

Desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución acoplada a Espectrometría de Masas- Masas para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano y su aplicación a un estudio de bioequivalencia en voluntarios sanos de población mexicana

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PRESENTA

QFB. Joceline Estefanía Rangel Velázquez

Director de Tesis

Dra. en C. Ana Laura Márquez Aguirre

Codirectores de Tesis:

Dr. En C. Murali Mohan Pendela

Asesor de Tesis

Dra. en C. Tania Amanda Camacho Villegas

M.C Teresita de Jesús Castro Sandoval

Guadalajara , Jalisco, Junio, 2020



Guadalajara, Jalisco a 06 de Mayo de 2020

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante Joceline Estefanía Rangel Velázquez, una vez leída y revisada la Tesis titulada “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS- MASAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RIVAROXABAN EN PLASMA HUMANO Y SU APLICACIÓN A UN ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA EN VOLUNTARIOS SANOS DE POBLACIÓN MEXICANA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Doctor/Maestro en Maestría en Investigación Clínica con opción terminal en métodos analíticos durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 06 del mes de mayo del año dos mil veinte.

Dra. en C Ana Laura Márquez Aguirre
Director de tesis/tutor académico

Dr. en C Murali Mohan Pendela
Co-director de tesis/tutor en planta

Dra. En C. Tanya Amanda Camacho Villegas
Asesor/Asesora

M en C. Teresita de Jesús Castro Sandoval
Asesor/Asesora



Guadalajara, Jalisco, a 3 de junio de 2020
CP/590/2020

JOCELINE ESTEFANÍA RANGEL VELÁZQUEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1704MA6384
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **"Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada espectrometría de masas-masas para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano y su aplicación a un estudio de bioequivalencia en voluntarios sanos de población mexicana"** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Ana Laura Máquez Aguirre. Directora de Tesis
Dr. Murali Mohan Pendela. Co-director de tesis
Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas. Asesora de Tesis
M. en C. Teresita de Jesús Castro Sandoval. Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestría en Investigación Clínica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



JUNTA DIRECTIVA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. en C. Ana Laura Márquez Aguirre

CIATEJ

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. en C. Murali Mohan Pendela

Avant Sante Research Center S.A de C.V

ASESORES DE TESIS

Dra. en C. Tanya Amanda Camacho Villegas

CIATEJ

M. en C. Teresita de Jesús Castro Sandoval

Avant Sante Research Center S.A de C.V

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El financiamiento del presente estudio estuvo a cargo de Avant Sante Research Center S.A de C.V quien facilito los recursos financieros, medicamentos, equipos e infraestructura para la realización del proyecto.



Avant Santé

Fostering health safety

Agradecimientos

A mi madre, Alma Delia Velázquez Carmona por su infinito amor, comprensión y apoyo en los triunfos y derrotas, por creer en mí y guiar mi camino, por alentándome a seguir adelante.

A mi familia, por estar apoyándome en todo momento a continuar con cada uno de los retos de esta vida.

A CIATEJ por permitirme continuar con esta etapa en mi vida académica.

A Avant Sante Research Center por darme la oportunidad de continuar con mis estudios, por el apoyo brindado para realizar el presente proyecto.

A mi directora, Dra. Ana Laura Márquez Aguirre por su paciencia y apoyo para continuar en esta etapa académica, así como las aportaciones al presente proyecto.

A la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas por sus aportaciones al proyecto.

Al Dr. Murali Mohan Pendela, por su paciencia y apoyo durante cada una de las etapas de la vida académica.

A la Mtra. Teresita de Jesús Castro Sandoval por haberme dado la oportunidad de trabajar en Avant Santé y continuar con mi proyecto académico.

Al Biol. Marco Antonio Morales Buendía por su apoyo durante la ejecución del proyecto.

A mis compañeros de Laboratorio de Bioanalítica por sus aportaciones y apoyo durante cada una de las etapas del proyecto.

A todos mis colegas de Avant Santé que participaron durante la ejecución clínica, analítica y bioestadística.

Al patrocinador por otorgar el permiso para publicación de resultados.

*“Ten siempre en mente que tu propia voluntad de tener éxito
es mucho más importante que cualquier otra cosa.”*

-Abraham Lincoln

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	1
INDICE DE FIGURAS.....	2
INDICE DE ANEXOS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1. Enfermedades tromboembólicas.....	12
3.2. Anticoagulantes	16
3.3. Terapia farmacológica con anticoagulantes	20
3.4. Rivaroxaban.....	22
3.4.1. Farmacocinética	22
3.5. Métodos analíticos para la cuantificación de anticoagulantes.....	32
3.6. Cromatografía de Líquidos de alta resolución acoplada a Espectrometría de Masas/Masas	33
3.7. Técnicas de preparación de muestras para Cromatografía MS/MS.....	35
3.8. Validación de métodos bioanalíticos	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
5. JUSTIFICACIÓN.....	40
6. HIPOTESIS.....	41
7. OBJETIVOS	42
8. METODOLOGIA	43
8.1. Fase Clínica	43

8.2. Fase Analítica	46
8.3. Análisis de muestras.....	61
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
10. CONCLUSIONES	90
11 .PERSPECTIVAS	91
12. IMPACTO SOCIAL	92
13. REFERENCIAS.....	93
14 ANEXOS	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regímenes de dosis para el Rivaroxaban en las indicaciones autorizadas.	21
Tabla 2. Parámetros de validación	37
Tabla 3. Sustancias de Referencia	46
Tabla 4. Concentraciones plasmáticas teóricas de Rivaroxaban	47
Tabla 5. Parámetros del Detector.....	64
Tabla 6. Condiciones Cromatográficas	65
Tabla 7. Precisión y exactitud del método analítico en la prueba de Repetibilidad	78
Tabla 8. Reproducibilidad del Analista 1	79
Tabla 9. Reproducibilidad del Analista 2.....	79
Tabla 10. Efecto matriz en presencia de fármacos concomitantes	81
Tabla 11. Estabilidad de Rivaroxaban en Plasma (EDTA K ₂).....	82
Tabla 12. Estabilidad de Rivaroxaban en muestra plasmática procesada	83
Tabla 13. Resultados globales de estándares de calibración y puntos control	85
Tabla 14. Resultados de la estadística de Biodisponibilidad de Rivaroxabán 10 mg en condiciones de ayuno.....	87
Tabla 15. Resultados de la estadística de Biodisponibilidad de Rivaroxabán 10 mg en condiciones de ayuno.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de coagulación extrínseca (Adaptada de Kalathottukaren <i>et al.</i> 2018).	13
Figura 2. Vía de coagulación intrínseca (Adaptada de Kalathottukaren <i>et al.</i> 2018).....	14
Figura 3. Factores de coagulación blanco por los anticoagulantes orales específicos en las vías intrínseca y Extrínseca. (Adaptada de Perzborn E <i>et al.</i> , 2011).....	19
Figura 4. Estructura química del Rivaroxaban.....	22
Figura 5. Perfil farmacocinético del Rivaroxaban de acuerdo con el curso temporal de la concentración obtenida posterior a la administración oral única (Adaptada de Kreutz 2011).	24
Figura 6. Esquema de Metabolismo In vitro de Rivaroxaban.....	25
Figura 7. Curso temporal del Tiempo de inhibición de la Protombina (PT) posterior a una dosis oral única. (Adaptada de Kreutz 2011).	28
Figura 8. Perfil farmacocinético de Rivaroxaban en sujetos sanos (Grupo control) y pacientes con insuficiencia renal, administrando una dosis de 10 mg. (Adaptada de Kreutz 2011) ...	30
Figura 9. Perfil farmacocinético de Rivaroxaban en sujetos sanos (Grupo control) y pacientes que presentan daño hepático.....	31
Figura 10. Esquema de la separación de iones en Cuadrupolo (Adaptada de Kaklamanos G. <i>et al.</i> 2012).....	34
Figura 11. Representación gráfica de Ionización por Electrospray (Adaptada de Kaklamanos G. <i>et al.</i> 2012	35
Figura 12. Esquema de un diseño clínico cruzado	43
Figura 13. Cromatograma obtenido para el seguimiento de Fosfolípidos (Pseudotransición 184 → 184) en una muestra STD Blk procesada por precipitación de proteínas con Acetonitrilo.....	67
Figura 14. Cromatograma obtenido para el seguimiento de Fosfolípidos	68

Figura 15. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Acarreo (a) Muestra plasmática STD Blk inyectada previo al STD 8 (b) Muestra plasmática STD Blk reinyectada posterior al STD 8.	70
Figura 16. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Verificación de Interferencia Cruzada (a) Muestras en solución del STD 8 sin la adición del EI (b) Muestra STD Zero en solución	71
Figura 17. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Verificación de Interferencia Cruzada (a) Muestra plasmática del STD 8 sin la adición del EI (b) Muestra STD Zero en plasma.	72
Figura 18. Curva de calibración en plasma obtenida durante el desarrollo del método analítico.	73
Figura 19. Cromatogramas obtenidos de las muestras plasmáticas de la prueba de selectividad (a) Muestras STD Blk en lote de plasma normal (b) Muestra STD 1 en lote de plasma normal (c) Muestras STD Blk de plasma lipémico (d) Muestra STD 1 en lote de plasma lipémico.	74
Figura 20. Cromatogramas obtenidos de las muestras plasmáticas de la prueba de selectividad (a) Muestras STD Blk en lote de plasma hemolizado ((b) Muestras STD 1 en lote de plasma hemolizado (c) Muestras STD Blk en lote de plasma heparinico ((d) Muestras STD 1 en lote de heparinico.	75
Figura 21. Curva de calibración en plasma obtenida durante la validación del método analítico.	76
Figura 22. Gráfica de medias de concentraciones, escala aritmética (con barras de error), para una dosis de 10 mg de Rivaroxaban en condiciones de ayuno.	86
Figura 23. Grafica de medias de concentraciones, escala semilogarítmica, para una dosis de 10 mg de Rivaroxaban en condiciones de ayuno.....	86
Figura 24. Gráfica de medias de concentraciones, escala aritmética (con barras de error), para una dosis de 20 mg de Rivaroxaban en estado postprandial.....	88
Figura 25. Grafica de medias de concentraciones, escala semilogarítmica, para una dosis de 20 mg de Rivaroxaban en estado postprandial.	88

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resumen de la validación del método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma (EDTA K2) por LC-MS/MS.....	100
Anexo 2. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 10 mg, dosis única en condiciones de ayuno para el medicamento de prueba (A) vs. tiempos de muestreo.	126
Anexo 3. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 10 mg, dosis única en condiciones de ayuno para el medicamento de referencia (B) vs. tiempos de muestreo.....	127
Anexo 4. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 20 mg, dosis única en estado postprandial para el medicamento de prueba (A) vs. Tiempos de muestreo.....	128
Anexo 5. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 20 mg, dosis única en estado postprandial para el medicamento de referencia (B) vs. tiempos de muestreo.	129

ABREVIATURAS

°C	:	Grados Celsius.
ADQ	:	Adecuabilidad.
ANOVA	:	Análisis de Varianza.
AUC _{0-t}	:	Área Bajo la Curva de Concentración-Tiempo de 0 a la última. concentración medible.
AUC _{0-∞}	:	Área Bajo la Curva de Concentración-Tiempo de 0 a Infinito.
ANVISA	:	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por siglas en portugués).
C _{máx}	:	Concentración Máxima observada en plasma.
Cm	:	Centímetros.
COFEPRIS	:	Comisión Federal para la Protección contra Riesgo Sanitario.
Comp	:	Concentración de comparación.
CoA	:	Certificado de Análisis (<i>Certificate of Analysis</i> , por sus siglas en inglés).
CS	:	Estándar de calibración (<i>Calibration Standard</i> , por sus siglas en inglés).
CV	:	Coefficiente de Variación.
DQC	:	Punto Control de Dilución (<i>Dilution Quality Control</i> , por sus siglas en inglés).
EDTA K ₂	:	Ácido Etilen Diamino Tetra Acético Sal Dipotásica.
E.I.	:	Estándar Interno.
EMA	:	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i> , por sus siglas en inglés).
EP	:	Embolia pulmonar.

ESI	:	Ionización por Electrospray (<i>Electrospray Ionization</i> , por sus siglas en inglés).
EXH	:	Estándar extremo extraído (<i>Extracted highest calibration curve standar</i> , por sus siglas en inglés).
FA	:	Fibrilación atrial.
FDA	:	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i> , sus siglas en inglés).
h	:	Hora.
HBsAg	:	Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.
HCV ab	:	Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C.
IMC	:	Índice de masa corporal.
Kg	:	Kilogramos.
LC-MS	:	Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas (<i>Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry</i> , por sus siglas en inglés).
LS	:	Límite Superior de Cuantificación.
mg	:	Miligramos.
Min	:	Minutos.
mL	:	Mililitro.
Mm	:	Milímetro.
MRM	:	Monitoreo de Múltiples Reacciones (<i>Multi Reaction Monitoring</i> , por sus siglas en inglés).
n	:	Numero de observaciones.
ng	:	Nanogramo.

ng/mL	: Nanogramo por mililitro.
PCA	: Punto Control de Calidad Alto.
PCB	: Punto Control de Calidad Bajo.
PCM	: Punto Control de Calidad Medio.
PCM2	: Punto Control de Calidad Medio 2.
PCLC	: Punto Control de Calidad del Límite de Cuantificación.
QC	: Muestra Control de Calidad.
R	: Coeficiente de Correlación.
SAS	: Sistema de Análisis Estadístico.
SD	: Desviación Estándar.
S/N	: Señal / ruido.
SR	: Solución de Reconstitución.
STD	: Estándar de calibración.
STD Blk	: Estándar Blanco.
STD Zero	: Estándar Blanco más Estándar Interno.
$t_{1/2}$: Vida Media.
$T_{m\acute{a}x}$: Tiempo de Concentración Máxima observada en plasma.
TEV	: Tromboembolismo venoso.
TR	: Tiempo de Retención.
TSOAC	: Anticoagulantes orales blanco-específicos.
TVP	: Trombosis venosa profunda.

Ultra cromatografía de líquidos-espectrometría de masas/espectrometría de

UPLC-MS/MS : masas (*Ultra-performance liquid chromatography-massspectrometry/mass spectrometry*, por sus siglas en inglés).

VDRL : Prueba de Sifilis (*Venereal Disease Research Laboratory*, por sus siglas en inglés).

VIH : Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VKAs : Antagonistas de la vitamina K.

v/v : Volumen / Volumen.

1. RESUMEN

Rivaroxaban es un agente anticoagulante de nueva generación, usado en el tratamiento de enfermedades tromboembólicas como; trombosis venosa profunda (TVP) y embolia pulmonar, así como en el tratamiento preventivo en tromboembolismo venoso (TEV), accidente cerebrovascular y embolia sistémica.

A pesar de ser un medicamento anticoagulante con un margen terapéutico amplio es necesario contar con metodologías analíticas que permitan monitorizarlo o bien que permitan caracterizar propiedades farmacocinéticas del fármaco, por lo tanto, se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano, con EDTA K₂ como anticoagulante, por Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución acoplado a Espectrometría de Masas/Masas y usando la técnica de extracción líquido-líquido con Éter etílico 100%.

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron en una columna Acquity UPLC BEH C18 (1.7µm 2.1 x 50mm) con Ácido fórmico 0.1% y Acetonitrilo en una proporción 65:35 v/v. La detección de los iones se realizó mediante una reacción de monitoreo múltiple siguiendo las transiciones 435.99 → 144.90 para Rivaroxaban y 440.00 → 144.96 para su estándar interno, Rivaroxaban-d4.

El método analítico desarrollado fue validado de acuerdo con los lineamientos nacionales e internacionales, establecidos por la NOM-177-SSA1-2013 y las guías US FDA 2018, ANVISA 2012 y EMA 2011, demostró ser selectivo, específico, lineal en un rango de trabajo de 0.483 a 577.736 ng/mL, preciso, exacto y robusto.

El método analítico fue empleado para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano en dos estudios clínicos para determinar bioequivalencia, entre el medicamento de prueba A y el medicamento de referencia B de dosis de 10 mg y 20 mg, bajo condiciones de ayuno y estado postprandial, respectivamente, en sujetos sanos sin potencial de reproducción.

El diseño de ambos estudios clínicos consistió en una dosis oral única, aleatorizado, balanceado, abierto, dos tratamientos, dos secuencias, dos periodos, cruzado con un periodo de lavado equivalente a 7 vidas medias.

En la evaluación de la dosis de 10 mg de Rivaroxaban en condiciones de ayuno, se enrolaron 28 sujetos sanos, de los cuales 26 sujetos completaron el estudio, los datos de éstos fueron tomados para el cálculo estadístico, se encontraban entre 19 – 54 años con un IMC de 18.9 – 26.8 kg/m². Los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos para el medicamento de prueba y referencia, respectivamente, fueron: C_{max} 134.944 ± 34.8393 ng/mL y 139.889 ± 37.2529 ng/mL, AUC_{0-t} 1042.903 ± 232.3915 ng·h/mL y 1003.509 ± 230.8413 ng·h/mL, T_{max} 2.077 ± 1.1056 h y 1.853 ± 1.0229 h.

En la evaluación de la dosis de 20 mg de Rivaroxaban en estado postprandial, se enrolaron 28 sujetos sanos se encontraban entre 19 – 54 años con un IMC de 18.9 – 26.8 kg/m². Los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos para el medicamento de prueba y referencia, respectivamente, fueron: C_{max} 262.073 ± 57.7605 ng/mL y 276.459 ± 53.4929 ng/mL, AUC_{0-t} 1810.222 ± 445.6505 ng·h/mL y 2015.584 ± 505.1603 ng·h/mL, T_{max} 3.397 ± 1.0176 h y 3.089 ± 1.1551 h.

En el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre los medicamentos de prueba A y los medicamentos de referencia B, para las dosis de 10 mg y 20 mg de Rivaroxaban, es decir, el medicamento de prueba A es Bioequivalente al medicamento de referencia B en sujetos sanos sin potencial de reproducción., por lo tanto, el medicamento de prueba puede ser considerado una alternativa farmacéutica.

El método analítico validado demostró selectividad, especificidad, linealidad, precisión, exactitud y robustez, dicho método fue empleado en la cuantificación de Rivaroxaban proporcionando datos confiables, adicional a su aplicación en estudios de bioequivalencia, el método podría ser empleado como una alternativa en el seguimiento y monitoreo de pacientes tratados con Rivaroxaban. Contar con un método analítico validado que cumpla con todos los requerimientos solicitados por las Agencias Regulatorias Nacionales e Internacionales , permite que el medicamento pueda ser sometido a inspección y posteriormente comercializado en diferentes países.

2. INTRODUCCIÓN

La trombosis venosa o arterial se caracteriza por la formación de coágulos sanguíneos (trombo) dentro la vasculatura ocasionando la ralentización o bloqueo del flujo sanguíneo, ocasionando como consecuencias; infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, embolia pulmonar (EP) e isquemia de extremidades.

Como parte de la enfermedad tromboembólica (ETV) se encuentra la trombosis venosa profunda (TVP) de miembros superiores e inferiores y la embolia pulmonar (EP) ocasionada por la migración del trombo hacia los vasos pulmonares causando un alto potencial de mortalidad (aproximadamente 7.5%), el tratamiento de EP presenta costos elevados y aproximadamente entre el 4-8% de las muertes en personas mayores institucionalizadas son ocasionada debido a esta complicación. Habitualmente, se ha observado en la población que los casos de ETV inician como TVP en extremidades inferiores y posteriormente puede evolucionar a EP (Otero *et. al* 2010; García M *et. al* 2014).

El grado de incidencia de las ETV ha sido estudiada por diferentes grupos de investigación en Estados Unidos de América, América Latina y Europa, en algunos casos determinaron una incidencia de 117 casos por cada 100 000 habitantes, se observó que la incidencia era mayor en personas entre 45 – 69 años, aunque las ETV puede afectar tanto a jóvenes como adultos mayores, el mayor porcentaje de incidencia es en adultos mayores, así como pacientes con otras complicaciones como; cáncer, cirugía reciente e inmovilización, alteraciones genéticas, riesgo cardiovascular, obesidad, diabetes mellitus, hipertensión arterial, tabaquismo (García M *et. al* 2014).

Alrededor del mundo, las enfermedades tromboembólicas presentan una incidencia en jóvenes de 1 caso por cada 10 000 habitantes, mientras que en adultos mayores se presenta 1 caso por cada 100 habitantes, en Estados Unidos de América, existen 145 casos por cada 100 000 habitantes con TVP y 500 000 casos por año de diagnosticados con TEP con una tasa de mortalidad de 2 a 10. En México, en el Hospital General del Centro Médico Nacional del IMSS, entre 1981 y 1990 se realizaron alrededor de 1685 necropsias de las cuales se informó que 252 casos correspondientes a un 15% fue debido a TEP (Cabrera *et. al* 2007).

3. ANTECEDENTES

3.1. Enfermedades tromboembólicas

El diagnóstico de las enfermedades tromboembólicas a pesar de tener un avance en el tratamiento usando fármacos anticoagulantes orales, sigue presentado altos índices de elevada morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados y ambulatorios (Murillo C *et al.* 2011).

La trombosis ocurre en áreas con baja irrigación o flujo disminuido, por consecuencia disminuye el oxígeno produciendo un ambiente donde las proteínas antitrombóticas, trombomodulina y el receptor de proteína C endotelial (EPCR), se afectan de manera negativa e impulsa la expresión de P-selectina entre otras proteínas procoagulantes (Myers D 2015, Stone J *et al.* 2017).

Las enfermedades tromboembólicas guardan una estrecha relación con la hemostasia, es decir, el mecanismo fisiológico de coagulación de la sangre, agregación plaquetaria y vasoconstricción para mantener un equilibrio homeostático en el flujo sanguíneo favoreciendo principalmente a la coagulación sanguínea, sin embargo, los procesos que regulan la hemostasia pueden desencadenar patologías (Longo *et al.*, 2012).

El mantenimiento de la integridad vascular en medio de la lesión de la pared del vaso requiere una interacción compleja entre el endotelio vascular, plaquetas y las proteínas circundantes que promueven (procoagulante) o limitan (anticoagulante) la formación de trombosis. La activación sucesiva de factores procoagulantes que conducen a la generación de trombina se reconoce como la cascada de la coagulación, y resulta en la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, y la formación de un trombo estable (Longo *et al.*, 2012).

El modelo clásico de la coagulación contempla una cascada de reacciones enzimáticas en serie en donde la trombina se convierte a fibrinógeno y este a su vez da como resultado la fibrina. En este modelo se contemplan dos vías de activación; Extrínseca e Intrínseca, iniciadas por el Factor XII y el factor tisular FT/Factor VII, respectivamente. En común las dos vías convergen en el nivel del Factor X activo (Xa) (Paramo J, *et al.*, 2009).

En la vía de coagulación extrínseca, cuando ocurre un daño en el endotelio vascular, el Factor Tisular (TF) que se expresa en la membrana celular en el subendotelio de los vasos sanguíneos, queda expuesto al factor FV activado (FVa) circulante en la sangre, dicha interacción forma el complejo extrínseco el cual produce la activación de los factores FIX a FIXa y FX a FXa, posteriormente el factor FXa se une al cofactor FVa produciendo el complejo de protombinasa que activa la protrombina (FII) en trombina (FIIa). La trombina degrada el fibrinógeno presente en la sangre a monómeros de fibrina para su posterior reacción de polimerización en el coagulo de fibrina estable, adicionalmente la trombina activa los factores FXIII a FXIIIa responsable de la reticulación de las fibras de fibrina en los coágulos sanguíneos dando resistencia y estabilidad (FIGURA 1).

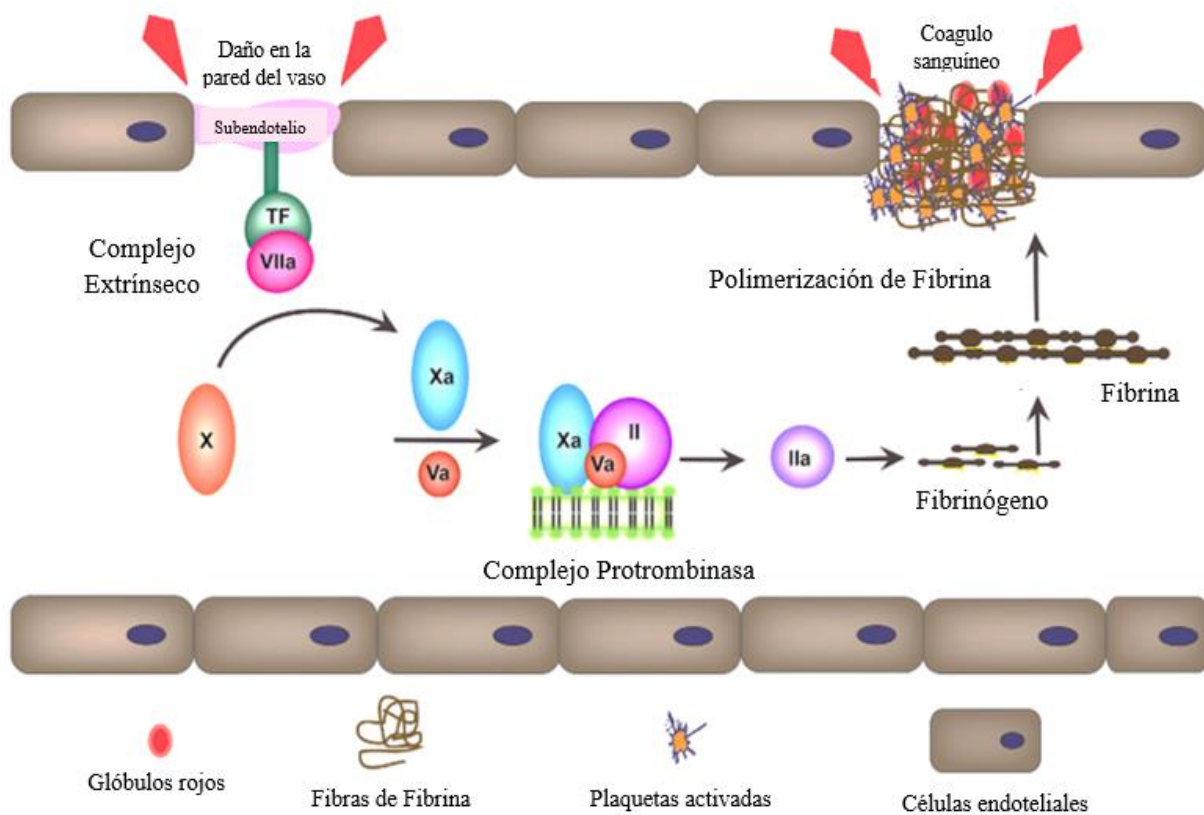


Figura 1. Vía de coagulación extrínseca (Adaptada de Kalathottukaren *et al.* 2018).

Por la vía intrínseca, la coagulación ocurre por activación de contacto, es decir, cuando la sangre entra en contacto con moléculas o superficies cargadas negativamente produciendo una cascada de señalización, el factor FXII sufre un cambio en su conformación y su activación secuencialmente activa los factores FXI a FXIa y FIX a FIXa. Adicionalmente, el

FXIIa es responsable de la ruptura proteolítica de la calicreína plasmática (PK) en calicreína activa que a su vez produce la bradiquinina (BK) a partir del quinínogeno (HK). La unión del factor FIXa con el cofactor VIIIa producen el complejo intrínseco, el cual activa al factor Xa produciendo la trombina quien posteriormente mediará la polimerización de la fibrina (Kalathottukaren *et. al* 2018).

