenta idéntico parámetro más favorable (Cl 2.14 ± 0.52 ml/kg/h). En el caso del Haemate-P, el descenso porcentual del Cl respecto al valor obtenido en dosis múltiple ha sido del 17.7%, mientras que en el Hemofil M el descenso ha sido inferior (3.5%), por lo que el fenómeno de acumulación -postulado anteriormente- sería, para esta especialidad, mucho menos acusado. Para el resto de marcas de concentrados, el descenso ha sido del 23.4 y del 19.4% (Criostat SD y Kryobulin Tim-3, respectivamente).

CONCLUSIONES

1- La osmolaridad y el pH de los concentrados reconstituidos no varía sensiblemente de los límites fisiológicos, muy lejos de los límites tolerables aceptados para un preparado endovenoso.

2- La difracción de Rx se demuestra como un método analítico válido para la caracterización de liofilizados, proporcionando datos fiables y concretos para el mejor conocimiento de la formulación empleada en cada caso y de la estructura cristalina del producto acabado. Los liofilizados estudiados están compuestos por una fase amorfa -factor VIII y proteínas acompañantes- y una fase cristalina -excipientes: glicina y cloruro sódico-. Se observa que unos presentan ambos excipientes, mientras que otros solo presentan uno de ellos.

3- Los elementos traza detectados en cantidades valorables son los esperados según las características del producto. La presencia de aluminio es muy inferior a la que aparece en la bibliografía anterior, lo que indica una mejora en las técnicas de preparación.

4- En función de los parámetros estudiados se pueden definir unas diferencias cualitativas entre los concentrados de factor VIII analizados, si bien pueden considerarse correctos en cuanto a su elaboración y aceptables para su empleo y administración.

5- El fibrinógeno (Fg) es cuantitativamente el principal contaminante proteico, pudiendo llegar a representar el 64% del total de la proteína presente (47 mg/100UI FVIII). En los concentrados

ultra-puros (purificados por columnas de inmunoafinidad) está prácticamente ausente. La concentración disponible -Fg funcionales es muy baja, por lo que no puede emplearse para uso terapéutico.

6- La fibronectina (Fn) es el segundo contaminante más importante en cuanto a concentración. En los concentrados ultra-puros está, también, prácticamente ausente, lo que indica una buena purificación en estos productos.

7- No existe una relación significativa entre la concentración de Fn y de Fg en los distintos concentrados, a pesar de ser proteínas muy ligadas, desde la perspectiva de la purificación del factor VIII.

8- Las inmunoglobulinas se encuentran en cantidades apreciables en los concentrados de factor VIII a excepción, asimismo, de los preparados ultra-puros, clara diferencia de la distinta tecnología empleada.

9- No existe una proporción constante entre las distintas inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) presentes en los concentrados.

10- El análisis comparativo de los datos obtenidos de concentración de proteínas, con los descritos en la literatura referidos a especialidades comercializadas en otros países, no ofrece diferencias destacables. En algún caso (Haemate-P), sin embargo, el contenido en Fg, Fn e inmunoglobulinas es sensiblemente menor,

fruto de una mejor tecnología de purificación.

11- El factor von Willebrand (FvW) total se encuentra, en los concentrados de factor VIII, en cantidades muy variables. El FvW funcional únicamente se encuentra en concentraciones potencialmente terapéuticas en una especialidad.

12- La albúmina, con mínimo poder aloantigénico, es la proteína más abundante en los concentrados ultra-puros, debido a que se añade como estabilizante durante el proceso tecnológico.

13- Existe una gran diferencia de actividad específica (UI FVIII/mg Pa [Proteína total-albúmina]) entre los concentrados de factor VIII: La actividad específica varía entre valores superiores a 1070 UI/mg Pa y 1.45 UI/mg Pa.

14- La proporción de proteína inalterada (ejemplarizada en el Fg) es variable (desde el 78% hasta < 13%), dependiendo, probablemente, de lo enérgico que haya sido el proceso de preparación.

15- Los concentrados comercializados hace una década eran hasta cinco veces más impuros que los concentrados convencionales empleados en la actualidad. Se ha mejorado pues globalmente, la tecnología de obtención, purificación y elaboración.

16- El factor VIII liofilizado se descompone progresivamente una vez reconstituido y disuelto en función del tiempo: El tiempo explica entre el 69.6 y el 95.2% de la variación de la concentra-

ción que se ha registrado en las 264 horas que ha abarcado el seguimiento de la misma en el estudio.

17- La estabilidad de los concentrados de factor VIII, en condiciones reales, varía sustancialmente según el concentrado de factor VIII: Al final del estudio (264 h) la concentración remanente oscila según la especialidad entre el 61.13 y el 13.59%. Varía también claramente, para cada lote y cada especialidad.

18- La cinética de degradación que sigue el factor VIII es de orden 0. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ésta y la de orden 1 (test F de Snedecor-Fisher), por lo que se asume el modelo más simple (orden 0).

19- La concentración de factor VIII obtenida a las 24 h es superior significativamente ($P < 0.05$) al 90%, en todos los casos: Por lo tanto, todas las soluciones reconstituidas de los concentrados de factor VIII, conservadas a temperatura ambiente (21-23 °C), pueden ser empleadas terapéuticamente durante las primeras 24 horas.

20- El análisis farmacocinético compartimental demuestra que la elección del modelo más adecuado (mono o bicompartimental), para el factor VIII en dosis única, es complejo: La proporción de curvas bifásicas con significación estadística es del 50%.

21- Los parámetros farmacocinéticos monocompartimentales obteni-

dos en nuestro estudio son coincidentes básicamente con los valores descritos para otras series.

22- En relación a los parámetros bicompartimentales, se observa que, si bien para la $T_{1/2}$ alfa no hay prácticamente diferencias, para la $T_{1/2}$ beta la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.01$).

23- Los resultados del análisis amodelístico son comparables a los obtenidos en otras series.

24- Existe una buena correlación entre el V_d área y el V_{ss} (tanto bicompartimental como amodelístico), y menor, aunque significativa, con el V_d (monocompartimental).

25- Existe, también, una buena correlación, significativa, entre el MRT y la $T_{1/2}$ (monocompartimental), la $T_{1/2}$ beta y la $T_{1/2}$ (amodelístico).

26- Los parámetros farmacocinéticos, obtenidos en regimen de dosis múltiple son distintos de los obtenidos en otras series: Si bien el V_d es prácticamente idéntico, el Cl es superior ($P < 0.001$) y la $T_{1/2}$ es inferior ($P < 0.05$).

