



**Caracterización del crioprecipitado obtenido como subproducto del proceso de fraccionamiento de plasma humano para su potencial uso como materia prima en la obtención de proteínas de interés terapéutico. Un enfoque para la obtención de Factor VIII de coagulación.**

Frank Alexis Gómez Manquillo

Trabajo de grado presentado para optar al título de Ingeniero Bioquímico

Tutor

Rigoberto Ríos Estepa, Doctor (PhD)

Sergio Andrés Pulido, PostDoctor (PostDoc)

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2022

---

Cita	(Gómez Manquillo, 2022)
<b>Referencia</b> <b>Estilo APA 7 (2020)</b>	Gómez Manquillo, F.A. (2022). <i>Caracterización del crioprecipitado obtenido como subproducto del proceso de fraccionamiento de plasma humano en la compañía farmacéutica LifeFactors para su potencial uso como materia prima en la obtención de proteínas de interés terapéutico. Un enfoque para la obtención de Factor VIII de coagulación.</i> [Trabajo de grado profesional Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.

---



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes.

**Decano:** Jesús Francisco Vargas Bonilla.

**Jefe departamento:** Lina María Gonzáles Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## Tabla de contenido

1. Resumen .....	5
3. Introducción .....	7
4. Objetivos .....	9
4. Objetivo general .....	9
4. Objetivos específicos .....	9
5. Marco teórico .....	10
5.1 Plasma humano .....	11
5.2 Medicamentos hemoderivados e indicaciones .....	11
5.3 Factor VIII antihemofílico .....	13
5.4 Cuantificación de Actividad Biológica del Factor VIII de coagulación .....	15
5.5 proceso de purificación del factor VIII de coagulación .....	16
6. Metodología .....	16
6.1 Determinación del rendimiento de crioprecipitado a partir del plasma humano .....	16
6.2 Determinación de proteína total y perfil de composición proteica .....	17
6.3 Evaluación del actividad biológica de factor VIII de coagulación en el crioprecipitado .....	18
6.4 Identificación de parámetros críticos para purificación de factor VIII de coagulación .....	19
7. Análisis de resultados.....	18
7.1 Rendimiento de crioprecipitado desde plasma humano.....	18
7.2 Proteína total y perfil de composición proteica por SDS-PAGE .....	19
7.3 Actividad bilógica de factor VIII de coagulación en el crioprecipitado .....	22
7.4 Parámetros críticos en el proceso de separación-purificación del FVIII de coagulación .....	25
8 Conclusiones .....	27
8.7 Bibliografía .....	28

### Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Esquema de transformaciones estructurales de FVIII durante el ciclo de vida. ....	14
<b>Figura 2</b> Línea de tendencia de rendimiento de crioprecipitado vs volumen total de plasma.. ....	19
<b>Figura 3</b> Línea de tendencia de rendimiento de crioprecipitado vs concentración de proteína total .....	22
<b>Figura 4</b> Análisis de composición proteica por SDS-PAGE.....	23

### Siglas, acrónimos y abreviaturas

<b>FVIII</b>	Factor VIII de coagulación
<b>FVW</b>	Factor de Von Willebrand
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>UI</b>	Unidades Internacionales de actividad biológica

## 1. Resumen

El crioprecipitado obtenido como subproducto del proceso de fraccionamiento de plasma humano en la compañía farmacéutica LifeFactors es una materia prima potencial para la obtención de proteínas de interés terapéutico. Entre otros, el crioprecipitado puede contener: FVIII de coagulación, factor de Von Willebrand, fibrinógeno, proteasas e inhibidores de proteasas. En el presente trabajo inicialmente se determinaron los valores de rendimiento de crioprecipitado, concentración de proteína total y análisis de composición proteica por electroforesis, bajo las condiciones estandarizadas de proceso en las primeras etapas de fraccionamiento de plasma humano. Los valores hallados fueron  $1.12 \pm 0.25$  % p/v para el rendimiento de crioprecipitado, y  $13.64 \pm 2.55$  g/dL para la concentración de proteína total en el crioprecipitado. Adicionalmente, y con base en un análisis densitométrico del gel de electroforesis, se determinó que el crioprecipitado contiene niveles significativamente altos de FVIII, en comparación con el criosobrenadante. A partir de los datos obtenidos de rendimiento de crioprecipitado y concentración de proteína total, se realizó un análisis estadístico para determinar si existe alguna correlación entre el volumen de plasma, la concentración de proteína y el rendimiento de crioprecipitado. Se encontró que hay correlación entre las variables concentración de proteína vs rendimiento de crioprecipitado; las variables rendimiento de crioprecipitado vs volumen de plasma no mostraron correlación. Finalmente, se analizó la actividad biológica del FVIII como valor determinante de la calidad del crioprecipitado como materia prima y se encontró un valor máximo de 4.92 UI/mL. Los niveles de actividad dejan ver la necesidad de mejorar las condiciones de obtención del crioprecipitado para que sea viable la obtención de FVIII con fines terapéuticos y a nivel comercial. Así, a partir de la literatura y del trabajo experimental desarrollado, se determinaron las variables críticas a tener en cuenta en el proceso de purificación del FVIII con miras a su comercialización.

*Palabras clave:* Plasma humano, medicamentos hemoderivados, crioprecipitado, Actividad Biológica, rendimientos, separación-purificación.

## 2. Abstract

Cryoprecipitate obtained as a by-product of the human plasma fractionation process at the pharmaceutical company LifeFactors is a potential raw material for obtaining proteins of therapeutic interest. Among others, the cryoprecipitate may contain: coagulation FVIII, Von Willebrand factor, fibrinogen, proteases and protease inhibitors. In the present work, the cryoprecipitate yield values, total protein concentration and analysis of protected composition by electrophoresis were determined, under standardized process conditions in the first stages of fractionation of human plasma. The values found were  $1.12 \pm 0.25\%$  w / v for the cryoprecipitate yield, and  $13.64 \pm 2.55$  g / dL for the total protein concentration in the cryoprecipitate. Furthermore, and based on a densitometric analysis of the electrophoresis gel, it was determined that the cryoprecipitate contains significantly higher levels of FVIII, compared to the cryosupernatant. From the data obtained on cryoprecipitate yield and total protein concentration, a statistical analysis was performed to determine if there is any correlation between plasma volume, protein concentration, and cryoprecipitate yield. It was found that there is a correlation between the variables protein concentration vs cryoprecipitate yield; the variables cryoprecipitate yield vs plasma volume did not correlate. Finally, the biological activity of FVIII was analyzed as a determining value of the quality of the cryoprecipitate as raw material and a maximum value of 4.92 IU / mL was found. The levels of activity reveal the need to improve the conditions for obtaining the cryoprecipitate so that it is viable to obtain FVIII for therapeutic purposes and at a commercial level. Thus, from the literature and the experimental work developed, the critical variables to be taken into account in the FVIII purification process were determined with a view to its commercialization.

*Keywords:* Plasma humano, medicamentos hemoderivados, crioprecipitado, Actividad Bilógica, rendimientos, separación-purificación.