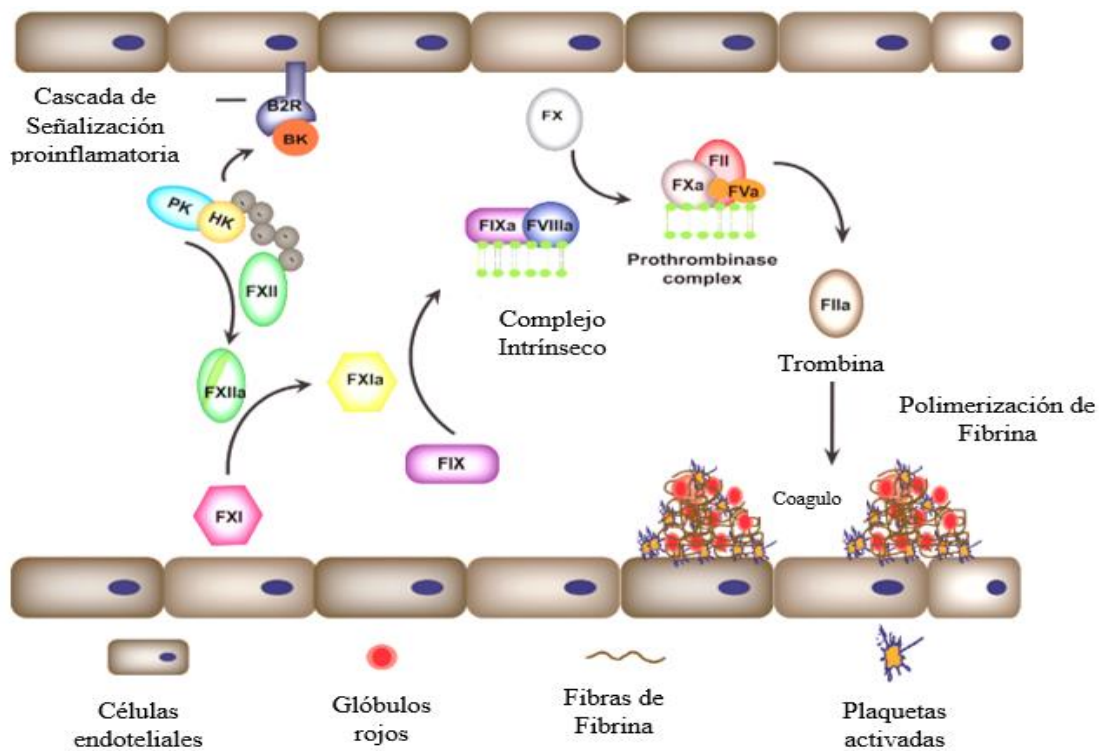


Figura 2. Vía de coagulación intrínseca (Adaptada de Kalathottukaren *et al.* 2018)

Otra manera de explicar la coagulación es mediante el modelo basado en células describe tres fases para la formación del coágulo; La fase de Iniciación comienza en las células productoras de FT, fibroblastos y monocitos, lo que conlleva a la generación de factores XIa, IXa y cantidades pequeñas de trombina, que activara a las plaquetas durante la fase de Amplificación permitiendo la acumulación de factores y cofactores de superficie que permiten el ensamblaje para dar lugar a reacciones enzimáticas donde las proteasas, en la fase de propagación, se combinan con los cofactores en la superficie plaquetaria produciendo grandes cantidades de fibrina para la su polimerización. (Paramo J, *et al*, 2009).

Un trombo se conforma de línea de Zahn, es decir plaquetas que conforman la parte interna, las cuales se rodean por un coágulo de fibrina y glóbulos rojos, al tener una mayor proporción

de factores procoagulantes las probabilidades de formación de trombos aumentan, entre estos factores se encuentran, Factor VII, Factor Von Willebrand, Factor VIII y la protrombina. (Stone J *et al.* 2017).

La formación de trombos está relacionada principalmente con tres factores (Triada de Virchow); estasis venosa, lesión vascular e hipercoagulabilidad. La estasis venosa es ocasionada por inmovilidad, embarazo o un deterioro en el flujo sanguíneo, el daño en la pared endotelial es ocasionado por diversos factores en los que se pueden incluir la interrupción directa del vaso debido algún trauma o cirugía mientras que la hipercoagulabilidad se debe alteraciones en el proceso de coagulación y el sistema hemostático lo cual puede ser resultado de procesos inflamatorios, cambio en la viscosidad de la sangre, aumento de citocinas, proteínas protrombóticas o deficiencias en factores anticoagulantes endógenos. (Mosevoll K *et al.* 2018; Stone J *et al.* 2017).

Existen dos tipos de estados hipercoagulables, heredados y adquiridos; los casos de formas heredadas son poco comunes entre ellas se encuentran la deficiencia de proteína C y S, factor de Leiden, antitrombina III, mutaciones del gen de protrombina mientras que un estado adquirido es bastante común y puede ser ocasionado por medicamentos (Reemplazos hormonales), procesos inflamatorios como, Embarazo, cirugía, traumas (Mosevoll K *et al.* 2018).

Para entender la fisiopatología de las ETV, es necesario prescindir de la triada de Virchow, ya que el daño en la pared vascular con lleva un proceso de producción de proteínas proinflamatorias y protrombóticas, es decir citocinas que promueven la interacción entre leucocitos y células endoteliales, aumento en el factor tisular disponible, proliferación de la adhesión y activación de plaquetas. La interacción entre los leucocitos y las células endoteliales provocara la formación de moléculas de adhesión y posteriormente la formación de coágulos. (Lowe G *et al.* 2004).

3.2. Anticoagulantes

El origen de los agentes antitrombóticos o anticoagulantes que actualmente son comercializados tienen su origen en el año de 1920 cuando la “Enfermedad del trébol dulce” azotó el ganado de América de Norte y Canadá. Los animales tras ser alimentados con heno de trébol dulce presentaban trastornos hemorrágicos internos, las investigaciones realizadas por Schofield y Roderick llevaron a la conclusión de que no se trataba de algún microorganismo, deficiencia nutricional o patología por algún defecto en la protrombina, sin embargo, se encontró que dicha enfermedad era esporádica de acuerdo a las estaciones del año, la principal característica que tenía el heno con el cual que se alimentaba a los animales era la presencia de moho debido a la humedad.

En Wisconsin, tras involucrarse en las investigaciones relacionadas con la enfermedad del trébol dulce, Karl Paul Link y su grupo de investigación llevaron a cabo diferentes estudios para determinar la razón de dicha enfermedad, la primera observación realizada fue la deficiencia de la actividad de protrombina. Dado que se conocía el antecedente del moho, se realizó el aislamiento y la identificación del agente causal, Dicumarol, producido por la acción microbiana sobre la cumarina, éste era usado también como rodenticida sin embargo no era práctico para el control de plagas, lo que llevó a la síntesis de compuestos derivados con una mayor potencia (Shehab *et al.* 2016; Van Gorp *et al.* 2015).

En el año de 1941, el grupo de investigación de Link, logró aislar el 4-hidroxycumarol, conocido actualmente como Warfarina, en honor a la institución Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF), mientras que el Dicumarol había sido introducido a la práctica clínica con éxito, los médicos se resistieron a emplear un agente rodenticida como terapia anticoagulante aunque posteriormente se demostró su superioridad tras ser empleada como tratamiento en pacientes con ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares (Shehab *et al.* 2016; Van Gorp *et al.* 2015).

Los primeros agentes anticoagulantes orales fueron los antagonistas de la vitamina K (AVK) como la Warfarina, ésta bloquea la reacción cíclica de la vitamina K y el epóxido de vitamina K, interviniendo en la reacción de la carboxilación de ácido glutámico, primordial para que los factores II, VII, IX y X procoagulantes ejerzan su función. Los AVK poseen una gran

efectividad, sin embargo, su manejo es complicado, tiene un margen terapéutico estrecho por lo que es necesario un monitoreo y ajuste de dosis en pacientes para evitar eventos adversos, además tienen a interactuar con terapia concomitante a nivel farmacocinético y farmacodinámico.

Previamente a los AVK, en el año de 1930 la Heparina no fraccionada (HNF) era empleada como agente anticoagulante, debido a la facilidad que tiene para unirse y cambiar la conformación de los sitios de unión, además de potenciar la actividad de la antitrombina contra los factores IIa, IXa y Xa; uno de sus inconveniente es el empleo de una vía de administración parental lo que ocasiona serios problemas para ser administrada fuera de un hospital además requerimientos de monitorización y serias reacciones adversas sobre las plaquetas (Gray E *et al* 2012), posteriormente para evitar algunos problemas relacionados con la HNF surgieron las Heparinas de bajo peso molecular (HBPM), como la enoxaparina en 1987, con una mayor biodisponibilidad y un menor régimen de monitoreo, ésta ejerce su poder anticoagulante por la potenciación de la antitrombina III e inactivación del factor Xa y en menor proporción IIa (Levine *et al.* 2004).

En 1990 se comenzaron a comercializar los Inhibidores directos de Trombina (DTI), Ximelagatrán, un profármaco oral de Melagatrán, es un compuesto sintético de péptidos que inhibe de manera directa la trombina uniéndose al sitio activo de la α -trombina soluble y unida a un coágulo, debido una farmacocinética predecible, estable y con una baja variación intersujeto, surge como una alternativa a los AVK debido a la baja interacción de con alimentos, terapia concomitante y principalmente, por no requerir un monitoreo exhaustivo, sin embargo, en el 2006 fue retirado del mercado europeo por ocasionar graves lesiones hepáticas (Ho *et al.* 2006; Vaughan, 2005).

Los antagonistas de la vitamina K (VKAs, por sus siglas en inglés), han sido los únicos anticoagulantes orales disponibles para el uso clínico, éstos han sido usados por décadas. Aunque efectivos los VKAs, presentan un inicio lento y un desplazamiento en su acción, así como numerosas interacciones alimento-fármaco y fármaco-fármaco; así como una respuesta farmacodinámica impredecible que requiere de un monitoreo de la coagulación de rutina y un ajuste de la dosis.

Dentro de la terapia de profilaxis y tratamiento de enfermedades tromboembólicas, existe la necesidad de encontrar un agente anticoagulante de practicidad clínica, es decir, que la vía de administración no suponga un impedimento, con un menor número de interacciones farmacológicas, una monitorización menos rigurosa pero efectiva puesto que en estudios realizados se ha encontrado que aproximadamente 50% de los pacientes que son tratados con AVK presentan un dos situaciones; Exceso o deficiencia del anticoagulante por lo que la salud del paciente se pone en riesgo debido a que puede sufrir hemorragias o un evento tromboembólico, respectivamente, esto se sabe que sucede debido a su complicado manejo en la clínica (Levine *et al.* 2004).

Las investigaciones de la terapia anticoagulante han buscado satisfacer las necesidades clínicas para brindar una mejor calidad de vida al paciente, por lo que han estado dirigidas al desarrollo de fármacos capaces de inhibir enzimas clave en la cascada de coagulación, como lo es el Factor Xa (FXa) responsable de catalizar la síntesis de trombina (Turpie, 2007).

Los anticoagulantes orales directos que específicamente tienen como blanco a un factor de coagulación único (tal como el Factor Xa o trombina) han sido desarrollados en recientes años para superar las limitaciones de los anticoagulantes establecidos. El Factor Xa juega un papel central en la coagulación sanguínea y está activado por ambas vías, la vía intrínseca y la extrínseca.

La inhibición de la cascada de coagulación representa un objetivo importante en el tratamiento de diversos trastornos tromboembólicos. Los anticoagulantes tradicionales, como la heparina no fraccionada o de bajo peso molecular (HBPM), se dirigen a múltiples puntos de la cascada de coagulación con un cofactor. Los VKAs, anteriormente eran la única opción para la anticoagulación oral a largo plazo, no se dirigen directamente a los factores de coagulación, pero conducen a la síntesis de factores de coagulación disfuncionales II, VII, IX y X (Angeno W *et al.* 2012).

Los anticoagulantes orales blanco-específicos inhiben los factores de coagulación específicos: Factor Xa en el caso de Rivaroxaban, Apixaban, y edoxabán y Factor IIa (trombina) para dabigatrán (Eikelboom J *et al.* Weitz J, 2010). El Rivaroxabán, apixabán y edoxabán se unen directa y selectivamente al sitio activo del Factor Xa, independientemente

de si está circulando libremente, unido al complejo de protrombinasa o se encuentra dentro de un trombo existente (Perzborn E *et al.* 2011; Wong P *et al.* 2011).

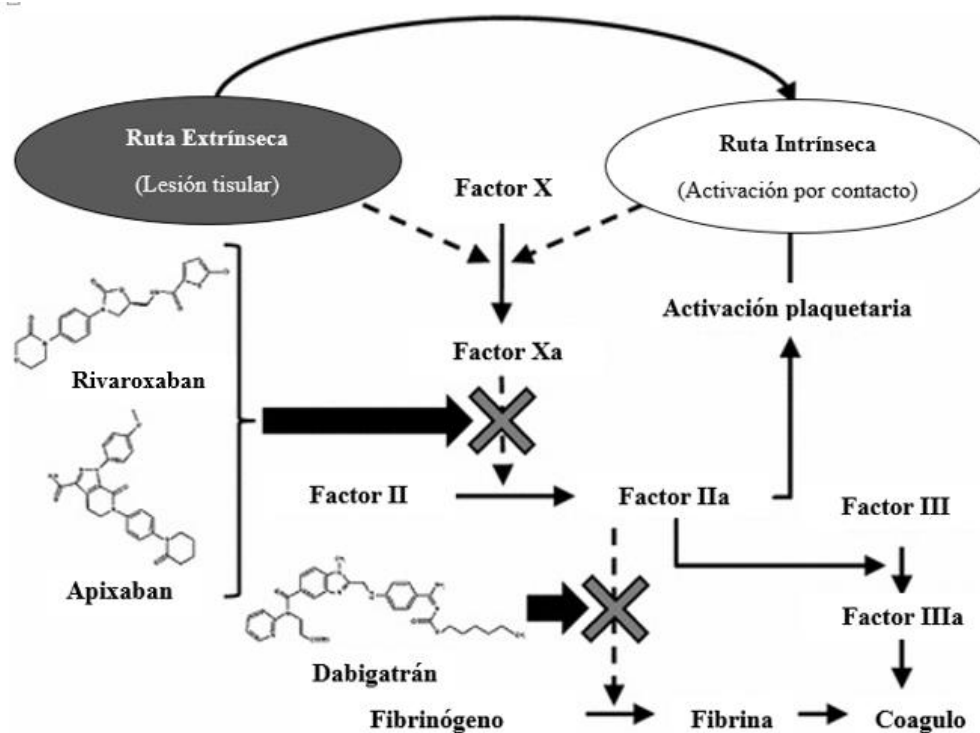


Figura 3. Factores de coagulación blanco por los anticoagulantes orales específicos en las vías intrínseca y Extrínseca. (Adaptada de Perzborn E *et al.*, 2011).

El Factor Xa directamente convierte la protrombina a trombina a través del complejo protrombinasa, conduciendo a la formación de coágulos de fibrina y la activación de plaquetas por la trombina (Weitz, *et al.* 2005). Información a partir de estudios preclínicos y clínicos han confirmado que el Factor Xa y la trombina son blancos viables para una efectiva anticoagulación.

El factor Xa es una serin proteasa de aproximadamente 59 kDa, se encuentra en el plasma a una concentración de 170 nmol/L, tiene una vida media en plasma de 1.5 días, es un sitio crítico para la amplificación de la coagulación catalizando aproximadamente 1000 moléculas de trombina (Ziedins *et al.* 2015). Es por lo que FXa ha sido blanco de diversas investigaciones puesto que actúa en punto mediático del proceso de coagulación.

3.3. Terapia farmacológica con anticoagulantes

El tratamiento de la ETV abarca el uso de agentes anticoagulantes dirigidos a factores procoagulantes y agentes antiplaquetarios. La Sociedad Estadounidense de Hematología (ASH, por sus siglas en inglés) estableció en el año 2018 las directrices para el tratamiento de la trombosis venosa, así como la profilaxis para pacientes hospitalizados.

Actualmente se prescriben anticoagulantes orales blanco-específicos (TSOACs, por sus siglas en inglés) como una alternativa a las heparinas tradicionales y a los antagonistas de la vitamina K (VKAs) para la profilaxis y tratamiento de desórdenes tromboembólicos.

El Rivaroxaban, Dabigatran Etoxilato y el Apixaban son los principalmente aprobados en Europa y Estados Unidos de América para la prevención de los derrames cerebrales y embolismo sistémico en pacientes con fibrilación atrial (FA) no valvular, quienes están en riesgo de un derrame. Los tres agentes están autorizados en Europa para la prevención del tromboembolismo venoso (TEV) posterior a la cirugía de reemplazo de rodilla y cadera.

El Rivaroxaban y el Apixaban están aprobados para su indicación en los Estados Unidos de América (EUA). Para el tratamiento de la trombosis venosa profunda (TVP) y el embolismo pulmonar (EP), así como la prevención de recaídas del TEV, el Dabigatran y el Rivaroxaban están disponibles para EUA y Europa. En Europa, el Rivaroxaban está aprobado para la prevención de eventos aterotrombóticos en pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SCA) y elevados bio-marcadores cardíacos con terapia antiplaquetaria estándar.

En la **Tabla 1**, se presenta los regímenes de dosis para el Rivaroxaban en las indicaciones autorizadas

Tabla 1. Regímenes de dosis para el Rivaroxaban en las indicaciones autorizadas.

Indicación	Rivaroxaban (Dosis)	Ajuste de Dosis	Duración
Prevención de derrame y embolismo sistémico en pacientes con fibrilación atrial de moderado a alto riesgo de derrame.	20 mg (una diariamente)	15 mg (una diariamente) en pacientes con CrCl 15-49 mL/min	En curso siempre que el riesgo de accidente cerebrovascular supere el riesgo de hemorragia
Prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía mayor de reemplazo de cadera o rodilla	10 mg (una diariamente)	Ninguna	12-14 días posterior al reemplazo de rodilla, 35 días posterior al reemplazo de la cadera.
Tratamiento de la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar y prevención del tromboembolismo venoso recurrente	15 mg (dos veces diariamente) por 3 semanas (tratamiento agudo). 20 mg (una vez diariamente) posterior a eso (prevención secundaria)	Ninguna	Generalmente al menos 3 meses, pero continuará siempre que el riesgo de TEV recurrente sea mayor que el riesgo de sangrado
Prevención de eventos aterotrombóticos en pacientes con síndrome coronario agudo reciente y biomarcadores cardíacos elevados (solo en Europa)	2.5 mg (dos diariamente) en combinación con terapia antiplaquetaria dual o simple.	Ninguna	Basado en el riesgo del paciente individual de eventos isquémicos contra los riesgos de sangrado

3.4. Rivaroxaban

El Rivaroxaban es un derivado de la oxazolidinona (5-cloro-N-([(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]-1,3-oxazolidin-5-yl]methy)tiofeno-2-carboxamida (Figura 4) (Roehring S *et al.* 2005), tiene un peso molecular de 435.88 g/mol y se encuentra clasificado bajo el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica como de alta permeabilidad, baja solubilidad es decir clase II.

Fisicoquímicamente, es un polvo blanco, inodoro con un peso molecular de 435.88 g/mol, posee una solubilidad limitada en agua (0.01 mg/mL) dependiente del pH en un medio acuoso de 5 a 7 mg/L con pH 1-9, pero es ligeramente soluble en polietilen-glicol 400 (2,431 mg/L) y soluble en dimetil sulfoxido y acetona. Tiene un punto de fusión de 228 – 229 °C, posee dos pKa uno fuertemente ácido de 13.6 y otro fuertemente básico de -1.6.

Usando un ensayo celular en la línea Caco-2 su aparente permeabilidad de la molécula a concentraciones de 1 a 100 µM fue aproximadamente 8×10^{-6} cm/s. Con un valor de coeficiente log P (partición octanol/agua) de 1.5. El Rivaroxaban exhibe moderada lipofilidad que es reflejada en su afinidad baja a moderada por tejidos periféricos. (Mueck *et al.* 2014)

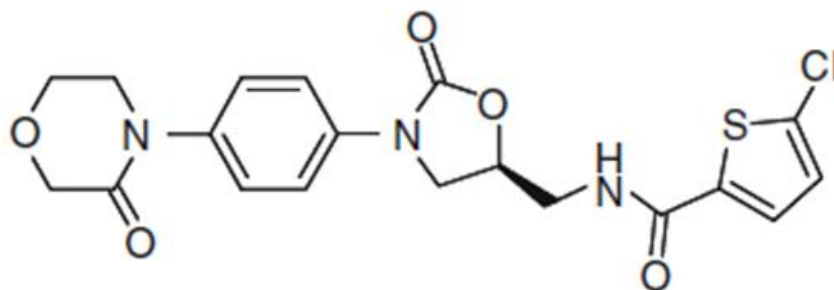


Figura 4. Estructura química del Rivaroxaban

3.4.1. Farmacocinética

Las concentraciones de Rivaroxaban se han determinado en plasma humano usando la cromatografía líquida de alto desempeño en “tándem” con el método de espectrometría de masas. Este tipo de metodologías son ampliamente utilizadas en ensayos farmacológicos y en estudios clínicos teniendo un rango de concentraciones de 0.50 – 500 µg/L, para dosis

únicas y múltiples de 5 a 30 mg en pacientes, las concentraciones dentro de este rango fueron consideradas como relevantes y pudieron ser determinadas con una alta exactitud inter ensayo (93.3 – 102.9%) y precisión ($\leq 7.4\%$) (Rohde . 2008).

El Rivaroxaban se absorbe rápidamente con concentraciones máxima en plasma (C_{max}) a las 2 a 4 horas después de una dosis única de 1.25 mg a 80 mg y en dosis múltiples (por arriba de los 30 días dos veces al día), este fármaco no presenta acumulación de forma relevante posterior a una dosificación múltiple (Kubitza D *et al.* 2005).

Se ha demostrado que la biodisponibilidad del Rivaroxaban es casi completa (80-100%) en sujetos sanos a una dosis de 10 mg, independientemente del ayuno o condiciones de dieta alimentaria, exhibe una farmacocinética lineal de 1.25 mg hasta 15 mg. La ingesta de alimentos no afectó el área bajo la curva (concentración plasmática-tiempo) o C_{max} después de una dosis de 10 mg. Sin embargo, la biodisponibilidad de una dosis de 20 mg fue de 66% bajo condiciones de ayuno. El grado de absorción se acercó a la integridad cuando se administró un comprimido de Rivaroxaban de 20 mg con alimentos, dando lugar a un aumento del área bajo la curva media del 39%. No existe influencia con respecto al tipo de alimentación (dieta alta en grasas o alta en carbohidratos) en su farmacocinética (Stampfuss *et al.* 2013).

Cuando se administra con la comida, los valores del AUC y C_{max} fueron similares para comprimidos de 20 mg enteros y desintegrados, mientras que un comprimido desintegrado y suspendido en agua administrado por un tubo nasogástrico y seguidamente de agua, proporcionó valores similares del ABC, pero existió una reducción del 18% en la C_{max} (Janssen Pharmaceuticals Inc. Xarelto® (Rivaroxaban) Prescribing Information; 2013). De acuerdo con un estudio realizado por Matos *et al.* 2017 en pacientes tratados por Rivaroxaban empleando dosis de 10 mg, 15 mg y 20 mg, se encontraron concentraciones plasmáticas de 110 ± 95 ng/mL, 141 ± 92 ng/mL y 183 ± 82 ng/mL respectivamente.

En la figura 5 se muestra un ejemplo del perfil farmacocinético de Rivaroxaban obtenido a partir de un estudio de biodisponibilidad administrando dosis únicas de 1.25 mg hasta 80 mg en sujetos sanos (Kreutz R. 2011).

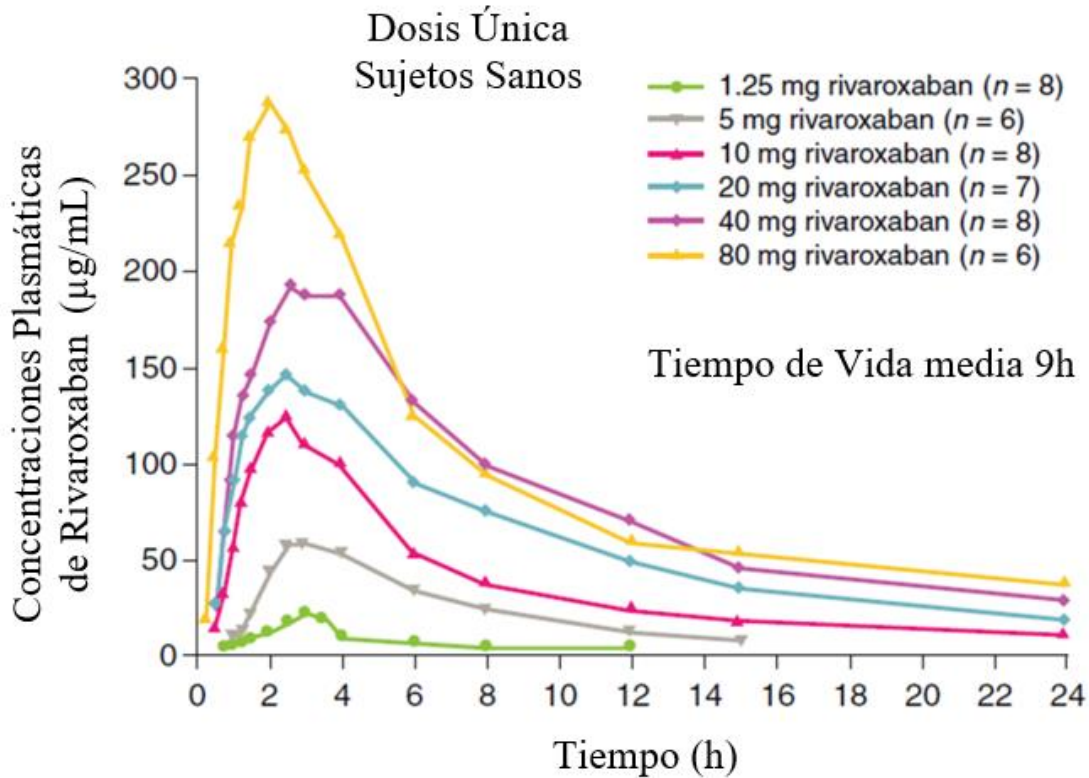


Figura 5. Perfil farmacocinético del Rivaroxaban de acuerdo con el curso temporal de la concentración obtenida posterior a la administración oral única (Adaptada de Kreutz 2011).

3.4.1.1. Unión a proteínas y distribución

Estudios en roedores se demostró que el Rivaroxaban se distribuye de manera heterogénea a los tejidos y órganos, aunque no penetra la barrera hematoencefálica. Se demostró que en ratas el [¹⁴C]Rivaroxaban y sus metabolitos marcados fueron capaces de penetrar la barrera placentaria a un grado moderado (con una razón de 0.2 del AUC feto/sangre materna), y su secreción hacia la leche materna fue del 2% de la dosis administrada.

Estudios in vitro demostraron que el Rivaroxaban se une a proteínas del plasma en un 92-95% siendo reversible. Debido a su alta unión a proteínas plasmáticas, Rivaroxaban no se espera que sea dializable. El volumen de distribución en estado estacionario es de aproximadamente 50 L (0.62 L/kg), indicando así su afinidad moderada hacia los tejidos periféricos (Weinz C *et al.* 2005; Bayer Pharma AG. Xarelto ®(Rivaroxaban) Summary of Product Characteristics; 2013).

3.4.1.2. Metabolismo y Eliminación

Un estudio realizado por Lang *et al.* 2009 con microsomas hepáticos y hepatocitos de humanos y perros, demostró que la principal ruta de vía metabólica es la oxidación del anillo de morfolinona y oxazolidinona, además de involucrarse rutas hidrolíticas, dichas rutas representan un 78% y 18% respectivamente del metabolismo de Rivaroxaban, produciendo 18 metabolitos.

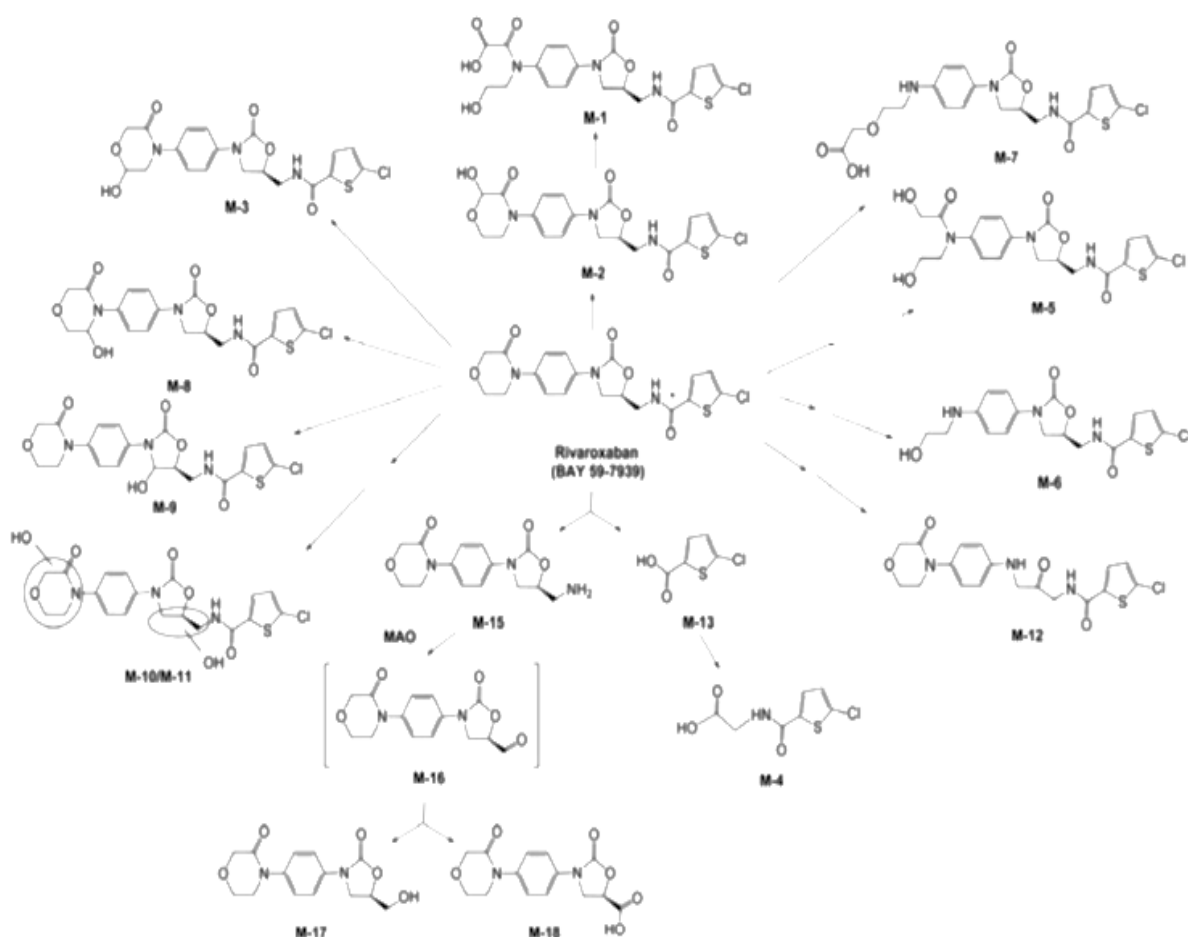


Figura 6. Esquema de Metabolismo In vitro de Rivaroxaban

Weinz *et al.* 2009 evaluaron el metabolismo de Rivaroxaban empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución y su detección de radioactividad por conteo de centelleo, encontraron que el 57% de la dosis oral administrada da sufre degradación esto concuerda con lo reportado por la European Medicines Agency 2008, que indica que aproximadamente dos tercios de la dosis de Rivaroxaban sufre degradación metabólica.