27- El análisis comparativo de los resultados obtenidos a partir del estudio de curvas de dosis única y de dosis múltiple muestra que éstos son similares, especialmente cuando el análisis de dosis única se realiza por los modelos bicompartimental y amode-

lístico.

28- Existen diferencias estadísticamente significativas entre los concentrados de factor VIII, en regimen de dosis múltiple, en relación al Cl (mínimos cuadrados y Bayesiano) y en relación al Vd y la T1/2 (mínimos cuadrados).

29- El análisis comparativo del valor del Cl, respecto al obtenido a partir del estudio de curvas en dosis única y de dosis múltiple, permite observar que existen claras diferencias en los resultados. El descenso porcentual del Cl ha sido del 20.8%, de acuerdo con esta apreciación.

30- En la perfusión continua, existen diferencias estadísticamente significativas, entre las marcas de concentrados en relación al Cl ($P=0.00016$).

BIBLIOGRAFIA.

- (1) ROSNER F. "Hemophilia in the Talmud and Rabbinic writings" *Ann Int Med*, 1969; 70 (4): 833-837.
- (2) ROSNER F. "Moses Maimonides (1135-1204)" *Ann Int Med*, 1965; 62: 372.
- (3) JAKOBOVITS J. "Jewish medical ethics", Block, New York, 1959: 198-199.
- (4) MAJOR RM. "A History of the medicine", vol I, Charles C. Thomas Pub., Springfield, Ill. 1954: 252.
- (5) OTTO JC. "An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families" *Med Reposit*, 1803; 6: 1 (Citado en HARDISTY RM e INGRAM GIC. "Bleeding disorders", Blackwell, Oxford, 1965: 32).
- (6) NASSE CF. "Von einer erblichen neigung zu todtlichen blutungen" *Arch Med Erfahr*, 1820; 1: 385 (Citado en (1) ROSNER F; 1969).
- (7) CASTIGLIONI A. "A History of medicine", Alfred A. Knopf Inc., New York, 1941: 707.
- (8) BULLOCH W, FILDES P. (Citado por HARDISTY RM, INGRAM GIC. "Bleeding disorders", Blackwell, Oxford, 1965: 32).
- (9) ADDIS T. "The pathogenesis of hereditary haemophilia" *J Pathol Bact*, 1911; 15: 427.
- (10) PATEK AS, TAYLOR FHL. "Hemophilia II. Some properties of a sustance obtained from normal plasma effective in accelerating the coagulation of haemophilic blood" *J Clin Invest*, 1937; 16: 113.
- (11) PAVLOSKY A. "Contribution to the pathogenesis of haemophil-

ia" Blood, 1947; 2: 185.

(12) BIGGS R, DOUGLAS AS, MACFARLANE RG, DACIE JV, PITNEY WR, MERSKEY C, O'BRIEN JR. "Christmas disease: A condition previously mistaken for haemophilia" Br Med J, 1952; 2: 1378.

(13) AGGELER PM, WHITE SG, GLENDENING MB, PAGE EW, LEAKE TB, BATES G. "Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: A new disease resembling haemophilia" Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1952; 79: 692.

(14) SMITH-SIBINGA CI, GÖKENMEYER VDM, TEN KATE LP, BOS-VAN ZWOL F. "Combined deficiency of factor V and factor VII. Report of a family and genetic analysis" Br J Haematol, 1942; 23: 467.

(15) ROSENTHAL RL, DRESKIN OH, ROSENTHAL N. "New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor" Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1953; 82: 171.

(16) VON WILLEBRAND EA. "Über hereditäre pseudohämophilie" Acta Med Scan, 1931; 76: 512.

(17) CASTILLO R, MARAGALL S. "Hipocoagulabilidades congénitas. Hemofilia y procesos afines". En SANS-SABRAPEN J. "Hematología clínica", Ed Doyma, Barcelona; 1988: 598-615.

(18) CARTER CO. "Monogenic disorders" J Med Genet, 1977; 14: 316-20.

(19) HALDANE JBS. "The rate of spontaneous mutation of a human gene" J Genetics, 1935; 31(3):317-23.

(20) DE LA CHAPELLE A Ed. "The human gene map. Eight workshop on human gene mapping" Cytogenet Cell Genet, 1985; 40: 1-832.

(21) GITSCHIER J, WOOD WI, GORALKA TM, WION KL, CHEN EY, EATON

DH, VEHAR GA, CAPON DJ, LAW RM. "Characterization of the factor VIII gene" Nature, 1984; 312 (5992): 326-30.

(22) MILLER CH. "Genética de la hemofilia y de la enfermedad de von Willebrand". En HILGARTNER MW. "Hemofilia en el niño y en el adulto", Ed. Espacs, Barcelona, 1984: 49-90.

(23) FIRSHEIN SI, HOYER LW, LAZARCHICK J, MAHONEY MJ. "Prenatal diagnosis of classical hemophilia" New Engl J Med, 1979; 300: 937-41.

(24) EDGELL CJS, KIRKMAN HN, CLEMONS E, BUCHANAN PD, MILLER CH. "Prenatal diagnosis by linkage: haemophilia A and polymorphic glucose-6-phosphate dehidrogenase" Am J Hum Genet, 1978; 30: 80-4.

(25) BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLICH H, DAVIS RW. "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms" Am J Hum Genet, 1980; 32: 314-31.

(26) OBERLE I, CAMERINO G, HELIG R, GRUNEBAUM L, CAZENAVE JP, CRAPAZANO C, MANNUCCI PM, MANDEL JL. "Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe" New Engl J Med, 1985; 312: 682-6.

(27) NUNES V, BAIGET M, ESTIVILL X, FELEZ J. "Estudio del patrón de segregación de los genes responsables de la hemofilia A" Med Clin (Bar), 1986; 86(18): 743-7.

(28) BAIGET M, NUNES V, DEL RIO E, RAMOS C, AYUSO C, BENITEZ J, DIAZ J. "Diagnóstico prenatal de hemofilia A mediante análisis del DNA. Primera experiencia en España" Med Clin (Bar), 1987; 88: 770-2.

(29) HOYER LW, CARTA CA, GOLBUS S. "Prenatal diagnosis of classic hemophilia (hemofilia A) by immunoradiometric assays"

Blood, 1985; 65: 1312-7.

(30) CASTILLO R, BASTIDA E. "Fisiología de la Hemostasia". En SANS-SABRAFEN J. "Hematología Clínica", Ed. Doyma, Barcelona; 1988: 547-71.

(31) HEPTINSTALL S, HANLEY SP. "Blood platelets and vessel wall". En BOWIE EJW, SHARP AA. "Hemostasis and Thrombosis", Butterworths & Co. Publishers, Londres; 1985: 36-74.