### **3. Introducción**

LifeFactors es una empresa del sector biotecnológico que obtiene medicamentos hemoderivados a través de una tecnología patentada para el proceso de fraccionamiento de plasma. Los medicamentos hemoderivados que actualmente se obtienen en LifeFactors tienen más de 200 usos terapéuticos para enfermedades raras, crónicas, procedimientos de emergencia y quirúrgicos y medicina preventiva; algunos ejemplos son: Hepatitis, VIH, enfermedades autoinmunes, condiciones de hígado, incompatibilidad de RH, quemaduras, cirugías importantes, conmoción, condiciones cardiopulmonares, trasplante de órganos y trauma.

La materia prima principal para la obtención de los medicamentos hemoderivados en LifeFactors es el plasma humano, el cual es considerado por la organización mundial de la salud (OMS) como un recurso de interés social a partir del cual se pueden obtener diversos compuestos con fines terapéuticos. Los principales componentes del plasma humano son albúmina, inmunoglobulinas, factores de coagulación, proteínas fibrinolíticas, proteasas e inhibidores de proteasas (USP 31, 2008).

Una de las primeras etapas del proceso de fraccionamiento del plasma que se emplea en la compañía LifeFactors para la obtención de las proteínas Inmunoglobulina G (IgG) y albúmina, es la precipitación por influencia de la temperatura, la cual permite obtener una fracción de proteínas solubles e insolubles bajo condiciones controladas. La fracción soluble está compuesta principalmente por IgG y albúmina; la fracción insoluble, denominada crioprecipitado, está compuesta por otras proteínas en su forma insoluble.

El crioprecipitado obtenido de esa etapa de fraccionamiento se trata actualmente en LifeFactors como subproducto y para su disposición como desecho biológico se incinera. El crioprecipitado está compuesto por diversas proteínas de interés terapéutico como Factor VIII de coagulación, factor de Von Willebrand, fibrinógeno, proteasas e inhibidores de proteasas (Gupta,

2015). La proteína factor VIII de coagulación representa un producto de gran importancia a nivel terapéutico para el tratamiento de pacientes con hemofilia A y coagulopatías asociadas. A partir del uso eficiente de los recursos LifeFactors busca contribuir al desarrollo social y económico del país a través de la generación de nuevos productos. En este informe, y como primera fase de un proyecto macro que busca generar la tecnología necesaria para la obtención de Factor VIII de coagulación, se presentan los resultados de la caracterización del crioprecipitado obtenido del procesamiento de plasma humano, y la evaluación de su potencial como materia prima para la producción industrial de Factor VIII de coagulación y otras proteínas de interés farmacéutico.

Teniendo en cuenta los objetivos de la compañía farmacéutica LifeFactors, se planteó inicialmente evaluar la concentración de proteína total, perfil de composición proteica, el rendimiento de crioprecipitado a partir del plasma humano y la actividad biológica del factor VIII de coagulación. Estos aspectos se consideran determinantes en la estandarización y evaluación de la calidad del crioprecipitado como materia prima y determinan la viabilidad de su aprovechamiento para la purificación de factor VIII y de otros factores de coagulación. Finalmente, a partir de los resultados de caracterización y de investigaciones previas, se establecieron los aspectos críticos que se deben tener en cuenta para el proceso de purificación de factor VIII de coagulación a partir del crioprecipitado.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la viabilidad de utilización del crioprecipitado obtenido como subproducto del proceso de fraccionamiento del plasma humano en la compañía farmacéutica LifeFactors para su uso como materia prima en la obtención de proteínas de interés farmacéutico y establecer los aspectos críticos para el proceso de purificación del factor VIII de coagulación en base a los aspectos identificados a nivel experimental y en investigaciones previas.

### **4.2 Objetivos específicos**

Identificar para el crioprecipitado el rendimiento en masa partir del plasma humano, concentración de proteína total y el perfil de composición proteica como variables importantes en la caracterización de este subproducto como materia prima.

Evaluar los valores de actividad biológica de la proteína Factor VIII de coagulación presente en el crioprecipitado y, en función de los resultados, valorar su utilización como materia prima.

Determinar los aspectos críticos para el proceso de purificación del factor VIII de coagulación en base a los aspectos bioquímicos y fisicoquímicos identificados a nivel experimental y en base a la información consignada en la bibliografía.

## **5. Marco teórico**

### **5.1 Plasma Humano**

El plasma es la fracción acuosa de la sangre y constituye aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo total. Se caracteriza por ser, en condiciones normales, un fluido transparente de color amarillo claro con una composición de 7% de proteínas, 91% de agua y 0,9% de sales minerales. La albúmina representa la mayor parte de la proteína total del plasma (aproximadamente 70%). Las demás proteínas del plasma obtenidas del fraccionamiento incluyen inmunoglobulinas, factores de coagulación, proteínas fibrinolíticas, proteasas e inhibidores de proteasas. Estas proteínas constitutivas del plasma se pueden aislar basándose en las diversas características de cada proteína cuando se las somete a condiciones específicas de pH, temperatura, concentración iónica y concentración de algún solvente orgánico como etanol (USP 31, 2008).

El plasma humano ha sido declarado por la OMS como un recurso de interés público debido a la diversidad de productos que se pueden obtener para el tratamiento de enfermedades, y en esta misma dirección la Asamblea Mundial de la salud en la Resolución WHA63.12 insta a gestionar eficientemente y de forma sostenible el uso de este recurso con el fin de garantizar el suministro suficiente en todos los países de medicamentos hemoderivados como inmunoglobulinas y factores de coagulación y que son necesarios para prevenir y tratar diversas afecciones graves que se dan en todas las regiones del mundo. Pese a las anteriores declaraciones y en contraste con los objetivos de la OMS y la Asamblea Mundial de la Salud, de 171 países indagados 90 declararon para el año 2020 que importan todos los productos medicinales derivados del plasma para cubrir la demanda interna (OMS, 2020).

