

CAPITULO 13

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Pablo Quiroga

Introducción

En general, los sistemas de control de calidad para productos biofarmacéuticos son muy similares a los utilizados rutinariamente en productos farmacéuticos de bajo peso molecular, la diferencia fundamental entre estos sistemas de control de calidad para productos obtenidos por biotecnología y productos farmacéuticos tradicionales reside en el tipo de métodos que se emplean para determinar la identidad del producto, su uniformidad, su pureza y el perfil de impurezas. La complejidad de los sistemas de control de calidad para los productos biofarmacéuticos está relacionada con el tamaño y con las características estructurales del producto y el proceso de fabricación.

En este capítulo desarrollaremos los fundamentos y principios básicos de los Ensayos Biológicos o Bioensayos los cuales constituyen una parte integral de la evaluación de la calidad de productos de origen biológico y son utilizados comúnmente para la estimación de la potencia de un principio activo.

Biofarmacéuticos/Bioterapéuticos

Agentes terapéuticos producidos a partir de organismos vivos o sus productos (incluyendo tecnología ADN recombinante, procesos de manufactura biotecnológica, y síntesis química utilizando nucleótidos o aminoácidos) e incluye los anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, péptidos, factores de reemplazo, proteínas de fusión, oligonucleótidos, y preparaciones de ADN para terapia génica. Esta clase de agentes terapéuticos ha tenido un gran crecimiento en estos últimos años y han sido y son utilizados para un

amplio espectro de indicaciones terapéuticas que van desde la oncología y enfermedades autoinmunes hasta enfermedades huérfanas y de origen genético. Si bien las vacunas y otros productos biológicos no están incluidos en la definición anterior, la determinación de su potencia relativa es realizada aplicando los ensayos biológicos o bioensayos.

Ensayos Biológicos o Bioensayos: se describen para la valoración de ciertas sustancias y preparaciones cuya potencia no puede garantizarse adecuadamente mediante análisis químico o físico. El principio a aplicar, siempre que sea posible, a lo largo de estos ensayos, es comparar una preparación desconocida con una preparación patrón y determinar que cantidad de la sustancia, que se está examinando, produce el mismo efecto biológico que una cantidad dada, *la Unidad*, de la preparación patrón / estándar de referencia. Es una condición esencial, que los ensayos sobre la preparación estándar y sobre la sustancia a examinar se realicen al mismo tiempo y bajo condiciones tan idénticas como sea posible (Farmacopea Europea Suplemento 2000, capítulo 5.3 Statistical Analysis of Results of Biological Assay and Tests). Estos ensayos se diferencian de los ensayos físicoquímicos por su dependencia de un sustrato biológico (ej. Animales, células vivas, o complejos funcionales de receptores blancos).

Estos ensayos constituyen herramientas fundamentales en la determinación de la potencia y el aseguramiento de la actividad de proteínas, vacunas, terapia celular, terapia génica, y mezclas complejas, los mismos juegan un rol muy importante en el monitoreo de la estabilidad de los productos biofarmacéuticos. Por lo tanto las aplicaciones comunes de los ensayos biológicos incluyen la caracterización de los productos biológicos y biotecnológicos, liberación de lotes productivos y estudios de estabilidad.

Como hemos visto en la definición de ensayo biológico los mismos son ensayos relativos por lo cual debemos contar con materiales biológicos de referencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS / WHO) provee dichos materiales referencia (al igual que la Farmacopea de Estados Unidos-USP y la European Pharmacopoeia-EP), los cuales sirven como fuente de referencia para una actividad biológica definida la cual es expresada internacionalmente

como *Unidad*. El concepto de la utilización de preparaciones bien caracterizadas como referencia contra los cuales diferentes lotes de productos biológicos son valorados, continua siendo fundamental para asegurar la calidad de los productos biológicos y también para demostrar la consistencia en la producción de los mismos, los cuales son esenciales para el establecimiento de apropiados niveles clínicos de dosificación.

La OMS en su WHO Technical Report Series, No. 932, 2006- Anexo 2 define a *estándar de referencia* como “*materiales que son utilizados como calibradores en los ensayos*”. La OMS provee estándar de referencia para un rango de sustancias las cuales son consideradas como “biológicos”: sustancias las cuales no pueden ser completamente caracterizadas solamente por métodos fisicoquímicos, y requieren de esta manera la utilización/aplicación de alguna forma de ensayo biológico. Los estándar de referencia son provistos para la calibración de los ensayos basados en la interacción de componentes de sistemas vivos, incluyendo aquellos basados en la función biológica, reactividad inmunológica, activación y amplificación enzimática y actúan como estándares globales de “orden superior” para la medición de los analitos que ellos definen. Para la liberación de lotes productivos, los bioensayos son utilizados para evaluar la potencia del principio activo antes de la liberación del producto biofarmacéutico, vacunas, etc. En estos se debe establecer una especificación de liberación, mediante la definición de un rango de valores de potencia que son aceptables para el producto en sus condiciones de almacenamiento / conservación declaradas hasta su fecha de vencimiento.