(32) PACKHAM MA, MUSTARD JF. "Platelet adhesion". En SPAET TH. "Progress in hemostasis and thrombosis", Grune & Stratton Inc., Nueva York; 1984, Volumen 7: 211-88.

(33) KESSLER CM. "Anticoagulation and thrombolytic therapy. Practical considerations" Chest, 1989; 95 (5): 245S-57S.

(34) MONCADA S, HIGGS EA. "Araquidonate metabolism in blood cells and the vessel wall" Clin Haematol, 1986; 15: 273-92.

(35) SAKARIASSEN KS, NIEVEL P, COLLER BS, SIXMA JJ. "The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium" Br J Haematol, 1986; 62: 681-91.

(36) DAVIE EW, FUJIKAWA K. "Basic mechanisms in blood coagulation" Ann Rev Biochem, 1975; 44: 799-828.

(37) LÄMMLE B, GRIFFIN JH. "The formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors" Clin Haematol, 1985; 14: 281-342.

(38) RATNOFF OD. "The evolution of knowledge about hemostasis". En RATNOFF, O.D.; FORBES, C.D. "Disorders of hemostasis" Grune & Stratton, New York, 1984; 1-21.

(39) DAVIE EW, RATNOFF OD. "Waterfall sequence for intrinsic blood

clotting" Science, 1964; 145: 1310-12.

(40) WESSLER S, GITEL SN. "Pharmacology of heparin and warfarin" J Am Coll Cardiol, 1986; 9: 10B-20B.

(41) COMP PC. "Hereditary disorders predisposing to thrombosis" Prog Hemost Thromb, 1986; 8: 71-102.

(42) COLLER BS, OWEN J, JESTY J, HOROWITZ D, REITMAN MJ, SPEAR J. "Deficiency of plasma protein S, protein C, or antithrombin III and arterial thrombosis" Arteriosclerosis, 1987; 7: 456-62.

(43) LAMMLA B, GRIFFIN JH. "Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors" Clin Haematol, 1985; 14: 281-342.

(44) BOUMA BN, GRIFFIN JH. "Initiation mechanisms: the contact activation system in plasma". En ZWAAL RFA, HEMKER HC. "Blood coagulation" Elsevier, Amsterdam, 1986; 103-128.

(45) SALEM HH. "The natural anticoagulants" Clin Haematol, 1986; 15: 371-92.

(46) TOLLEFSEN DM, MAJERUS DV, BLANK MK. "Heparin cofactor-II. Purification and properties of an heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma" J Biol Chem, 1982; 257: 2162-69.

(47) ESMON CT. "Protein C". En SPAET TH. "Progress in hemostasis and thrombosis", Grune & Stratton, Nueva York, 1984; vol 7: 25-54.

(48) SUZUKI K. "Activated protein C inhibitor" Semin Thromb Hemostas, 1984; 10: 154-61.

(49) RATNOFF OD. "The significance of contact activation". En BOWIE EJW, SHARP AA. "Hemostasis and thrombosis" Butterworths & Co., Londres, 1985; 75-97.

(50) RICK ME, HOYER LW. "Las estructuras moleculares del factor

VIII y del factor IX". En HILGARTNER MW. "La hemofilia en el niño y en el adulto" Espaxs Pub. Med., Barcelona, 1984; 15-48.

(51) SADLER JE, DAVIE EW. "Hemophilia A, hemophilia B and von Willebrand's disease". En STAMATOYANNOPOULOS, NIENHUIS, LEDER & MAJERUS Eds. "The molecular basis of blood diseases", WD Saunders & Co., 1987:575-630.

(52) SAKARIASSEN KS, BOLHUIS PA, SIXMA JJ. "Human blood platelet adherence to artery subendotelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendotelium" Nature, 1979; 279: 636-638.

(53) HOLMBERG L, NILSSON IM. "Von Willebrand's disease" Clin Haematol, 1985; 14: 461-488.

(54) FOWLER WE, FRETTO LJ, HAMILTON KK. "Substructure of human von Willebrand factor" J Clin Invest, 1985; 76: 1491-1500.

(55) MANN KG. "Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation". En SPAET TH. "Progress in Hemostasis and thrombosis" Grune & Stratton Inc., New York, 1984; 7: 1-23.

(56) TOOLE JJ, KNOPF JL, WOZNEY JM, SULTZMAN LA, BUECKER JL, PITTAN DD, KAUFMAN RJ, BROWN E, SHOEMAKER C, ORR EC, AMPHLETT GW, FOSTER WB, COE ML, KNUTSON GJ, FASS DN, HEWICK RM. "Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor" Nature, 1984; 312: 342-347.

(57) WOOD WI, CAPON DJ, SIMONSEN CC, EATON DL, GITSCHIER J, KEYT B, SEEBURG PH, SMITH DH, HOLLINGSHEAD P, WION KL, DELWART E, TUDDENHAM EGD, VEHAR GA, LAWN RM. "Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones" Nature, 1984; 312: 330-337.

(58) VEHAR GA, KEYT B, EATON D, RODRIGUEZ H, O'BRIEN DP, ROTBLAT D, OPPERMANN H, KEKC R, WOOD WI, HARKINS RN, TUDDENHAM EGD, LAWN RM, CAPON DJ. "Structure of human factor VIII" *Nature*, 1984; 312: 337-342.

(59) TOOLE JJ, PITTMAN DD, ORR EC, MURTHA P, WASLEY LC, KAUFMAN RJ. "A large region (= 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for "in vivo" procoagulant activity" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 5939-5942.

(60) WEISS HJ, HOYER LW. "Von Willebrand factor: Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity" *Science*, 1973; 182: 1149-1157.

(61) TITANI K, KUMAR S, TAKIO K, ERICSSON LH, WADE RD, ASHIDA K, WALSH KA, CHOPEC MW, SADLER JE, FUJIKAWA K. "Amino Acid sequence of human von Willebrand factor" *Biochemistry*, 1986; 25: 3171-3184.

(62) WEISS HJ, SUSSMAN II, HOYER LW. "Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor! Studies on post-transfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease" *J Clin Invest*, 1977; 60: 390-404.

(63) BRINKHOUS KM, SANDBERG H, GARRIS JB, MATTSSON C, PALM M, GRIGGS T, READ MS. "Purified human factor VIII procoagulant protein: Comparative hemostatic response after infusions into hemophilia and von Willebrand disease dogs" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 8752-8756.