En el metabolismo de Rivaroxaban están involucradas enzimas del citocromo P450 (CYP3A4/5, CYP2J2) y mecanismos independientes de CYP, las enzimas del citocromo involucradas, CYP3A4 representa el 18% y el CYP2J2 con aproximadamente el 14% de la eliminación total de Rivaroxaban. Adicional a la biotransformación oxidativa, la hidrólisis de los enlaces amida no mediada por el CYP representa el 14%, en el estudio realizado no se detectaron metabolitos activos en plasma, el área bajo la curva AUC no sufrió cambios significativos (Weinz *et al.* 2009).

La eliminación de Rivaroxaban se produce por vía renal en un 66% y aproximadamente 28% por vía hepatobiliar, aproximadamente el 36% es eliminado como fármaco activo (sin cambios) en la orina. De la dosis administrada, el 43% se excreta como fármaco inalterado, de este porcentaje, 36% de la dosis de Rivaroxaban eliminada en orina y el 7% restante a través de heces (Weinz C. *et al.* 2009). Debido a que la secreción renal activa representa un 30% y la filtración glomerular 6%, los estudios de interacción *in vitro* e *in vivo* sugieren que los transportadores Glicoproteína P (P-gp) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP), al estar involucrados en estos procesos, la inhibición de éstos reduciría el aclaramiento renal ocasionando la acumulación de Rivaroxaban. (Gnoth M *et al.* 2011; Mueck W *et al.* 2013),

La eliminación del Rivaroxaban del plasma ocurre con una vida media de 5-9 h en sujetos jóvenes sanos y de 11-13 h en sujetos mayores (Kubitza D *et al.* 2005; Kubitza D *et al.* 2008). El aclaramiento sistémico después de la administración intraveosa en sujetos sanos es aproximadamente 10L/h (0.14L/h/kg), con una variabilidad inter-sujeto (coeficiente de variación) entre el 30-40% (Weinz C *et al.* 2009).

3.4.2. Interacción farmacéutica del Rivaroxaban

3.4.2.1.Efecto de otros fármacos sobre la farmacocinética del Rivaroxaban

En estudios clínicos fase I en sujetos sanos, los parámetros de absorción y farmacocinéticos del Rivaroxaban no fueron afectados por cambios en el pH gástrico inducido por el antagonista al receptor H₂, ranitidina. Tampoco se observaron cambios en los parámetros farmacocinéticos cuando una dosis única de 20 mg de Rivaroxaban fue administrado a sujetos

sanos que habían recibido omeprazol 40 mg diarios por 5 días (Kubitza D *et al.* 2006; Moore K *et al.* 2011).

Así mismo, otros estudios mostraron que la co-administración del Rivaroxaban con naproxeno (500 mg) (Kubitza D *et al.* 2007), aspirina (500 mg seguida de 100 mg) (Kubitza D *et al.* 2006), clopidogrel (300 mg seguido por 75 mg) (Kubitza D *et al.* 2012), enoxaparina (40 mg) (Kubitza D *et al.* 2013) y Warfarina (titulada a un INR de 2.0 – 3.0) (Kubitza D *et al.* 2013) no afectaron la farmacocinética del Rivaroxaban.

Otros estudios clínicos de fase I, demostraron que no existe interacción farmacocinética clínicamente relevante entre el Rivaroxaban y el midazolam, sustrato del CYP3A4; la digoxina, sustrato del P-gp o con la atorvastatina sustrato del CYP3A4/P-gp, confirmando que el Rivaroxaban no es un inductor o inhibidor de cualquier isoforma principal de CYP. La administración concomitante del Rivaroxaban con inhibidores fuertes del CYP3A4 y P-gp/BCRP (ejemplo: ketoconazol y ritonavir), significativamente incrementa la exposición del Rivaroxaban. Cuando una dosis de 10 mg de Rivaroxaban y 200 mg de ketoconazol en estado estacionario una vez al día, fue coadministrado, el AUC y la Cmax del Rivaroxaban se incrementaron de 1.8 a 1.5 veces, respectivamente (Mueck W *et al.* 2013; Kubitza D *et al.* 2012).

3.4.3. Perfil Farmacodinámico

En un estudio realizado controlado con placebo, con 108 sujetos sanos en dosis escalonada con una dosis única oral de 1.25 – 80 mg, el Rivaroxaban tuvo un efecto de manera prolongada dependiente de la dosis del Tiempo de Protrombina (PT, Figura 7) y del Tiempo de tromboplastina Parcial Activado (aPTT, datos no mostrados en la gráfica). Otro estudio de fase I, demostró la inhibición del factor Xa dependiente de la dosis posterior a la dosificación múltiple en sujetos sanos; con la consecuente dosis dependiente del PT, la prolongación y de forma última la generación de la inhibición de la trombina. Las concentraciones en plasma del Rivaroxaban están íntimamente correlacionadas con la prolongación del PT tanto en sujetos sanos como en pacientes que serían candidatos a reemplazo total de cadera o de rodilla (Kreutz R. 2012).

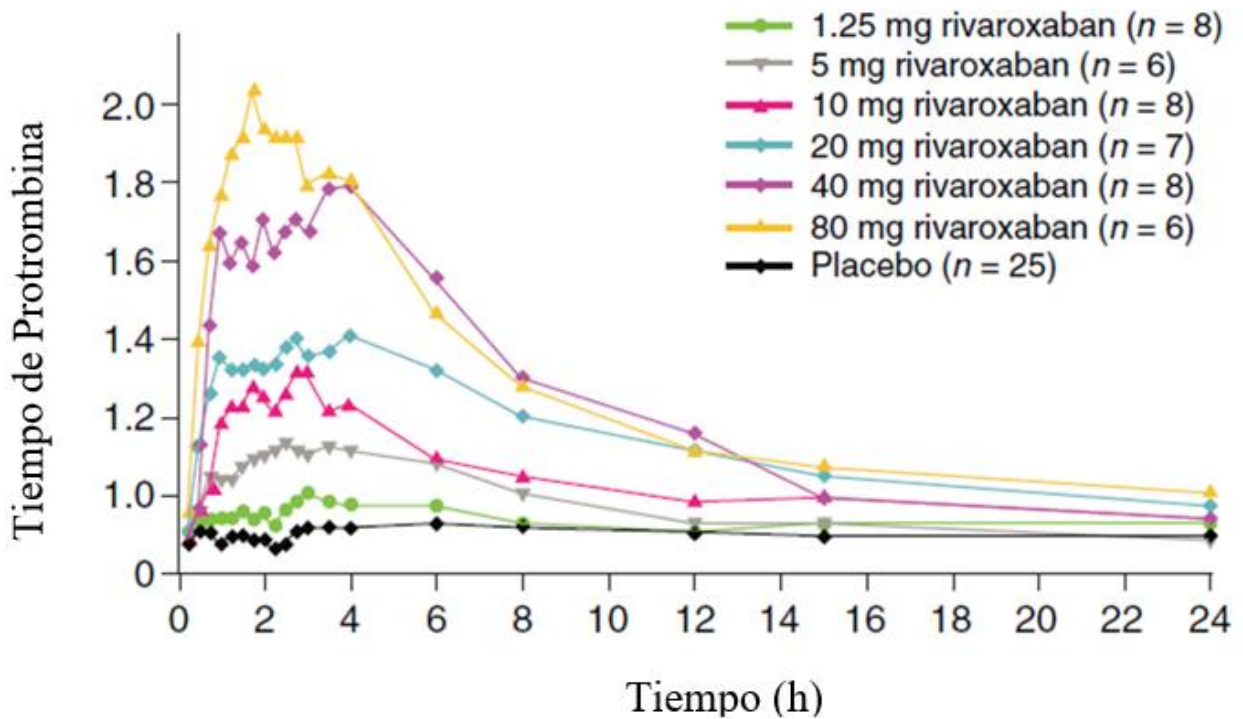


Figura 7. Curso temporal del Tiempo de inhibición de la Protombina (PT) posterior a una dosis oral única. (Adaptada de Kreutz 2011).

3.4.4. Reacciones adversas del Rivaroxaban

Los pacientes que participan en ensayos clínicos difieren en muchos aspectos de los pacientes que reciben tratamiento en la práctica clínica normal. Por eso es importante monitorear la efectividad y la seguridad de los medicamentos, incluso después de haber recibido la autorización de comercialización. Un componente para la estrategia de farmacovigilancia de las autoridades reguladoras es el sistema de notificación espontánea, en el que personal sanitario y los pacientes pueden informar sobre las sospechas de las reacciones adversas de los fármacos; que ocurren con el uso clínico normal de ellos. La ventaja de este método es que se pueden detectar señales de reacciones graves, inusuales y / o desconocidas de los medicamentos. Estos pueden ser investigados y potencialmente confirmados. Una desventaja es que muchos eventos notificables incluyendo eventos graves, no se reportan. Las reacciones adversas a los medicamentos se definen como graves si son fatales, potencialmente mortales, requieren de hospitalización prolongada, causa discapacidad persistente, significativa o incapacidad para trabajar o una anomalía congénita e incluso defectos de nacimiento. En suma, la reacción en sí puede resultar en un evento adverso que se clasifica como grave. Debido a la falta de informes, los informes espontáneos no se pueden

utilizar aisladamente para calcular la frecuencia de una reacción adversa dada. Además, las tasas de notificación difieren entre los fármacos. Las reacciones adversas se informan con mayor frecuencia para los nuevos medicamentos que para los más antiguos, por ejemplo. El sistema de notificación espontánea no puede utilizarse para comparar la incidencia de reacciones adversas por diferentes fármacos (Eek A *et al.* 2018).

De acuerdo con lo reportado en la *Prescription Database and Norwegian Pharmacovigilance Database*, un total de 28 243 usuarios reciben Rivaroxaban como tratamiento a diferentes enfermedades, en un periodo comprendido entre el 1 de junio de 2013 al 31 de mayo de 2015, se han reportado casos de hemorragias cerebrales, articulares, gastrointestinales y renales, anemia, úlceras, dolor epigástrico, trombosis, infarto cerebral, dolor de cabeza, disnea, picor, a pesar de mostrar un índice terapéutico y un margen de seguridad mayor, respecto a los otros anticoagulantes, se debe tener cuidado en el manejo de la terapéutica de Rivaroxaban.

3.4.5. Efectos del Rivaroxaban

3.4.5.1. Efectos sobre el peso corporal y sobre el género humano

En un estudio con sujetos femeninos y masculinos a doble ciego y controlado con placebo, el perfil farmacocinético y farmacodinámico de 10 mg de Rivaroxaban se mantuvo sin cambios en un rango de peso de 45 – 173 kg, sugiriendo que puede usarse a una dosis fija no correlacionada con el peso. No existieron diferencias debida al peso corporal en la incidencia o naturaleza de los eventos adversos en los sujetos sanos enrolados en el estudio. Se demostró que el género no afecta al perfil farmacocinético o farmacodinámico del Rivaroxaban a una administración de 10 mg (Kubitza D *et al.* 2007).

3.4.5.2. Efectos sobre la edad y la insuficiencia renal

La exposición general al Rivaroxaban fue mayor en ancianos que en individuos más jóvenes con una prolongación de la vida media hasta 13 h. Esta observación es en gran parte atribuible a la disminución general de la función renal observada en los ancianos. Consistente con esto, estudios en voluntarios sanos han demostrado que la insuficiencia renal resulta en una disminución del aclaramiento renal de una dosis única de 10 mg de Rivaroxaban y aumenta en general la exposición al fármaco (Figura 8). Un estudio reciente confirmó el incremento

la exposición en el plasma y los efectos farmacodinámicos en sujetos con insuficiencia renal. Sin embargo, la influencia de la función renal sobre el aclaramiento de Rivaroxaban fue moderada, ya que se espera que un medicamento solo se excrete parcialmente por vía renal. De acuerdo con la indicación aprobada del Rivaroxaban 10 mg, no se requiere ajuste de dosis en la insuficiencia renal leve (aclaramiento de creatinina [CrCl] 50 – 80 mL/min) o moderada (CrCl 30 – 49 mL/min). Sin embargo, el Rivaroxaban debe usarse con precaución en pacientes con insuficiencia renal moderada con tratamiento concomitante con otros fármacos que puedan incrementar la concentración del Rivaroxaban y principalmente en pacientes con insuficiencia renal severa (CrCl 15 – 29 mL/min). El Rivaroxaban no es recomendado en pacientes con un CrCl < 15 mL/min. (Kreutz 2011).

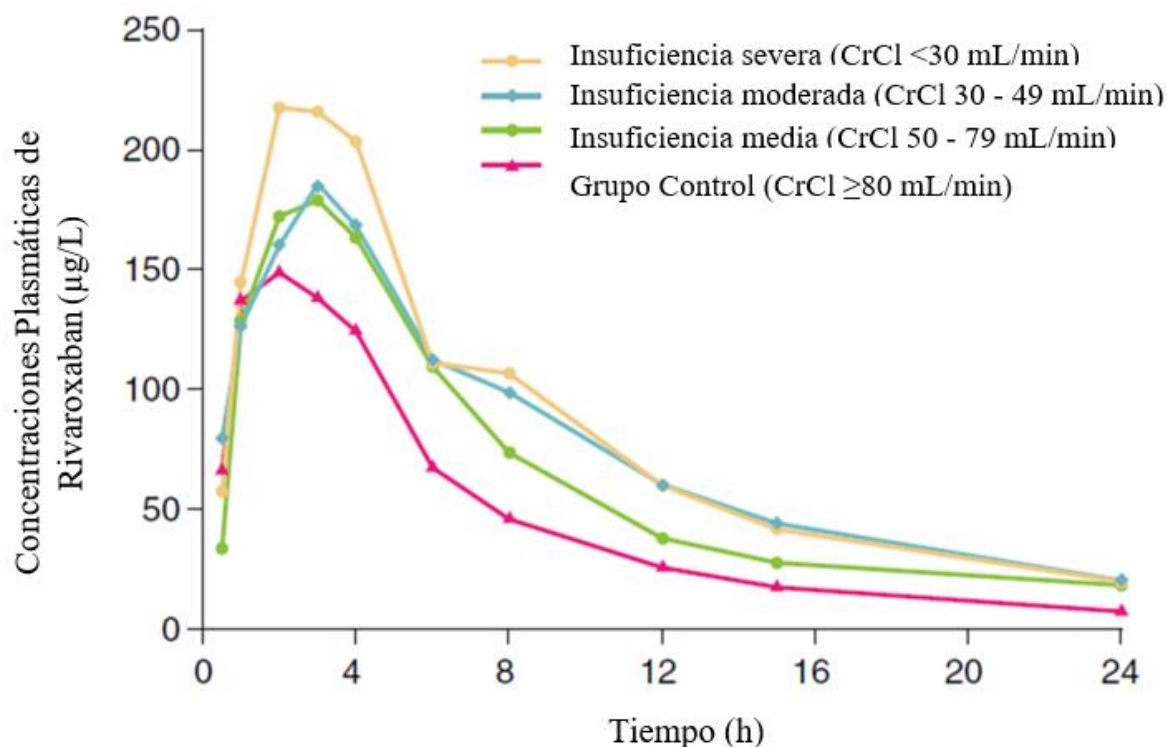


Figura 8. Perfil farmacocinético de Rivaroxaban en sujetos sanos (Grupo control) y pacientes con insuficiencia renal, administrando una dosis de 10 mg. (Adaptada de Kreutz 2011)

3.4.5.3.Efectos sobre el daño hepático

No existen diferencias relevantes en los perfiles farmacocinéticos o farmacodinámicos en pacientes con daño hepático leve (Child-Pugh A) posterior a la administración de una dosis de 10 mg. Sin embargo, sujetos con daño hepático moderado (Child Pugh B) mostraron un incremento y exposición prolongada con aclaramiento total corporal reducido del Rivaroxaban e incremento en la inhibición del factor Xa comparado con sujetos sanos (Figura 9). Consecuentemente, el Rivaroxaban se encuentra contraindicado en pacientes con enfermedades hepáticas significativas asociadas con coagulopatías que conduzcan a un riesgo de sangrado clínicamente relevante. El Rivaroxaban puede ser usado con precaución en pacientes cirróticos con daño hepático moderado si no está asociado con alguna coagulopatía y no requiere de ajuste de dosis en pacientes con otras enfermedades hepáticas (Bayer Pharma AG, 2009).

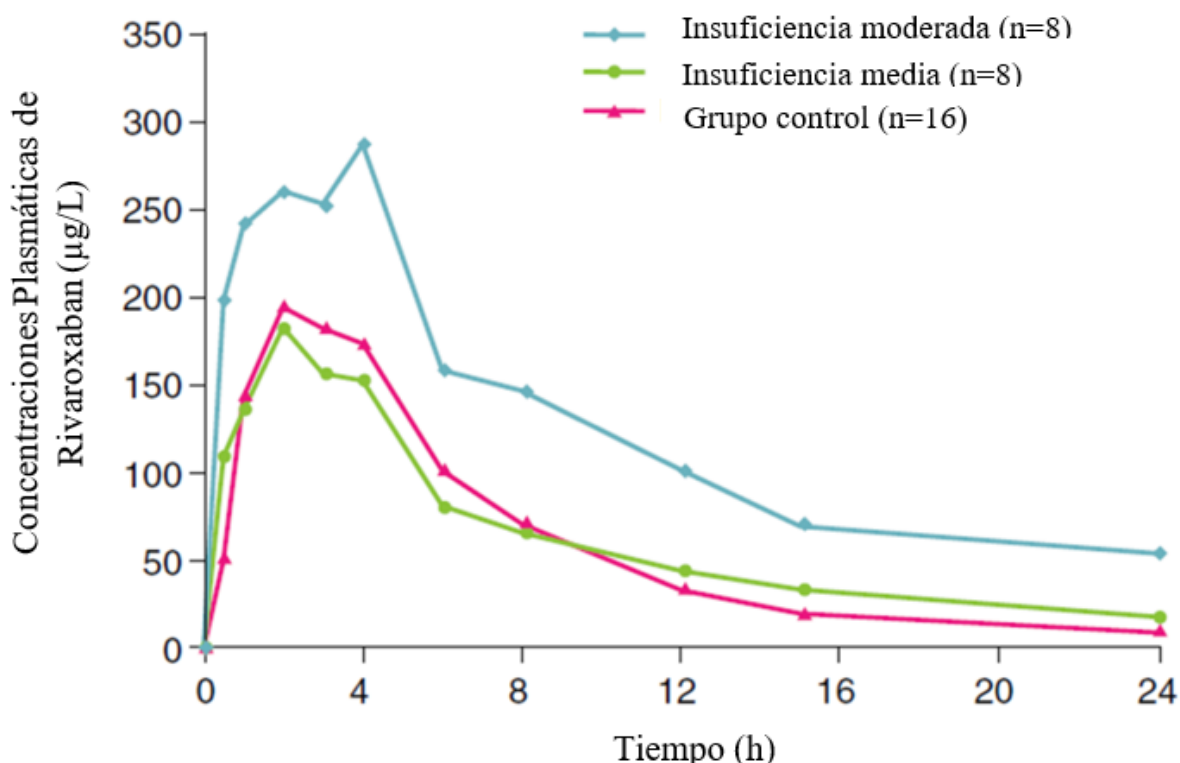


Figura 9. Perfil farmacocinético de Rivaroxaban en sujetos sanos (Grupo control) y pacientes que presentan daño hepático.

3.5. Métodos analíticos para la cuantificación de anticoagulantes

Con la aparición de los anticoagulantes orales y sus efectos farmacológicos, estos han sido correlacionados con las concentraciones en plasma, por lo que el desarrollo de técnicas analíticas para su cuantificación en muestras biológicas se ha incrementado con el tiempo. En los datos clínicos recién encontrados se recomienda aplicar una monitorización farmacocinética y plasmática de los anticoagulantes siempre que sea posible, al menos en poblaciones especiales o sensibles. Esto demanda una farmacoterapia personalizada y consecuentemente exige técnicas analíticas más precisas y sensibles. Esta necesidad clínica insatisfecha impulsó el desarrollo y validación de varias metodologías cromatográficas para la determinación rutinaria de aquellos fármacos anticoagulantes en fluidos corporales con precisión, exactitud y reproducibilidad.

Las técnicas de cromatografía de líquidos se han convertido en herramienta importante no solo para apoyar en la monitorización terapéutica de los fármacos anticoagulantes, sino también durante el desarrollo de fármacos en estudios clínicos y no-clínicos, así como durante el control de calidad de formulaciones farmacéuticas.

Adicionalmente otras técnicas están disponibles para la evaluación de la actividad anticoagulante de este tipo de fármacos, como los ensayos específicos de coagulación (tiempo de trombina diluida y ensayos de anti-Xa cromogénicos calibrados). No obstante, estas técnicas tienen poca sensibilidad y no son lo suficientemente sensibles ni exactas para cuantificar bajas concentraciones en plasma, teniendo en cuenta estas limitaciones, técnicas analíticas de alta resolución como HPLC o UPLC acoplados a detectores UV o MS/MS han sido considerados como la mejor estrategia para evaluar con precisión y exactitud las concentraciones de los fármacos anticoagulantes orales en muestras biológicas (Gouveia F *et al.* 2019).

3.6. Cromatografía de Líquidos de alta resolución acoplada a Espectrometría de Masas/Masas

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento en los últimos años 15 años ha mostrado mejoras para obtener una mayor eficiencia, resolución, selectividad y optimizar tiempos, de esta manera, se ha incrementado el uso en el análisis farmacéutico, alrededor de un 20%, en desarrollo, control de calidad de productos medicamentos y en bioanálisis, empleada para el monitoreo y estudios clínicos.

En bioanálisis, la cuantificación de fármacos, metabolitos o biomarcadores se encuentran concentraciones bajas en fluidos biológicos como sangre, plasma suero, orina y saliva o en tejidos, por lo que se requiere sensibilidad, selectividad y robustez para una correcta caracterización.

El acoplamiento de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas/Masas permite tener métodos bioanalíticos que cumplen con dichos requisitos, en tiempos de análisis cortos, además de permitir el análisis de un mayor número de compuestos, incluyendo farmoquímicos y proteínas (Nováková *et al.* 2017).

El principio de la técnica analítica de espectrometría de masas es la separación de compuestos con base a su relación masa/carga (m/z), para llevar a cabo su cuantificación las moléculas deben formar iones, los cuales son separados por acción de potenciales eléctricos y dirigidos por un alto vacío dentro el espectrómetro de masas hasta llegar al detector, donde se traduce la señal proporcional a la concentración de los iones de la molécula. (Kaklamanos G. *et al.* 2012; Nováková *et al.* 2017).

Existen tres tipos de analizadores de masas ampliamente utilizados, Cuadrupolo (Q), Tiempo de Vuelo (TOF) y Trampa de Iones (Ion-trap), sin embargo, existen instrumentos híbridos que combinan dos analizadores, como por ejemplo qTOF, Ion-trap-TOF o la combinación de Ion-trap con análisis de alta resolución como Orbitrap o resonancia del ciclotrón iónico transformada de Fourier (FT-ICR).

El analizador de Cuadrupolo es el más utilizado, su diseño se basa en cuatro barras de metal alineadas conectadas eléctricamente, con voltajes de radiofrecuencias (RF) y con voltajes de corriente continua (CC) que producen un campo eléctrico en el que solamente lo iones de un

determinado m/z serán detectados, por lo que los iones inestables son eliminados del sistema(Figura 10).

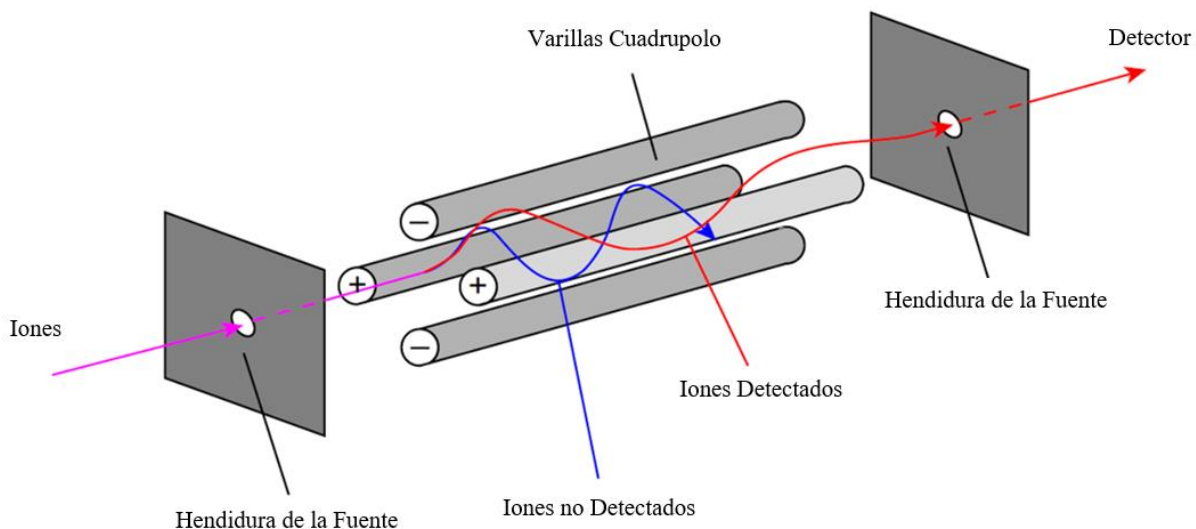


Figura 10. Esquema de la separación de iones en Cuadrupolo (Adaptada de Kaklamanos G. *et al.* 2012)

Los analizadores triple cuadrupolo son los más empleados en el análisis cuantitativo, en el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona la masa con base en su m/z (ion precursor) la cual será colisionada con un gas de alto potencial de ionización (Nitrógeno o Argón) a alta presión en el segundo cuadrupolo (Q2) o celda de colisión, los iones producidos después de la colisión (ion producto) son analizados en el tercer cuadrupolo (Q3) para posteriormente pasar al detector donde la abundancia de los iones se mide como una señal eléctrica. Para la formación de los iones productos, se describen diferentes formas de ionización entre los que destacan, desplazamientos de electrones y reordenamientos de hidrógeno (Kaklamanos G. *et al.* 2012).

Existen diferentes técnicas para lograr la ionización de las moléculas entre ellas; Ionización por Electrospray (ESI), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI), caracterizadas por la producción de iones (M+H)⁺ o (M-H)⁻ usando altos voltajes y nebulización neumática, también existe la ionización por Desorción con Láser Asistida por Matriz (MALDI) empleada para el análisis de biomoléculas. La Ionización por Electrospray (ESI) es comúnmente empleada en bioanálisis, consiste en la formación de iones en fase líquida.

La formación de los iones ocurre en una cámara con un vacío de $10e^{-3}$ Pa, el analito en solución, ya ionizado debido al efecto del pH del medio, pasa a través de un capilar con una diferencia de potencial, formado el Electrospray, posteriormente las moléculas son atraídas al cono de Taylor con una diferencia de potencial hasta la entrada al analizador, mientras que las gotas son transferidas del capilar hacia el cono, el solvente se evapora por acción del gas de desolvatación, (Nitrógeno) ocasionando la fisión de las gotas alcanzando el límite de Rayleigh, donde la tensión superficial no puede sostener la carga y se produce la explosión Coulombica, por una repulsión de iones con la misma carga (Figura 11).