Los Bioensayos pueden ser divididos en:

Bioensayos in vivo. (animales)

Bioensayos ex vivo.

Bioensayos in vitro (células)

Bioensayos in vivo: los ensayos de potencia in vivo son bioensayos en los cuales un número de diluciones tanto del estándar como del material test son administradas a los animales, para la estimación de la potencia se utiliza una relación *Dosis vs. Respuesta*. Con la aparición de líneas celulares específicas para mecanismo de acción fisiológico propuesto, la utilización de animales para

la determinación de la potencia ha sido ampliamente disminuida. Cuando la actividad in vitro no está fuertemente asociada con la actividad in vivo, es necesario recurrir a una combinación de ensayos in vitro basados en células y un adecuado método fisicoquímico para poder sustituir un bioensayo in vivo.

Bioensayos ex vivo: en este tipo de bioensayos células o tejidos obtenidos de animales o donantes humanos pueden ser cultivados en el laboratorio y utilizados para la valoración de una preparación Desconocida.

Bioensayos in vitro (basados en células): estos bioensayos utilizan clones de líneas celulares que responden a un ligando o agente infeccioso específico y pueden ser utilizados como ensayos de liberación de lotes de bioterapéuticos. Estas líneas celulares pueden derivar de tumores, líneas celulares de ingeniería transfectadas con un receptor apropiado, entre otros. Los avances en la tecnología ADN recombinante y el entendimiento de los mecanismos de señalización celular han permitido la generación de líneas celulares de ingeniería las cuales mejoran la respuesta y aumentan la estabilidad de las mismas. Las respuestas incluyen: proliferación celular, muerte celular, actividad antiviral, diferenciación, secreción de citoquinas/mediadores y activación enzimática.

Teniendo en cuenta lo indicado en el Tópico Q6B de ICH no siempre es necesario en el ensayo biológico reproducir exactamente la actividad Biológica del producto en una situación clínica, pero deberá previamente establecerse en estudios farmacodinámicos o clínicos una correlación entre la respuesta clínica esperada y la actividad evaluada en el ensayo biológico.

¿Cuándo debemos recurrir a un ensayo biológico?

- ◆ Cuando la droga no puede ser valorada por procedimientos químicos o físicos por no presentar características que lo hagan posible
- ◆ Cuando los métodos químicos o físicos no son capaces de distinguir diferencias estructurales de la droga, que sin embargo repercuten considerablemente en su actividad biológica.

- ◆ Cuando la presencia de otros compuestos interfiere en las valoraciones físicas o químicas.
- ◆ Cuando el principio activo se encuentra en una concentración tan pequeña que no es posible detectarlo por ningún método físico o químico.

Los bioensayos se basan en la relación Dosis/Concentración vs. Respuesta

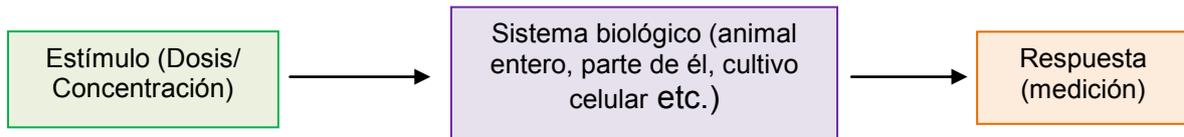


Figura 1. Esquema relación dosis/concentración- respuesta

Una vez obtenida la respuesta se gráfica la *dosis/concentración* vs la *Respuesta media de "n" determinaciones*, la respuesta (Y) puede ser directamente la respuesta medida o una transformación de la misma y en el caso de la dosis o concentración (X) se utiliza fundamentalmente la transformación logarítmica, diferentes funciones matemáticas pueden ser utilizadas para describir de manera adecuada y correcta la relación dosis/ concentración- respuesta tal que los valores de Y de X satisfagan la hipótesis de linealidad $Y = a + bX$.