(64) KAUFMAN RJ, PITTMAN DD, WASLEY LC, WANG JH, ISRAEL DI, GILES AR, DORNER AJ. "Expression and characterization of factor VIII produced in mammalian cells by recombinant DNA technology". In ROBERTS HH. "Biotechnology and the promise of pure factor VIII"

Baxter Healthcare Pub., Brussels, 1989; 119-141.

(65) DORNER AJ, BOLE DG, KAUFMAN RJ. "The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins" J Cell Biol, 1987; 105: 2665-2674.

(66) JENNY RJ, PITTMAN DD, TOOLE JJ, KRIZ RW, ALDAPE RA, HEWICK RM, KAUFMAN RJ, MANN KG. "Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V" Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 4846-4850.

(67) FOSTER WB, NESHEIM MB, MANN KG. "Characterization of factor V activation intermediates" J Biol Chem, 1983; 259: 3187-3196.

(68) FRANCIS RT, McDONAGH J, MANN KG. "Factor V is a substrate for the transamidase factor XIIIa" J Biol Chem, 1986; 261: 9787-9792.

(69) EATON DL, RODRIGUEZ HR, VEHAR GA. "Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity" Biochemistry, 1986; 25: 505-512.

(70) EATON DL, HASS PE, RIDDLE L, MATHER J, WIEBE M, GREGORY T, VEHAR GA. "Characterization of human recombinant factor VIII" J Biol Chem, 1987; 262: 3285-3290.

(71) FAY PJ. "Thrombin-activated factor VIIIa is composed of a noncovalent 73/51 kDa dimer" Thromb Haemost, 1987; 58: 343a.

(72) PITTMAN DD, KAUFMAN RJ. "Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII)" Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 2429-2433.

- (73) ROBERTS HR, JONES M "Hemophilia and related conditions- Congenital deficiencies of prothrombin (factor II), factor V, and factors VII to XII". En WILLIAMS WJ, BENTLER E, ERSLER AJ, LICHTMAN MA "Hematology" Mc Graw-Hill P.C., New York, 1990; 1453-1474.
- (74) JONES P "Living with haemophilia" M.T.P. Co. Ld., London, 1974.
- (75) LEVINE PH "Clinical manifestations and therapy of hemophilias A and B". En COLMAN RW, HIRSH J, MARDER VJ, SALZMAN EW "Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice" E. Lippincott, Philadelphia, 1987; 97.
- (76) LAZARCHICK J, HOYER LW "Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen" J Clin Invest, 1978; 62: 1048-1052.
- (77) HILGARTNER MW "Terapia sustitutiva de los factores". En Hilgartner MW "Hemofilia en el niño y en el adulto" Espaxs Pub. Med., Barcelona, 1984; 91-116.
- (78) MONTORO JB, JODAR RJ, ROCA M "Concentrados de factores de la coagulación" Monografía científica no. 59 de la S.E.F.H., 1989; 1-38.
- (79) ROBERTS HR, PENICK GD, BRINKHOUS, KM "Intensive plasma therapy in hemophilia" JAMA 1964; 190: 546-548.
- (80) POOL GJ, SHANDON AE "Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed bag system" N Eng J Med 1965; 273: 1443.
- (81) NESS PM, PERKINS HA "La utilización del crioprecipitado como sustitutivo del fibrinógeno" JAMA 1979; 241: 1690.
- (82) WEBSTER WP, ROBERTS HR, THELIN GM, WAGNER RH, BRINKHOUS, KM

"Clinical use of new glicine precipitated antihemophilic fraction" Am J Med Sci 1965; 250: 643-651.

(83) ANONIMO "Biotechnology and the promise of pure FVIII" Baxter Healthcare Corp., Hyland Div., Glendale, 1987.

(84) MANNUCCI PM "Hemophilia diagnosis and management: Progress and problems". En Poller L "Recent advances in blood coagulation" Churchill Livingstone, London, 1981; 193.

(85) BEL E. "Problemática legal de la sangre y derivados" Real Academia de Farmacia de Barcelona, Discurso de recepción, Barcelona, 1989; 56-62.

(86) BRINKHOUS KM, SHAMBRON E, ROBERTS HR, WEBSTER WP, FEKETE L, WAGNER RH. "A new high-potency glicine precipitated antihemophilic factor (AHF) concentrate" JAMA 1968; 205: 613.

(87) ROBERTS HR, MACIK BG. "Factor VIII and IX concentrates: clinical efficacy as related to purity". En VERSTRAETE M, VERMYLEN J, LIJEN R, ARNOU J. "Thrombosis and Haemostasis" Leuven Univ. Press, 1987; 563-581.

(88) MONTORO JB. "Tratamiento sustitutivo de la hemofilia A: Concentrados de factor VIII" El Farmacéutico hospitales 1988; 4: 41-44.

(89) YOSHIOKA A, SHIMA M, NISHINO M, YOSHIKAWA N, FUKUI H. "In vitro characterization of various heat-treated concentrates" Proc. Fourth Inter. Sym. Haemophilia Treatment, 1985; 163-170.

(90) MEYER D. "Obtainment of new factor VIII concentrates by monoclonal antibody affinity chromatography". En Roberts HR "Biotechnology and the promise of pure factor VIII" Baxter Healthcare Publ., Brussels, 1989; 61-67.

- (91) TUDDENHAM ED, TRABOLD NC, COLLINS JA, HOYER LW. "The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography" J Lab Clin Med, 1979; 93: 40-53.
- (92) FULCHER CA, ZIMMERMAN TS. "Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody" Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79: 1648-1652.
- (93) GRIFFITH M, LIU S, NESLUND G, TSANG I, LETTELIER D, BERKEVILE R. "Preparation of high specific activity plasma AHF by anti-FVIII:C immunoaffinity chromatography" Thromb Haemostas, 1987; 58: 307.
- (94) TERRY W, SCHREIBER A TARR C, HRINDA M, CURRY W, FELDMAN F. "Human factor VIII:C produced using monoclonal antibodies" Ric Clin Lab, 1986; 16: 202.
- (95) HRINDA ME, FELDMAN F, CURRY W, TARR C, SCHRECKER AB, TERRY ND. "Monoclate: Factor VIII produced using monoclonal antibodies". En Proc. 5th Intern. Symp. Hemophilia Treatment, Tokio, 1986.
- (96) HEIMBURGER N, KUMPE G, WORMSBACHER W. "A new pasteurized high purity factor VIII concentrate: FVIII:C P" 17th International Congress of the World Federation of Hemophilia, Madrid, mayo 1988; Abstract Book, 25.
- (97) GOMPERS E. "Procedures for the inactivation of viruses in clotting factor concentrates" Am J Haematology, 1986; 23: 295-305.
- (98) HEIMBURGER N, KARGES HE. "Strategies to produce virus-safe blood derivatives" Curr Stud Hematol Blood Transfus. Basel, Karger, 1989; 56: 23-33.
- (99) MANNUCCI PM, COLOMBO M. "Virucidal treatment of clotting

factor concentrates" Lancet, 1988; 2: 782-785.