### **5.2 Medicamentos hemoderivados e indicaciones**

Son diversos los medicamentos biológicos que se pueden obtener en el proceso de fraccionamiento del plasma humano y que pueden ser empleados para un amplio rango de

enfermedades y afecciones. Los diferentes productos y sus potenciales usos terapéuticos se resumen en la tabla 1 (Curling, 2012). Actualmente estos productos se obtienen por diversas etapas de fraccionamiento. Los métodos usados son el método de Cohn; método de fraccionamiento tradicionalmente utilizado y el método de separación por dos fases acuosas; siendo este último el proceso de fraccionamiento patentado por la compañía LifeFactors. Pese a ser dos procesos muy diferentes, ambos comparten una de las primeras etapas de fraccionamiento la cual corresponde a la separación de una fracción de proteínas solubles de la parte de proteínas insoluble a unas condiciones de temperatura dadas. A la fracción de proteínas insolubles se le denomina crioprecipitado y está compuesto principalmente por fibrinógeno y factor VIII de coagulación (Ekiaby et al. 2010)

**Tabla 1**

*Usos terapéuticos para los medicamentos hemoderivados*

<b>Proteína</b>	<b>Principales Indicaciones</b>
<b>Albúmina</b>	
Suero de albúmina humana	Regulación de la circulación, mantenimiento de la presión osmótica, balance de fluidos posterior a traumas y como proteína de transporte
Inmunoglobulina G	tratamiento de Hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencias primarias como terapia de reemplazo, generación de inmunidad pasiva en individuos expuestos a enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias secundarias
<b>Factores de coagulación</b>	
Factor VIII	Hemofilia A
Complejo protrombina (PCC/PPSB)	Enfermedades complejas del hígado, reversión de derivados de Warfarina o Cumarina
Factor IX	Hemofilia B
Factor de Von Willebrand	Enfermedad de Von Willebrand
Factor XI	Hemofilia C

Fibrinógeno	Sellador de fibrina, medio de transporte para metabolitos y medicamentos y, como matriz para el cultivo de células
Factor XIII	Tratamiento de enfermedades huérfanas (Tendencia a sangrados)
Concentrado de complejo de protrombina (CCP) activado	Hemofilia con Inhibidores de FVIII Y FIX
<b>Inhibidores de proteasa</b>	
Alfa 1 antitripsina	Enfisema por daño pulmonar
Antitrombina	Trombosis por deficiencia de ATIII
Inhibidor C1	Angioedema hereditario
<b>Anticoagulantes</b>	
Proteína C	Deficiencia de proteína C / Trombosis

*Nota.* Adaptado de Curling (2012).

### 5.3 Factor VIII antihemofílico

El uso del Factor VIII de coagulación en el tratamiento de Hemofilia A se dio desde la implementación de la primera técnica de fraccionamiento de plasma humano, desarrollada por Edwin J. Cohn en el año 1950, en el cual se administraba a los pacientes el crioprecipitado y que se sabía contenía mayor concentración de factor antihemofílico en relación con el plasma sin fraccionar (Curling, 2012). A través de los años con las regulaciones en los procesos de manufactura en la búsqueda de la calidad, seguridad, identidad, pureza y eficacia de los medicamentos este tratamiento se ha hecho inviable. Otra de las desventajas asociadas es que para el tratamiento de un paciente con hemofilia A se requieren 1200 donaciones de sangre por año (Chapman, 2020).

El factor VIII de coagulación es una proteína plasmática, no enzimática e inestable principalmente en su forma activa y esencial para el proceso de coagulación de la sangre. Es sintetizado en el hígado por los hepatocitos; aunque se ha detectado RNAm en diferentes células y tejidos (Ro Sen & Casoni, 2000). El gen que codifica para el factor VIII está localizado en el

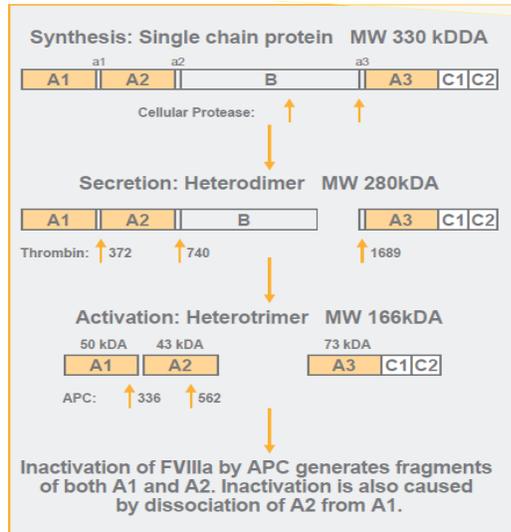
cromosoma X y comprende al menos 26 exones separados por 25 intrones no codificantes y el gen completo constituye aproximadamente el 0,1% del cromosoma. En su forma madura el factor VIII está conformado por 2332 aminoácidos y alcanza un peso de 330 KDa (Bertolini et al., 2012).

Uno de los aspectos que determina la compleja funcionalidad del factor VIII en la ruta de la coagulación, son los tres dominios por los cuales está conformado: dominios A, B Y C. El dominio A, el cual presenta tres repeticiones dentro de la molécula, dos de las cuales están compuestas por regiones acídicas y, que confieren estabilidad a la proteína y permiten la interacción con el factor IXa y el Factor de Von Willebrand (FVW). El dominio B es una región altamente glicosilada por unión de carbohidratos a residuos de asparagina y se desconoce funcionalidad dentro de la ruta de coagulación (Bertolini et al., 2012). El dominio C posee dos repeticiones que son importantes para la interacción con los fosfolípidos cargados negativamente (Ro Sen & Casoni, 2000). Los diferentes dominios y su secuencia en la cadena polipeptídica se representan en la figura 1.

Por otra parte, la proteína factor VIII presenta modificaciones en su estructura desde su síntesis en el hígado por las células hepáticas, hasta su activación e inactivación dentro de la ruta de la coagulación. La primera es una traslocación en el retículo endoplasmático para la eliminación de un péptido señal amino terminal. La segunda modificación es la escisión enzimática del dominio B, posterior a la cual se da la secreción del heterodímero conformado por una cadena pesada de 200 KDa y una cadena liviana de 80 KDa; unión dependiente del ion  $\text{Cu}^{1+}$  y de los puentes disulfuro entre los diferentes residuos de tirosina. Las diferentes formas conocidas en el ciclo de vida del factor VIII, desde la síntesis hasta la degradación en ciclo homeostático de la sangre se esquematizan en la figura 1 (Ro Sen & Casoni, 2000).

### Figura 1

Esquema de transformaciones estructurales de FVIII durante el ciclo de vida.



Nota. Adaptado de Ro Sen & Casoni, 2000.

Además de la complejidad intrínseca de la estructura molecular del factor VIII de coagulación, otro de los aspectos que determina su estabilidad y funcionalidad es la unión al factor de Von Willebrand (FVW), factor que desempeña la función de proteína chaperona, estabilizando y protegiendo el factor VIII durante la circulación en la sangre de la proteólisis inespecífica del plasma (Bertolini et al., 2012). El complejo entre el factor de Von Willebrand y el factor VIII circulan unidos por enlaces no covalentes y es uno de los complejos más grandes conocidos con una longitud máxima de 65 nm y un peso molecular de hasta 2000 KDa. FVW se une a la cadena ligera en las regiones amino- y carboxi-terminales. La presencia de VWF aumenta la vida media del factor VIII en circulación, evita la degradación y protege los sitios de unión importantes para preservar su funcionalidad como cofactor (Bertolini et al., 2012).

En relación con la degradación, FVW específicamente protege al factor VIII de la degradación por parte de la proteína C (APC) y de la activación por el Factor Xa. La reacción de activación se da en presencia de una superficie fosfolipídica que es proveída por las plaquetas activadas que se unen a los sitios funcionales de FVIII. También se da la activación de FVII por la proteína trombina y que no requiere superficies lipídicas para que se de la activación y posterior degradación.