Clasificación de los Ensayos Biológicos

Los ensayos biológicos los podemos clasificar en: *Ensayos Directos* y *Ensayos Indirectos*:

Ensayo Directo: es aquel en el cual se mide la dosis de la preparación Estándar y Desconocido que producen una respuesta biológica específica y bien definida, la respuesta es fija, y la dosis variable llamada *dosis umbral*. El cociente entre la dosis umbral media para la preparación Estándar y la dosis umbral media para la preparación Test proporciona directamente la potencia. La dosis umbral se determina dos veces en cada animal, una con el Estándar y

la otra con el Desconocido, posteriormente cada dosis se convierte en su logaritmo, se determina la diferencia entre ambos logaritmos de las dosis respectivas para cada animal y se calcula la potencia a partir del promedio de estas diferencias. Los ensayos directos no siempre son posibles, el mayor inconveniente está en la determinación exacta de la dosis que produce respuesta biológica específica, a continuación se describe en ejemplo de este tipo de ensayo.

Bioensayo in vivo. Valoración de Adrenalina de F.A. VI ed.

Procedimiento

Se preparan las soluciones Estándar de adrenalina y de la solución Desconocida en solución al 0.9 % de ClNa en agua para inyectable (sol. Fisiológica), se anestesia el animal con solución de cloralosa 8%, se aísla la carótida y se le conecta un manómetro de Hg el cual permite registrar la presión arterial, posteriormente se le inyecta por vena un volumen de la solución patrón de adrenalina hasta obtener la respuesta indicada, cuando la presión vuelve a su nivel inicial se repite la inyección de la misma dosis, deberá obtenerse en esta y 2-3 inyecciones sucesivas la misma respuesta. Una vez fijada la dosis del patrón que produce un efecto constante se determina, procediendo de forma análoga, la dosis de la solución a valorar que produzca la misma respuesta, posteriormente se procede a inyectar nuevamente la solución de adrenalina Estándar, con el objetivo de comprobar que la sensibilidad del animal no ha variado. De la comparación de las dosis umbral de ambas soluciones transformadas a logaritmo, se calcula la *Potencia Relativa (PR)* de la sustancia Desconocida, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$PR = DE/DD$ aplicando la transformación logarítmica de los valores de dosis,

$\log PR = \log DE - \log DD = M$

$PR = \text{Antilog } M$

PR: Potencia Relativa

DE: Dosis de la preparación Estándar requerida para producir la respuesta biológica específica y definida.

DD: Dosis de la preparación Desconocida requerida para producir la misma respuesta.

Ensayo Indirecto: En estos ensayos por lo general la dosis umbral no puede medirse directamente, por lo tanto la potencia se determina de manera indirecta por comparación de las respuestas a dosis conocidas del Estándar y las respuestas después de una o varias dosis del Desconocido, es decir en este tipo de ensayos se administran dosis predeterminadas de la preparación Desconocida y de la preparación Estándar y se registran las respuestas de cada unidad experimental a cada dosis administrada.

Existen fundamentalmente dos tipos de datos en este tipo de ensayos:

A. Respuestas Graduales o cuantitativas

B. Respuestas Cuantales - Cualitativas o del Todo o nada.

Esta clasificación se refiere a la naturaleza de la respuesta utilizada para la construcción del modelo (relación *Dosis/Concentración vs. Respuesta*) en el ensayo.

A. Respuestas graduales o cuantitativas: estas respuestas son mediciones numericas sobre una escala continua (Ej. Respuesta espectrofotometrica, luminiscencia, densidad optica, peso corporal, etc.) son aquellas en las cuales se administran diferentes *Dosis/Concentraciones* del preparado Estándar y del Desconocido a cada unidad experimental (en el caso de un bioensayo en vivo) y se mide el efecto o respuesta en cada una de ellas sobre la base de una escala cuantitativa, es decir en cada unidad experimental se observa y cuantifica una respuesta (ej. si la unidad experimental es el ratón y cada grupo tratado esta compuesto por 6 ratones, obtendremos un valor para cada uno de los 6 ratones, a partir de los resultados individuales se obtiene un valor medio con su respectiva dispersión). Los ensayos que se basan en este tipo de respuesta se denominan *Ensayos Cuantitativos*.

B. Respuestas Cuantales - Cualitativas o del "Todo o nada": son respuestas categoricas, aquellas en las cuales es imposible o excesivamente laborioso cuantificar o medir la respuesta en cada unidad experimental, por lo tanto se evalua si un efecto o sintoma (ej. muerte o sobrevida, ausencia o presencia de convulsiones) ocurre o no ocurre en cada unidad experimental, en este caso en lugar de tener "n" valores individuales de respuesta, tendríamos un solo valor para cada tratamiento, este valor se expresa como la fracción o el porcentaje

de unidades experimentales en cada grupo tratado que ha mostrado una respuesta determinada. Ej. si la unidad experimental es el ratón y cada grupo está compuesto por 10 ratones y la respuesta buscada es la muerte o sobrevivencia del animal, si 6 animales mueren, entonces el resultado será 6/10 o sea 0.6 o 60%. Los ensayos que se basan en este tipo de respuesta se denominan *Ensayos Cuantales*, a continuación se describe un ejemplo de Ensayo Cuantal

Ejemplo:

Valoración de Insulina por inyección subcutánea en ratón. (European Pharmacopeia, 1997)

Respuesta: presencia de convulsiones debido a hipoglucemia dentro de los 75 minutos posteriores a la inyección subcutánea de insulina.