(100) SCHIMPF K, MANNUCCI PM, KREUTZ W. "Absence of hepatitis after treatment with pasteurised factor VIII concentrate in patients with hemophilia and no previous transfusion" N Engl J Med, 1987; 316: 918-922.

(101) MANNUCCI PM, ZANETTI AR, COLOMBO R. "Prospective study of hepatitis after factor VIII concentrate exposed to hot vapor" Br J haematol, 1988; 68: 427-430.

(102) HOROWITZ MS, ROOKS C, HOROWITZ B, HILGARTNER MW. "Virus safety of solvent-detergent treated antihemophilic factor concentrate" Lancet, 1988; 2: 186-189.

(103) BRETTLER DB. "A multicentre study to determine the hepatitis safety of Monoclate". En MANNUCCI PM "Replacement therapy in haemophilia. Problems and solutions" Medi-Fax Inter. Publ., 1989; 94-101.

(104) COLOMBO M, MANNUCCI PM, CARNELLI V, SAVITGE GF, GAZENGEL C, SCHIMPF K and The European Study Group. "Transmission of non-A non-B hepatitis by heat treated factor VIII concentrate" Lancet, 1985; ii: 1-4.

(105) ROUZIOUX C, CHAMARET S, MONTAIGNIER L, CARNELLI V, ROLLAND G, MANNUCCI PM. "Absence of antibodies to AIDS virus in haemophiliacs treated with heat-treated factor VIII concentrate" Lancet, 1985; i: 271-272.

(106) HOLLINGER FB, DOLAN G, THOMAS W, GYORKEY F. "Reduction in risk of hepatitis transmission by heat-treatment of a human factor VIII concentrate" J Inf Dis, 1984; 150: 250-262.

(107) PRESTON FE, HAY CRM, DEWAR MS. "Non A, non B hepatitis and

heat treated factor VIII concentrate" Lancet, 1985; ii: 213.

(108) CARNELLI V, GOMPERS ED, FRIEDMAN A. "Assesment for evi-
dence of non A, non B hepatitis in patients give n-heptane sus-
pended heat-treated clotting factor concentrates" Trombosis
Research, 1987; 46: 827-834.

(109) SCHIMPK K, MANNUCCI PM, KREUTZ W. "Absence of hepatitis
after treatment with a pasteurised factor VIII concentrate in
patients with hemophilia and no previous transfusion" N Engl J
Med, 1987; 316: 918-922.

(110) MANNUCCI PM, ZANETTI AR, COLOMBO M and the Study Group of
the Fondazione dell'Emofilia. "Prospective study of hepatitis
after factor VIII concentrate exposed to hot vapor" Br J Haema-
tol, 1988; 68: 427-430.

(111) PRINCE AM, HOROWITZ B, BROTMAN B, HUIMA T, RICHARDSON L,
Van Den ELDE MC. "Inactivation of hepatitis B and Hutchison
strain non A non B heptatitis viruses by exposure to Tween 80 and
ether" Vox Sang, 1984; 46: 36-43.

(112) PRINCE AM, HOROWITZ B, BROTMAN B. "Sterilization of hepa-
titis and HTLV-III viruses by exposure to tri (n-butyl) phosphate
and sodium cholate" Lancet, 1986; i: 706-710.

(113) HOROWITZ MS, ROOKS C, HOROWITZ B, HILGARTNER M. "Virus
safety of solvent-detergent treated antihaemophilic factor VIII
concentrate" Lancet, 1988; ii: 186-189.

(114) ANONIMO. "Monoclote (r): Antihemophilic factor (human).
Summary of the preclinical and clinical data" Armour Pharmaceuti-
cal company, Kankakee, 1987.

(115) WHITE GC, McMILLAN CW, KINGDOM HS, SHOEMAKER CB. "Use of
recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patiens

with classic hemophilia" N Engl J Med, 1989; 320: 166-170.

(116) FLETCHER ML, TROWELL JM, CRASKE J, PAVIER K, RIZZA CR. "Non A non B hepatitis after transfusion of factor VIII in frequently treated patients" Br Med J, 1983; 287: 1754-1757.

(117) KERNOFF PBA, LEE CA, KARAYIANNIS P, THOMAS HC. "High risk of non A non B hepatitis after a first exposure to volunteer or commercial clotting factor concentrates effects of prophylactic immune serum globulin " Br J Haematol, 1985; 60: 469-470.

(118) EIRI J, EDERG G, ANDERLE K. "Issue associated with safety testing of blood products in endemic areas" Br J Haematol, 1988; 69: 575-576.

(119) HILGARTNER MW. "Hemofilia en el niño y en el adulto: Sección II, Tratamiento médico y complicaciones" Espacx Pub. Med., Barcelona, 1984; 91-249.

(120) HALVORSEN EP. "Transient acquired defect in platelet function, following therapy with AHF concentrate" Annual New York Area Seminar on Hemostasis, New York, feb. 1967.

(121) HAY CRM. "Clotting factor concentrates and immune function". En LUSHER JM, KESSLER CM. "Hemophilia and von Willebrand's disease in the 1990s" Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1991; 219-224.

(122) EIBLE MM, AHMAD R, WOLFE HM, LINNAU L, GOTZ E, MANNHALTER JW. "A component of factor VIII preparations which can be separated from factor VIII activity down-modulates human monocyte functions" Blood, 1989; 69: 1153-1160.