#### **5.4 Actividad biológica del Factor VIII de coagulación**

Respecto a las técnicas utilizadas para la cuantificación de actividad biológica del factor VIII, se tienen dos enfoques: determinación de la potencia de productos concentrados en factor VIII como principio activo y la evaluación de actividad biológica de pacientes en laboratorios clínicos (Ph. Eur, 2019). Para esto, actualmente existen dos técnicas analíticas en la determinación de la actividad biológica del factor VIII: ensayo de coagulación en una o dos etapas y ensayo con sustrato cromogénico. Cada una de estas técnicas emplea diferentes principios de funcionamiento; principios basados a su vez en el entendimiento del ciclo de coagulación de la sangre, que se da a nivel fisiológico de forma espontánea con las condiciones necesarias para desencadenar la reacción.

Los ensayos de coagulación están basados en la determinación del tiempo de coagulación de una muestra diluida que contiene el factor a determinar, evaluado con un plasma deficitario de factor VIII de coagulación, pero que aporta el resto de los factores en niveles adecuados excepto el factor VIII. La reacción se da en presencia de fosfolípidos, superficies de cargas negativas y iones calcio (tiempo de tromboplastina parcial activada: aPTT). El tiempo de coagulación obtenido es inversamente proporcional a la actividad de FVIII presente en la muestra (Verbruggen et al., 2008). El ensayo de coagulación es un método de fácil implementación, pero presenta como desventaja las interferencias en los resultados obtenidos por lípidos, trazas de heparina y la sensibilidad de preactivación del factor (Barrowcliffe, 2003).

La potencia de productos concentrados en factor VIII como principio activo y la evaluación de actividad biológica para pacientes en laboratorios clínicos se mide en unidades internacionales. Una unidad internacional (UI) es equivalente a la cantidad de analito en un mililitro de pool de plasma normal (Bertolini et al., 2012).

### **5.5 Separación-purificación del factor VIII de coagulación**

Con el propósito de, por un lado, atender a la demanda de medicamentos contra la Hemofilia A y por otro obtenerlos atendiendo a las condiciones necesarias de pureza, a través de los años se han enfocado esfuerzos en los procesos de separación y purificación de la proteína Factor VIII de coagulación a partir del crioprecipitado. Estos procesos además de enfocarse en la obtención del Factor VIII como medicamento, han tenido en cuenta los aspectos críticos relacionados a la estabilidad de la proteína, procesos de inactivación viral, y rendimientos asociados en términos de la actividad biológica del Factor VIII como producto final. Las técnicas de separación que se han empleado son principalmente precipitaciones con agentes como PEG, alcohol-heparina, glicina, precipitación por temperatura y adsorción en hidróxido de aluminio. Respecto al proceso de purificación se han empleado técnicas como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de afinidad. Para los procesos de inactivación viral se han realizado principalmente procesos con solvente detergente y/o pasteurización (Curling, 2012).

## **6. Metodología**

### **6.1 Determinación del rendimiento de crioprecipitado a partir del plasma**

Los porcentajes de rendimiento en peso de crioprecipitado se determinaron para siete lotes de pool de plasma humano, cada lote conformado por 220 unidades de plasma. Los parámetros estándar para el proceso de criocentrifugación son 4000 rpm, -10°C y 20 minutos para la agitación, temperatura y tiempo respectivamente. El valor numérico de rendimiento (%p/v) se determinó a través de la relación entre el peso del crioprecipitado obtenido y el volumen total de pool de plasma.

### **6.2 Determinación de proteína total y perfil de composición proteica**

La cuantificación de proteína total se hizo mediante el método de Biuret; método utilizado en LifeFactors en diversas etapas del proceso de biomanufactura (USP 31, 2008). El procedimiento detallado se hizo de acuerdo con el procedimiento operativo estándar proporcionado por el

laboratorio de control de calidad de LifeFactors. Con base en los resultados obtenidos a partir de las muestras de plasma y crioprecipitado se hizo un análisis comparativo de los rendimientos calculados.

El perfil de composición proteica se realizó por electroforesis SDS PAGE, en condiciones no reductoras y en gel de corrida en concentración de 7.5% de acrilamida. La prueba se realizó para un lote independiente de pool de plasma (Lote 8), bajo los mismos parámetros de temperatura, tiempos de descongelación y centrifugación, tenidos en cuenta para los lotes 1 al 7, dispuestos para los análisis de correlación, rendimiento de crioprecipitado y concentración de proteína total y actividad biológica, pero con menor número de unidades de pool de plasma (10 unidades). Las muestras cargadas al gel fueron: pool de plasma, crioprecipitado y criosobrenadante. La comparación entre el perfil electroforético de las muestras permitió concluir acerca de la viabilidad del paso de fraccionamiento por criocentrifugación para la obtención del factor VIII de coagulación.

### **6.3 Evaluación de la actividad biológica del Factor VIII de coagulación en el crioprecipitado.**

En condiciones normales de fraccionamiento del plasma humano, se evalúa la actividad biológica de factor VIII de coagulación en el crioprecipitado, como mecanismo de control de calidad en proceso. Actualmente la actividad biológica del factor VIII se evalúa por determinación del tiempo de coagulación, el cual, como ya se mencionó anteriormente, es inversamente proporcional a la actividad biológica de factor VIII de coagulación. Esta técnica analítica ya ha sido estandarizada y debidamente validada

Los resultados se analizaron haciendo la conversión desde porcentajes normales de coagulación en pacientes, a unidades internacionales de actividad biológica. Los valores en unidades internacionales de actividad biológica son los valores de referencia utilizados para caracterización del crioprecipitado y determinación de potencia en concentrados de factores de coagulación. El factor de conversión desde porcentaje de coagulación a unidades internacionales es de 1 UI/mL.

## 6.4 Identificación de parámetros críticos de purificación del factor VIII de coagulación

La búsqueda en las bases bibliográficas se realizó teniendo en cuenta las investigaciones ejecutadas previamente para la purificación del factor VIII de coagulación a partir del crioprecipitado, e identificando los principales aspectos críticos que impactan el rendimiento y la actividad biológica del factor VIII como medicamento biológico. Finalmente se relacionaron los hallazgos bibliográficos con los análisis realizados para la etapa experimental de caracterización.

## 7. Resultados y análisis

### 7.1 Estimación del rendimiento de crioprecipitado a partir del pool de plasma

Como etapa inicial se consideró la formación del lote de pool de plasma a partir de las unidades dispuestas para fraccionamiento. Un lote de pool de plasma consta de 220 unidades de plasma, con un volumen que varía, para cada unidad, entre 200 y 300 mL; estos volúmenes individuales son dispuestos por los bancos de sangre que proveen el plasma a la compañía.