Procedimiento: Se administran 2 dosis de 24 miliunidades/ratón y 40 miliunidades/ratón contenidas en un volumen de 0.25 ml, de la preparación patrón, dosis equivalentes de la preparación desconocida son preparadas en base a la potencia declarada. Cada dosis de la preparación Estándar y Desconocida son administradas a grupos de 24 ratones cada uno. Se presentan los resultados en la Tabla 1.

Preparación	Dosis (MU)	(n)*	(r)°	P= r/n
Estándar (E)	40 (E1)	24	21	0.88
	24 (E2)	24	8	0.33
Desconocido (D)	40 (T1)#	24	20	0.83
	24 (T2)#	24	10	0.42

Tabla 1. * N° de ratones por grupo, ° N° de ratones por grupo que presentaron respuesta, # Las dosis de la preparación Desconocida fueron preparadas basándose en la potencia declarada.

Validación de los Ensayos Biológicos

Antes de aplicar un ensayo biológico en nuestro laboratorio, debemos proceder a validar el mismo con el objetivo de evaluar las condiciones o características operacionales del procedimiento propuesto, tal cual lo descrito en el Capítulo 2 de este libro.

La validación de un ensayo biológico deberá incluir muestras que sean representativas del material que será evaluado durante el mismo, con el objetivo de evaluar su performance.

Para estudiar las propiedades de los reactivos empleados (animales, líneas celulares, etc) y las condiciones de nuestro laboratorio, el primer paso es obtener una curva *Dosis/Concentración vs. Respuesta* con la preparación Estándar, con un buen nivel de precisión y en un amplio rango de dosis, en el caso de un ensayo in vivo, se utilizará un número determinado de animales (por ej. 30), divididos en seis grupos, cada grupo es administrado con un nivel de dosificación, es decir evaluamos 6 Dosis diferentes en total. En general cuando se gráfica Dosis/Concentración o log. Dosis/Concentración vs. Respuesta, las curvas obtenidas tiene forma sigmoideas, pero sólo debemos considerar la parte central de dicha curva que es lineal, la cual toma el nombre de línea de regresión Figura 2.

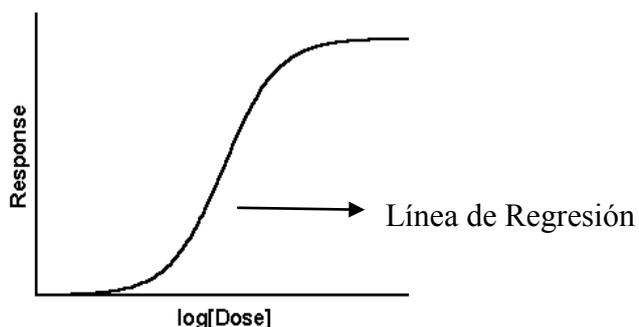


Figura 2. Relación Logaritmo Dosis - Respuesta

Los parámetros a evaluar para la validación son similares a los descritos en el capítulo 2 y son: exactitud relativa, especificidad, precisión intermedia y rango, respecto de otros parámetros como el límite de cuantificación y detección los mismos en general no son considerados relevantes para un ensayo biológico

donde el objetivo sea reportar una potencia relativa, si bien la robustez no es un requerimiento en la validación de los bioensayos, es recomendable realizarlo como pre-validación o mediante ensayos adicionales inmediatamente posterior a la validación.

Las definiciones para los parámetros descritos anteriormente son las mismas que las dadas en el capítulo de validaciones, la diferencia es que en estos casos estamos en un ensayo biológico.

Métodos utilizados para el cálculo de la potencia relativa

Una vez validado el ensayo biológico procederemos a aplicar el ensayo como control de calidad de rutina en las condiciones establecidas en la validación, para lo cual deben ensayarse la preparación Estándar y Desconocido simultáneamente, obteniéndose 2 curvas *Dosis/Concentración vs. Respuesta*: una para el Estándar y otra para el Desconocido, las cuales se compararán entre sí y por medio de análisis estadístico se estimara la potencia relativa y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad.