(123) PASI KJ, HILL FGH. "Correlation between increasing product purity and reduced in vitro inhibition of monocyte phagocytic

- function". En MANNUCCI PM "Replacement therapy in haemophilia. Problems and solutions" Alden Press, Oxford, 1989; 116-119.
- (124) THORPE R, DILGER P, DAWSON NJ, BARROWCLIFFE TW. "Inhibition of interleukin-2 secretion by factor VIII concentrates: a possible cause of immunosuppression in haemophiliacs" Br J Haematol; 1989; 71: 387-391.
- (125) HAY CRM, McEVOY P, DUGGAN-KEEN M. "Inhibition of lymphocyte IL-2 receptor expression by factor VIII concentrate: a possible cause of immunosuppression in haemophiliacs" Br J Haematol, 1990; 75: 278-281.
- (126) ARONSON DL. "Cause of death in haemophilia A patients in the United States from 1968 to 1979" Am J Haematol, 1988; 27: 7-12.
- (127) ROSENDAAL FR, VAREKAMP I, SMITH C et al. "Mortality and causes of death in Dutch haemophiliacs, 1973-86" Br J Haematol, 1989; 71: 71-76.
- (128) BRETTLER DB, FORSBERG AD, LEVINE PH, PETILLO J, LAMON K, SULLIVAN JL. "Factor VIII:C concentrate purified from plasma using monoclonal antibodies: Human studies" Blood, 1989; 73: 1859-63.
- (129) BIASI R, ROCINO A, MIRAGLIA E, MASTRULLO L, QUIRINO AA. "The impact of a very high purity factor VIII concentrate on the immune system of human immunodeficiency virus-infected hemophiliacs: A randomized, prospective, two-year comparison with an intermediate purity concentrate" Blood, 1991; 78: 1919-1922.
- (130) MANNUCCI PM, GRINGERI A, BIASI R, BAUDO F, MORFINI M, CIAVARELLA N. "Immune status of asymptomatic HIV-infected hemophiliacs: Randomized, prospective, two-year comparison of treat-

ment with a high-purity or an intermediate-purity factor VIII concentrate" *Thrombosis & Haemostasis*, 1992; 67: 310-313.

(131) ABILBGAARD CF. "Tratamiento de los inhibidores de la hemofilia". En HILGARTNER MW. "Hemofilia en el niño y en el adulto" *Espacx Pub. Med.*, Barcelona, 1984; 217-233.

(132) SHAPIRO SS, HULTIN M. "Acquired inhibitors to the blood coagulation factors" *Semin Thromb Haemostas*, 1975; 336-385.

(133) KASPER CK. "Management of inhibitors to factor VIII" *Prog Haematol*, 1982; 12: 143-163.

(134) SJAMSOEDIN LJM, HEIJNEN L, MAUSER-BUNSCHOTEN EP, van GEIJLSWIJK JL, van HOUWELINGEN H, van ASTEN, SIXMA JJ. "The effect of activated prothrombin-complex concentrate (Feiba) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and inhibitors to factor VIII" *New Engl J Med*, 1981; 305: 717-721.

(135) NILSSON IG, SUNDQUIST SB, FREIBURGHANUS C. "Extracorporeal protein A-sepharose and specific affinity chromatography for removal of antibodies". En HOYER LW. "Factor VIII inhibitors" *Alan R Liss, Inc.*, New York, 1984; 225-241.

(136) LUSHER JM, SHAPIRO SS, PALASCAK JE, RAO AV, LEVINE PH, BLATT PM and The Hemophilia Study Group. "Efficacy of prothrombin complex concentrates in hemophiliacs with antibodies to factor VIII" *New Engl J Med*, 1980; 303: 421-425.

(137) BRETTLER DB, FORSBERG AD, LEVINE PH, ALEDORT LM, HILGARTNER MW, KASPER CK, LUSHER JM, McMILLAND C, ROBERTS HR. "The use of porcine factor VIII concentrate (Hyate:C) in the treatment of patients with inhibitor antibodies to factor VIII" *Arch Intern Med*, 1989; 149: 1381-1385.

- (138) HEDNER V, KISIEL W. "Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors" J Clin Invest, 1983; 71: 1836.
- (139) ROBERTS HR. "Hemophiliacs with inhibitors: Therapeutic options" New Engl J Med, 1981; 305: 757-758.
- (140) BRACKMANN HH. "Induced immunotolerance in factor VIII inhibitor patients" Prog Clin Biol Res, 1984; 150: 181-184.
- (141) NILSSON IM, BERNTORP E, ZETTERVALL O. "Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII" New Engl J Med, 1988; 318: 947-953.
- (142) SUÑE-NEGRE JM, MONTORO JB, MARTINEZ B, OLIVA I, SUÑE-ARBUS-SA JM. "Contribución a la evaluación de liofilizados de factor VIII: Parámetros farmacotécnicos" Ciencia Farmacéutica, 1991; 1: 227-239.
- (143) MONTORO JB, CARRERAS MJ, DOMINGUEZ MC, MORENO A, BARROSO C. "Contenido de aluminio en los concentrados de factores de la coagulación" XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Córdoba, 1988; 937-941.
- (144) HOYER LW. "The factor VIII complex: Estructure and function" Blood, 1981; 58: 1-13.
- (145) SULLIVAN JL, BREWSTER FE, BRETTLER DE FORSBURG AD, CHEESEMAN SH, BYRON KS, BAKER SM, WILLITTS DL, LEW RA, LEVINE P. "Hemophilic immunodeficiency: influence of exposure to factor VIII concentrates" J Ped, 1986; 108: 504-510.
- (146) LEDERMAN MM, SAUNDERS C, TOOSI Z, LEMON M, EVERSON L, RATNOFF OD. "Antihemophilic factor (FVIII) preparations inhibit lymphocyte proliferation and production of interleukin-2" J Lab

Clin Med, 1986; 107: 471-478.

(147) LEDERMAN MM, RATNOFF OD, SCHACTER E, SHOGER T. "Impaired cell mediated immunity in hemophilia II. Persistence of subclinical immunodeficiency and enhancement of natural killer activity by lymphokines" J Lab Clin Med, 1985; 106: 197-204.

(148) BERNTORP E, NILSSON IM. "Biochemical and in vivo properties of commercial virus-inactivated factor VIII concentrates" Eur J Haematol, 1988; 40: 205-214.

(149) BARROWCLIFFE TW. "Comparative immunosuppressive effects of various factor VIII concentrates". En MANNUCCI PM. "Replacement therapy in haemophilia. Problems and solutions" Medi-Fax Int., London, 1989; 125-128.

(150) LAURELL CB. "Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies" Anal Biochem, 1966; 15: 42-52.

(151) HOWARD GI, FIRKIN BG. "Ristocetin a new tool in the investigation of platelet aggregation" Thromb et Diath Haemorrh, 1971; 26: 362-369.

(152) SCHNEPPENHEIM R, PLENDL H, BUDDE U. "Luminography -An alternative assay for detection of von Willebrand factor multimers" Thromb Haemostasis, 1988; 60: 133-136.

(153) BUDDE U, SCHNEPPENHEIM R, PLENDL H, RUGGIERI ZM, ZIMMERMAN TS. "Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes" Thromb Haemostasis, 1990; 63: 312-315.

(121) HAY CRM "Clotting factor concentrates and immune function". En LUSHER JM, KESSLER CM "Hemophilia and von Willebrand's disea-

se in the 1990s" Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1991; 219-224.