Para la formación del crioprecipitado se realizó la centrifugación del plasma, teniendo en cuenta los siguientes parámetros estandarizados mencionados en la metodología. Se realizó la extracción del criosobrenadante, y se recolectó el crioprecipitado de cada contenedor. Se tomaron las muestras de crioprecipitado en un tubo Falcon de 15 mL para su posterior análisis, antes de proceder a su almacenamiento a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ . Este procedimiento se repitió para cada uno de los lotes piloto de pool plasma dispuestos para fraccionamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

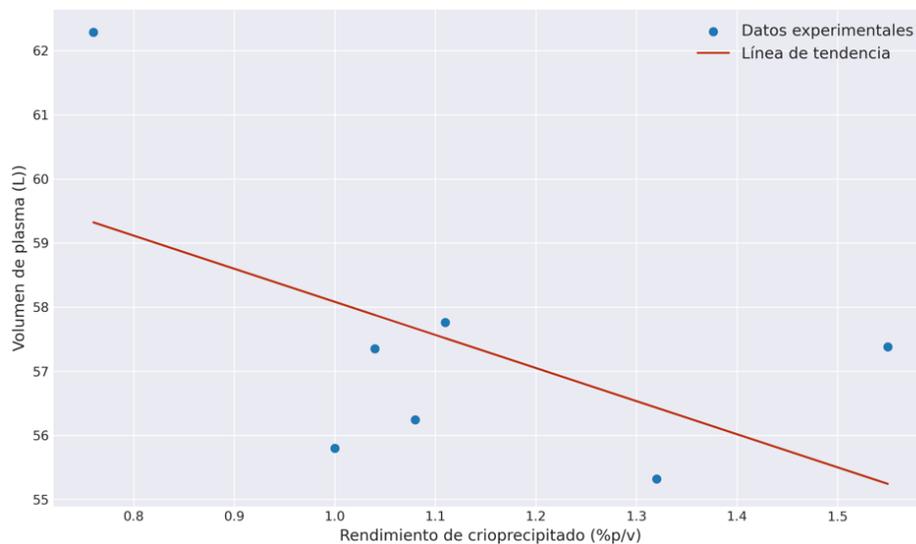
*Rendimientos de crioprecipitado obtenidos para cada lote de fraccionamiento.*

Lote de fraccionamiento	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
Volumen de plasma (L)	57.35	55.80	62.29	56.24	55.32	57.38	57.76
Peso de crioprecipitado obtenido (kg)	0.59	0.56	0.47	0.61	0.73	0.89	0.64
Rendimiento (% p/v)	1.04	1.00	0.76	1.08	1.32	1.55	1.11

Se calcularon los parámetros estadísticos de valor promedio y desviación estándar del rendimiento obteniendo 1.12% y 0.25%, respectivamente. Con el fin de determinar correlación (asociación o interdependencia) entre el rendimiento de crioprecipitado y volumen de plasma, se usó el método de correlación de Spearman para analizar los datos estadísticamente, dado que no se encontró una distribución normal (Sandoval, 2008). El coeficiente de correlación obtenido fue de -0.2143 y el valor del p-value fue de 0.6445. Estadísticamente se puede afirmar que no hay una correlación entre el volumen de plasma para fraccionamiento y la cantidad de crioprecipitado obtenido. Dicho de otra forma, los factores que afectan el rendimiento de crioprecipitado no son dependientes del volumen de plasma. La figura 2 muestra la línea de tendencia y dispersión de los datos previo a la aplicación del análisis de correlación para los valores de rendimiento de crioprecipitado vs volumen de plasma, de cada lote analizado.

## Figura 2

*Línea de tendencia de rendimiento de crioprecipitado vs volumen total de plasma.*



*Nota.* Elaboración propia

## 7.2 Proteína total y perfil de composición proteica por SDS PAGE

Para el crioprecipitado obtenido del proceso de criocentrifugación se determinó la concentración de proteína total por el método de Biuret. Se tomaron alícuotas de crioprecipitado de aproximadamente 50 mg, las cuales posteriormente se disolvieron en 1 mL de solución salina

al 0.9%. Finalmente, para el análisis de la muestra se procedió atendiendo al protocolo de cuantificación de proteína total por el método de Biuret, estandarizado en el laboratorio de control de calidad. El valor de concentración de proteína obtenido fue de  $13.64 \pm 2.55$  g/dL. Los resultados obtenidos para cada lote se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Rendimientos de proteína total calculados para cada lote de fraccionamiento.*

Lote de fraccionamiento	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
Rendimiento (% p/v)	1.04	1.00	0.76	1.08	1.32	1.55	1.11
Proteína total %	11.90	12.90	9.00	15.20	15.80	16.08	14.60

A partir de los resultados se observó que valores altos de rendimiento de crioprecipitado, implican valores mayores de rendimiento en concentración de proteína total. Por tanto, si se logra optimizar los parámetros que favorecen la formación del crioprecipitado en futuras investigaciones, se podrá tener una materia prima con mayor proporción de proteínas de interés y, por ende, mejorar el rendimiento en la obtención de diversos productos finales.

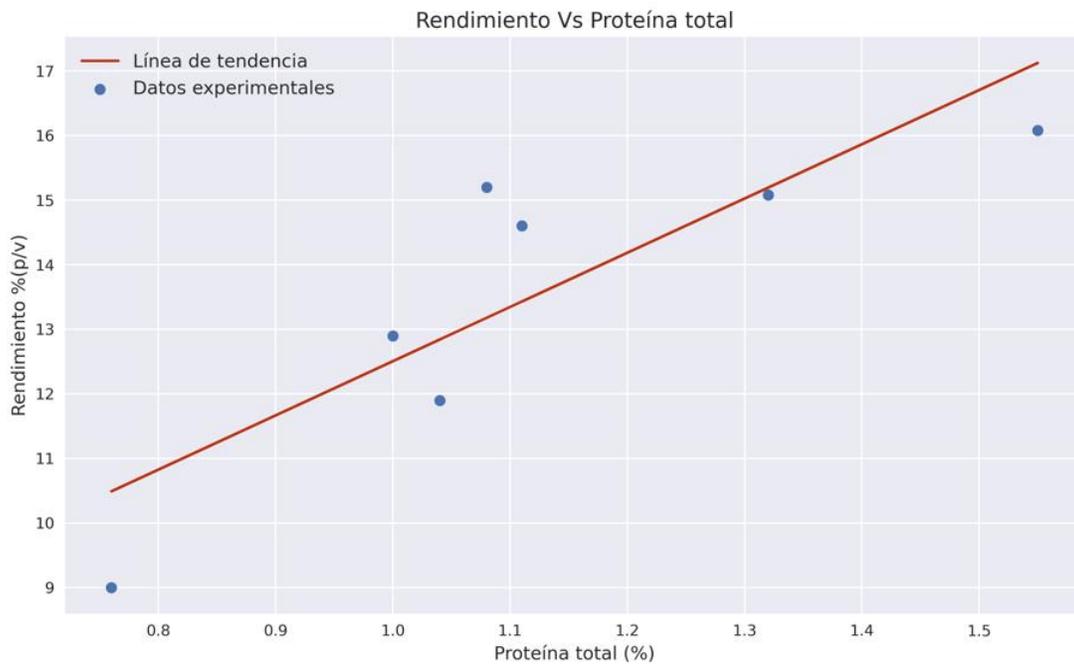
En la Figura 3 se ilustran los datos de rendimiento de crioprecipitado vs porcentaje de proteína total. De forma cualitativa se observa una tendencia lineal de los datos, lo que inicialmente dio indicio de correlación entre el rendimiento y el porcentaje de proteína total, en el crioprecipitado. Para validar estadísticamente la hipótesis de que, para valores mayores de rendimiento de crioprecipitado, mayor concentración de proteína, se hizo el análisis de correlación de Pearson. Se determinó un coeficiente de correlación de 0.8863 y un p-value de 0.0079, con lo que se concluyó que hay una asociación y/o interdependencia entre las dos variables analizadas. Se puede inferir que, a mayores rendimientos obtenidos de crioprecipitado, el mismo tendrá mayor concentración de proteína, con lo que se puede obtener un crioprecipitado de mejores características en cuanto a composición para la obtención de las proteínas de interés.