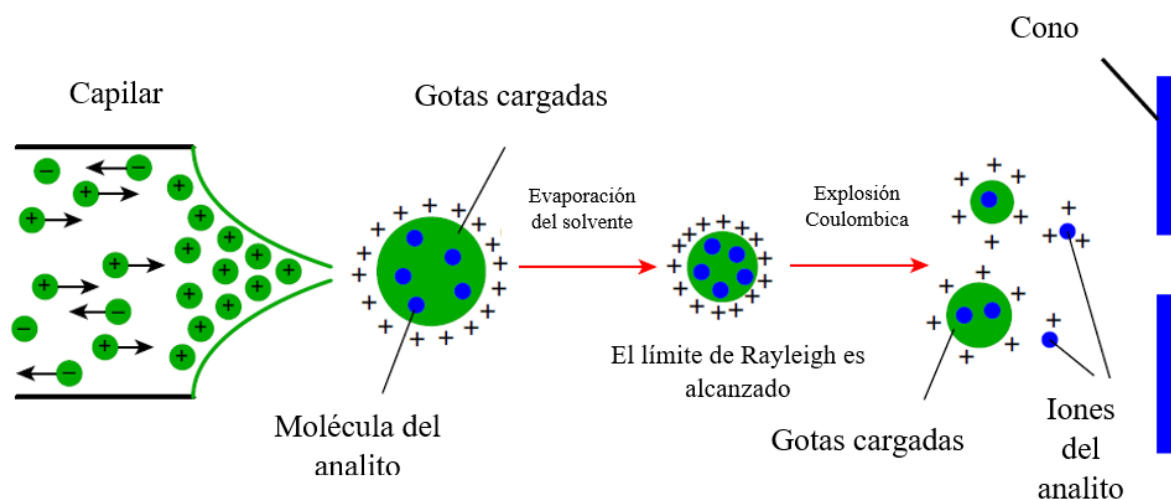


Figura 11. Representación gráfica de Ionización por Electrospray (Adaptada de Kaklamanos G. *et al.* 2012)

3.7. Técnicas de preparación de muestras para Cromatografía MS/MS

Los especímenes biológicos humanos, también conocidos como bioespecímenes, la mayoría de las veces incluyen: sangre, plasma y orina, estos son colectados durante los procedimientos de monitoreo farmacocinético y en los estudios clínicos. Adicionalmente también pueden existir homogenados de tejidos o sangre-plasma colectados a partir de animales desde la parte de investigación básica o en estudios preclínicos. Sin embargo, en este caso la mayoría de las técnicas validadas de HPLC para la cuantificación de fármacos orales anticoagulantes se han desarrollado en muestras humanas de plasma u orina.

Varias metodologías han sido empleadas para minimizar las interferencias cromatográficas y para evitar el deterioro de la columna. Convencionalmente, la preparación de las muestras ha sido ejecutadas ya sea por precipitación de proteínas (PP), extracción de fase líquido-

líquido (LLE) o extracción de fase sólida (SPE), pero varias modificaciones modernas tales como la micro extracción en fase sólida (SPME), micro extracción líquido-líquido (LLME), la micro extracción por absorbentes empacados (MEPS), polímeros molecularmente impresos (MIP) actualmente están siendo empleados. Para seleccionar la metodología adecuada para la preparación de la muestra, es importante tomar en cuenta el objetivo específico de la investigación, el tipo de matriz biológica y las características fisicoquímicas del fármaco anticoagulante oral (Gouveia F *et al.* 2019).

3.8. Validación de métodos bioanalíticos

En la industria farmacéutica los métodos bioanalíticos juegan un papel importante en la cuantificación de fármacos de bajo peso molecular, metabolitos y macromoléculas, como proteínas, en fluidos biológicos lo cual permite su caracterización farmacocinética, biodisponibilidad, interacciones entre fármacos, bioequivalencia y/o biocomparabilidad, es por ello que se necesario demostrar mediante un proceso de validación que los métodos analíticos son adecuados para lo que fueron diseñados y que los resultados obtenidos serán precisos, exactos y reproducibles. (González O *et al.* 2014; Kadian N *et al.* 2016).

La validación del método es a evidencia documental que garantiza que los datos son confiables y cumple con el objetivo para el que el método fue diseñado, existen tres tipos de validaciones; validación completa la cual se ejecuta cuando se trata de metodologías nuevas, validación parcial es evaluada cuando existen modificaciones como por ejemplo cambio en el sistema de detección, cambio en equipo empleado en el procesamiento de muestras, anticoagulante, entre otras, en ocasiones las validaciones parciales pueden evaluar únicamente precisión y exactitud entre ensayos o prácticamente realizar una validación completa, esto dependerá de los cambios realizados, finalmente se tiene la validación cruzada tiene como objetivo la comparación de los parámetros de dos o más métodos bioanalíticos para generar datos de un mismo estudio, este tipo de validación es necesaria cuando el análisis de muestras de un estudio clínico se realiza en más de un laboratorio. (Food and Drug Administration, 2018)

A lo largo de la historia las entidades regulatorias han intentado armonizar las guías de validación con el objetivo de tener uniformidad en los requisitos que debe cumplir un método

analítico. En la tabla 2 se muestran los parámetros que deben ser evaluados durante la validación del método analítico.

Tabla 2. Parámetros de validación

Parámetro	Definición
Selectividad	Capacidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la matriz
Especificidad	Capacidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros compuestos en la muestra.
Linealidad	Es la relación entre la respuesta instrumental con respecto a la concentración del analito en un rango de trabajo.
Límite de cuantificación	Capacidad del método analítico para cuantificar la concentración más baja del analito de manera confiable
Exactitud	Concordancia entre los resultados medios obtenidos experimentalmente y el valor nominal.
Integridad de la dilución	Evalúa la capacidad del método para cuantificar de manera confiable las concentraciones por encima del límite superior de cuantificación o en caso de volumen parcial de muestra.
Precisión (Repetibilidad / Reproducibilidad)	Es la capacidad del método analítico para reproducir resultados bajo las mismas condiciones en un periodo corto y con variaciones, por ejemplo, diferente día, diferente analista.

Parámetro	Definición
Efecto Matriz	Alteración directa o indirecta que ocasiona una interferencia en la respuesta que puede deberse a la presencia de componentes no deseados u otras sustancias interferentes en la muestra
Robustez (Tolerancia)	La capacidad del método de obtener resultados reproducibles considerando cambios como, columna, equipos
Recobro	Mide la eficiencia del método de extracción para la obtención del analito de la matriz.
Estabilidad en matriz / solución	Es la capacidad del analito de permanecer dentro de las especificaciones establecidas durante su periodo.
Prueba de Acarreo	Es el efecto generado por concentraciones altas ocasionando la aparición de picos o aumento de la señal, debido a una contaminación de la muestra por el inyector.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un antecedente que precede a los agentes anticoagulantes desde su descubrimiento es el hecho de ser fármacos con un estrecho marco terapéutico, además de causar múltiples interacciones a nivel farmacodinámico y farmacocinético; en algunos otros casos pueden almacenarse y ocasionar graves problemas a la salud.

Rivaroxaban ha sido un blanco de investigaciones debido a su capacidad para inhibir el FXa dentro de la cascada de coagulación y por poseer un bajo número de interacciones, siendo una prometedora terapia para enfermedades tromboembólicas por demostrar su eficacia y ventajas sobre los fármacos anticoagulantes convencionales.

Al ser un medicamento de nueva generación su disponibilidad en el mercado es únicamente como medicamento de patente, sin embargo, existen las alternativas farmacéuticas como los medicamentos genéricos, los cuales son más accesibles a la población; para poder ser comercializados los medicamentos genéricos deben de cumplir, además de requisitos de Buenas Prácticas de Fabricación, con requerimientos regulatorios para poder ser comercializados, entre ellos se incluyen pruebas de Bioequivalencia.

Para demostrar la Bioequivalencia entre dos medicamentos se necesita tener una metodología analítica permita la cuantificación de Rivaroxaban en plasma de manera selectiva, específica, precisa y exacta.

Actualmente se sabe que el Bioanálisis este regulado principalmente por las agencias regulatorias internacionales FDA, ANVISA y EMA, y en el territorio nacional por COFEPRIS, en las metodologías reportadas por la literatura únicamente cumplen con los requerimientos de una agencia regulatoria, es por ello que se busca tener una metodología analítica que cumpla con las pruebas establecidas por cada regulación a nivel mundial de modo que se pueda proporcionar la evidencia científica que cada una de ellas requiere, de este modo el medicamento genérico pueda ser comercializado en diferentes países y por consecuencia la población tenga un acceso a nuevos medicamentos anticoagulantes.

5. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo y validación de metodologías analíticas empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas-Masas, han demostrado mayor sensibilidad, especificidad, selectividad y robustez.

En la literatura se ha descrito metodologías analíticas empleando esta técnica para la cuantificación de Rivaroxabán en plasma humano, sin embargo, presentan algunas deficiencias que pueden optimizarse.

Por lo tanto, es necesario el desarrollo y la validación un método analítico de mayor sensibilidad, que permita la determinación y cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano y con ello la caracterización farmacocinética de éste en población mexicana, adicionalmente el tener un método que cumpla con los requerimientos de las Agencias Regulatorias Nacionales e Internacionales, permitirá que se tenga una oportunidad de comercialización a nivel mundial beneficiando a la población la cual tendrá un acceso a alternativas farmacéuticas.

6. HIPOTESIS

El desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano por LC-MS/MS basado en los parámetros y criterios que establece la norma mexicana NOM-177-SSA1-2013 y las guías internacionales, permitirá tener un método selectivo, específico, robusto, preciso y exacto para la cuantificación y aplicación en un estudio de bioequivalencia.

7. OBJETIVOS

7.1.General

Desarrollar y validar un método analítico de alta especificidad, selectividad y robustez por Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución acoplada a Espectrometría de Masas-Masas para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano de acuerdo con los lineamientos regulatorios nacionales e internacionales.

7.2.Específicos

- 7.2.1. Establecer los parámetros óptimos en el cromatógrafo de líquidos de ultra resolución acoplado al espectrómetro de masas para obtener una adecuada elución y una alta eficiencia de la respuesta analítica de Rivaroxaban.
- 7.2.2. Definir un método de extracción conveniente para la obtención de Rivaroxaban de la matriz biológica (Plasma humano).
- 7.2.3. Validar el método analítico de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 y las guías internacionales; BMV USFDA (2018), BMV ANVISA (2012) y BMV EMA (2011).
- 7.2.4. Aplicar la metodología validada para la evaluación de bioequivalencia de Rivaroxaban en sujetos sanos.

8. METODOLOGIA

8.1.Fase Clínica

8.1.1. Estudio Clínico

El medicamento de prueba Rivaroxaban de 10 mg y 20 mg fue desarrollado como una alternativa al producto de referencia aprobado por las autoridades sanitarias, Xarelto®, por lo que el medicamento de prueba se comparó contra éste para determinar la bioequivalencia.

De acuerdo en los parámetros farmacocinéticos T_{max} y vida media de Rivaroxaban se determinó la frecuencia de los tiempos de muestreo, se consideró un mínimo de 7 veces la vida media como periodo de lavado entre los tratamientos, en el caso del último tiempo de muestreo correspondiente a las 48.00 h se cubrieron 4 vidas medias, con base en el coeficiente de variación intersujeto se considero una n de 28 sujetos (26 sujetos + 2 sujetos extra).

8.1.2. Diseño del estudio

El diseño del estudio clínico fue aleatorizado, de dosis única, balanceado abierto, dos tratamientos, dos secuencias, dos periodos y cruzado. (Ver figura 12)

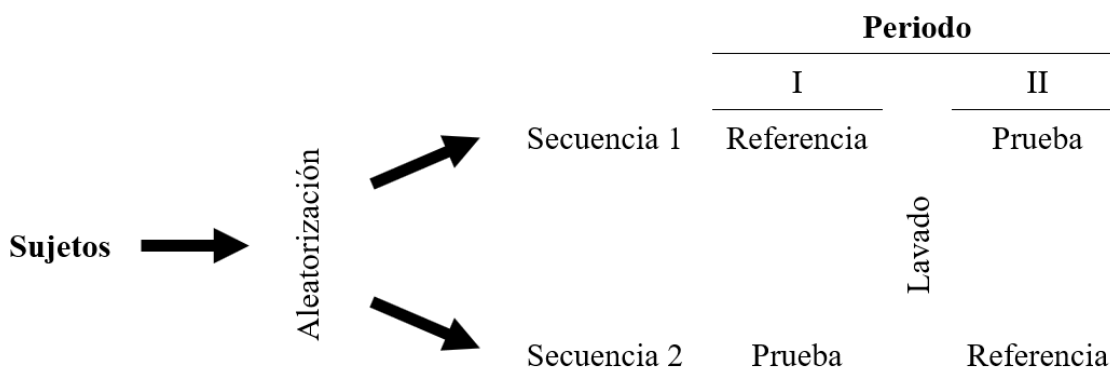


Figura 12. Esquema de un diseño clínico cruzado

8.1.3. Criterios de inclusión

Los sujetos enrolados en el estudio pueden ser adultos masculinos o femeninos sanos que no tenga potencial para procrear entre 18 y 55 años, con un peso mayor a 50 kg y con un IMC en un rango de 18.0 a 27.0 Kg/m², con ECG y signos vitales normales, ser no fumador o exfumador (por lo menos 1 año).

Los sujetos involucrados en el estudio clínico deben poder comunicarse de manera efectiva.

Los sujetos involucrados deben proporcionar un consentimiento informado por escrito.

8.1.4. Criterios de exclusión

Son motivos de exclusión contar con antecedentes de alergia o hipersensibilidad a Rivaroxaban, a cualquiera de sus metabolitos/derivados, contar con una prueba positiva para el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), para el anticuerpo del virus de la Hepatitis C (HCV Ab) para los anticuerpos del virus de la inmunodeficiente humana (VIH) tipos I y II o para sífilis (VDRL), abuso de alcohol o drogas en el último año, haber fumado durante los 12 meses previos al día del estudio, resultado positivo en el examen de alcohol o en la prueba de detección de drogas.

En caso de sujetos con antecedentes de dificultad para la donación de sangre o ser alérgico a la heparina, haber realizados donación de sangre, plaquetas o plasma en al menos 60 días previos al estudio.

En caso de existir antecedentes o presencia de enfermedad o alteración cardiovascular, pulmonar, hepática, renal, gastrointestinal, endocrina, dermatológica, neurológica o psiquiátrica, cirugía o cualquier otra condición conocida que pueda interferir con la absorción, distribución metabolismo y eliminación.

Para sujetos femeninos es motivo de exclusión obtener un resultado positivo para la prueba de embarazo o estar lactando.

8.1.5. Criterios de eliminación

Los sujetos son eliminados del estudio clínico si sufre de enfermedades intercurrentes y significativas, se somete a cirugía durante el curso del estudio, evento adverso, retiro de consentimiento informado.

8.1.6. Ejecución clínica

El ingreso de los sujetos participantes en el estudio clínico se realizó una vez firmado el consentimiento informado, un día antes de la administración del medicamento, se llevó a cabo el internamiento, previamente se llevó a cabo la valoración clínica del sujeto, prueba de alcohol y detección de drogas, para garantizar que sigue siendo candidato.

El día de administración del medicamento, se tomaron signos vitales a cada uno de los sujetos enrolados, se colocó el catéter y se tomaron las muestras pre-dosis (00.00 h) una vez realizado

lo anterior se llevó a cabo la administración del medicamento de prueba y referencia de acuerdo con un programa de aleatorización.

Las tomas de muestra sanguínea se realizaron en tubos con EDTA K₂ como anticoagulante. Se realizó la toma de muestras en los tiempos de muestreo establecidos en el protocolo clínico correspondiente. Para la dosis de 20 mg en estado postprandial se recolectaron un total de 19 muestras en los siguientes tiempos; 00.00 h (Pre-dosis), 00.50 h, 01.00 h, 01.50, 02.00 h, 02.50 h, 03.00 h, 04.00 h, 05.00 h, 05.50 h, 06.00 h, 07.00 h, 08.00 h, 10.00 h, 12.00 h, 16.00 h, 24.00 h, 36.00 h, 48.00 h. Y para la dosis de 10 mg en condiciones de ayuno se recolectaron un total de 20 muestras en los siguientes tiempos; 00.00 h (Pre-dosis),: 00.33 h, 00.67 h, 01.00 h, 01.33 h, 01.67 h, 02.00 h, 02.50 h, 03.00 h, 03.50 h, 04.00 h, 05.00 h, 06.00 h, 08.00 h, 10.00 h, 12.00 h, 16.00 h, 24.00 h, 36.00 h, 48.00 h.

Una vez recolectadas las muestras sanguíneas se sometieron a centrifugación por 10 min a 3500 rpm a una temperatura de 4 ± 2 °C para la obtención de plasma.

Las muestras plasmáticas obtenidas fueron separadas en dos alícuotas en tubos de 2.0 mL previamente etiquetados, posteriormente fueron almacenadas en ultracongelación a -70 ± 15 °C.

8.2. Fase Analítica

El desarrollo, validación y análisis de muestras se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución, Acquity UPLC I-FTN acoplado a un Espectrómetro de Masas Triple Cuadrupolo Xevo TQS, marca Waters®.

El análisis de los datos obtenidos del sistema LC-MS/MS se realizó con el software MassLynx, Versión 4.1, validado.

Para la ejecución de curvas de calibración y puntos de control, así como estándar interno, se emplearon las siguientes sustancias de referencia (Tabla 3).

Tabla 3. Sustancias de Referencia

Sustancia de Referencia	Lote	% Pureza	Condiciones de almacenamiento
Rivaroxaban	CS-WS-AAA-1439-04	95.84	Refrigeración 2-8°C
Rivaroxaban-d4	CS-RR-494	97.74	

8.2.1. Preparación de soluciones de referencia

Se realizaron dos pesadas de manera independiente para la preparación de los estándares de calibración y puntos control, para ello se pesaron aproximadamente, 2.500 mg de Rivaroxaban y se disolvieron en 10 mL de Acetonitrilo, para obtener soluciones stocks de 250 000.000 ng/mL (Concentración teórica). Las soluciones stocks fueron fraccionadas, etiquetadas y almacenadas en condiciones de refrigeración de 2 - 8°C.

Se realizaron soluciones intermedias, transfiriendo 3.200 mL de la respectiva solución Stock de Rivaroxaban (250 000.000 ng/mL) a un matraz volumétrico de 10 mL aforando con solución diluyente (SD) de Acetonitrilo: Agua (80:20 v/v), a partir de la solución intermedia, se llevaron a cabo la preparación de estándares de calibración (STD 1 a STD 8) y puntos control (DQC, PCA, PCM, PCB, PCLC) empleando el método de dilución seriada.

Para la preparación de la solución del estándar interno, se pesó aproximadamente 1.000 mg de Rivaroxaban-d4 y se disolvió en 5 mL de Acetonitrilo para obtener una solución de 200 000.000 ng/mL.

A partir de la solución stock de Rivaroxaban-d4 (200 000.000 ng/mL) se tomó una alícuota de 0.200 mL y se aforo a 10 mL con solución diluyente para obtener una solución intermedia de 4 000.000 ng/mL. Posteriormente, se transfirieron 1.500 mL de la solución intermedia de Rivaroxaban-d4 y se llevó a un volumen de 20 mL con solución diluyente para obtener una solución de trabajo con una concentración de 300.000 ng/mL.

La preparación de muestras plasmáticas consistió en la adición de 5 µL de la solución de carga correspondiente a 195 µL de plasma. En la tabla 3 se muestran las concentraciones plasmáticas teóricas.

Tabla 4. Concentraciones plasmáticas teóricas de Rivaroxaban

Muestra cargada ID	Conc. Final (ng/mL)	Muestra cargada ID	Conc. Final (ng/mL)
STD 8	600.000	DQC	1300.00
STD 7	534.000	PCA	507.000
STD 6	301.710	PCM	248.430
STD 5	150.855	PCB	1.491
STD 4	60.342	PCLC	0.514

8.2.2. Validación del Método Analítico

La validación del método analítico se realizó de acuerdo con los lineamientos nacionales e internacionales, así como a los procedimientos normalizados de operación de Avant Santé Research Center S.A de C.V.

La preparación de muestras plasmáticas se realizó cargando 5 µL de la solución de carga correspondiente en 195 µL de plasma libre de Rivaroxaban, en el caso de las muestras en acuosas, se mantuvo el mismo factor de dilución que en las muestras plasmáticas, para lo

cual se emplearon 15 µL de la solución de carga correspondiente, 15 µL de solución de trabajo del estándar interno y 1170 µL de solución de reconstitución.

8.2.2.1. Adecuabilidad del sistema

Esta prueba forma parte de la idoneidad del sistema en la cual se monitorea el rendimiento del equipo (LC-MS/MS) garantizando que funcione de manera adecuada y de esta manera obtener resultados reproducibles.

Para su evaluación se empleó una muestra en solución (ADQ) de 87.154 ng/mL preparada utilizando 45 µL de la solución de carga del STD 4 de Rivaroxaban y 15 µL de la solución de trabajo de Rivaroxaban-d4. La evaluación consistió en seis inyecciones consecutivas de la muestra ADQ al inicio de cada una de las pruebas de validación.

Criterio de aceptación: El %CV de la respuesta (relación de áreas) no deberá ser mayor al 5 % en LC-MS/MS y el %CV del tiempo de retención (RT) para ambos, analito y estándar interno no deberá ser mayor del 5 % LC-MS/MS durante la evaluación de la adecuabilidad.

8.2.2.2. Prueba de Acarreo

La prueba de Acarreo fue evaluada usando las muestras plasmáticas LC (0.483 ng/mL), STD Blk y LS (577.736 ng/mL) procesadas de acuerdo con el método de extracción; La adquisición de muestras se realizó en el siguiente orden: 6 réplicas diferentes correspondientes a la muestra, STD Blk, LS, STD Blk (Reinyección 1 y Reinyección 2).

Criterio de aceptación: El acarreo del inyector de un LS en el tiempo de retención del analito y del estándar interno en el STD Blk no debe ser mayor al 20% y 5% de la respuesta promedio obtenida del analito y estándar interno en el LC

8.2.2.3. Selectividad

Se evaluó la selectividad del método LC-MS/MS analizando muestras STD Blk y STD 1 de nueve lotes de plasma normales, dos lotes de plasma lipémicos y dos lotes de plasma

hemolizado con EDTA K2 como anticoagulante, adicionalmente se evaluó un lote de plasma con heparina como anticoagulante.

Criterio de aceptación: El porcentaje de interferencia en las muestras STD Blk debe ser menor al 20.00% en el tiempo de retención del analito y menor al 5.00% en el tiempo de retención del estándar interno, respecto a la muestra STD 1 extraída.

8.2.2.4.Verificación de Interferencia Cruzada

La verificación de interferencia cruzada fue evaluada con muestras acuosas y muestras extraídas del límite superior de cuantificación sin adición de estándar interno, límite inferior de cuantificación sin adición de estándar interno y muestra STD Zero, es decir muestra con estándar interno, sin analito.

Criterio de aceptación: El porcentaje de interferencias debido al estándar interno en el tiempo de retención del analito debe ser menor al 20.00% con respecto a la respuesta de la muestra LC y el porcentaje de interferencia debido al LC y LS en el tiempo de retención del estándar interno, deber ser menor al 5.00% comparado con la respuesta obtenida del estándar interno en la muestra STD Zero.

8.2.2.5.Límite de Cuantificación

La evaluación del Límite Inferior de cuantificación se realizó analizando seis muestras del STD 1 (0.483 ng/mL) en matriz.

Criterio de aceptación: El % CV promedio para el analito debe ser menor al 20.00% y el % de exactitud debe encontrarse entre 80.00 – 120.00%. La señal/ruido de cada una de las inyecciones y el promedio de éstas debe ser mayor a 10.

8.2.2.6.Linealidad

La linealidad del método LC-MS/MS fue evaluada con tres curvas de calibración integradas con 8 puntos calibrantes cada una, en el rango de calibración de 0.483 a 577.736 ng/mL, adicionalmente, se incluyen muestras STD Blk y STD Zero.

Criterio de aceptación: La respuesta de la interferencia en el tiempo de retención del analito en las muestras STD Blk y STD Zero, debe ser menor al 20.00% y la respuesta obtenida de la interferencia en el tiempo de retención en la muestra STD Blk debe ser menor al 5.00%, respecto al STD 1.

El % exactitud para todos los puntos de la curva de calibración excepto para el STD 1, deben estar dentro del 85.00 – 115.00 %, el % exactitud para el STD 1 debe estar dentro del 80.00 – 120.00 %. Al menos el 75% de los puntos de la curva de calibración deben cumplir con los criterios de aceptación incluyendo el STD 1 (LC) y el STD 8 (LS). No se pueden excluir dos puntos consecutivos de la curva de calibración. El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0.9900.

8.2.2.7.Efecto Matriz

El efecto de la matriz para el método LC-MS/MS se evaluó utilizando un total de 10 plasmas, de los cuales corresponden a seis lotes de plasma normal, dos lotes de plasma lipémicos y dos lotes de plasma hemolizado con EDTA K2 como anticoagulante. Se prepararon tres réplicas de muestras control equivalentes de los niveles de concentración PCB y PCA, para cada lote de plasma, las cuales fueron preparadas y analizadas junto con una curva de calibración. Adicionalmente, se prepararon tres muestras acuosas de cada nivel con concentraciones equivalentes a los puntos control PCB y PCA para comparar la respuesta de las muestras post-extraídas y acuosas.

Criterio de aceptación:

El %CV incluyendo todas las muestras debe ser menor del 15%. Al menos 67 % (2 de 3) de las muestras de cada nivel deberán estar entre 85.00 - 115.00 %. De las muestras totales el 80 % (5 de 6) de los lotes de las matrices deberán estar entre 85 – 115 %. El % de la exactitud promedio de las concentraciones obtenidas de los PCB y PCA preparados con diferente lote de matriz biológica deberá estar entre 85.00 - 115.00 %. El % CV de todos los PCB y PCA de las muestras preparadas de los diferentes lotes deberán ser ≤ 15.00 %.

8.2.2.8.Factor Matriz

El factor matriz para el método LC-MS/MS se evaluó utilizando un total de 10 plasmas, de los cuales corresponden a seis lotes de plasma normal, dos lotes de plasma lipémico y dos lotes de plasma hemolizado con EDTA K2 como anticoagulante. Se prepararon muestras blanco de cada uno de los lotes de plasmas, las cuales fueron extraídas y cargadas con analito y estándar interno posterior al proceso de extracción para tener la concentración de los puntos control PCB y PCA (tres muestras por cada nivel), para cada lote de plasma. Adicionalmente, se prepararon tres muestras acuosas de cada nivel con concentraciones equivalentes a los puntos control PCB y PCA para comparar la respuesta de las muestras post-extraídas y acuosas.

Criterio de aceptación

El % CV todos los PCB y PCA de las muestras preparadas de los diferentes lotes deberán ser ≤ 15.00 %.

8.2.2.9.Precisión y Exactitud

La precisión y exactitud del método analítico fue evaluada analizando seis réplicas de cada uno de los niveles de concentración equivalentes a los puntos control PCA, PCM, PCB, PCLC, DQC durante cada prueba de validación. La precisión del método fue calculada como % C.V y la exactitud como el valor absoluto de la relación entre los valores promedio calculados de las muestras control de calidad y su respectiva concentración nominal.

Las pruebas realizadas para evaluar la precisión y exactitud del método en la validación consistieron en repetibilidad, (dentro de una corrida analítica) y reproducibilidad (entre días) evaluada por dos analistas distintos.

Criterios de aceptación:

La precisión entre corridas (entre día) para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser ≤ 15.00 % y para el PCLC, éste deberá ser ≤ 20.00 %. Entre corridas: Al menos el 67 % (20 de 30) de un total de muestras QC y un 50 % (3 de 6) de cada nivel deberá estar entre 85.00

- 115.00 % excepto para el PCLC, el cual deberá estar entre 80.00 - 120.00 %, el % Exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser entre 85.00 - 115.00 %; para el PCLC éste deberá ser entre 80.00-120.00 %.

8.2.2.10. Recobro

El recobro promedio para el analito y para el estándar interno fue evaluado comparando la respuesta obtenida en muestras control extraídas y muestra control en solución a nivel de concentración del PCA, PCM y PCB.

Criterios de aceptación

El % CV del recobro para los QC (PCB, PCM, PCA) y para el EI deberá ser $\leq 15.00\%$, el recobro deberá ser homogéneo en los tres niveles de concentración evaluados, de manera global el % CV para el recobro promedio para los QC (PCB, PCM, PCA) deberá ser $\leq 20.00\%$.

8.2.2.11. Efecto de la dilución

El efecto de la dilución fue evaluado con seis réplicas de la muestra control (DQC), la concentración de éstas previo al proceso de dilución fue de 1247.913 ng/mL correspondiente a 2.2 veces mayor al límite superior de cuantificación. Las muestras fueron diluidas 5 veces con plasma libre de Rivaroxaban para obtener una concentración de 249.583 ng/mL

Criterios de aceptación

Al menos el 67% (4 de 6) de las muestras diluidas deberán estar entre 85.00% - 115.00%, el % exactitud promedio de las muestras diluidas deberán estar entre 85.00% – 115.00% y el % CV de las muestras diluidas deberá ser $\leq 15.00\%$.

8.2.2.12. Tolerancia

La tolerancia del método fue evaluada analizando muestras preparadas para la evaluación de la precisión y exactitud utilizando una columna diferente, de las mismas características y marca, así como un equipo diferente, de las mismas especificaciones, marca y modelo.

Criterios de aceptación:

El % de precisión de la corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser $\leq 15.00\%$ y para PCLC $\leq 20.00\%$

Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% -120.00%.

% exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%

8.2.2.13. Reproducibilidad de la reinyección

La reproducibilidad de la reinyección fue evaluada con una curva de calibración y muestras control por sextuplicado de cada nivel de concentración (PCA, PCM, PCB, PCLC, DQC) que cumplió previamente con los criterios de aceptación de linealidad, precisión y exactitud, el cual fue almacenada en el automuestreador del instrumento a una temperatura de 5 ± 4 °C, por al menos 24 horas.

Criterio de aceptación

La %CV de la corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser entre $\leq 15.00\%$ y para PCLC $\leq 20.00\%$

Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% -120.00%

% exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%

8.2.2.14. Precisión y exactitud de una corrida analítica (Long Batch)

La duración de una corrida analítica, simulando un Batch de análisis de muestras del estudio clínico, se evaluó analizando 60 réplicas de muestras control a nivel de concentración de PCA, PCM y PCB junto con una curva de calibración, dando un total de 190 muestras (lo cual equivale en el análisis de muestras a; Curva de Calibración, Sujeto 1 Periodo 1 Periodo 2 + QC, Sujeto 2 Periodo 1 Periodo 2 + QC, Sujeto 3 Periodo 1 Periodo 2 + QC).

Criterios de aceptación

La precisión de la misma corrida para las muestras PCB, PCM y PCA deberán ser $\leq 15.00\%$.

Al menos el 67% (4 de 6) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% - 115.00%.

% exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA deberán estar entre 85.00% - 115.00%

8.2.2.15. Selectividad de Fármacos Concomitantes

La evaluación de la selectividad de fármacos concomitantes se realizó mediante la carga y procesamiento de muestras blanco de plasma a las cuales se adiciono cada uno de los siguientes fármacos; Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco sódico, Paracetamol, Ácido Salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina, con su correspondiente concentración terapéutica.

Criterio de aceptación

Las interferencias de las muestras blanco en el TR del analito deberán ser $< 20.00\%$ con respecto al promedio del área del analito de STD 1 (LC) y las interferencias en los blancos en el TR del E.I. deberán ser $< 5.00\%$ con respecto al promedio del área del E.I. del STD 1 (LC).

8.2.2.16. Efecto de Fármacos Concomitantes

El efecto de fármacos de concomitantes se evaluó con tres réplicas de muestras plasmáticas a nivel de concentración de PCLC y PCA interpoladas en una curva de calibración, cargadas con las concentraciones terapéuticas de Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco sódico, Paracetamol, Ácido Salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina.

Criterio de aceptación

El % CV de la concentración calculada para todas las muestras deberá ser menor a 15.00%. (Si %CV es mayor debido a resultado de muestras hemolizadas, el % CV puede ser obtenido excluyendo estas muestras, sin embargo, este tipo de muestra no debe ser considerado en un análisis de muestras de sujetos).

Al menos 67% (2 de 3) de las muestras para cada nivel deberán estar entre 85.00% - 115.00%.

Al menos el 80% (5 de 6) lotes de plasma deberán estar entre el 85.00% - 115.00%

El % de exactitud promedio de las concentraciones calculadas para todas las muestras PCA y PCB deberán estar entre 85.00 – 115.00%.

El %CV de la relación de áreas obtenidas para las muestras PCB y PCA (factor de respuesta comparada) deberá ser $\leq 15.00\%$.

Si %CV total excede 15.00%, indica que algún fármaco concomitante individual puede estar causando efecto matriz, las muestras de sujetos con ese medicamento no deberán ser analizadas.

8.2.2.17. Efecto Matriz en presencia de Fármacos Concomitantes

El efecto matriz en presencia de fármacos concomitantes fue evaluado utilizando un total de 10 plasmas, de los cuales corresponden a seis lotes de plasma normal, dos lotes de plasma lipémico y dos lotes de plasma hemolizado con EDTA K2 como anticoagulante. Para cada lote de plasma se prepararon tres réplicas de muestras control equivalente a los niveles de concentraciones del PCA y PCB, a las cuales se les adicionó 5 μ L de una solución cóctel de fármacos concomitantes (Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco sódico, Paracetamol, Ácido Salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina), dichas muestras fueron analizadas junto con una curva de calibración. Adicionalmente, se prepararon tres muestras

acuosas de cada nivel con concentraciones equivalentes a los puntos control PCB y PCA para comparar la respuesta de las muestras extraídas y acuosas.

Criterios de aceptación

El %CV incluyendo todas las muestras debe ser menor del 15%. En caso de que el %CV sea mayor, debido al resultado de una muestra hemolizada, se podrá obtener el %CV excluyendo esa muestra, sin embargo, en el análisis de muestras, no se deberán analizar muestras hemolizadas.

Al menos 67 % (2 de 3) de las muestras de cada nivel deberán estar entre 85.00 - 115.00 %.

Al menos el 80 % (5 de 6) de los lotes de las matrices deberán estar entre 85 - 115 %.

El % de la exactitud promedio de las concentraciones obtenidas de los PCB y PCA preparados con diferente lote de matriz biológica deberá estar entre 85.00 - 115.00 %.

El % CV de todos los PCB y PCA de las muestras preparadas de los diferentes lotes deberán ser ≤ 15.00 %.

8.2.2.18. Estabilidad en solución

8.2.2.18.1. Estabilidad a corto plazo solución stock y la solución de carga del analito y estándar interno

La estabilidad de la solución stock del analito a corto plazo fue determinada después de mantener la solución por al menos 6 h a temperatura ambiente ~ 25 °C. La solución stock para evaluar la estabilidad fue comparada con una solución stock fresca (recién preparada) a partir de cada solución stock, estabilidad y comparación, se obtuvieron por diluciones seriadas la solución equivalente a la concentración del STD 8 (LS) y STD 1 (LC) para el análisis. Se preparo una muestra acuosa del STD 8 y STD 1 adicionando 15 μ L de la solución de carga correspondiente, 15 μ L de la solución de trabajo de Rivaroxaban-d4 y 1170 μ L de solución de reconstitución (SR), dicha muestra fue inyectada por sextuplicado. Para la evaluación de la estabilidad de Rivaroxaban-d4 se preparó una muestra STD Zero adicionando 15 μ L de la solución de trabajo de Rivaroxaban-d4 y 1185 μ L de SR, dicha fue inyectada por triplicado y se comparó el porcentaje de interferencia en el tiempo de retención del analito contra una muestra STD 1 sin la adición de EI.

Criterio de aceptación

El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% -110.00%. El %CV de la relación de áreas deberá ser ≤ 10.00 %.

En el caso del estándar interno, el % de la interferencia promedio del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con respecto al promedio del área obtenida para el STD-1.

8.2.2.18.2. Estabilidad a largo plazo solución stock del analito, estándar interno y la solución de carga del analito y estándar interno

La estabilidad de la solución stock del analito a corto plazo fue determinada fue determinada después de almacenarla en refrigeración a una temperatura de 2 - 8°C. La solución stock para evaluar la estabilidad fue comparada con una solución stock fresca (recién preparada) a partir de cada solución stock, estabilidad y comparación, se obtuvieron por diluciones seriadas la solución equivalente a la concentración del STD 8 (LS) y STD 1 (LC) para el análisis. Se preparo una muestra acuosa del STD 8 y STD 1 adicionando 15 μ L de la solución de carga correspondiente, 15 μ L de la solución de trabajo de Rivaroaban-d4 y 1170 μ L de solución de reconstitución (SR), dicha muestra fue inyectada por sextuplicado. Para la evaluación de la estabilidad de Rivaroxaban-d4 se preparó una muestra STD Zero adicionando 15 μ L de la solución de trabajo de Rivaroaban-d4 y 1185 μ L de SR, dicha fue inyectada por triplicado y se comparó el porcentaje de interferencia en el tiempo de retención del analito contra una muestra STD 1 sin la adición de EI.

Criterio de aceptación

El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% -110.00%. El %CV de la relación de áreas deberá ser ≤ 10.00 %.

En el caso del estándar interno, el % de la interferencia promedio del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con respecto al promedio del área obtenida para el STD-1.

La estabilidad de Rivaroxaban fue evaluada con la finalidad de establecer los rangos de tiempo en el que la muestra biológica no sufre cambios y permanece dentro de las especificaciones sometiéndola como muestra en sangre total, muestra en plasma sin procesar y muestra en plasma procesada, a diferentes condiciones de temperatura a las cuales puede estar expuesta durante la ejecución clínica y analítica, o en caso de alguna contingencia, asegurando de este modo su integridad.

8.2.2.19. Estabilidad en Sangre Total

La estabilidad en sangre fue evaluada en condiciones de temperatura ambiente y en baño de hielo, para cada condición se usaron tres réplicas de muestras control a nivel del PCA y PCB, las cuales fueron comparadas con muestras frescas (recién preparadas).

Para preparar las muestras sanguíneas se cargaron 100 μ L de la solución correspondiente al PCA y PCB de Rivaroxaban, en 4900 μ L de sangre, éstas se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente y en baño de hielo por al menos tres horas. Una vez cumplido el tiempo de evaluación la sangre se centrifugo a 3000 rpm por 10 min para obtener la obtención de plasma, se tomó la alícuota correspondiente a 200 μ L y se procesaron junto con muestras recién preparadas.

8.2.2.20. Estabilidad en Plasma Humano (EDTA K₂)

La estabilidad en plasma humano fue evaluada en bajo diferentes condiciones a las que son expuestas las muestras durante el procesamiento, para cada condición se emplearon seis réplicas de muestras control a nivel del PCA y PCB, las cuales fueron comparadas con muestras frescas (recién preparadas).

8.2.2.20.1. Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación a -70 ± 15 °C

La estabilidad a ciclos de congelación/descongelación para el analito en plasma humano (EDTA K₂) fue evaluada con muestras previamente sometidas a congelación (a -70 ± 15 °C) y descongelación (a temperatura ambiente de ~ 25 °C) por 5 ciclos de aproximadamente 12 horas, dichas muestras fueron procesadas junto con estándares de curva de calibración y puntos control cargados en fresco.

8.2.2.20.2. Estabilidad a Temperatura ambiente (~ 25 °C)

La estabilidad a temperatura ambiente del analito en plasma humano (EDTA K2) se evaluó manteniendo réplicas de muestras sin procesar, a temperatura ambiente (~25 °C) por aproximadamente 6 h. La estabilidad de las muestras se evaluó con estándares de curva de calibración y muestras control de calidad frescas.

8.2.2.20.3. Estabilidad en automuestreador (5 ± 4 °C)

La estabilidad de automuestreador del analito fue evaluada procesando y analizando réplicas de muestras de estabilidad, después de mantenerlas almacenadas por aproximadamente 48 h a 5 ± 4 °C en el automuestreador. Las muestras de estabilidad fueron procesadas con estándares de curva de calibración y controles de calidad recién preparados.

8.2.2.20.4. Estabilidad de la muestra post-evaporación a temperatura ambiente (~25 °C)

La estabilidad de post-evaporación para el analito fue evaluada procesando réplicas de muestras de estabilidad y manteniéndolas a temperatura ambiente (~25 °C), posterior al paso de evaporación, por al menos 4 horas, las muestras de estabilidad fueron analizadas junto con una curva de calibración y muestras control frescas.

8.2.2.20.5. Estabilidad de la muestra post-evaporación en refrigeración (2 - 8 °C)

La estabilidad de post-evaporación para el analito fue evaluada procesando réplicas de muestras de estabilidad y manteniéndolas en refrigeración (2 - 8 °C), posterior al paso de evaporación, por al menos 4 horas, las muestras de estabilidad fueron analizadas junto con una curva de calibración y muestras control frescas.

8.2.2.20.6. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente (~ 25 °C)

La estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente fue evaluada procesando réplicas de muestras de estabilidad y manteniéndolas a temperatura ambiente (~ 25 °C), posterior al paso de reconstitución, por al menos 4 horas, las muestras de estabilidad fueron analizadas junto con una curva de calibración y muestras control frescas.

8.2.2.20.7. Estabilidad de la muestra procesada en refrigeración (2 - 8 °C)

La estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente fue evaluada procesando réplicas de muestras de estabilidad y manteniéndolas a temperatura ambiente (~ 25 °C), posterior al paso de reconstitución, por al menos 4 horas, las muestras de estabilidad fueron analizadas junto con una curva de calibración y muestras control frescas.

8.2.2.20.8. Estabilidad a Largo plazo en plasma a -70 ± 15 °C y -20 ± 15 °C

La estabilidad a largo plazo del analito en plasma humano (EDTA K2) fue evaluada analizando réplicas de muestras de estabilidad almacenadas a -70 ± 15 °C y -20 ± 15 °C. Las muestras de estabilidad a largo plazo fueron analizadas con una curva de calibración y muestras control de calidad frescas.

8.3. Análisis de muestras

8.3.1. Fase analítica

Las concentraciones de Rivaroxaban fueron cuantificadas usando el método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban por LC-MS/MS validada de acuerdo con la regulación aplicable.

El análisis de muestras de los sujetos se realizó utilizando el mismo anticoagulante (EDTA K₂).

El uso de sustancias de referencia, soluciones, carga de muestras de curva de calibración y puntos control, así como el análisis de muestras de los sujetos fueron realizados de acuerdo con las condiciones de estabilidad establecidos.

En cada corrida analítica, las muestras control de calidad fueron distribuidas a través de cada lote de muestras del estudio, todas las muestras de los sujetos fueron analizadas, las concentraciones que se encontraron por debajo del límite de cuantificación fueron reportadas como “Debajo del límite de cuantificación”

8.3.2. Fase estadística

El análisis farmacocinético se realizó con un modelo no-compartimental sobre las concentraciones plasmáticas observadas de Rivaroxaban usando el software de WinNonlin (Versión 6.4 o superior).

En el análisis estadístico solo se consideraron los sujetos que cumplieron con ambos periodos, los parámetros farmacocinéticos para establecer la bioequivalencia fueron calculados usando el paquete estadístico SAS® (Versión 9.4 o superior), con un intervalo de confianza al 90%.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de desarrollo del método analítico, se diseñó un rango de la curva de calibración para cubrir las dosis de 10 mg y 20 mg de Rivaroxaban, dicho rango de estableció de acuerdo en los requerimientos de las normas nacionales e internacionales, los protocolos clínicos para y con base en la C_{max} reportada en la literatura.

Para una dosis de 10 mg se reporta una C_{max} de 113.000 ng/mL (27%) en condiciones de ayuno y para una dosis de 20 mg se reporta una C_{max} de 281.000 ng/mL (27%), por lo que para determinar el límite superior 2 a 3 veces la C_{max} de la dosis de 20 mg y para el límite inferior de cuantificación (LC) se tomó el 5% de la C_{max} de la dosis de 10 mg, aunque considerando la sensibilidad del equipo el LC se disminuye para lograr una correcta caracterización de la fase de eliminación, por lo tanto, el rango teórico propuesto es de 0.500 – 600.000 ng/mL en plasma, considerando el rango que se pretende cubrir se empleó un espectrómetro de masas Xevo TQS marca Waters® y un equipo Acquity UPLC I-FTN marca Waters® para llevar a cabo la separación cromatográfica.

El plasma empleado durante el desarrollo del método analítico, validación del método y análisis de muestras, fue obtenido con anticoagulante EDTA K_2 , la elección de dicho anticoagulante desde la etapa clínica es debido a que ocasiona un menor número de interferencias con el fármaco y proporciona mayor estabilidad, adicionalmente, una vez obtenida la sangre el EDTA K_2 inhibe la cascada de coagulación debido a que los iones de K^+ interactúan con los iones de Ca^{2+} impidiendo la formación del coagulo de fibrina, es decir el EDTA K_2 actúa como agente quelante, por lo que independientemente de que las muestras sean sometidas a congelación, ciclos de congelación y descongelación así como expuestas a temperatura ambiente, se asegura que no se tendrá formación de dicho coagulo, a diferencia de la Heparina la cual únicamente retrasa su formación por lo que al someter la muestra a diversas condiciones ambientales, se formará el coagulo (Pawula M *et al.* 2013). En bioanálisis, en un estudio realizado con diferentes CROs acerca del uso racional de anticoagulantes para obtención de muestras, se menciona como primera elección EDTA K_2 , seguido de la Heparina, la razón principal por la que éste se la primer opción es que la formación del coagulo de fibrina puede ocasionar problemas al momento de tomar de la

muestra ocasionando errores de medición del así mismo como la transferencia a un sistema automatizado o transferencia de método por cambio de anticoagulante es decir, se tendrá una variación menor al realizar el cambio de EDTA K₂ a EDTA K₃ que de Heparina de Sodio a Heparina de Litio, adicionalmente el EDTA K₂ presenta un efecto matriz reducido comparado con la Heparina u otros anticoagulantes (Sadagopan *et al.* 2003, Sennbro *et al.* 2011).

La técnica a presión atmosférica por Electrospray es ideal para la ionización de Rivaroxaban, considerando las características de la molécula y su compatibilidad con ésta, en polaridad positiva empleando una reacción de monitoreo múltiple (MRM). Los parámetros óptimos del espectrómetro de masas tanto para el analito como para el estándar interno, se realizó mediante la infusión directa de una solución de Rivaroxaban de 103.921 ng/mL y Rivaroxaban-d4 de 106.615 ng/mL, se empleó una concentración alta tanto del analito como del estándar interno, debido a que a bajas concentraciones se observaron problemas de ionización, adicionalmente para favorecer la ionización de la molécula se empleó un modo combinado con la móvil, Acetonitrilo: Acido fórmico al 0.1% en una proporción de 50:50 v/v, de esta manera se lograron obtener los parámetros óptimos de la fuente de ionización (Tabla 5). Las transiciones obtenidas posterior a la fragmentación del analito y estándar interno considerando la relación masa/carga (m/z) de [M+H]⁺ fueron: Rivaroxaban 435.99 → 144.90 (m/z) y Rivaroxaban-d4 440.00 → 144.96 (m/z), los cuales son semejantes de lo reportado por (Baldelli, *et al.* 2016).

Las condiciones cromatográficas se definieron con base en obtener sensibilidad, selectividad, resolución de impurezas, forma de pico, factor de capacidad igual o mayor a 2.0 y un tiempo de corrida corto. Durante la evaluación de la cromatografía se emplearon como fases móvil un buffer de Formiato de amonio 5mM y una solución de ácido fórmico al 0.1% en combinación con Metanol o Acetonitrilo en diversas proporciones empleando como fase estacionaria una columna Acquity UPLC BEH C18 de 2.1 x 50 mm, 1.7µm así como otras columnas con un empaquetamiento C18 como Zorbax Eclipse Plus C18 de 2.1 x 50 mm, 3.5 µm y Luna C18 de 2.1 x 50 mm, 1.6 µm, en modo isocrático y gradiente, se observó que la columna que presenta una mejor forma de pico es la columna Acquity UPLC BEH C18 así mismo se determinó que las fases móviles de ácido fórmico 0.1% y acetonitrilo son las

ideales para obtener una señal óptima de Rivaroxaban, de acuerdo con los experimentos realizados no es necesario realizar un gradiente para la elución de la Rivaroxaban, en modo isocrático empleando una proporción de 65:35 v/v permiten tener un factor de capacidad de 2.453, forma de pico aceptable y mayor respuesta.

Tabla 5. Parámetros del Detector

Tipo de Ionización			ESI positivo	
Tipo de Escaneo			MRM	
Molécula	Ion precursor	Ion producto	Voltaje Cono (V)	Energía de colisión (V)
Rivaroxaban	435.99	144.90	35	25
Rivaroxaban-d4	440.00	144.96	40	25
Voltaje del Capilar			3.50 V	
Voltaje del Cono			35 V	
Temperatura de desolvatación			500 °C	
Flujo de gas desolvatación			800 L/Hr	
Flujo de gas de cono			150 L/Hr	
Flujo de gas de colisión			0.15 mL/min	
Flujo de gas nebulizador			7.00 Bar	
Energía de colisión			25.00 V	

Tabla 6. Condiciones Cromatográficas

Columna	Acquity® UPLC BEH C18, 1.7 μ m 2.1 x 50 mm
	FA: Ácido fórmico 0.1%
Fase Móvil	FB: Acetonitrilo
	Proporción 65:35 v/v
Velocidad de flujo	0.300 mL/min
Temperatura de columna	35 \pm 2 °C
Temperatura de Automuestreador	5 \pm 4 °C
Volumen de inyección	5 μ L
Lavado Pre-inyección	0 s
Lavado Post-inyección	6 s
Tiempo de retención Rivaroxaban (Analito)	1.16 \pm 0.3 min
Tiempo de retención Rivaroxaban-d4 (Estándar interno)	1.16 \pm 0.3 min

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y los parámetros del espectrómetro de masas descritos en la Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente, se realizaron pruebas de extracción empleando los métodos de precipitación de proteínas, de acuerdo con lo descrito por Schmitz *et al.* 2014 y líquido-líquido, empleando diversos solventes orgánicos como Metil Ter-butil éter y éter etílico en medio neutro, alcalino y ácido, por sus características fisicoquímicas y con la finalidad de obtener un método de extracción de mayor limpieza y evitar efectos de la matriz.

Matos *et al.* 2017 al igual que Rohde *et. al* 2008 describen el método de precipitación de proteínas como un método de primera elección para la extracción de Rivaroxaban Muzaffar *et al.* 2015 reporta que el efecto de la matriz, empleando una técnica de precipitación de proteínas se encuentra dentro del criterio $\pm 15.00\%$ en un estudio de farmacocinética de Rivaroxaban en ratas, sin embargo, durante la ejecución de pruebas de desarrollo se demostró que usar dicha técnica tiene múltiples efectos de la matriz tipo supresión y aumento iónico, esto fue demostrado tras la adquisición por una hora de una muestra STD Blk procesada con esta técnica realizando un seguimiento de fosfolípidos, usando la pseudotransición de 184 \rightarrow 184 descritas por Xia *et al.* 2009.

En los 60 min de adquisición de la muestra STD Blk se observó supresión iónica alrededor de 0.5 min y múltiples aumentos iónicos a partir de los 15 min (Figura 13), por lo que este efecto de la matriz afectaría la precisión y la exactitud del método analítico por lo que no es viable

El efecto de la matriz podría ser reducido si emplea una elución de Rivaroxaban en modo gradiente, como lo descrito por Matos *et al.* 2017 y Rohde *et. al* 2008, o emplear una técnica de extracción de mayor limpieza como fase sólida, Badelli *et. al* 2016 reporta el uso de cartuchos C18 Bond Elute (1mL, 100 mg, Agilent Milan, Italia) para su extracción, sin embargo, esta técnica tiene un mayor costo y lo que se busca es optimizar un método analítico en cuanto a tiempos de ejecución y costo, por lo que se optó por la extracción líquido-líquido.

El método de extracción líquido-líquido con éter etílico, tras la adquisición de la muestra STD Blk por 60 min, no se observó un efecto de la matriz tipo supresión iónica, en la figura 14, se puede apreciar en el min 0.3, aproximadamente, un efecto tipo enhancement sin

embargo ocurre en el tiempo muerto de la columna por lo que difícilmente ocasionaría problemas de precisión y exactitud.

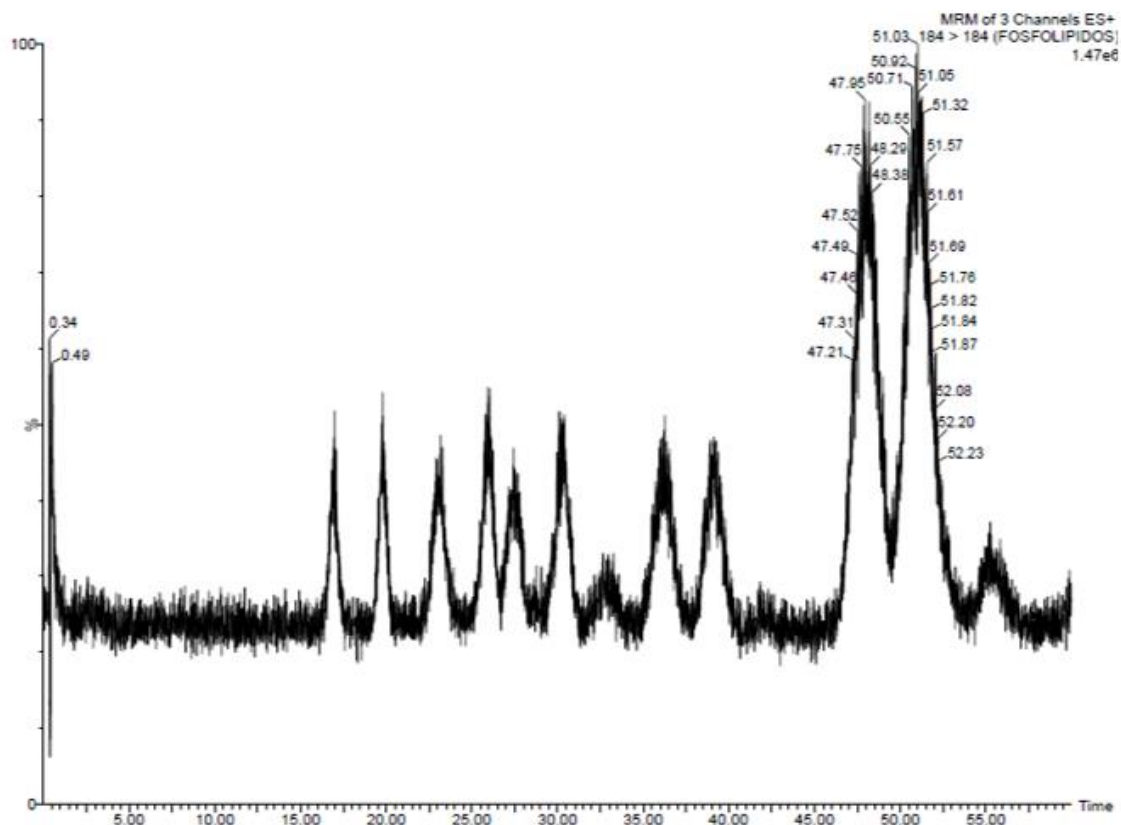


Figura 13. Cromatograma obtenido para el seguimiento de Fosfolípidos (Pseudotransición 184 → 184) en una muestra STD Blk procesada por precipitación de proteínas con Acetonitrilo.

Con base en lo observado, se determinó que el método de extracción ideal debe realizarse por una técnica líquido-líquido empleando éter etílico anhidro 100% como solvente de extracción.

Para asegurar que no se tienen efectos de la matriz empleando una técnica de extracción líquido-líquido empleando un modo isocrático para la elución, adicional al seguimiento de fosfolípidos, se realizó la evaluación del efecto matriz post-columna infundiendo una concentración de 100 ng/mL de Rivaroxaban mientras se inyectaban muestras plasmáticas STD Blk provenientes de plasma normal, lipémico y hemolizado, durante un tiempo de 30 min, en donde no se encontraron efecto tipo aumento o supresión iónica. Schmitz *et al.* 2014 realizaron la misma evaluación del efecto matriz post-columna en un tiempo de 4.50 min donde no se observó efecto de la matriz, pero el tiempo de evaluación es corto y al tener una

elución de Rivaroxaban por gradiente el efecto pudo ser evadido, pero se pueden tener múltiples problemas durante la ejecución de un análisis de muestras por desgaste de columnas al tener gradientes agresivos o gradientes con tiempos cortos que no permiten el equilibrio de la columna entre inyecciones.

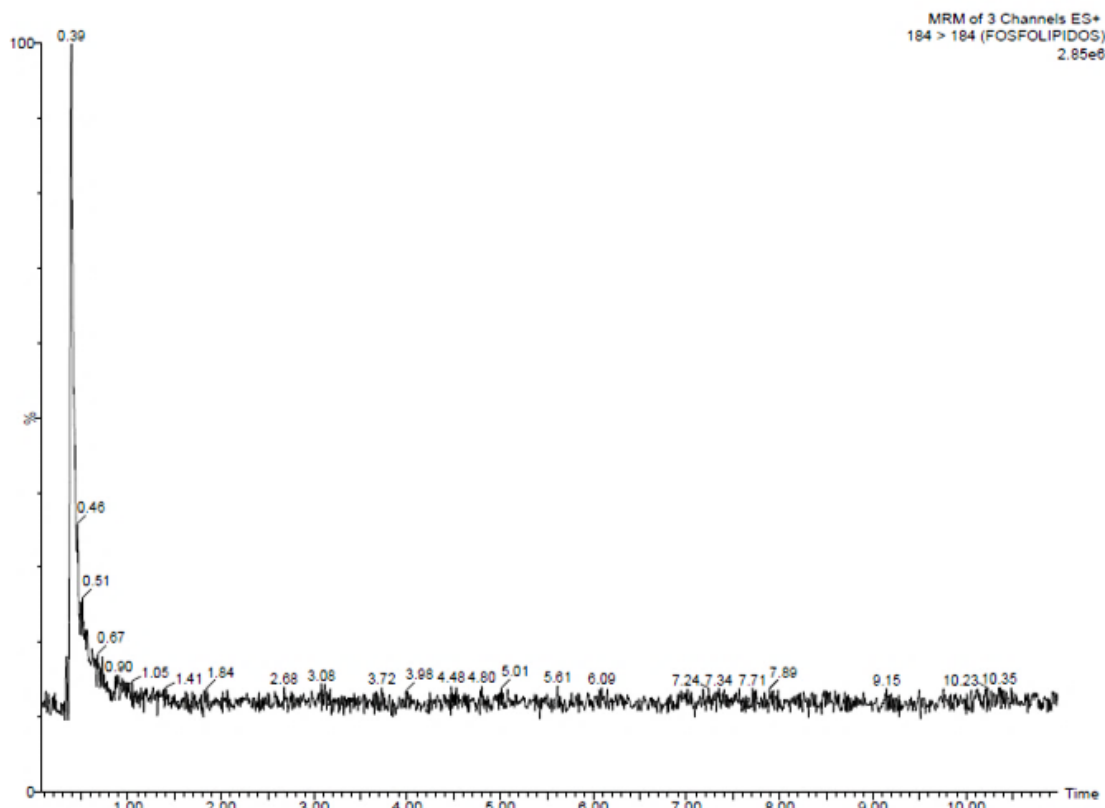


Figura 14. Cromatograma obtenido para el seguimiento de Fosfolípidos (Pseudotransición 184 → 184) en una muestra STD Blk procesada por extracción líquido-líquido con Éter etílico.