(154) SCHWINN H, SMITH A, WOLTER D. "Progress of purification of virus-inactivated factor VIII concentrates. Three generations of solvent/detergent treated plasma derivatives" *Arzneim-Forsch Drug Res*, 1989; 39: 1302-1305.

(155) HEIMBURGER N, SCHWINN H, GRATZ P, LÜBEN G, KUMPE G, HERCHENHAN B. "Factor VIII concentrate, highly purified and heat-treated" *Arzneim-Forsch Drug Res*, 1981; 31: 619-622.

(156) YOSHIOKA A, SHIMA M, NISHINO M, YOSHIKAWA N, FUKUI H. "In vitro characterization of various factor VIII concentrates" *Arzneim-Forsch Drug Res*, 1987; 37: 753-756.

(157) MORFINI M, MESSORI A, CINOTTI S, RAFANELLI D, FILIMBERTI E, BUM E, LONGO G. "Comparative studies on available clotting factor concentrates". En LUSHER JM, KESSLER CM. "Haemophilia and von Willebrand's disease in the 1990's" Elsevier Pub. BV, Amsterdam, 1991; 213-218.

(158) GRALNICK HR, WILLIAMS SB, MORISATO D. "Effect of the multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor protein on binding to platelets" *Blood*, 1981; 58: 387-397.

(159) LOPEZ-FERNANDEZ MF, LOPEZ-BERGES C, CORRAL M, GARCIA-TALAVERA JR, LOPEZ-BORRASCA A, BATLLE J. "Assessment of multimeric structure and ristocetin-induced binding to platelets of von Willebrand factor present in cryoprecipitate and different factor VIII concentrates" *Vox Sang*, 1987; 52: 15-19.

(160) TAKAHASHI H, TATEWAKI W, NAGAYAMA R, HANANO M, TAMURA M, YAMAGUCHI T, TAKIZAWA S, WADA K, SHIBATA A. "Heat-treated factor VIII/von Willebrand factor concentrate in platelet-type von

Willebrand's disease" *Haemostasis*, 1987; 17: 353-360.

(161) MAZURIER C, DE ROMEUF C, PARQUET A, GOUDEMAM M. "In vitro and in vivo characterization of a high-purity, solvent/detergent-treated factor VIII concentrate: Evidence for its therapeutic efficacy in von Willebrand's disease" *Eur J Haematol*, 1989; 43: 7-14.

(162) SCHARRE I. "The treatment of von Willebrand's disease". En LUSHER JM, KESSLER CM. "Haemophilia and von Willebrand's disease in the 1990's" Elsevier Pub. BV, Amsterdam, 1991; 463-469.

(163) WALLEVIK K. "Influence of factor VIII concentrates of different purity on the in-vitro transformation of lymphocytes from haemophiliacs". En MANNUCCI PM. "Replacement therapy in haemophilia. Problems and solutions" *Medi-Fax Int.*, London, 1989; 111-115.

(164) FRANQUESA R. "Estabilidad de medicamentos" *Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*, 1985: 4-18.

(165) "Pharmacopée Européene", 2^a Ed. Maisonneuve SA, Sainte Raffine, 1986; 275 (1-4).

(166) SCHOU SA. *Acta Helvetica*, 1959; 34: 309.

(167) OVER J. "Methodology of the one-stage assay of factor VIII (FVIII:C)" *Scan J Haematol (suppl)*, 1984; 41: 13-24.

(168) CINOTTI S, LONGO G, MESSORI A, MORFINI M, BLOMBACK M, SCHIMPF K, SHUMACHER K, KJELLMAN H, NOVAKOVA-BANET A, DELVO U. "Reproducibility of one-stage, two-stage and chromogenic assays of factor VIII activity: A multi-center study" *Thromb Research*, 1991; 61: 385-393.

(169) CHANDRA S, KLEKAMP MS, STACKHOUSE TM, KLESZINSKI RR, HO L,

WEEKS RL, FELDMAN F "Stability of Monoclote-P - A high purity monoclonal antibody purified factor VIII:C preparation for treatment of hemophilia A" XIX International Congress of the World Federation of Hemophilia, Washington, 1990: 24.

(170) CHANDRA S, HUANG ChC, HO L, LLING RE, WEEKS RL, FELDMAN F "Studies on the stability of factor VIII:C (Monoclote) in lyophilized and solution form" XVIII International Congress of the World Federation of Hemophilia, Madrid, 1988: 23.

(171) PEERLINCK K, ARNOUT J, VERMYLEN J "Factor VIII solutions in pre-filled syringes" Lancet, 1992; 339: 303-304.

(172) MARTINEZ B, MONTORO JB, RODRIGUEZ S, SUÑE-NEGRE JM, SUÑE JM "Concentrados de factor VIII: Estabilidad a tiempo real en solución" Ciencia Farmacéutica, 1991; 1: 15-18.

(173) TRISSEL LA "Handbook on injectable drugs" A.S.H.P., 1990; IX-XII.

(174) MAZURIER C. "Purification, biochemistry and structure-function relationships of vWf". En SEGATCHIAN MJ, SAVIDGE GF. "Factor VIII-von Willebrand factor", CRC Press, Boca Raton, 1989; vol I: 41-82.

(175) SMITH JK, SNAPE TJ, LANE RS. "Advances in plasma fractionation and in the production of factor VIII concentrates". En SEGATCHIAN MJ, SAVIDGE GF. "Factor VIII-von Willebrand factor", CRC Press, Boca Raton, 1989; vol I: 289-300.

(176) PEREZ M, MONTORO JB. Datos no publicados.

(177) MESSORI A, LONGO G, MATUCCI M, MORFINI M, ROSSI-FERRINI P. "Clinical pharmacokinetics of factor VIII in patients with classic hemophilia" Clin Pharmacokinet, 1987; 13: 365-380.

(178) MESSORI A, LONGO G, MORFINI M, CINOTTI S, FILIMBERTI G,

GIUSTARINI G, ROSSI-FERRINI P. "Multi-variate analysis of factors governing the pharmacokinetics of exogenous factor VIII in hemophiliacs" Eur J Clin Pharmacol, 1988; 35: 663-668.

(179) MORFINI M, MESSORI A, LONGO G. "Recommendations for pharmacokinetics study of clotting factors concentrates" Preliminary report of ICTH Subcommittee on factor VIII and factor IX, Barcelona, 20-21 Junio de 1990: 1-10.

(180) MORFINI M, LEE M, MESSORI A. "The design and analysis of half-life and recovery studies for factor VIII and factor IX" Thrombosis Haemostasis, 1991; 66: 384-386.