Para seleccionar el método/modelo estadístico a aplicar en un bioensayo para calcular la potencia relativa, debemos considerar: el tipo de dato y el diseño del bioensayo, en general el modelo debe reflejar fuertemente el diseño del mismo (completamente al azar, bloques al azar, etc.).

En los métodos para el cálculo de la potencia relativa, se asume primariamente la similaridad o similitud, dos preparaciones son similares si ellas contienen el mismo o los mismos constituyentes efectivos y en la misma proporción. Si esta condición se cumple, la preparación Desconocida se comporta como una dilución (o concentración) de la preparación Estándar.

La similaridad o similitud puede ser representada matemáticamente por la siguiente fórmula:

$$F_T(Z) = F_S(\rho Z)$$

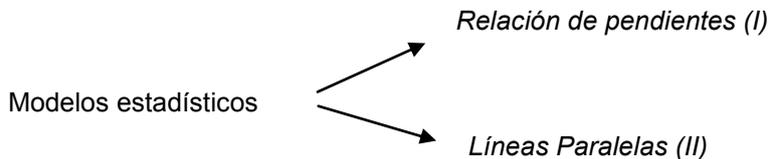
F_T : función dosis/concentración – respuesta para la preparación Desconocida

F_S : función dosis/concentración – respuesta para la preparación Estándar

Z: representa la dosis/concentración

ρ : potencia relativa de la muestra Desconocida relativa al Estándar

Los modelos estadísticos para la estimación de ρ en los ensayos cuantitativos pueden ser:



Para ambos modelos se asumen las siguientes condiciones: todos incluyen un término residual, el cual se asume que es independiente de una medición a otra y que tiene una variancia constante entre diferentes concentraciones.

Para aplicar cualquiera de estos dos modelos estadísticos deben cumplirse las siguientes condiciones:

1. Los diferentes tratamientos deben ser asignados al azar a las unidades experimentales.
2. Las respuestas a cada tratamiento deben distribuirse normalmente.
3. La desviación estándar de las respuestas dentro de cada grupo de tratamiento, para la preparación Estándar y Desconocida, no debe diferir significativamente una de otra (homocedasticidad de los datos).
4. Cada preparación (Estándar y Desconocida) en el ensayo debe ser contrastada con el mismo número de dosis.
5. En el modelo de relación de pendientes, el intervalo entre dosis/ concentraciones adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos en el ensayo (progresión aritmética), en el modelo de líneas paralelas, el cociente entre las dosis / concentraciones adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos del ensayo (progresión geométrica).
6. Debe haber un número igual de unidades experimentales para cada tratamiento.

1. Modelo de relación de pendientes, este modelo puede aplicarse cuando:

- A. La relación entre la dosis / concentración y la respuesta es lineal.
- B. Las rectas Dosis/Concentración vs. Respuesta del Estándar y del Desconocido tienen la misma ordenada al origen (no necesariamente debe

corresponder al origen de coordenadas), lo cual demuestra la similitud estadística.

Para que el ensayo sea estadísticamente válido deben cumplirse, además de las ya mencionadas (1, 2, 3) las siguientes condiciones:

1. La variación debida a los blancos en los diseños ($h \times d + 1$) debe ser no significativa, es decir la respuesta debida a los blancos no difiere significativamente. En el ejemplo anterior sería ($2 \times 3 + 1$)

dónde:

° h : Número de preparaciones en el ensayo incluyendo la preparación Estándar

° d : Número de niveles de dosis para cada preparación (excluyendo el blanco)

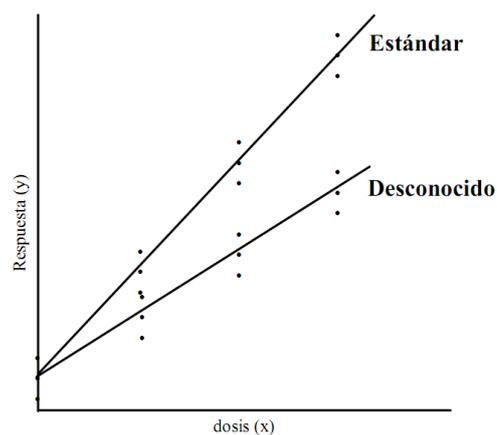


Figura 3. *Relación Dosis – Respuesta- Modelo de relación de pendientes*

2. Demostrar estadísticamente la igualdad de las ordenadas al origen.

3. Demostrar linealidad (para ensayos que incluyen al menos tres dosis), el mismo indica que la relación entre la dosis y la respuesta puede representarse por una línea recta en todo el intervalo de dosis utilizadas, los valores medios de respuesta de las preparaciones no se apartan significativamente de una recta en el rango de dosis/concentraciones utilizadas.