Green et al., 2018, reportan que los componentes del plasma que son susceptibles a la precipitación, en el proceso de descongelamiento bajo condiciones de temperatura controladas, son: factor VIII, factor de Von Willebrand, factor XIII, fibronectina y fibrinógeno. Teniendo en cuenta que la importancia del crioprecipitado como materia prima se da por su alto contenido de

proteínas, es posible mejorar u optimizar la calidad del crioprecipitado (como materia prima para la obtención de proteínas terapéuticas), como tema central de futuras investigaciones.

### Figura 3

*Línea de tendencia de rendimiento de crioprecipitado vs concentración total de plasma.*

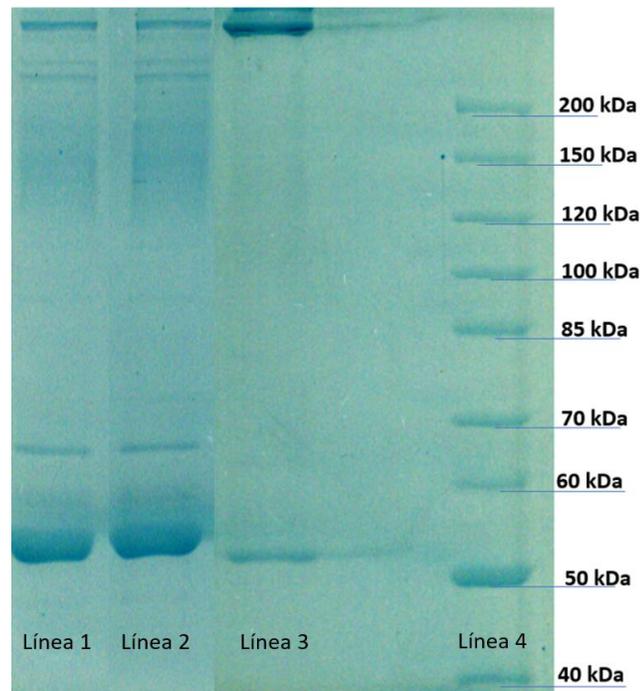


*Nota.* Elaboración propia

Por otra parte, el perfil de composición proteica, ilustrado en la Figura 4, permitió determinar de forma cualitativa que la mayor proporción en composición proteica del crioprecipitado (Linea 3) está dada por proteínas de alto peso molecular (peso molecular > 200 KDa), entre las que se encuentra principalmente el factor VIII de coagulación. Para el factor VIII de coagulación el peso molecular puede variar desde 170 hasta 290 KDa (Curling, 2012) y para el fibrinógeno el PM es de 340 KDa (Metwalli, 2011).

**Figura 4**

Análisis de composición proteica por SDS-PAGE (7.5%, acrilamida). Línea 1: Pool de plasma, Línea 2: Criosobrenadante, Línea 3: Crioprecipitado, Línea 4: marcador de peso molecular.



*Nota.* Elaboración propia

Los contrastes entre los análisis cualitativos por electroforesis del pool de plasma, crioprecipitado y criosobrenadante, también llevan a concluir que la etapa de fraccionamiento por criocentrifugación permite obtener una buena separación del factor VIII de coagulación de las proteínas Albúmina (PM= 69 KDa) e Inmunoglobulina G (PM = 150 KDa), que se purifican actualmente en LifeFactors a partir del criosobrenadante.

### 7.3 Actividad biológica de factor VIII de coagulación

Los valores de actividad biológica se evaluaron para lotes 5, 6 y 7 por disponibilidad de la técnica analítica. Determinar la actividad biológica en el crioprecipitado como subproducto del proceso de fraccionamiento del plasma humano es necesario dentro del control de calidad en proceso, ya que

permiten determinar de forma indirecta si el plasma del cual proviene el crioprecipitado cuenta con una actividad de coagulación aceptable. Además, la actividad biológica de factor VIII representa un aspecto crítico en la caracterización de un lote de crioprecipitado para certificar su calidad como materia prima, principalmente si uno de los productos de interés es el factor VIII de coagulación para el tratamiento de la hemofilia A.

Los valores obtenidos de actividad biológica en los lotes 5, 6 y 7 son de 204%, 359% y 492%, respectivamente. Para estos valores se hace necesario realizar la respectiva conversión a unidades internacionales, ya que además de permitir comparar con los valores estandarizados para el control de calidad del crioprecipitado, si se quiere realizar el proceso de separación-purificación, se debe tener como punto final valores de pureza y estabilidad en unidades internacionales (Invima, 2015).

Pese a que estos valores provienen de tres lotes en los que no se tienen condiciones muy diferentes de rendimiento de crioprecipitado y de porcentaje de proteína total, se puede observar una variabilidad alta respecto a la actividad biológica. De esta manera, si se determina como punto de comparación el coeficiente de variación para el rendimiento del crioprecipitado y la composición proteica, se obtienen unos valores de 16,82% y 5,07%. Estos valores difieren significativamente de un valor del coeficiente de variación para la actividad biológica del factor VIII de coagulación, que corresponde a un 41%.

En función de los resultados anteriores es válido afirmar que la actividad biológica del factor VIII de coagulación es independiente de la concentración de proteína total y el rendimiento del crioprecipitado obtenido desde el plasma, como también fue reportado por Subramaniyan et al., 2017. Sin embargo, la determinación y estandarización de los rendimientos de crioprecipitado y de proteína total son estrictamente necesarios para el proceso de purificación de las proteínas de interés.

Respecto a la variabilidad, pese a que las condiciones de proceso de los lotes se dan en condiciones semejantes, Bach et al, 2020 reportan las condiciones de recolección y descongelamiento del plasma como parámetros críticos para estandarizar y caracterizar el crioprecipitado. Particularmente, las variables temperatura y tiempo de descongelamiento del plasma son de especial interés para la obtención del crioprecipitado con los atributos deseados, debido a la inestabilidad de los factores de coagulación a las diferentes condiciones de temperatura bajo las cuales se mantienen durante los procesos productivos y de almacenamiento.