(181) LONGO G, MATUCCI M, MORFINI M, VANNINI S, MESSORI A "A calculator program for individualizing factor VIII dosage" Drug Intell & Clin Pharm, 1984; 18: 726-730.

(182) FINNEY DJ "A computer program for parallel line bioassay" J Pharmacol Exp Ther, 1976; 198: 497-506.

(183) GIBALDI M, PERRIER D "Pharmacokinetics" Marcel Decker Ed., New York; 1982

(184) MORFINI M, MANNUCCI PM, LONGO G, CINOTTI S, MESSORI A "Comparative evaluation of the pharmacokinetics of three monoclonal factor VIII concentrates" Thrombosis Research, 1991; 61: 285-290.

(185) MATTUCCI M, MESSORI A, ROSSI-FERRINI P "Kinetic evaluation of four factor VIII concentrates by model-independent methods" Scand J Haematol, 1985; 34: 22-28.

(186) KASPER CK, BOYLEN L, EWING NP "Hematologic management of hemophilia A for surgery" J Am Med Assoc, 1985; 253: 1279-1283.

(187) BOXENBAUM HG, RIEGELMAN S, ELASHOFF RM "Statistical

- estimation in pharmacokinetics" J Pharmacokin & Biopharm, 1974; 123-145.
- (188) RUFFO S, MESSORI A, GRASELA TH, LONGO G, DONATI-CORI G, MATUCCI M, MORFINI M, TENDI E "A calculator program for clinical application of the Bayesian method of predicting plasma drug levels" Comput Progr Biomed, 1985; 19: 167-175.
- (189) SHEINER LB, BEAL SL "Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: Routine clinical pharmacokinetic data. J Pharmacokin & Biopharm, 1983; 11: 303-319.
- (190) LONGO G, MATUCCI M, MESSORI A, MORFINI M, ROSSI-FERRINI P "Pharmacokinetics of a new heat-treated concentrate of factor VIII estimated by model-independent methods" Thrombosis Research, 1986; 42: 471-476.
- (191) MORFINI M, MESSORI A, LONGO G, CINOTTI S, MATUCCI M, ROSSI-FERRINI P "Half-life and in vivo recovery of heated factor VIII" Lancet, 1986; ii: 571-572.
- (192) HOLFORD NGH, SHEINER LB "Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models" Clin Pharmacokin, 1981; 429-453.
- (193) SMITH KJ, LUSHER JM, COHEN AR, SALZMAN P "Initial clinical experience with a new pasteurized monoclonal antibody purified factor VIIIC" Seminars in Haematology, 1990; 27 (suppl 2): 25-29.
- (194) BJORKMAN S, CARLSSON M, BERNTORP E, STENBERG P "Pharmacokinetics of factor VIII in humans. Obtaining clinically relevant data from comparative studies" Clin Pharmacokinet, 1992; 22: 385-395.
- (195) ROSEN S "Assay of factor VIII:C with a chromogenic sub-

trate" *Scan J Haematol*, 1984; 33 (suppl 40): 139-145.

(196) RUFFO S, MESSORI A, DONATI-CORI G, TENDI E, ROSSELLI P, VARINI C "Calculator programs for weighted least-squares iterative fits in pharmacokinetics" *Am J Hosp Pharm*, 1985; 42: 628-630.

(197) MESSORI A, LONGO G, MORFINI M, DONATI-CORI G, MATUCCI M, RUFFO S, TENDI E, VANINI S "Individualization of factor VIII dosage" *J Clin Hosp Pharm*, 1984; 9: 95-103.

(198) DUNCAN B, LLOYD J, LESNIKOWSKI E "Successive factor VIII doses for a hemophiliac undergoing major surgery calculated on a microcomputer" *Thromb Haemost*, 1982; 47: 66.

(199) NOE D, BELL WR, NESS PM, LEVIN J "Plasma clearance rates of coagulation factors VIII and IX in factor-deficient individuals" *Blood*, 1986; 67: 969-972.

(200) LONGO G, MESSORI A, MORFINI M, BAUDO F, CIAVARELLA N, CINOTTI S, FILIMBERTI E, GIUSTARINI G, MOLINARI AC, ROSSI-FERRINI PL "Evaluation of factor VIII pharmacokinetics in haemophilia subjects undergoing surgery and description of a nomogram for dosing calculations" *Am J Haematol*, 1989; 30: 140-149.

(201) KITCHENS CS "Surgery in haemophilia and related disorders. A prospective study of 100 consecutive procedures" *Medicine*, 1986; 65: 34-38.

(202) McMILLAN CW, WEBSTER WP, ROBERTS HR, BLYTE WB "Continuous intravenous infusion of factor VIII in classic haemophilia" *Br J Haematol*, 1970; 18: 659-667.

(203) HATHAWAY HE, CHRISTIAN MJ, CLARKE SJ, HASIBA U "Comparison of continuous and intermitent factor VIII concentrate therapy in haemophilia A" *Am J Hematol*, 1984; 17: 85-88.

(204) BONA RD, WEINSTEIN RA, WEISMAN SJ, BARTOLOMEO A, RICKLESS FR "The use of continuous infusion of factor concentrates in the treatment of hemophilia" Am J Hematol, 1989; 32: 8-13.

(205) WEINSTEIN RE, BONA RD, RICKLESS FR "Continuous infusion of monoclonal antibody-purified factor VIII" Am J Hematol, 1991; 36: 211-212.

(206) FLORA S, HAMBLEY H, THUMPSTON J, CLARK J "Continuous Infusion of highly purified factor VIII (Monoclalte-M)" Am J Hematol, 1992; 40: 157.

(207) MARTINOWITZ U, GITEL SN, EZRA D, HEIM M, BRENNER M, VARON D, SCHULMAN S "Continuous replacement therapy after operations in hemophilic patients" Throm Haemostas, 1991; 65: 1658.

(208) LAURIAN Y, LAMBERT T, DREYFUS M, LARRIEU MJ "Continuous infusion of an activated prothrombin complex concentrate (Auto-plex) for surgery in patients with high titers of factor VIII antibody" XIX International Congress of The World Federation of Hemophilia, Washington, Agosto 14-19; 1990.

(209) RODRIGUEZ-BUENO S, MONTORO JB, MARTINEZ B, ALTISENT C, TUSELL JM "Administración de concentrados de factor VIII a hemofílicos mediante bomba de perfusión continua" Med Clin (Barc), 1991; 96: 364-366.

(210) MORFINI M, MESSORI A, Centro per la Diagnosi, la Cura e lo Estudio dell'Emofilia, Ospedale di Careggi, Firenze. Comunicación personal, datos no publicados.