Con base en los resultados obtenidos el emplear una técnica de extracción líquido-líquido permite obtener una muestra limpia y sin problemas de efectos de la matriz. Para obtener un mejor recobro, se evaluaron modificadores de pH alcalinos, es decir Hidróxido de Amonio en un rango de concentraciones de 0.1% - 5% para evaluar una cinética de concentraciones, sin embargo, el uso de modificadores no tiene un efecto significativo en el recobro, por lo tanto, se emplearon condiciones de extracción neutras con la finalidad de tener un método sencillo y rápido en ejecución, se establecen los siguientes pasos para la extracción Rivaroxaban.

Paso 1. Procesar 200 μ L de muestra plasmática (195 μ L de plasma + 5 μ L de analito)



Paso 2. Adicionar 5 μ L de la solución del trabajo del estándar interno Rivaroxaban-d4.



Paso 3. Agitar 10 s las muestras en vortex.



Paso 4. Adicionar 1.5 mL de Éter Etílico Anhidro 100 %.



Paso 5. Agitar durante 5 min en vortex a máxima velocidad.



Paso 6. Centrifugar las muestras durante 5 min a 13 000 rpm a 4 ± 2 °C.



Paso 7. Someter las muestras a congelación en un baño de hielo seco-acetona.



Paso 8. Decantar la fase orgánica a tubo de vidrio.



Paso 9. Evaporar la muestra durante 8 min a 50 °C a una presión de 10 psi.



Paso 10. Reconstituir las muestras con 400 μ L de solución de reconstitución y agitar durante 2 min en vortex a máxima velocidad



Paso 12. Transferir las muestras a viales e inyectar 2.0 μ L en el sistema LC-MS/MS

En la evaluación del método analítico se realizaron pruebas de Acarreo, Selectividad, Especificidad, Linealidad, Precisión y Exactitud, Recobro y Efecto de la Matriz, como parte de las pruebas finales del desarrollo.

En la evaluación de la prueba de acarreo, en la muestra STD Blk no se observaron interferencias significativas en el tiempo de retención del analito mayores al 20.00%, en el caso del estándar interno, mayores al 5.00%, posterior a la inyección de una muestra equivalente al límite superior de cuantificación. (STD 8).

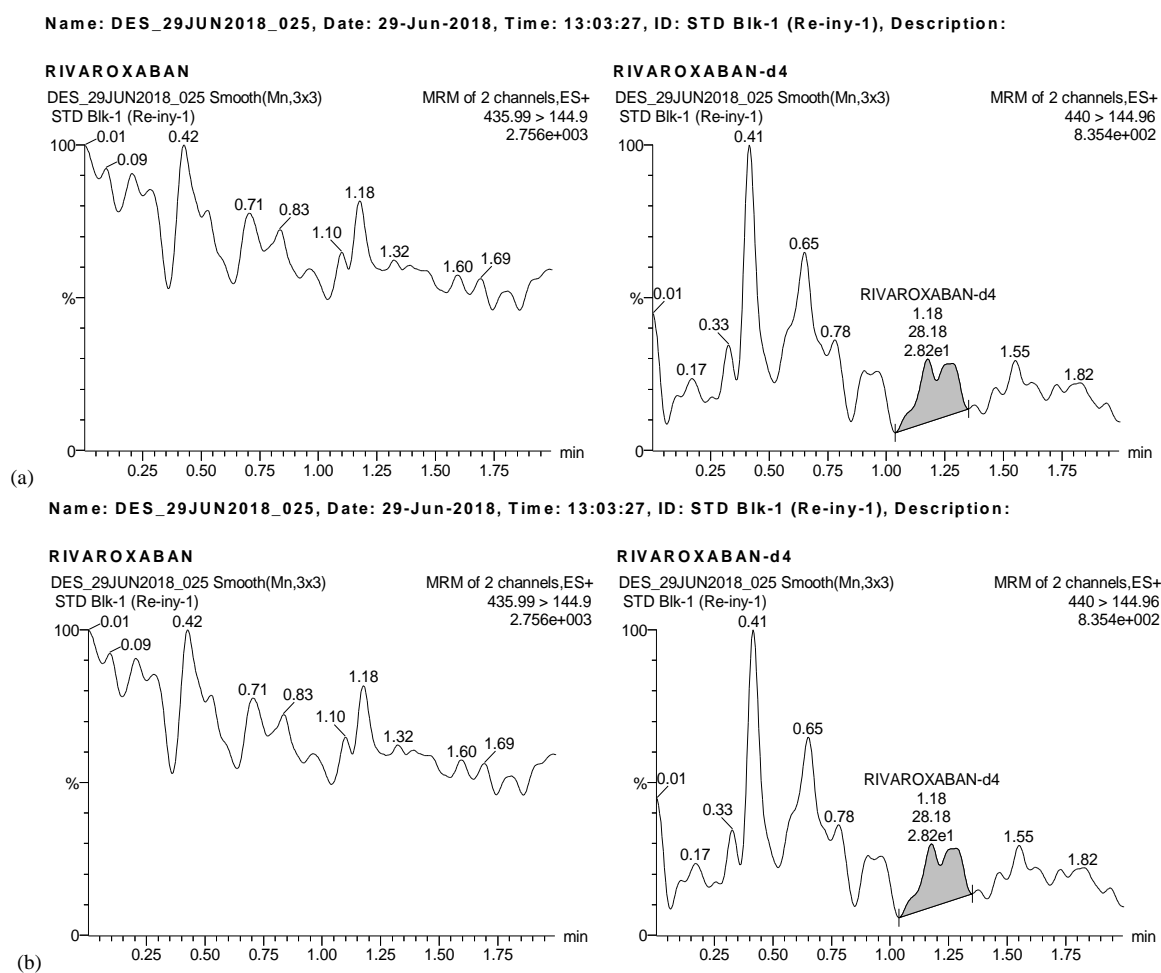


Figura 15. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Acarreo (a) Muestra plasmática STD Blk inyectada previo al STD 8 (b) Muestra plasmática STD Blk reinyectada posterior al STD 8.

En la evaluación de las pruebas de selectividad no se observaron interferencias significativas en el tiempo de retención del analito mayores al 20.00%, en el caso del estándar interno,

mayores al 5.00%, en lotes de plasma normal, lipémico, hemolizado y con Heparina de sodio como anticoagulante.

Adicionalmente para determinar la especificidad del método se realizó la verificación de la interferencia cruzada, en donde se determinó que no existe interferencias significativas en tiempo de retención del analito y estándar interno en muestras acuosas y extraídas ocasionadas por intercambio isotópico o un efecto tipo “Crosstalk” al compartir el mismo ion producto (Figura 16, Figura 17).

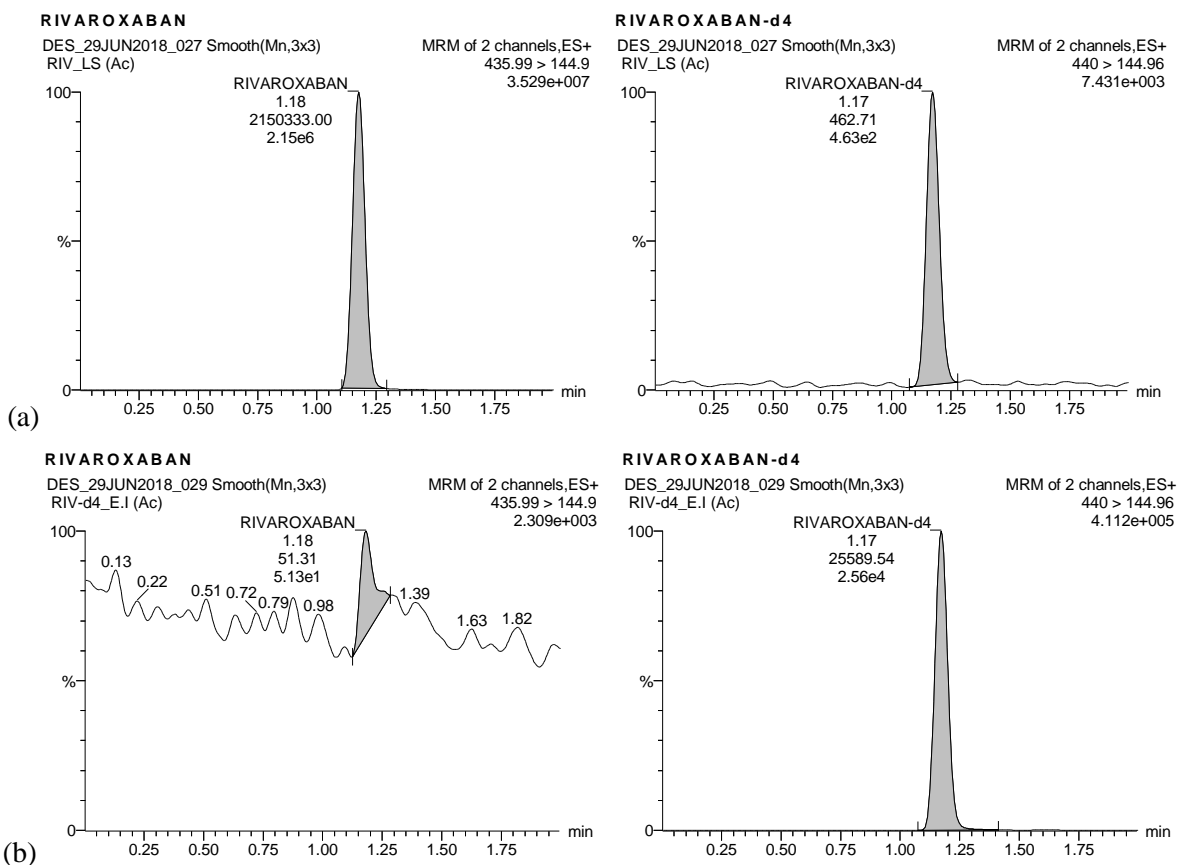


Figura 16. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Verificación de Interferencia Cruzada (a) Muestras en solución del STD 8 sin la adición del EI (b) Muestra STD Zero en solución

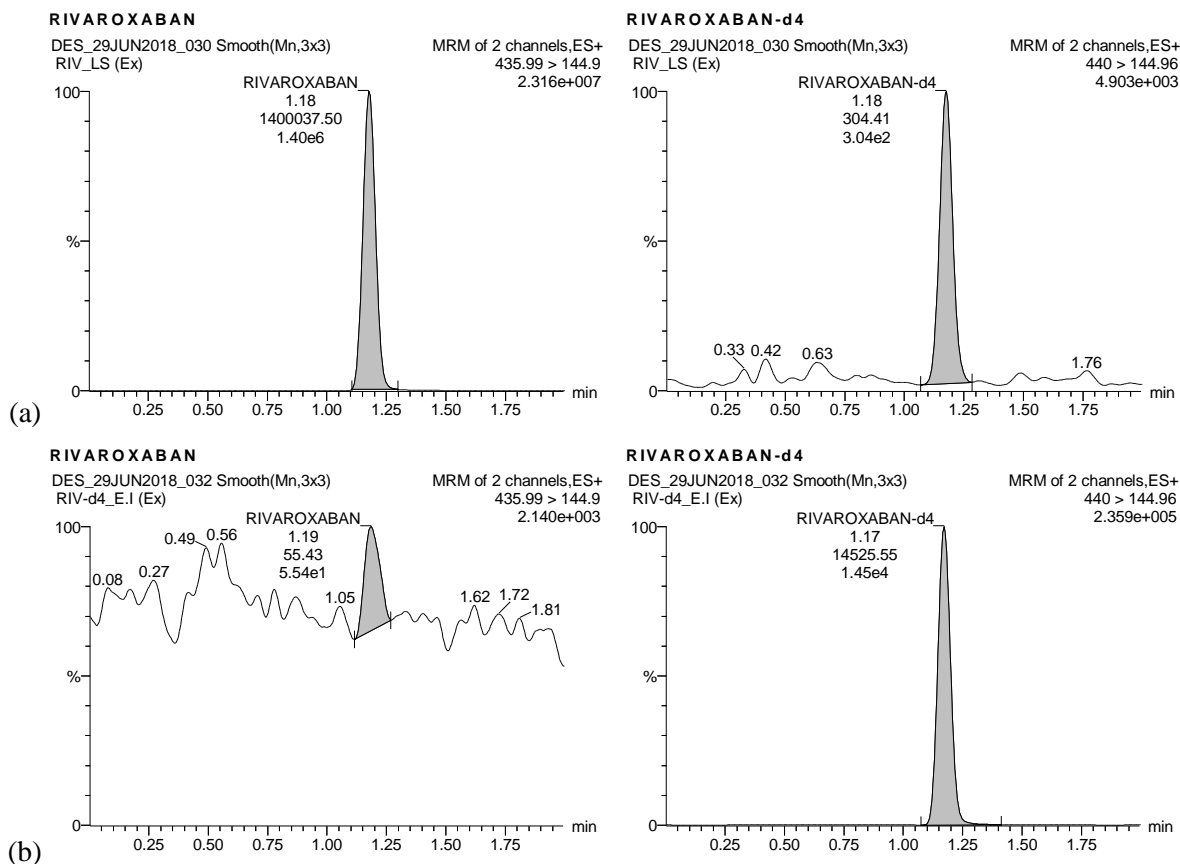


Figura 17. Cromatogramas obtenidos de la prueba de Verificación de Interferencia Cruzada
(a) Muestra plasmática del STD 8 sin la adición del EI (b) Muestra STD Zero en plasma.

La linealidad del método fue evaluada con tres curvas de calibración integradas cada una por 8 puntos de calibrantes (STD 1 a STD 8), el método demostró ser lineal en un rango de 0.504 – 606.656 ng/mL (Rango del Desarrollo). Con los resultados obtenido de las curvas de calibración, se realizó el análisis estadístico utilizando las pruebas de Xi cuadrada, donde se demostró que el mejor modelo matemático para la regresión lineal era $1/x^2$ (Figura 18).

El método analítico demostró que no existe efecto matriz evaluado lotes plasmas normales, dos lipémicos y dos hemolizados, con EDTA K₂. El % de exactitud promedio de las concentraciones obtenidas para las muestras PCB y PCA fue de 102.07 % y 98.13% y el % CV para cada una de las concentraciones evaluadas fue de 3.21% y 4.57% respectivamente.

Compound name: RIVAROXABAN
Correlation coefficient: $r = 0.998487$, $r^2 = 0.996976$
Calibration curve: $0.151794 * x + 0.00422843$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

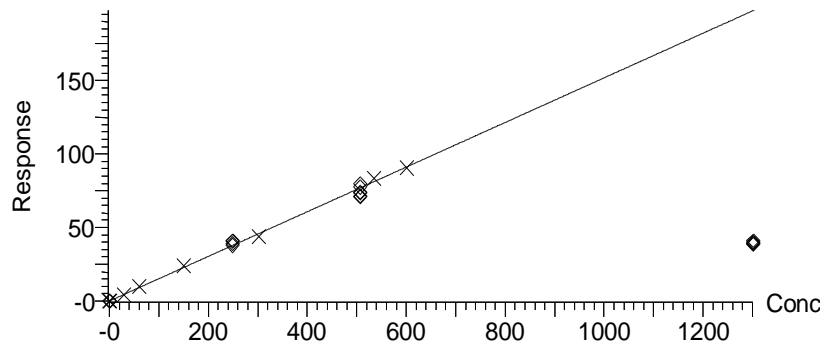


Figura 18. Curva de calibración en plasma obtenida durante el desarrollo del método analítico.

La validación del método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma se realizó de acuerdo con los procedimientos normalizados de operación de Avant Sante Reserch Center S.A de C.V con base en lo descrito en la NOM-177-SSA1-2013 y las guías internacionales de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por su nombre en inglés Food and Drug Administration) y la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA).

Durante la validación del método analítico se determinó que el equipo UPLC-MS/MS no tiene efecto de acarreo en el inyector, es decir, no se observaron interferencias significativas en el tiempo de retención del analito ni del estañar interno (Anexo I), por lo tanto, no se tiene el riesgo de tener interferencias posteriores a la inyección de una muestra de alta concentración.

La selectividad del método analítico fue demostrada al evaluar nueve lotes de plasma normales, dos lotes de plasma lipémico y dos lotes de plasma hemolizado usando como anticoagulante EDTA K₂ y un lote de plasma con heparina, al no presentar interferencias significativas en los tiempos de retención del analito y estándar interno. De los lotes de plasma normales que fueron selectivos, se eligieron seis de éstos para preparar un “pool de plasma” para las pruebas subsecuentes (Figura 19, Figura 20).

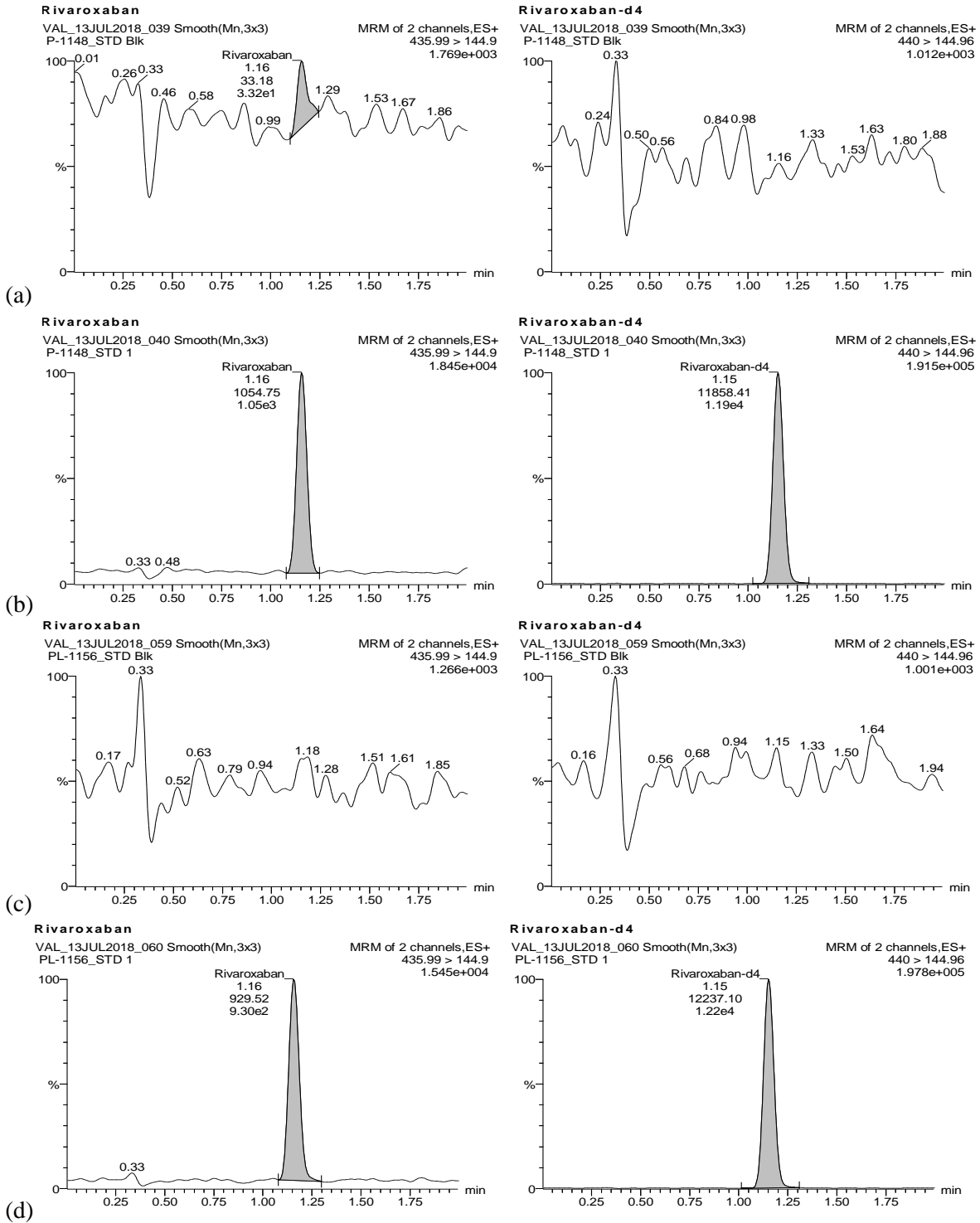


Figura 19. Cromatogramas obtenidos de las muestras plasmáticas de la prueba de selectividad (a) Muestras STD Blk en lote de plasma normal (b) Muestra STD 1 en lote de plasma normal (c) Muestras STD Blk de plasma lipémico (d) Muestra STD 1 en lote de plasma lipémico.

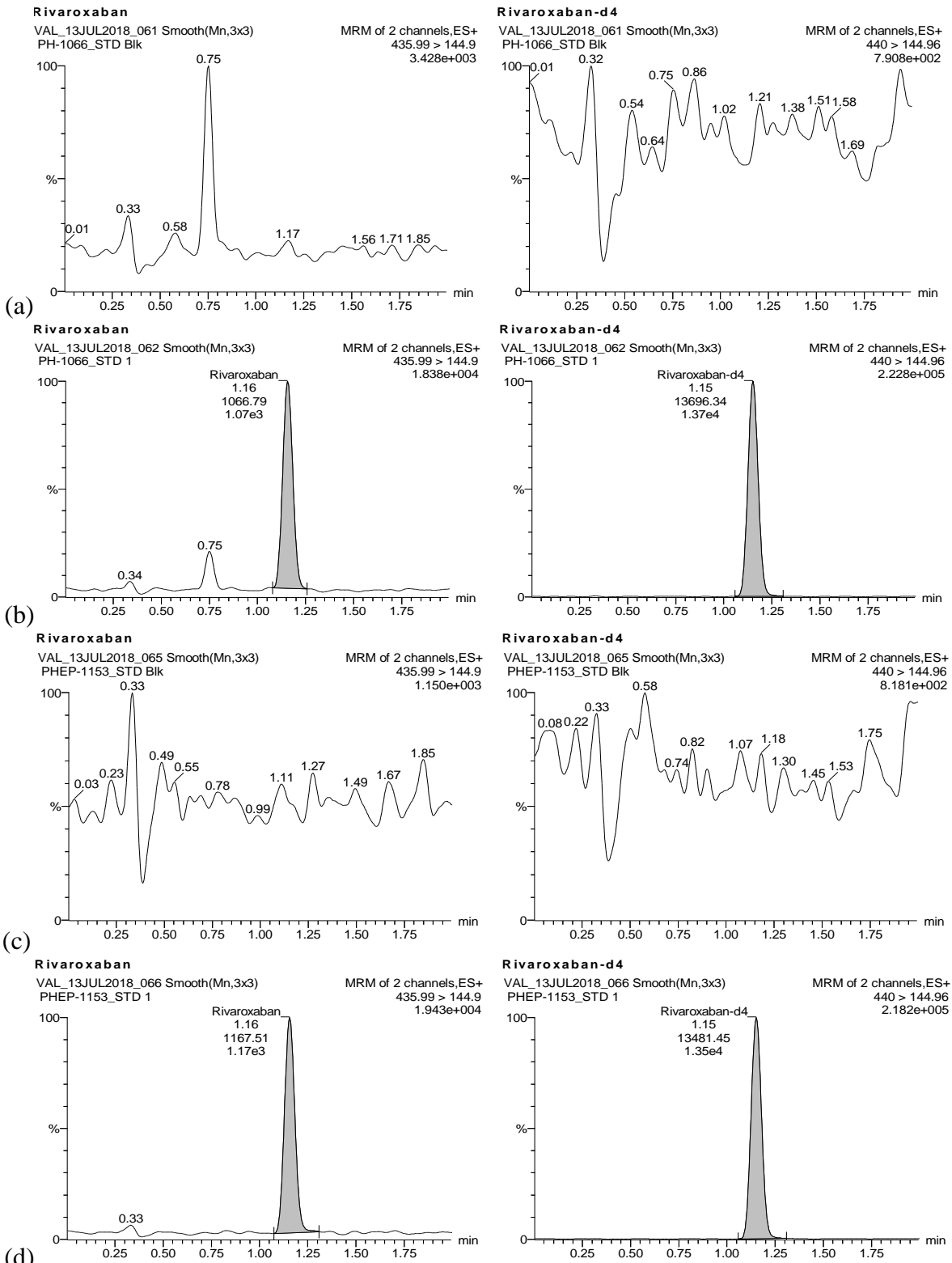


Figura 20. Cromatogramas obtenidos de las muestras plasmáticas de la prueba de selectividad (a) Muestras STD Blk en lote de plasma hemolizado (b) Muestras STD 1 en lote de plasma hemolizado (c) Muestras STD Blk en lote de plasma heparinico (d) Muestras STD 1 en lote de heparinico.

Adicional a la selectividad, se evaluó la especificidad con la prueba de verificación de la interferencia cruzada, en donde se determinó que no existe interferencias en tiempo de retención del analito y estándar interno en muestras acuosas y extraídas ocasionadas por intercambio isotópico o un efecto tipo “Crosstalk” al compartir el mismo ion producto, confirmando el resultado obtenido del desarrollo.

El método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban demostró ser lineal en un rango de 0.483 a 577.736 ng/mL (Rango validado) empleando una ponderación $1/x^2$, de acuerdo a las pruebas estadísticas realizadas durante el desarrollo, el coeficiente de correlación (r) durante la validación fue ≥ 0.9993 , el % de exactitud promedio de las tres curvas de calibración empleadas para la evaluación de la linealidad fue de 97.47 % a 102.73% mientras que el % CV oscilo en un rango de 0.48% a 4.62% (Figura 21). Se determinó la precisión y exactitud del método para la cuantificación de concentraciones bajas, es decir, el límite de cuantificación establecido de 0.483 ng/mL, con un % CV de 3.14 % y un % exactitud de 102.93% la relación señal ruido promedio obtenida fue de 105.0.

Compound name: Rivaroxaban
Correlation coefficient: $r = 0.999604$, $r^2 = 0.999208$
Calibration curve: $0.159196 * x + 0.00450416$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

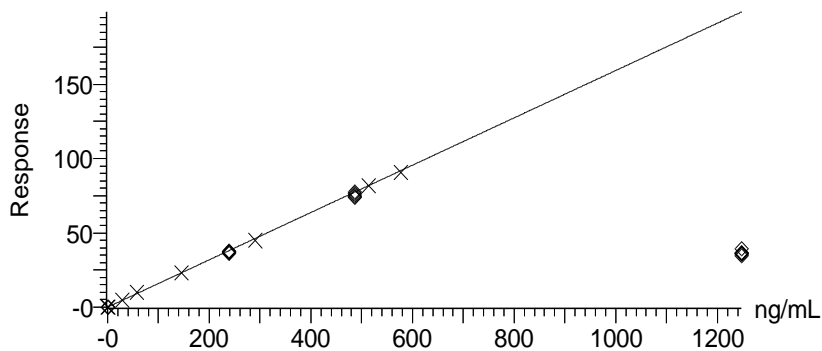


Figura 21. Curva de calibración en plasma obtenida durante la validación del método analítico.

Se demostró que no existe efecto matriz evaluado seis lotes plasmas normales, dos lipémicos y dos hemolizados, con EDTA K₂ como anticoagulante. El % de exactitud promedio de las concentraciones obtenidas para las muestras PCB (1.431 ng/mL) y PCA (486.686 ng/mL) fue de 108.29% y 105.41% respectivamente, el % CV para cada una de las concentraciones evaluadas PCB y PCA fue de 2.92% y 3.32% respectivamente. La relación de áreas promedio para cada nivel de concentración PCB y PCA fue de 0.98642 y 1.06179, con un % CV de 2.92% y 3.32%, respectivamente. por lo que se concluye que la condición del plasma no tiene impacto en la cuantificación de Rivaroxaban ya que los resultados son precisión y exactos.