Una vez establecida la validez estadística, se procede a estimar la potencia y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad, a continuación se detallan las ecuaciones para el cálculo de la potencia relativa:

Para la Preparación Estándar:

$$Y = a + b D_E \quad D_E = \text{Dosis preparación del Estándar}$$

Para la preparación Desconocida:

$$Y = a + b^1 D_D \quad D_D = \text{Dosis preparación Desconocida}$$

Como hemos comprobado que el ensayo es válido podemos asegurar que las rectas tienen una ordenada al origen (a) igual, pero difieren en el valor de la pendiente (b y b¹), si consideramos D_E y D_D frente a la misma respuesta Y, igualando ambas ecuaciones tenemos:

$$a + b D_E = a + b^1 D_D$$

$$D_E / D_D = b^1 / b$$

$$PR = D_E / D_D$$

$$PR = b^1 / b = \rho$$

La Potencia relativa (ρ) de la preparación Desconocida está dada por la relación de pendientes de ambas rectas, debido a esto este tipo de modelo se denomina *Modelo de Relación de Pendientes*.

II. Modelo de líneas paralelas, para aplicar este modelo deben cumplirse las siguientes condiciones:

A. La relación entre el *logaritmo de la dosis y la respuesta* se representa por una línea recta en el intervalo de *Dosis/Concentración* utilizadas

B. Para cualquier preparación Test en el ensayo, la línea recta es paralela al Estándar, lo cual demuestra la similitud estadística.

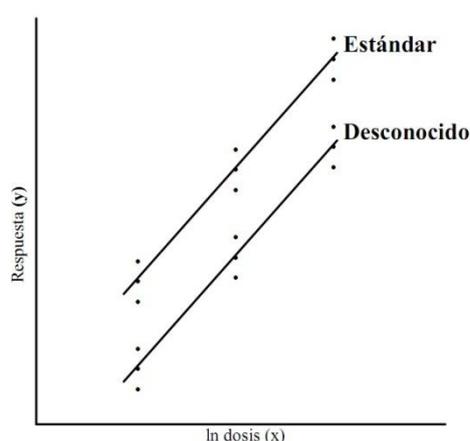


Figura 4. Relación Logaritmo Dosis/Concentración vs. Respuesta -Modelo de líneas paralelas

Para que el ensayo sea estadísticamente válido deben cumplirse las siguientes condiciones:

1. *Hipótesis de regresión*: La pendiente de la curva log Dosis/Concentración vs. Respuesta difiere significativamente de cero.
2. *Hipótesis de paralelismo*: Para cualquier preparación Desconocida en el ensayo, la línea recta es paralela al Estándar.
3. *Hipótesis de linealidad*: La relación entre el logaritmo de la dosis/concentración y la respuesta debe representarse por una línea recta en todo el intervalo de dosis utilizadas. Una vez establecida la validez estadística, se procede a estimar la potencia relativa y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad.

Hemos demostrado que el término de linealidad es significativo entonces procedemos a calcular la potencia para cada preparación Desconocida:

$$Y = a + b \log D_E$$

$$Y = a^1 + b \log D_D$$

Hemos demostrado que ambas rectas son paralelas por lo tanto tienen la misma pendiente (b) pero distinta ordenada al origen, trabajando a iguales valores de respuesta (y)

$$a + b \log D_E = a^1 + b \log D_D \quad (1)$$

Despejando a^1

$$a^1 = a + b \log D_E - b \log D_D$$

$$a^1 = a + b (\log D_E - \log D_D) \quad \text{como } \log D_E - \log D_D = \log PR$$

$$a^1 = a + b \log PR$$

Reemplazando en (1) obtengo:

$$a + b \log D_E = a + b \log PR + b \log D_D$$

$$b \log D_E = b (\log PR + \log D_D)$$

$$\log D_E = \log PR + \log D_D$$

$$\log PR = \log D_E - \log D_D$$

$$\log PR = \log (D_E / D_D) = \log \rho$$

Podemos observar que cuando las líneas Dosis/Concentración vs. Respuesta son paralelas, la separación horizontal corresponde para una misma respuesta

a la diferencia en el nivel de actividad biológica, esta diferencia horizontal corresponde numericamente a $\log \rho$ (logaritmo de la Potencia Relativa).

En la siguiente Tabla se resumen las condiciones que deben cumplirse para aplicar cada uno de los modelos estadísticos discutidos anteriormente.

Condiciones para su aplicación	Modelo Relación de Pendientes	Modelo de líneas Paralelas
Regresión	X	X
Linealidad	X	X
Intersección	X	-
Paralelismo	-	X

Tabla 2. Condiciones para la aplicación de los modelos estadísticos

Ensayos cuantales: para los ensayos biológicos que dependen de respuestas cuantales se aplica el *modelo estadístico de líneas paralelas*.