Para evaluar la viabilidad de los lotes de crioprecipitado obtenidos, principalmente para la obtención de factor VIII de coagulación, se hizo necesario comparar los valores de actividad biológica obtenidos con los valores reportados para los requerimientos de calidad necesarios. Los valores estándares de actividad biológica se reportan en unidades internacionales, por tanto, para su comparación y evaluación se realizó la conversión desde porcentajes a unidades internacionales, que es la unidad reportada en los prospectos de los medicamentos con el factor VIII como principio activo. Los valores de actividad en porcentaje son comúnmente los valores que se reportan clínicamente para determinar el estado homeostático de un paciente.

El método coagulativo bajo el cual se determinó la actividad biológica de factor VIII en el crioprecipitado, especifica una actividad para un paciente normal en un rango de 70 a 150% (Fickenscher, 1998; Ovanesov et al., 2020). Inicialmente, de forma cualitativa se puede establecer un valor significativo de actividad biológica para los tres lotes evaluados, ya que se encuentran muy por encima del valor máximo normal de referencia especificado en el inserto del método. Por otro lado, si se tiene en cuenta que el método evalúa las condiciones normales o deficientes del factor de coagulación de un solo paciente, se debe tener en cuenta que el crioprecipitado proviene de un pool de plasma de 220 donaciones, lo cual se concluyó ser un valor muy por debajo de lo esperado y se hace inviable un proceso de purificación de factor VIII de coagulación desde esta materia prima.

Para concluir de forma cuantitativa acerca de la viabilidad o no del crioprecipitado obtenido bajo condiciones normales del proceso de fraccionamiento del plasma humano, se realizó la conversión de los valores de porcentaje a unidades internacionales de actividad biológica. El factor de conversión especifica que un 100% de actividad de factor VIII de coagulación equivale a 1 UI/mL (Ro Sen & Casoni, 2000). Para el lote 1, el valor de actividad biológica en unidades internacionales equivale a 2.04 UI/mL; para el lote 2, 3.59 UI/mL y para el lote 3, 4.92 UI/mL.

Finalmente, se tuvieron en cuenta como punto de referencia las especificaciones establecidas por Green et al., 2018, para un crioprecipitado apto para transfusión a pacientes con tratamiento profiláctico contra hemofilia A. Un valor aproximado que establece el servicio de transfusión de sangre del Reino Unido (UKBTS, por sus siglas en inglés) es de 10.61 UI/mL de actividad de factor VIII. Los valores se calcularon de acuerdo con las particularidades de cada lote: número de unidades de plasma para fraccionamiento y volumen de cada unidad de plasma.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que los valores de actividad biológica de factor VIII, en los tres lotes de crioprecipitado, no se ajustan al requerimiento mínimo para ser aprovechado como materia prima en la obtención de factores de coagulación y de forma particular para la purificación de factor VIII de coagulación.

#### **7.4 Parámetros críticos en el proceso de separación-purificación del factor VIII de coagulación**

Como se mencionó anteriormente, la concentración de factor VIII determina un aspecto crítico de la purificación, ya que en cada etapa necesariamente se da la pérdida de un porcentaje de la proteína de interés y/o de la actividad biológica de la misma. La concentración de factor VIII en el plasma es 0.3 mg/L (Metwalli, 2011) valor que no supera un porcentaje del 0.002% de composición total del plasma. Sumado a la baja concentración, se debe tener en cuenta que también hay pérdida en el paso de criocentrifugación como primera etapa de separación.

En un orden lógico para un proceso de separación-purificación, el primer aspecto para tener en cuenta es el estado de agregación del crioprecipitado, el cual tiene consistencia semisólida (como se observó para los distintos lotes), tener una consistencia variable respecto al tiempo de almacenamiento obteniendo una consistencia de mayor solidez. Se debe tener en cuenta un paso de disolución. Debido a la labilidad de las proteínas en el crioprecipitado la solución de dilución debe preservar la integridad de estas en el tiempo y durante las etapas de purificación consiguientes. Para este proceso se reporta (en estudios previos) el uso de una solución de cloruro de sodio al 0.9 %, ya que esta concentración simula las condiciones en las cuales se encuentran las proteínas en condiciones fisiológicas y favorece la estabilidad (Callum et al., 2011).

Para los pasos intermedios de purificación, un aspecto significativamente crítico son los pasos de inactivación viral seleccionados. Sumado a la inestabilidad por diversas causas del factor VIII de coagulación (Wang et al., 2003), los procesos utilizados para la inactivación viral influyen significativamente reduciendo en una proporción de hasta el 40% la actividad biológica del factor VIII de coagulación (Green et al., 2018). Algunos de los métodos tradicionalmente utilizados son la pasteurización, tratamiento con calor seco, tratamiento con solvente detergente y nanofiltración. De estos métodos de inactivación viral, todos son reportados como utilizados en varios de los medicamentos biológicos en el mercado con factor VIII de coagulación como principio activo (Bertolini et al., 2012). El aspecto que se debería evaluar en este punto para determinar la viabilidad

del uso de cualquiera de esos métodos son los aditivos necesarios para conservar la integridad de la proteína.

Respecto a los pasos cromatográficos, estos son determinantes para obtener un producto de alta pureza y con la actividad biológica necesaria de acuerdo con las especificaciones de las farmacopeas. Se ha utilizado principalmente cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de exclusión molecular (Cheng et al., 2010; Ahn et al., 2020). De estas se pudo determinar en base a comparación entre algunos medicamentos disponibles en el mercado que el medicamento Monoclate P de la farmacéutica CSL Behring presenta una actividad biológica significativamente mayor respecto al medicamento que le sigue en orden de mayor a menor actividad biológica. La actividad reportada para Monoclate P utilizando cromatografía de inmunoafinidad es mayor a 3000 UI/mg de proteína. El segundo medicamento que reporta la mayor actividad es Bariate P de la farmacéutica CSL Behring con una actividad específica de 170 UI/mg de proteína, utilizando cromatografía de intercambio iónico (Bertolini et al., 2012).

Finalmente, se deben tener en cuenta las restricciones y especificaciones consignadas tanto en la farmacopea europea como en la estadounidense para los medicamentos biológicos contra la hemofilia A, con factor VIII de coagulación como principio activo. La potencia del preparado proteico no debe ser menor a 20 UI posterior al proceso de reconstitución que es normalmente en 10 mL de solución, equivalente a 2 UI/mL. Si se compara con la actividad biológica de FVIII máxima en una de las muestras de crioprecipitado analizadas en este estudio (4.92 UI/mL), se observa que indiscutiblemente se requiere mejorar las condiciones de actividad en el crioprecipitado como materia prima. Si en cada etapa del proceso de purificación se incluye una pérdida aproximada del 10% de proteína sumado a una pérdida de hasta el 40% de actividad biológica en el paso de inactivación viral no se podrá cumplir con las especificaciones de las farmacopeas. Respecto a la actividad específica no debe ser menor a 1 UI/mg de proteína total antes de la adición de cualquier estabilizante. Para el caso de la muestra de crioprecipitado con mayor actividad específica se obtuvo un valor de 0.055 UI/mg de proteína total, por lo que en una condición hipotética donde no se dé pérdida de actividad biológica se debería obtener un factor de purificación de hasta 18 veces a partir del crioprecipitado como materia prima. En conclusión, de las especificaciones de identidad del medicamento consignadas en las farmacopeas depende la selección y validación de las etapas productivas y, por tanto, la posterior aprobación para la

comercialización del medicamento biológico por las entidades regulatorias (USP 31, 2008; Ph. Eur, 2020).