Adicionalmente, con los mismos lotes de plasma, se evaluó el efecto matriz enriqueciendo las muestras blanco-procesadas al finalizar el proceso de extracción para determinar el factor matriz comparando la respuesta del analito y estándar interno en muestras post-extraídas contra muestras acuosas.

El coeficiente de variación obtenido para las muestras control a nivel PCB fue de 4.72% y para PCA 3.80 %, la comparación de la respuesta analítica promedio en muestras post - extracción y muestras acuosas fue de 0.99317 y de 1.01595 para muestras control PCB y PCA respectivamente. De acuerdo con lo descrito con (Kadian, *et al.* 2016) si el resultado de la prueba presenta un factor matriz normalizado (FMN) un valor igual o cercano a 1, no se presentan efectos de la matriz.

El método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma demostró ser preciso y exacto tras las pruebas de repetibilidad (Tabla 7) y reproducibilidad realizadas por dos analistas en diferentes días (Tabla 8 y Tabla 9), donde no se encontraron diferencias significativas entre diferentes analistas, ni en días de ejecución.

Se demostró que la dilución de las muestras aplicando un factor de dilución de 5 no tiene impacto en la precisión y exactitud de las muestras, al presentar un % CV de 3.19% y un % de exactitud de 90.31%.

El recobro absoluto promedio global de Rivaroxaban fue de 63.66 % con un %CV de 0.33%, y para el estándar interno de 63.64% con un %CV de 1.05%, el recobro fue homogéneo en los tres niveles evaluados (PCA, PCM, PCB) comparado el 98.40% de recobro reportado por Badelli *et*

al. 2015 usando una extracción en fase sólida, es ligeramente menor, sin embargo, es cercano a lo obtenido por Schmitz *et al.* 2014 y Muzaffar *et al.* 2015, los cuales emplean una técnica de extracción por precipitación de proteínas.

Tabla 7. Precisión y exactitud del método analítico en la prueba de Repetibilidad

	PCA	PCM	PCB	PCLC	DQC	
Conc. nominal (ng/mL)	486.686	238.476	1.431	0.494	1247.913	
Concentración obtenida (ng/mL)						
Replica	1	496.897	241.739	1.459	0.488	998.043
	2	466.654	242.634	1.311	0.469	1106.709
	3	476.266	231.335	1.449	0.468	1084.480
	4	447.121	236.003	1.533	0.520	1074.281
	5	462.051	225.408	1.453	0.457	1086.996
	6	471.121	231.268	1.361	0.501	1074.203
Promedio	470.1187	234.7312	1.4277	0.4838	1070.203	
DE	16.51319	6.68776	0.07903	0.02371	37.56644	
% CV	3.51	2.85	5.54	4.90	3.51	
% Exactitud promedio	96.60	98.43	99.77	97.94	85.81	

Tabla 8. Reproducibilidad del Analista 1

	PCA	PCM	PCB	PCLC	DQC
Conc. nominal (ng/mL)	486.686	238.476	1.431	0.494	1247.913
Concentración obtenida (ng/mL)					
Dia 1	470.018	234.731	1.428	0.484	1070.785
Dia 2	469.234	230.283	1.403	0.516	1127.004
Dia 3	475.022	230.141	1.497	0.529	1155.268
Promedio	471.584	231.718	1.442	0.509	1117.685
DE	13.95943	7.432	0.07379	0.02896	47.96302
% CV	2.96	3.21	5.12	5.69	4.29
% Exactitud promedio	96.87	97.17	100.8	103.12	89.56

Tabla 9. Reproducibilidad del Analista 2

	PCA	PCM	PCB	PCLC	DQC
Conc. nominal (ng/mL)	486.686	238.476	1.431	0.494	1247.913
Concentración obtenida (ng/mL)					
Dia 1	455.6612	235.8555	1.4353	0.4963	1324.5275
Dia 2	486.1590	233.4820	1.4333	0.5132	1363.5067
Dia 3	446.4650	226.5877	1.4107	0.4823	1260.7335
Promedio	463.759	232.188	1.426	0.4973	1317.2527
DE	26.11380	8.71349	0.05905	0.02462	69.77577
% CV	5.63	3.75	4.14	4.95	5.30
% Exactitud promedio	95.29	97.36	99.68	100.66	105.56

En las pruebas de robustez se evaluó la tolerancia al cambio de equipo, en el que se determinaron las siguientes transiciones; Rivaroxaban 436.11 → 144.99 (m/z) y Rivaroxaban-d4 440.90 → 144.98 (m/z), las cuales son semejantes de las obtenidas en el primer instrumento y lo descrito por (Baldelli, *et al.* 2016). En la tolerancia al cambio de columna se empleó una columna de las mismas características, Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 x 50mm, de diferente lote la cual presento reproducibilidad de tiempos de retención y formas de pico. El cambio de equipo o columna no afecta la precisión y exactitud del método analítico en la cuantificación de Rivaroxaban (Ver Anexo I).

Se demostró que la reinyección de las muestras no afecta la precisión y exactitud después de un periodo de 1 día 01 horas 21 min de estar almacenadas a temperatura de automuestreador (5 ± 4 °C). En la reinyección de muestras, previamente analizadas, se obtuvieron % CV de 2.33% a 4.05% y % de exactitud de 93.20% a 101.25%. (Ver Anexo I).

Para simular la duración de una corrida analítica del análisis de muestras de un estudio clínico, se analizaron 190 muestras, de las cuales 180 corresponden a 60 réplicas de muestras control de cada nivel, es decir, PCA, PCM y PCB, junto con una curva de calibración, donde la precisión y exactitud del método no se ve afectada por el número de muestras. El % CV oscilo de 2.65% a 3.88% y el % exactitud de 95.89% a 97.57%.

Como parte de las pruebas de especificidad, se evaluó el efecto que tiene el uso de medicamentos concomitantes en la identificación y cuantificación de Rivaroxaban, para ello se llevaron a cabo pruebas de selectividad a los siguientes fármacos; Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco Sódico, Paracetamol (Acetaminofén), Ácido Salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina, en donde no se encontraron interferencias significativas en los tiempos de retención de Rivaroxaban y Rivaroxaban-d4. Así mismo, se demostró que el enriquecimiento de muestras plasmáticas con dichos fármacos no tiene efecto en la cuantificación de Rivaroxaban al tener resultados precisos y exactos.

La adición de un pool de fármacos concomitantes uso común en la ejecución clínica en caso de eventos adversos, conformado por; Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco sódico, Paracetamol (Acetaminofén) Ácido salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina a muestras

plasmáticas con diferentes condiciones plasmáticas, es decir, normales, lipémicas y hemolizadas, no tiene impacto sobre el cambio en el efecto matriz obteniendo resultados precisos y exactos, con un % de exactitud promedio global, es decir, tomando en cuenta las muestras preparadas en los diferentes lotes de plasma, de 100.70% para las muestras PCB y 102.87% para las muestras PCA, y su % CV fue de 5.36% y 3.36% para las muestras PCB y PCA, respectivamente. (Ver Tabla 10)

Tabla 10. Efecto matriz en presencia de fármacos concomitantes

		PCA	PCB
		Concentración nominal (ng/mL)	
		486.686	1.431
Tipo de Plasma	Lote de Plasma	Concentración obtenida (ng/mL)	
Normal	P-1148	503.420	1.493
	P-1151	512.220	1.425
	P-1152	489.959	1.417
	P-1158	492.977	1.497
	P-1161	491.791	1.440
	P-1180	514.531	1.401
Lipémico	PL-1149	508.480	1.399
	PL-1156	493.673	1.450
Hemolizado	PH-1066	502.987	1.475
	PH-1067	504.488	1.433
	Promedio	501.452	1.443
	DE	16.82664	0.07844
	% CV	3.36	5.44
	% Exactitud promedio	102.87	100.7

En sangre total a temperatura ambiente (~25 °C) fue estable por 03 h 07 min, el % de exactitud obtenido para las muestras PCB y PCA fue de 95.67% y 113.38%, mientras que en sangre total en baño hielo, fue estable por un periodo de 03 h 02 min, los % de exactitud obtenidos fueron de 101.61% y 106.56% para los niveles PCB y PCA respectivamente.

La muestra fue sometida a diferentes condiciones de temperatura como muestra plasmática sin procesar (Tabla 11) y muestra plasmática procesada (Tabla 12), las muestras de estabilidad fueron interpoladas en una curva de calibración fresca y comparadas con muestras control de recién preparación, en donde no se observaron diferencias significativas en la variación del área del analito, además de cumplir con criterios de precisión y exactitud.

Tabla 11. Estabilidad de Rivaroxaban en Plasma (EDTA K₂)

Condición	Tiempo	Concentración (ng/mL)		% CV	% Exactitud
		Nominal	Obtenida		
A Temperatura Ambiente (~25°C)	06 h 28 min	486.686	474.996	2.82	97.6
		1.431	1.415	1.41	98.93
Ciclos de Congelación-Descongelación (-70 ± 15°C)	5 ciclos	486.686	468.318	2.36	96.23
		1.431	1.420	3.74	99.23
Largo plazo a -70 ± 15°C	213 días 21 h 23 min	486.686	529.689	3.88	108.84
		1.431	1.599	4.44	111.77
Largo plazo a -20 ± 10°C	213 días 21 h 28 min	486.686	527.211	2.47	108.33
		1.431	1.586	5.33	110.83

Tabla 12. Estabilidad de Rivaroxaban en muestra plasmática procesada

Condición	Tiempo	Concentración (ng/mL)		% CV	% Exactitud
		Nominal	Obtenida		
Muestra procesada a temperatura ambiente (~25°C)	03 h 59 min	486.686	467.366	3.07	96.03
		1.431	1.393	1.87	97.36
Muestra procesada en refrigeración (2-8 °C)	5 h 23 min	486.686	477.82	4.32	98.18
		1.431	1.451	6.95	101.43
Muestra post-evaporación a temperatura ambiente (~25°C)	05 h 14 min	486.686	473.377	3.04	97.27
		1.431	1.449	1.35	101.27
Muestra post-evaporación en condiciones de refrigeración (2-8 °C)	04 h 57 min	486.686	475.887	2.81	97.78
		1.431	1.45	3.12	101.39
En Automuestreador (5 ± 4°C)	2 días 09 h 06 min	486.686	460.57	2.25	94.63
		1.431	1.407	3.65	98.32

La estabilidad en solución a largo plazo de Rivaroxaban y Rivaroxaban-d4 almacenadas en refrigeración a temperatura de 2 – 8°C, demostraron ser estables por 7 días 22 h y 35 min para las soluciones stock preparadas en Acetonitrilo 100% (Solución Stock) y por 7 días 18 h 17 min para las soluciones de carga y de trabajo preparadas en Acetonitrilo: Agua [80:20 v/v], mientras que la estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente fue de 06 h 33 min

para las soluciones stock de y 06 h 42 min para las soluciones de carga y de trabajo para Rivaroxaban y Rivaroxaban-d4.

A lo largo de la validación se realizó la compilación de los datos globales de puntos control en los diferentes niveles de concentración, obtenido un % de exactitud de 97.73%, 97.62%, 99.89%, 97.49% y 102.36%, para PCA, PCM, PCB, DQC y PCLC, respectivamente. Los detalles de cada una de las pruebas de la validación se resumen en el Anexo I.

El método desarrollado y validado ofrece grandes ventajas respecto a los métodos reportados en la literatura, como por ejemplo, un modo de elución que garantiza un mayor tiempo de vida de la columna, menor cantidad de problemas en el sistema UPLC debido al uso de gradiente en corridas analíticas grandes, un tiempo de corrida corto, una técnica de extracción más limpia que precipitación de proteínas y a un menor costo comparado con una extracción en fase sólida, la combinación de un método de procesamiento rápido con un tiempo de corrida corto, permite la ejecución y adquisición de 2 lotes de muestras plasmáticas de 190 muestras cada uno, lo cual fue aplicado en los análisis de muestras de Bioequivalencia.

Los dos estudios de bioequivalencia en voluntarios sanos sin potencial de reproducción para evaluar las dosis de 10 mg y 20 mg en condiciones de ayuno y estado postprandial, respectivamente, fueron ejecutados de acuerdo con lo especificado en la validación del método.

Las muestras plasmáticas de los voluntarios, de cada uno de sus respectivos estudios, fueron obtenidas de acuerdo con el protocolo clínico correspondiente y considerando los periodos de estabilidad en sangre total determinados durante la validación del método analítico, posteriormente las muestras fueron trasferidas de la Unidad Clínica a la Unidad Analítica para llevar a cabo su análisis.

En el caso del protocolo clínico para la evaluación de la dosis de 10 mg se analizaron las muestras plasmáticas provenientes de 26 sujetos completos (dos periodos) y 2 sujetos parciales (1 solo periodo, por eventos adversos o retiro del consentimiento informado) con 20 tiempos de muestreo con un total de 1070 muestras; mientras que para el protocolo clínico para la evaluación de la dosis de 20 mg se analizaron las muestras plasmáticas provenientes

de 28 sujetos (dos periodos) con 21 tiempos de muestreo, por lo que se analizaron 1170 en total.

Las corridas analíticas cumplieron con criterios de aceptación para selectividad, linealidad, precisión y exactitud, durante la ejecución de los análisis de muestras se realizó la inclusión de la muestra punto control medio 2 (PCM2) cargada alrededor de un 10% del LS para brindar un mayor soporte a la Cmax obtenida en caso de tener variaciones, el porcentaje de reanálisis con base en el número de muestras total analizadas fue de 0.09 % (1 muestra) para la dosis de 10 mg y de 0.34% (4 muestras) para la dosis de 20 mg.

De acuerdo con los resultados globales obtenidos de la curva de calibración y puntos control reportados en la tabla 13, no se observan diferencias significativas en el % CV y % exactitud.

Tabla 13. Resultados globales de estándares de calibración y puntos control

	Dosis de 10 mg		Dosis de 20 mg	
	% Exactitud	% CV	% Exactitud	% CV
STD 1 – STD 8	94.75 – 102.87	1.32 – 2.79	93.67 – 103.15	1.03 – 2.18
PCA	98.13	0.39	96.08	0.29
PCM	100.33	0.33	99.24	0.25
PCM2	101.13	0.31	100.68	0.30
PCB	100.79	0.33	99.28	0.28

En la ejecución de clínica, para la evaluación de 10 mg de Rivaroxaban no se administraron medicamentos concomitantes, mientras que para la evaluación de 20 mg de Rivaroxaban se administró únicamente paracetamol, el cual fue evaluado durante la validación del método analítico y no tiene efectos sobre la cuantificación de Rivaroxabán.

En análisis estadístico, la Cmax de Rivaroxaban para una dosis de 10 mg en condiciones de ayuno, para el medicamento de referencia fue de 139.994 ± 37.252 ng/mL en un tiempo (Tmax) de 1.853 h con un AUC_{0-∞} de 1003.509 h·ng/mL y para el medicamento de prueba fue de 134.944 ± 34.839 en un tiempo (Tmax) de 2.077 h con un AUC_{0-∞} de 1042.903 h·ng/mL, las concentraciones promedio obtenidas en cada tiempo de muestro para el

medicamento de prueba A de 10 mg, se muestran en el Anexo 2 y para el medicamento de referencia B de 10 mg, en el anexo 3. De acuerdo con las pruebas estadísticas realizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre ambas formulaciones, además los perfiles farmacocinéticos obtenidos para el medicamento de prueba y referencia son similares entre sí (Figura 22, Figura 23).

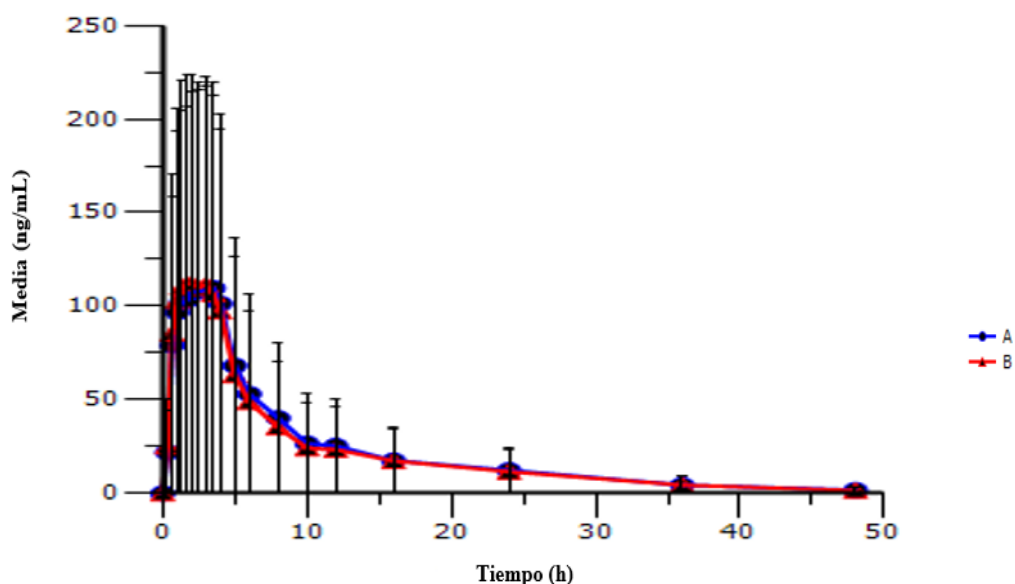


Figura 22. Gráfica de medias de concentraciones, escala aritmética (con barras de error), para una dosis de 10 mg de Rivaroxaban en condiciones de ayuno.

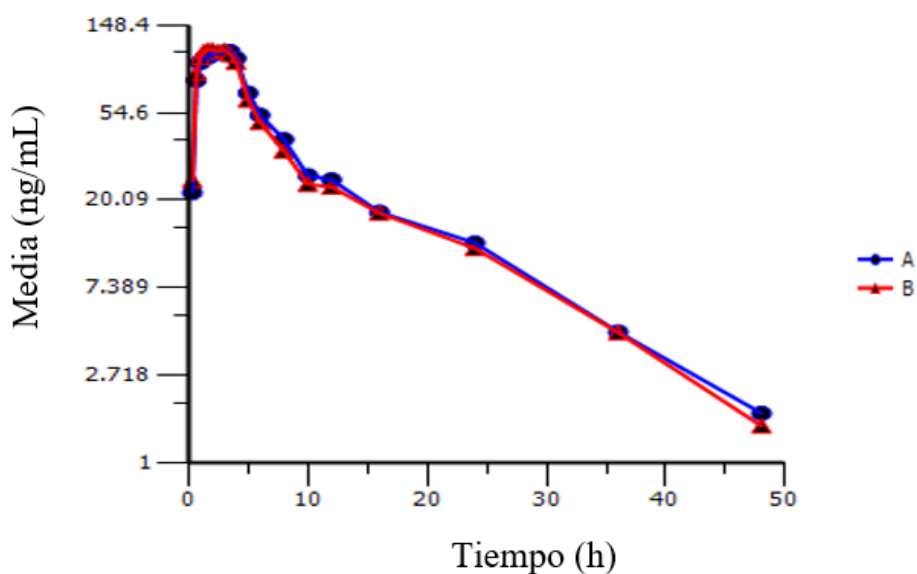


Figura 23. Gráfica de medias de concentraciones, escala semilogarítmica, para una dosis de 10 mg de Rivaroxaban en condiciones de ayuno.

La determinación de la Bioequivalencia se realizó aplicando la prueba t doble unilateral de Shuirmann con un intervalo de confianza al 90%, (Tabla 14), los resultados obtenidos para los cocientes de la C_{max}, AUC_{0-t} y AUC_{0-∞} se encontraron dentro del rango de 80.00 – 125.00% por lo que el medicamento de prueba y referencia son bioequivalentes para una dosis de 10 mg.

Tabla 14. Resultados de la estadística de Biodisponibilidad de Rivaroxabán 10 mg en condiciones de ayuno.

Parámetro	A/B (%)	Intervalo de Confianza al 90% del cociente 80.00-125.00%	Schuirmann		Poder Estadístico (%)
			P<80.00	P>125.00	
C _{máx}	95.6	87.78 – 104.07	0.0008	0.0000	99.5
AUC _{0-t}	103.7	96.59 – 111.24	0.0000	0.0001	99.9
AUC _{0-∞}	103	95.66 – 110.98	0.0000	0.0001	99.9

En el caso de la dosis de 20 mg en estado postprandial, para el medicamento de referencia fue de 276.459 ± 53.492 ng/mL en un tiempo (T_{max}) de 2.303 h con un AUC_{0-∞} de 2060.829 h·ng/mL y para el medicamento de prueba fue de 262.073 ± 57.760 ng/mL en un tiempo (T_{max}) de 1.667 h con un AUC_{0-∞} de 1840.143 h·ng/mL, las concentraciones promedio obtenidas en cada tiempo de muestro para el medicamento de prueba A de 20 mg se muestran en el Anexo 4 y para el medicamento de referencia B de 20 mg en el anexo 5. De acuerdo con las pruebas estadísticas realizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre ambas formulaciones, además los perfiles farmacocinéticos

obtenidos para el medicamento de prueba y referencia son similares entre sí (Figura 24, Figura 25).

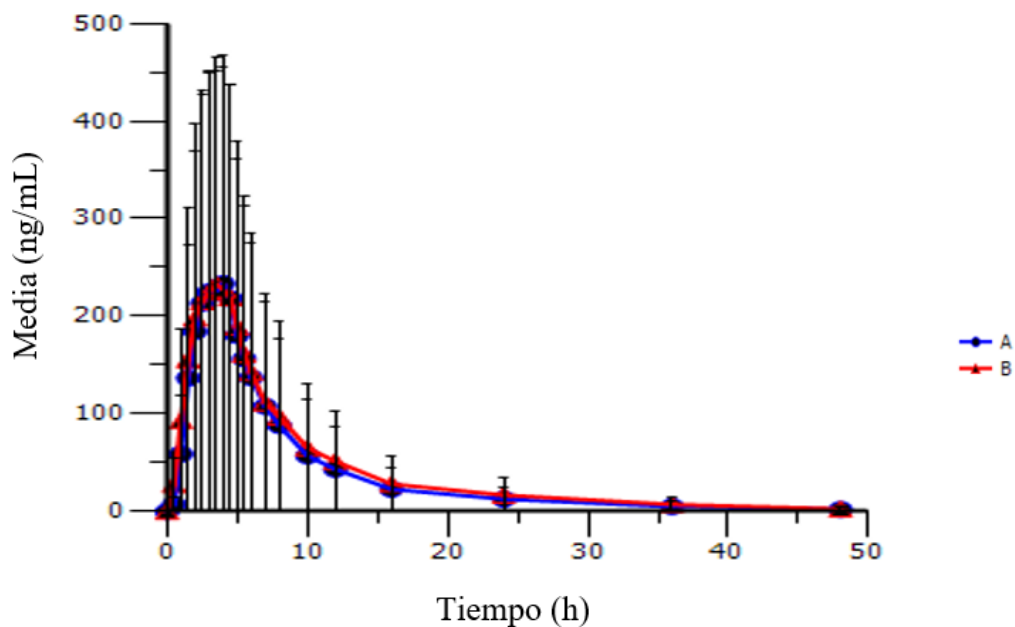


Figura 24. Gráfica de medias de concentraciones, escala aritmética (con barras de error), para una dosis de 20 mg de Rivaroxaban en estado postprandial.

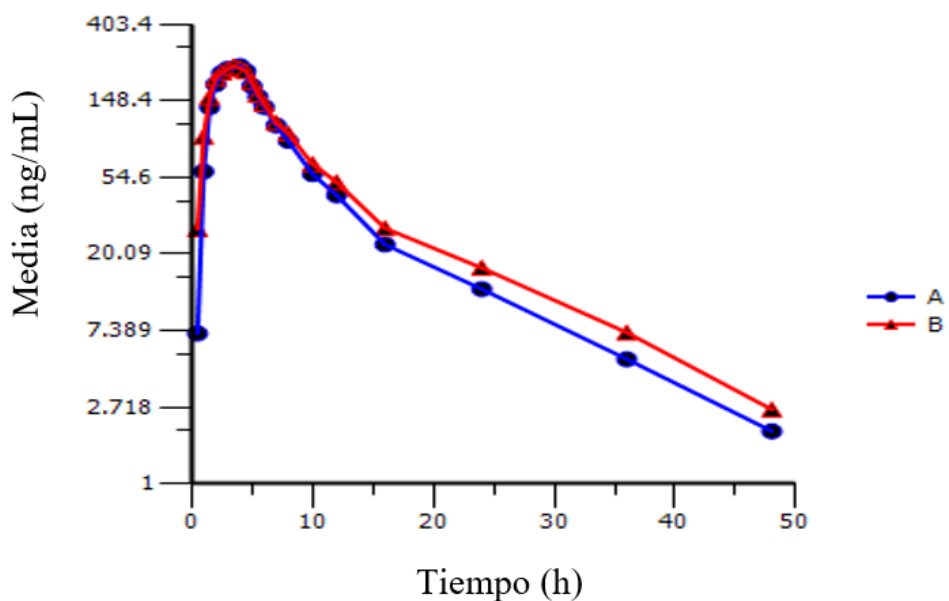


Figura 25. Gráfica de medias de concentraciones, escala semilogarítmica, para una dosis de 20 mg de Rivaroxaban en estado postprandial.

La determinación de la Bioequivalencia se realizó aplicando la prueba t doble unilateral de Shuirmann con un intervalo de confianza al 90%, (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de la estadística de Biodisponibilidad de Rivaroxabán 10 mg en condiciones de ayuno.

Parámetro	A/B (%)	Intervalo de Confianza al 90% del cociente 80.00-125.00%	Schuirmann		Poder Estadístico (%)
			P<80.00	P>125.00	
C _{máx}	94.1	87.34 – 101.41	0.0005	0.0000	99.9
AUC _{0-t}	89.7	83.34 – 96.62	0.0068	0.0000	99.9
AUC _{0-∞}	89.1	83.06 – 95.68	0.0074	0.0000	99.9

Un estudio en Alemania, administro una dosis de 10 mg (Tabletas 2 x 5 mg) y la C_{max} obtenida fue de 114.000 ng/mL y un T_{max} 4 (1-4 h) y un AUC_{0→∞} de 816 ngh/mL y para una dosis 20 mg (Tabletas 4 x 5 mg) se obtuvo una C_{max} de 278 ng/mL con un T_{max} de 3 (2.5 – 4 h) y AUC_{0→∞} de 1994 ngh/mL (FDA 2009). Dichos parámetros son ligeramente semejantes a los obtenidos en la población mexicana tanto para el medicamento de prueba como el medicamento de referencia para las dosis de 10 mg y 20 mg son semejantes a las reportadas por estudios de farmacocinética reportados por FDA, sin embargo, las diferencias que existen pueden ser ocasionadas por variabilidad genética (Polimorfismos CYP), alimentación, entre otros.

10. CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado y validado para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma humano usando Cromatografía de Líquidos de Alta resolución acoplado a Espectrometría de Masas-Masas, cumple con los requisitos de la regulación Nacional e Internacional en materia de Bioanálisis.

El método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban demostró ser selectivo, específico, lineal, robusto, preciso y exacto, además de brindar ventajas de tiempos de ejecución, optimización de costos, reducción de problemas de efecto de la matriz, vitalidad de las columnas, entre otros comparado con los métodos de reportaos en la literatura.

La aplicación del método analítico validado en un estudio de Bioequivalencia permitió caracterizar los parámetros farmacocinéticos de Rivaroxaban en población mexicana tras la administración de tabletas de 10 mg y 20 mg en ayuno y estado postprandial, respectivamente.

Los resultados obtenidos en ambos análisis de muestras fueron precisos y exactos, es decir, el método demostró robustez al presentar coeficientes de variación menores al $\pm 15\%$ y porcentajes de exactitud entre el 85-115%, durante la ejecución de estos de los análisis. Por lo que las variaciones observadas en los parámetros farmacocinéticos pueden ser producto de la variabilidad intersujeto y no debido al método analítico.

La evaluación de las especialidades farmacéuticas pruebas y referencia para ambas dosis, 10 mg y 20 mg, fueron Bioequivalentes, no se encontraron diferencias significativas entre la C_{max} y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$.

El medicamento de prueba al ser bioequivalente resulta ser una alternativa farmacéutica con el mismo efecto, régimen de dosificación, estándares de calidad y margen de seguridad, pero a un precio más accesible para la población y sistemas públicos de salud.

11.PERSPECTIVAS

El método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma podría ser utilizado en estudios de Fase II, Fase III y Fase IV para la monitorización de pacientes, adicionalmente, el método podría ser empleado para llevar a cabo la recopilación de datos farmacocinéticos para un estudio de Farmacocinética poblacional en México o en el extranjero.

El contar con una metodología analítica que cumpla con los requisitos de la regulación Nacional e internacional, existe la posibilidad de llevar a cabo un mayor número de estudios de Bioequivalencia que puedan ser sometidos a las entidades regulatorias correspondientes en cada país y, por lo tanto, el medicamento genérico pueda encontrarse a disposición de la población en una mayor a nivel internacional.

12. IMPACTO SOCIAL

Los sistemas de salud a nivel mundial cuentan con recursos limitados por lo que se ha optado por la incorporación de medicamentos genéricos con la finalidad de reducir costos. El sistema de salud en Estados Unidos, entre los años de 2007 – 2016, ahorro alrededor de 1.67 trillones de dólares con la incorporación de medicamentos genéricos (Food and Drug Administration).