Como hemos visto anteriormente en estos ensayos se registra la fracción de unidades experimentales en cada grupo tratado que ha mostrado una respuesta determinada, cuando estas fracciones son graficadas vs. el log. de las dosis la curva resultante es sigmoidea más que lineal, entonces una función matemática que representa esta curvatura sigmoidea es utilizada para estimar la curva *Dosis vs. - Respuesta*, la función más comúnmente utilizada es la *función de distribución normal acumulativa*, de esta manera transformamos una curva sigmoidea en lineal, es decir ahora se reemplaza cada respuesta (ej. fracción o porcentaje de respuesta por grupo) por el correspondiente valor de la distribución normal acumulativa estándar este valor usualmente llamado "normit" tiene un rango teórico entre $-\infty$; $+\infty$, entonces se propuso adicionar el valor 5 a cada "normit" dando origen al término *probit*, una vez que la curva Dosis - Respuesta ha sido linealizada es posible aplicar el modelo de líneas paralelas. Antes de calcular la potencia y el intervalo de confianza debe determinarse que el ensayo es estadísticamente válido, para esto deben cumplirse las hipótesis de linealidad y de paralelismo explicadas anteriormente.

Combinación Ponderada de resultados de múltiples ensayos

En general, un solo ensayo no es suficiente para reportar un valor de potencia relativa para cumplir con las exigencias regulatorias, por lo tanto con el objetivo de disminuir los efectos de la variabilidad, es necesario la repetición de bioensayos independientes y combinar los resultados de los mismos para obtener un solo valor reportable de Potencia Relativa. Para que puedan combinarse los resultados de los diferentes bioensayos se debe demostrar que los mismos son:

1. Independientes (la ejecución de un ensayo no afecta las probabilidades de los posibles del otro), los errores aleatorios en la totalidad de los factores esenciales que influyen sobre el resultado en un bioensayo, tienen que ser independientes de los correspondientes aleatorios en el otro. Ensayos realizados en distintos días pero utilizando las mismas soluciones originales y conservadas de Estándar no corresponden a ensayos independientes.
2. Las potencias individuales estimadas forman un conjunto homogéneo: los resultados son considerados homogéneos cuando difieren solamente debido a los errores al azar dentro del ensayo.
3. El número de grados de libertad de los errores residuales individuales, no es inferior a 6 y preferiblemente es mayor a 15.
4. Para cada ensayo el valor de C está próximo a 1 (menor de 1.1)

Hipótesis Esenciales para la validez fundamental de los Ensayos Biológicos

A. Las diferencias entre los valores medios de las respuesta debido a los distintos tratamientos se deben únicamente a los mismos o a variaciones muestrales del azar, con esto estamos suponiendo que todos los demás factores que indudablemente afectan las respuestas han sido controlados por el investigador. Por lo tanto el investigador debe estudiar cuales son las condiciones que pueden modificar las respuestas y poder controlarlas, por ej:

A1. Deberán mantenerse constantes las condiciones ambientales (macro y microambiente)

A2. El experimento deberá diseñarse tal que las distintas fuentes de variabilidad puedan segregarse en el análisis de varianza.

A3. Distribuir las unidades experimentales al azar entre los distintos tratamientos. Azar significa: un método de selección de unidades de muestreo de modo tal que una muestra tenga una probabilidad fija y determinada de ser seleccionada.

B. La respuesta esperada debe ser una función monótona determinable de la dosis dentro del rango de dosis utilizadas, es decir que siempre crece o siempre decrece. Muchos errores pueden cometerse cuando los ensayos son realizados con pocas dosis y sobre reactivos biológicos no bien conocidos como ser la cepa o colonia de rata que se emplea etc. Entonces con dosis muy grandes pueden obtenerse respuestas que pueden ser menores que las correspondientes respuestas a dosis más bajas, por lo tanto debe conocerse el sistema biológico de manera de asegurar que las respuestas que se está evaluando invaliden el ensayo en lo fundamental, este hecho puede no ser detectado con los test estadísticos.

C. Las respuestas producidas por la preparación Estándar y la preparación Desconocida deben ser debidas a un mismo principio activo. En el caso de que esté presente más de un principio activo, éstos deben estar en igual proporción en ambas preparaciones. Si se cumple esta hipótesis de similitud las funciones que relacionan las respuestas con las dosis deben tener la misma forma para ambas preparaciones en las mismas condiciones experimentales.