## **8. Conclusiones**

A partir de los datos de volúmenes de plasma de fraccionamiento, rendimiento de crioprecipitado y concentración de proteína total en el crioprecipitado se pudo demostrar por análisis estadístico la asociación o interrelación existente entre la concentración de proteína total y el rendimiento de crioprecipitado. Al contrario, también se observó la falta de correlación entre el rendimiento de crioprecipitado obtenido respecto al volumen de fraccionamiento de plasma. Los valores numéricos y la relación entre estas variables suponen ser de interés para los procesos de separación purificación de proteínas desde el crioprecipitado como materia prima.

Por análisis del perfil de composición proteica del crioprecipitado se validó la presencia del factor VIII de coagulación. Por análisis densitométrico, se pudo observar una alta concentración del factor VIII de coagulación respecto al pool de plasma y al criosobrenadante. De esta forma, se puede concluir de la viabilidad de la criocentrifugación como operación unitaria para el proceso de separación del factor VIII de coagulación de las proteínas Albúmina Humana e Inmunoglobulina G.

Los valores de actividad biológica de factor VIII de coagulación encontrados permitieron determinar, con base en los reportes bibliográficos y en las especificaciones de control de calidad para el crioprecipitado como materia prima, la baja actividad biológica de factor VIII de coagulación y por tanto la necesidad de validar el plasma como materia prima para obtención de crioprecipitado con la actividad biológica de factor VIII mínima requerida.

A partir de la literatura y de los resultados experimentales se identificaron los aspectos críticos que se deberán tener en cuenta para el proceso de separación-purificación del factor VIII de coagulación y que serán determinantes para la obtención del medicamento contra la Hemofilia A con el factor VIII de coagulación como principio activo y con la identidad, eficacia y calidad requeridas.

## 9. Bibliografía

- Ahn, J. W., Chang, E. S., Jung, Y. J., Kim, S. R., Seong, B. L., & Ha, S. H. (2020). Characterization of the von Willebrand factor/factor VIII complex produced by a novel purification process. *Archives of pharmacal research*, 43(7), 714-723.
- Bach, J., Haubelt, H., & Hellstern, P. (2010). Sources of variation in factor VIII, von Willebrand factor and fibrinogen measurements: implications for detecting deficiencies and increased plasma levels. *Thrombosis research*, 126(3), e188-e195.
- Barrowcliffe, T. W. (2003). Standardization of FVIII & FIX assays. *Haemophilia*, 9(4), 397-402
- Bertolini, J., Goss, N., & Curling, J. (2012). *Production of plasma proteins for therapeutic use*. John Wiley & Sons.
- Camacho-Sandoval, J. Asociación entre variables cuantitativas: análisis de correlación. *Acta Medic Costarric* 2008; 50: 94-96.
- Callum, J. L., Karkouti, K., & Lin, Y. (2009). Cryoprecipitate: the current state of knowledge. *Transfusion medicine reviews*, 23(3), 177-188.
- Castagnino, J. M. (2000). Electroforesis capilar. *Bioquimia*, 25(1), 13-32. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/576/57611797003.pdf>
- Chapman, M. Patients with Bleeding Disorders Given Global Voice in PPTA Awareness Campaign. 2020. Recuperado de <https://hemophilianewstoday.com/2020/03/04/patients-bleeding-disorders-given-global-platform-awareness-campaign/>
- Cheng, E., Jinzenji, D., Lorthiois, A. P. A. A., de Carvalho, R. R., Tanaka-Azevedo, A. M., Raw, I., & Martins, E. A. L. (2010). Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. *Biotechnology letters*, 32(9), 1207-1214.
- El-Ekiaby, M., Sayed, M. A., Caron, C., Burnouf, S., El-Sharkawy, N., Goubran, H., ... & Burnouf, T. (2010). Solvent-detergent filtered (S/D-F) fresh frozen plasma and cryoprecipitate minipools prepared in a newly designed integral disposable processing bag system. *Transfusion medicine*, 20(1), 48-61.
- European pharmacopoeia – 10th edition. (2020)
- Farmacopea Europea, 6a. Edición 2008. European Pharmacopeia. Recuperado de <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/voncento>
- Fickenscher K. Analysis of individual coagulation factors. In: Thomas L, ed. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st Ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 607-9.
- Green, L., Bolton-Maggs, P., Beattie, C., Cardigan, R., Kallis, Y., Stanworth, S. J., ... & Zahra, S. (2018). British Society of Haematology Guidelines on the spectrum of fresh frozen plasma

- and cryoprecipitate products: their handling and use in various patient groups in the absence of major bleeding. *Br J Haematol*, 181(1), 54-67.
- Gupta, D. Handbook on component preparation for BCSU. 2015. (26 de mayo de 2015).
- Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos INVIMA (2015)
- Metwalli, N. E. (2011). Who Recommendations for the production, control, and regulation of Human Plasma for Fractionation. METWALLI, N. E. (2011).
- Organización Mundial de la salud. Disponibilidad y seguridad de la sangre a nivel mundial (10 de junio de 2020). Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>.
- Ovanesov, M. V., Williams, S. C., Nübling, C. M., Dodt, J., Hilger, A., Maryuningsih, Y., & Gray, E. (2020). Summary of the WHO hearing on the development of product-specific reference materials for coagulation factor VIII and factor IX products. *Biologicals*, 67, 88-93
- Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I. (2008). USP 31. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 26. Formulario nacional. United States Pharmacopeial Convention. Rockville
- Rosen, S. (1984). Assay of factor VIII: C with a chromogenic substrate. *Scandinavian Journal of Haematology*, 33(S40), 139-145. Recuperado de <https://diapharma.com/product/hemostasis/coagulation-kits/factor-viii-fviii/chromogenix-coatest-sp-factor-viii/>
- Ro Sen, S., & Casoni Chiarion, M. (2000). Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates.
- Subramaniyan, R., Marwaha, N., Jain, A., & Ahluwalia, J. (2017). Factors affecting the quality of cryoprecipitate. *Asian journal of transfusion science*, 11(1), 33.
- Verbruggen, B., Meijer, P., Novakova, I., & Van Heerde, W. (2008). Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia*, 14, 76-82.
- Wang, W., Wang, Y. J., & Kelner, D. N. (2003). Coagulation factor VIII: structure and stability. *International journal of pharmaceutics*, 259(1-2), 1-15.