Hipótesis Esenciales para la validez estadística

A. Hipótesis de linealidad: La relación entre Y (valor esperado de Y) y X debe expresarse por la ecuación de una línea recta por lo menos en el

rango de observaciones utilizadas en el cálculo: $Y = a + bX$, esta recta puede calcularse por el método de cuadrados mínimos.

- B. Hipótesis de normalidad:** la variable Y se distribuye normalmente para cada nivel de dosis X utilizado en el cálculo.
- C. Hipótesis de Homocedasticidad:** la varianza de la respuesta o transformación de las mismas es independiente del nivel de dosis utilizado. Para corroborar esta hipótesis puede utilizarse el test de Bartlett en el cual se estudian las diferencias entre las varianzas. Si en una serie de ensayos existe la tendencia a un aumento o disminución de las varianzas de las respuestas con el aumento de las dosis deberá procurarse otra transformación de las respuestas, que sin alterar el cumplimiento de las otras hipótesis, iguale las varianzas en los distintos grupos de dosis.

Preguntas Orientadoras

1. Indique cuando es necesario recurrir a un ensayo biológico.
2. Describa como se clasifican las respuestas en un ensayo indirecto.
3. Describa como demuestra la similitud en un modelo estadístico de líneas paralelas
4. Qué parámetros evaluaría durante la validación de un bioensayo?
5. Qué condiciones se deben cumplir para calcular la potencia relativa en un modelo estadístico de relación de pendientes.

Test de Autoevaluación

1. Los ensayos biológicos pueden ser solo realizados en:
 - (a) Animales
 - (b) Células
 - (c) Células y animales
 - (d) Animales, células y tejidos

2. Un ensayo biológico debe:
 - (a) Siempre reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo.
 - (b) No siempre debe reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo y no debe establecer correlación con la misma
 - (c) No siempre debe reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo pero debe establecer correlación con la misma.
 - (d) Ninguna es correcta

3. En un ensayo directo las respuestas pueden ser:
 - (a) Cuantitativas
 - (b) Cualitativas
 - (c) Cuantitativas y cualitativas
 - (d) Ninguna es correcta

4. Para reportar un valor de Potencia relativa, en general es suficiente con:
 - (a) Un solo ensayo independiente
 - (b) Combinación de varios ensayos independientes
 - (c) Combinación de varios ensayos independientes y con resultados homogéneos
 - (d) Combinación de varios ensayos independientes, con resultados no homogéneos

5. En los ensayos directos puedo aplicar los siguientes modelos estadísticos para el cálculo de la potencia relativa.
 - (a) Líneas paralelas
 - (b) Relación de pendientes
 - (c) Líneas paralelas y relación de pendientes
 - (d) Ninguna de las anteriores.

Bibliografía

1. World Health Organization WHO Technical Report Series, No. 932, Annex 2- (2006) *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards*.
2. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VIII ed. Vol. 1. Buenos Aires
3. European Pharmacopoeia 3rd Edition. Statistical (2000) *Analysis of Results of Biological Assays and Tests* (5.3). Supplement.
4. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) *Design and Analysis of Biological Assays. General Chapter <111>*. Rockville.
5. Pharmacopeial Forum. (2010) *Design and Development of Biological Assays – General Chapter <1032>*
6. Pharmacopeial Forum. (2010) *Biological assay Validation – General Chapter <1033>*
7. Pharmacopeial Forum.(2010) *Analysis of Biological assays- General Chapter <1034>*
8. Michael. J. Groves. (2006) *Pharmaceutical Biotechnology*, Second Edition, Taylor and Francis
9. M. Would (2006) *Pharmacokinetics and Toxicology of Therapeutics Proteins: Advances and Challenges*. Journal of Biological Chemistry. 3 (4):73-92
10. Lee, J. Wang, Y. Moxness, M. and De Silva, B. (2011) *Bioanalytical Considerations in the Comparability assessment of Biotherapeutics*. Bioanalysis 3 (6): 613-622
11. Roberto Rodriguez Diaz, Tim, Wehr and Stephen Tuck. (2005) *Analytical Techniques for biopharmaceutical Development*. Taylor and Francis.
12. Rosenkranz, A y Glanczspigel, R. (1972) *Valoración de Productos Biológicos*. Revista SAFYBI, Vol. 12, N° 40: 705-708
13. Glanczspigel, R. Y Rosenkranz, A. (1973) *Valoración de Productos Biológicos*. Revista SAFYBI, Vol. 13, N° 41: 762-765
14. Rosenkranz, A y Glanczspigel, R. (1975) *Valoración de Productos*

Biológicos. Revista SAFYBI, Vol. 15, N° 44: 870-877

15. ICH (1999) *Topic Q 6 B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products.*