Los medicamentos genéricos son alternativas farmacéuticas a los medicamentos de marca con las mismas características de dosificación, vía de administración, calidad, potencia y seguridad, produciendo el mismo efecto y beneficio clínico, pero a un bajo costo.

Los fármacos anticoagulantes orales de acción directa han beneficiado el tratamiento de enfermedades tromboembólicas puesto que presentan un bajo porcentaje de interacciones con otros medicamentos y alimentos, sin embargo, su disponibilidad en el mercado es como medicamentos de marca a un costo elevado.

Rivaroxaban es un medicamento innovador que es comercializado como medicamento de marca (patente) con un alto costo para la población, por lo que los sistemas de salud públicos a nivel mundial no lo han incorporado a su régimen de salud optando por los medicamentos tradicionales con una mayor posibilidad de presentar reacciones adversas, un manejo terapéutico complejo y un margen de seguridad estrecho.

El contar con un medicamento genérico para un fármaco anticoagulante como Rivaroxaban, el cual ha demostrado resultados satisfactorios en la terapéutica de diversas enfermedades tromboembólicas, en comparación con otros medicamentos anticoagulantes de la misma familia y anticoagulantes tradicionales, permite que los sistemas de salud públicos y privados, así como la población en general, tenga un fácil acceso reduciendo el costo de adquisición.

La ejecución de estudios clínicos de bioequivalencia que cuentan con los requerimientos del marco regulatorio nacional e internacional permiten que la industria farmacéutica pueda comercializar el medicamento genérico trayendo consigo beneficios a la población y sistemas de salud a nivel mundial.

13.REFERENCIAS

- 13.1. Baldelli, S., Cattaneo, D., Pignatelli, P., Perrone, V., Pastori, D., Radice, S., Clementi, E. (2016). Validation of an LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of Dabigatran, Rivaroxaban and Apixaban in human plasma. *Bioanalysis*, 275 - 283.
- 13.2. Bayer Pharma AG. Xarelto® (rivaroxaban) Summary of Product Characteristics (2009);http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf
- 13.3. Cabrera R.A, Nellen H.H, (2007). Epidemiología de la enfermedad tromboembólica venosa. *Gaceta Medica Mexico*, 143(1), 3-5.
- 13.4. Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee (2009). FDA Advisory Committee Briefing <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/CardiovascularandRenalDrugsAdvisoryCommittee/UCM181524.pdf>
- 13.5. Duxbury, B. Poller, L. (2001). The oral anticoagulant saga: past, present and future. *Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 7(4), 269 - 275.
- 13.6. Eek AK, Strøm BO, Bakkehøi G, Stenberg-Nilsen H. (2013) Anticoagulant-associated adverse drug reactions. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 21;138(12).
- 13.7. European Medicines Agency. CHMP assessment report for Xarelto (2008). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/000944/WC500057122.pdf
- 13.8. Food Drug Administration. Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(S); (2009). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/022406Orig1s000ClinPharmR.pdf
- 13.9. García P.M, Maseda A, Sánchez A., López L.L, Núñez N.L, Millán C.J.C. (2014). Venous thromboembolism in elderly people: a literatura review, *Gerokomos*, 25(3), 93-97.

- 13.10. Gnoth M.J, Buetehorn U, Muenster U, Schwarz T, Sandman S. (2011). In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther.* 338:372–80.
- 13.11. González O, Blanco M.E, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui M.I, Alonso R.M (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with as special focus on the non-well-defined parameters limit of quantification, robustness, and matrix effect, *Journal of Chromatography A*, 1353, 10-27.
- 13.12. Gouveia F, Bicker J, Gonçalves J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. (2009). Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Anal Chim Acta.* 1076:18-31.
- 13.13. Gray E, Hogwood J., M. B. (2012). The anticoagulant and Antithrombotic Mechanisms of Heparin. In Heparin - A century of Progress. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin Heidelberg, 43–61.
- 13.14. Ho S.J, Brighton, T.A. (2006). Ximelagatran: direct thrombin inhibitor. *Vascular Health and Risk Management*, 2(1), 49–58.
- 13.15. Insull W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am. J. Med.* 2009, 122(1 Suppl): S3-S14.
- 13.16. Janssen Pharmaceuticals Inc. Xarelto® (rivaroxaban), (2013). Prescribing Information http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022406s004lbl.pdf
- 13.17. Kadian N, Rama Raju K, Rashid M, Malik M, Taneja I, Wahajuddin M. (2016). Comparative assesment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 126:83 - 97.
- 13.18. Kalathottukaren M.T, Kizhakkedathu J.N (2018). Mechanism of blood coagulation in response to biomaterials: Extrinsic factors. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinicals Applications*, 29 -49.
- 13.19. Kreutz R, (2012). Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundamental Clin Pharmacol*, 26(1):27-32.
- 13.20. Kubitzka D, Becka M, Mück W, Krätzschar J, (2013). Pharmacodynamics and pharmacokinetics during the transition from warfarin to rivaroxaban in healthy subjects:

- a multicenter, randomized, placebo-controlled study. *J Thromb Haemost*, 11:820 (Abstract PB 3.46-1).
- 13.21. Kubitza D, Becka M, Mueck W. (2012). Effect of co-administration of rivaroxaban and clopidogrel on bleeding time, pharmacodynamics and pharmacokinetics: a phase I study. *Pharmaceuticals*, 5:279–96.
- 13.22. Kubitza D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M, (2007). Rivaroxaban (BAY59-7939)—an oral, direct Factor Xa inhibitor—has no clinically relevant interaction with naproxen. *Br J Clin Pharmacol*, 63:469–76.
- 13.23. Kubitza D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M, (2006). Safety, tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor—are not affected by aspirin. *J Clin Pharmacol*, 46:981–90.
- 13.24. Kubitza D, Becka M, Roth A, Mueck W, (2012). Absence of clinically relevant interactions between rivaroxaban—an oral, direct Factor Xa inhibitor—and digoxin or atorvastatin in healthy subjects. *J Int Med Res*, 40:1688–707.
- 13.25. Kubitza D, Becka M, Roth A, Mueck W, (2008). Dose-escalation study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in healthy elderly subjects. *Curr Med Res Opin*, 24:2757–65.
- 13.26. Kubitza D, Becka M, Schwers S, Voith B, (2013). Investigation of pharmacodynamics and pharmacokinetic interactions between rivaroxaban and enoxaparin in healthy male subjects. *Clinical Pharm Drug Dev*, 2:270–7.
- 13.27. Kubitza D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G, (2005). Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther*, 78:412–21.
- 13.28. Kubitza D, Becka M, Wensing G, Wensing G, Zuehlsdorf M, (2005). Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, 61:873–80.
- 13.29. Kubitza D, Becka M, Zuehlsdorf M, Mueck W, (2006). Effect of food, an antacid, and the H2 antagonist ranitidine on the absorption of BAY 59-7939 (rivaroxaban), an oral, direct Factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*, 46:549–58.

- 13.30. Kubitza D., Becka M., Zuehlsdorf M., Mueck W, (2007). Body weight has limited influence on the safety, tolerability, pharmacokinetics, or pharmacodynamics of rivaroxaban (BAY59-7939) in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol*, 47 218–226.
- 13.31. Levine, M. N., Raskob, G., Beyth, R. J., Kearon, C., Schulman, S. (2004). Hemorrhagic Complications of Anticoagulant Treatment. *Chest*, 126(3), 287S–310S.
- 13.32. Longo, D. L., Kasper, D. L., Jameson, L., Fauci, A. S., Hauser, S. L, (2012). *Harrison. Principios de medicina interna*. McGraw Hill, New York, USA.
- 13.33. Lowe G., (2004) Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages, *The European Menopause Journal*, 47(4): 259 – 263.
- 13.34. Matos, D. P., Rentas, S. L., Fernandes de Aranda, V., Paris, C. M., Pitangueira, M. C., Katz, M., Dos Santos, F. (2017). Determination of Rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal PLOS One*, 12(2), 1-14.
- 13.35. Moore K.T, Plotnikov A.N, Thyssen A, Vaccaro N, Ariyawansa J, Burton P.B, (2011) Effect of multiple doses of omeprazole on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of a single dose of rivaroxaban. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58:581–8.
- 13.36. Mosevoll KA, Johansen S, Wendelbo Ø, Nepstad I, Bruserud Ø, Reikvam H. (2018). Cytokines, Adhesion Molecules, and Matrix Metalloproteases as Predisposing, Diagnostic, and Prognostic Factors in Venous Thrombosis. *Front Med (Lausanne)*, 5:147.
- 13.37. Mueck W, Kubitza D, Becka M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76:455–66.
- 13.38. Mueck W, Stampfuss J, Kubitza D, Becka M, (2014). Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban, *Clinical Pharmacokinetics*, 53(1) 1-16.
- 13.39. Murillo M.C, Aguilar A.M.L, Velasco O.E, Alonso G.R, Castellanos S.H, Romo J.A, Vargas R.A, Torres A.L, Viniegra O.A. (2011). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. *Rev. Med. Inst Mex Seguro Soc*, 49(4):437-439.

- 13.40. Muzaffar I, Nasr Y Khalli, Faisal I, Khalid A, (2015). A validated high-throughput UHPCL-MS/MS assay for accurate determination of Rivaroxaban in plasma sample. *J. Thromb Thrombolysis*, 39: 79-88.
- 13.41. Myers J.D (2015) Pathophysiology of venous thrombosis, *Phlebology*, 30(1):7-13.
- 13.42. Nováková, L., Svoboda, P., Pavlík, J. (2017). Ultra-highperformance liquid chromatography. En S. Fanali, H. R.P, C. Poole, M. Riekkola, *Liquid Chromatography Volume 1; Fundamentals and Instrumentation*, Elsevier, 719 - 769.
- 13.43. Otero Candelera R, Gonzales Vergara D. Enfermedad tromboembólica venosa. Diagnóstico y tratamiento, (2010). Disponible en: <http://www.neumosur.net/files/EB04-40%20ETEV.pdf>
- 13.44. Palta S, Saroa R, Palta A. (2014). Overview of the coagulation system, *Indian J Anaesth*, 58(5):515 – 52
- 13.45. Paramo J.A, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R (2009). Coagulación 2009: Una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra*, 53(1): 19-23.
- 13.46. Pawula M., Hawthorne G., Smith T.G., Hill M.H (2013). Chapter 13 Best Practice in Biological sample collection, processing and storage for LC-MS in Bioanalysis of Drugs. En Li W., Zhang J., Tse L.S.F., *Handbook of LC-MS Bioanalysis; Best Practices, Experimental Protocols and Regulations* (pp. 139 – 154). New Jersey, United States of America: John Wiley & Sons, Inc.
- 13.47. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, Lampe T, Pernerstorfer, Schlemmer K.H, Reinemer P, Perzborn E, (2005). Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-([(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl]methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Med Chem*, 48:5900 – 8.
- 13.48. Rohde G, (2008). Determination of rivaroxaban—a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor—in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 872:43–50.
- 13.49. Sadagopan N.P., Li W., Cook A.J., Galvan B., Weller L.D., Fountain T.S., Cohen H.L. (2003). Investigation of EDTA anticoagulant in plasma to improve the throughput of liquid chromatography/ tandem mass spectrometric assays. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17:1065 – 1070.

- 13.50. Sennbro J.C., Knutsson M., Timmerman P., Amsterdam V.P. (2011). Anticoagulant counter ion impact on bioanalytical LC-MS/MS assay performance: additional validation required?, *Bioanalysis*, 3(21): 2389 - 2391
- 13.51. Schmitz E, Boonen K, Van Den Heuvel D, Van Dongen J, Schellings M.E, Van Der Graaf F, Van De Kerkhof D, (2014). Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by Ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12:1636 - 1646.
- 13.52. Shehab A, Elnour A.A, Bhagavathula A.S, Erkekoglu P, Hamad F, Al Nuaimi S, Eltayeb A.E.Y.A, (2016). Novel oral anticoagulants and the 73rd anniversary of historical warfarin. *Journal of the Saudi Heart Association*, 28(1):31–45.
- 13.53. Shehab A, Elnour A.A, Bhagavathula A.S, Erkekoglu P, Hamad F, Nuaimi, S.A, Saraan, K. (2015). Novel oral anticoagulants and the 73rd anniversary of historical warfarin. *Journal Saudi Heart Association*, 28(1): 31 - 15.
- 13.54. Stampfuss J, Kubitza D, Becka M. Mueck W, (2013). The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 51:549–61.
- 13.55. Stone J, Hangge P, Albadawi H, Wallace A, Shamoun F, Knuttien G.M, Naidu S, Oklu R, (2017). Deep vein thrombosis: pathogenesis, diagnosis and medical management. *Cardiovascular Diagnostics and Therapy*, 7(3): S276 – S284.
- 13.56. Turpie, A. G. G. (2007). Oral, Direct Factor Xa Inhibitors in Development for the Prevention and Treatment of Thromboembolic Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(6), 1238–1247.
- 13.57. Van Gorp, R. H., Schurgers, L. J. (2015). New insights into the pros and cons of the clinical use of vitamin K antagonists (VKAs) versus direct oral anticoagulants (DOACs). *Nutrients*, 7(11): 9538–9557.
- 13.58. Vaughan, C. (2005). Ximelagatran (Exanta): alternative to warfarin? Proceedings. *Baylor University Medical Center*, 18(1):76–80.
- 13.59. Weinz C, Buetehorn U, Daehler H.P, Kohlsdorfer C, (2005). Pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—in rats and dogs. *Xenobiotica* 35:891–910.

- 13.60. Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, (2009). Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor, in rats, dogs and humans. *Drug Metab Dispos*, 37:1056–64.
- 13.61. Xia YQ, Jemal M (2009), Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: Comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23(14): 2125 – 2138

14. ANEXOS

Anexo 1. Resumen de la validación del método analítico para la cuantificación de Rivaroxaban en plasma (EDTA K2) por LC-MS/MS.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Adecuabilidad	<p>El %CV de la respuesta (relación de áreas) no deberá ser mayor al 5 % en LC-MS/MS durante la prueba de adecuabilidad.</p> <p>El %CV del tiempo de retención (RT) para ambos, analito y estándar interno no deberá ser mayor del 5 % LC-MS/MS durante la evaluación de la adecuabilidad.</p>	<p><u>Tiempo de retención:</u> Rivaroxaban (Analito): %CV del tiempo de retención es menor al 5%.</p> <p>Rivaroxaban-d4 (E.I): %CV del tiempo de retención es menor al 5%.</p> <p><u>Relación de áreas:</u> %CV de relación de áreas: es menor al 5%.</p>
Prueba de Acarreo del Inyector	<p>El acarreo del inyector de un EXH en el tiempo de retención del analito y del estándar interno en el Std Blk no deberá ser mayor del 20% y del 5% de la respuesta promedio del analito y del estándar interno en el LC (CS).</p>	<p>Rivaroxaban (Analito): % Acarreo: 5.55%</p> <p>Rivaroxaban-d4(E.I): % Acarreo: 0.00%</p> <hr/> <p>Tolerancia a Equipo Rivaroxaban (Analito): % Acarreo: 5.21%</p> <p>Rivaroxaban-d4(E.I): % Acarreo: 0.00%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Selectividad	a) Las respuestas de los picos de interferencias en el STD Blk en el tiempo de retención del analito deberá ser < 20.00 % con respecto al LC. b) La respuesta de los picos que interfieren en el STD Blk en el tiempo de retención del EI deberá ser < 5.00 % con respecto al LC.	No se observan interferencias endógenas significativas en el tiempo de retención del Rivaroxaban y Rivaroxaban-d4
Selectividad: Verificación de Interferencia Cruzada	a) El porcentaje de interferencia debido al E.I en el TR del analito deberá ser <20.00 % de la respuesta correspondiente al LC. b) El % de interferencia debido al LS en el TR del E.I. deberá ser < 5.00 % con respecto a la respuesta del E.I.	No se observan interferencias significativas en el tiempo de retención de los analitos Rivaroxaban y Rivaroxaban-d4
Límite de cuantificación	a) Al menos el 67 % (4 de 6) de las muestras deberán estar entre 80.00 - 120.00 %. b) El % Exactitud promedio deberá estar entre 80.00 - 120.00 %. c) % CV deberá ser no >20%. La respuesta promedio de la señal (S/N) deberá ser más de 10.	Concentración nominal: 0.483 ng/mL % CV: 3.14 % % exactitud promedio: 102.93 % Relación señal ruido promedio: 105.0

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Efecto de la matriz	<p>a) El %CV incluyendo todas las muestras debe ser menor del 15%. En caso de que el %CV sea mayor, debido al resultado de una muestra hemolizada, se podrá obtener el %CV excluyendo esa muestra, sin embargo, en el análisis de muestras, no se deberán analizar muestras hemolizadas.</p> <p>b) Al menos 67 % (2 de 3) de las muestras de cada nivel deberán estar entre 85.00 - 115.00 %.</p> <p>c) Al menos el 80 % (5 de 6) de los lotes de las matrices deberán estar entre 85 - 115 %.</p> <p>d) El % de la exactitud promedio de las concentraciones obtenidas de los PCB y PCA preparados con diferente lote de matriz biológica deberá estar entre 85.00 - 115.00 %.</p> <p>e) El % CV de todos los PCB y PCA de las muestras preparadas de los diferentes lotes deberán ser ≤ 15.00 %.</p>	<p><u>Concentración obtenida:</u></p> <p>% CV PCB: 2.90 %</p> <p>% CV PCA: 3.32 %</p> <p>% exactitud promedio PCB: 108.29%</p> <p>% exactitud promedio PCA: 105.41%</p> <p><u>Comparación relación de área:</u></p> <p>% CV PCB: 2.92 %</p> <p>% CV PCA: 3.32 %</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Factor matriz	a) El %CV deberá ser $\leq 15\%$	<u>Comparación de relación de áreas:</u> % CV PCB: 4.72% % CV PCA: 3.80 %
Linealidad (Parámetros de la curva de calibración)	<p>a) El % exactitud para todos los puntos de la Curva de Calibración excepto para el LC (STD1) deberá estar dentro del 85.00 - 115.00 %. El % exactitud para el LC deberá estar entre el 80.00 - 120.00 %. Al menos el 75 % de los puntos de Curva de Calibración deben cumplir con los criterios de aceptación, incluyendo el LC y el Límite Superior (LS).</p> <p>b) No se pueden excluir dos puntos consecutivos de la curva de calibración. En caso de presentarse un valor fuera de especificación, el Coordinador deberá revisar el valor antes de la exclusión. Se debe presentar los resultados con y sin el valor excluido.</p> <p>c) La respuesta de las interferencias presentadas en los tiempos de retención del analito del interés en las</p>	<p>Número de estándares: 8</p> <p>Rango de calibración: 0.483–577.736 ng/mL.</p> <p>% exactitud promedio: 97.47% a 102.73%</p> <p>% CV: 0.48% a 4.62%</p> <p>Coefficiente de correlación (r): ≥ 0.9993</p> <p>Ponderación: $1/x^2$</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>muestras STD Blk y STD ZERO deberá ser $\leq 20.00\%$ con respecto al LC. La respuesta obtenida de las interferencias en el tiempo de retención del EI deberá ser $\leq 5.00\%$ con respecto al LC.</p> <p>d) La regresión (valor de r^2) deberá ser $r \geq 0.9800$, es decir, $r^2 \geq 0.9900$.</p> <p>e) Al menos el 67 % (20 de 30) del total del número de muestras QC y el 50 % (3 de 6) de cada nivel deberán estar dentro de 85.00 - 115.00 % excepto el PCLC, el cual deberá estar entre 80.00 - 120.00 %.</p> <p>f) Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15 % de la concentración nominal y 20 % para el límite inferior de cuantificación.</p> <p>g) Una vez que se tengan las tres curvas de PyE, se obtendrá el promedio de cada concentración, desviación estándar y % CV. Se realizará</p>	

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	la gráfica correspondiente de concentración esperada vs obtenida.	
Repetibilidad	<p>a) La precisión de una misma corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser $\leq 15.00\%$ y para el PCLC, éste deberá ser $\leq 20.00\%$.</p> <p>b) En una misma corrida:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al menos el 67 % (20 de 30) de un total de muestras QC y un 50 % (3 de 6) de cada nivel deberá estar entre 85.00 - 115.00 % excepto para el PCLC, el cual deberá estar entre 80.00 - 120.00 %. <p>c) % Exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser entre 85.00 - 115.00 %; para el PCLC éste deberá ser entre 80.00-120.00 %.</p>	<p><u>Concentración nominal:</u></p> <p>PCLC: 0.494 ng/mL PCB: 1.431 ng/mL PCM: 238.476 ng/mL PCA: 486.686 ng/mL DQC: 1247.913 ng/mL</p> <p>% CV: PCB, PCM, PCA y DQC: 2.85 % a 5.54 %</p> <p>% CV PCLC: 4.90 %</p> <p>% Exactitud promedio: PCB, PCM, PCA y DQC: 85.81 % a 99.77 %</p> <p>% Exactitud promedio PCLC: 97.94%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
<p>Precisión y exactitud (Analista 1)</p>	<p>a) La precisión entre corridas (entre día) para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser $\leq 15.00\%$ y para el PCLC, éste deberá ser $\leq 20.00\%$.</p> <p>b) Entre corridas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al menos el 67 % (20 de 30) de un total de muestras QC y un 50 % (3 de 6) de cada nivel deberá estar entre 85.00 - 115.00 % excepto para el PCLC, el cual deberá estar entre 80.00 - 120.00 %. <p>c) % Exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser entre 85.00 - 115.00 %; para el PCLC éste deberá ser entre 80.00-120.00 %.</p>	<p><u>Concentración nominal:</u> PCLC: 0.494 ng/mL PCB: 1.431 ng/mL PCM: 238.476 ng/mL PCA: 486.686 ng/mL DQC: 1247.913 ng/mL</p> <p>% CV: PCB, PCM, PCA y DQC: 2.96 % a 5.12%</p> <p>% CV PCLC: 5.69%</p> <p>% Exactitud promedio: PCB, PCM, PCA y DQC: 89.56% a 100.80%</p> <p>% Exactitud promedio PCLC: 103.12%</p>
<p>Precisión y exactitud (Analista 2)</p>	<p>a) El %CV entre corridas (entre día) para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser $\leq 15.00\%$ y para el PCLC deberá ser $\leq 20.00\%$</p> <p>Entre corridas:</p> <p>b) Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3</p>	<p><u>Concentración nominal:</u> PCLC: 0.494 ng/mL PCB: 1.431 ng/mL PCM: 238.476 ng/mL PCA: 486.686 ng/mL DQC: 1247.913 ng/mL</p> <p>% CV: PCB, PCM, PCA y DQC: 3.75 % a 5.63 %</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%</p> <p>c) % exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00 %, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% -120.00%.</p>	<p>% CV PCLC: 4.95 %</p> <p>% Exactitud promedio: PCB, PCM, PCA y DQC: 95.29% a 105.56 %</p> <p>% Exactitud promedio PCLC: 100.66 %</p>
<p>Recobro Absoluto</p>	<p>a) El % CV del recobro para los QC (PCB, PCM, PCA) y para el EI deberá ser $\leq 15.00\%$.</p> <p>b) El % CV para el recobro promedio global para los QC (PCB, PCM, PCA) $\leq 20.00 \%$.</p>	<p><u>Analito:</u></p> <p>% Recobro promedio: PCB: 63.49 % PCM: 63.90 % PCA: 63.60 %</p> <p>% Promedio global de recobro: 63.66 %</p> <p>% CV total: 0.33%</p> <p><u>E.I:</u></p> <p>% recobro promedio global: 63.64 %</p> <p>% CV Total: 1.05%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Factor de dilución (Factor 5 dilución)	a) Al menos el 67% (4 de 6) de las muestras diluidas deberán estar entre 85.00% - 115.00% b) % exactitud promedio de las muestras diluidas deberán estar entre 85.00% – 115.00% c) El % CV de las muestras diluidas deberá ser \leq 15.00%.	Dilución QC Concentración nominal: 1247.913 ng/mL Factor de dilución: 5 Plasma Humano EDTA K ₂ % exactitud promedio: 90.31% % CV precisión: 3.19 %
Tolerancia (Columna)	a) El % de precisión de la corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser \leq 15.00% y para PCLC \leq 20.00% <u>En la misma corrida</u> b) Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00% c) % exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%	% CV: PCB, PCM, PCA y DQC: 1.80 % a 4.86 % PCLC: 3.65 % % exactitud promedio: PCB, PCM, PCA y DQC: 97.54 % a 107.88 %. PCLC: 101.11%

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Tolerancia al cambio de Equipo	<p>a) El % de precisión de la corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser $\leq 15.00\%$ y para PCLC $\leq 20.00\%$</p> <p>En la misma corrida</p> <p>b) Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%</p> <p>c) % exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%</p>	<p>% CV:</p> <p>PCB, PCM, PCA y DQC: 1.01 % a 4.92 %</p> <p>PCLC: 6.07%</p> <p>% exactitud promedio:</p> <p>PCB, PCM, PCA y DQC: 96.77% a 99.76%.</p> <p>PCLC: 104.93%</p>
Reproducibilidad a la Reinyección	<p>a) La % CV de la corrida para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberá ser entre $\leq 15.00\%$ y para PCLC $\leq 20.00\%$</p> <p><u>En la misma corrida</u></p> <p>b) Al menos 67% (4 de 6) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%,</p>	<p>Duración establecida: 1 día 01 h 21 min.</p> <p>% CV:</p> <p>PCB, PCM, PCA y DQC: 2.33% a 2.97 %</p> <p>PCLC: 4.05%</p> <p>% de exactitud promedio PCB, PCM, PCA y DQC:</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%</p> <p>c) % exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA y DQC deberán estar entre 85.00% - 115.00%, excepto para el PCLC el cual deberá estar entre 80.00% - 120.00%</p>	<p>93.20 % a 99.62%</p> <p>PCLC: 101.25 %</p>
<p>Efecto de fármacos interferentes potenciales (fármacos concomitantes) y selectividad</p>	<p>a) Al menos el 67% (2 de 3) de las muestras PCA deberán estar dentro del 85.00 – 115 % y 80.00 – 120.00 % para las muestras PCLC, para cada fármaco concomitante.</p> <p>b) Las interferencias de las muestras blanco en el TR del analito deberán ser < 20.00% con respecto al promedio del área del analito de STD 1 (LC) y las interferencias en los blancos en el TR del E.I. deberán ser <5.00% con respecto al promedio del área del E.I. del STD 1 (LC).</p>	<p>a) Fármacos concomitantes evaluados y aceptados: Ibuprofeno, Cafeína, Difenhidramina, Diclofenaco sódico, Paracetamol (Acetaminofén), Ácido salicílico, Ketorolaco, Ondansetrón y Nicotina.</p> <p>b) Selectividad: Fármacos concomitantes: El efecto de fármacos concomitantes ha sido determinado mediante la carga individual de los fármacos antes mencionados. No se observó un efecto de interferencia significativo.</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Efecto matriz en presencia de Fármacos concomitantes	<p>a) El % CV de la concentración calculada para todas las muestras deberá ser menor a 15.00%. (Si %CV es mayor debido a resultado de muestras hemolizadas, el % CV puede ser obtenido excluyendo estas muestras, sin embargo, este tipo de muestra no debe ser considerado en un análisis de muestras de sujetos).</p> <p>b) Al menos 67% (2 de 3) de las muestras para cada nivel deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>c) Al menos el 80% (5 de 6) lotes de plasma deberán estar entre el 85.00% - 115.00%</p> <p>d) El % de exactitud promedio de las concentraciones calculadas para todas las muestras PCA y PCB deberán estar entre 85.00 – 115.00%.</p> <p>e) El %CV de la relación de áreas obtenidas para las muestras PCB y PCA (factor de respuesta comparada) deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p>% CV para todas las concentraciones obtenidas: %CV PCB: 5.44% %CV PCA: 3.36%</p> <p>% exactitud promedio PCB: 100.70% % exactitud promedio PCA: 102.87%</p> <p><u>Comparación de relación de áreas:</u> %CV PCB: 5.36% %CV PCA: 3.36%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	f) Si %CV total excede 15.00%, indica que algún fármaco concomitante individual puede estar causando efecto matriz, las muestras de sujetos con ese medicamento no deberán ser analizadas.	
Precisión y exactitud de una corrida analítica (Long batch)	<p>a) La precisión de la misma corrida para las muestras PCB, PCM y PCA deberán ser \leq 15.00 %.</p> <p>b) Al menos el 67% (4 de 6) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>c) % exactitud promedio para las muestras PCB, PCM, PCA deberán estar entre 85.00% - 115.00%</p>	<p>No. Total, de muestras evaluadas: 190 (CC y QC)</p> <p><u>Precisión %CV</u> PCB: 3.88% PCM: 2.65% PCA: 3.16%</p> <p><u>% exactitud promedio</u> PCB: 96.05% PCM: 97.57% PCA: 95.89%</p>
Estabilidad de la solución stock a corto plazo (Analito a temperatura ambiente)	<p>a) El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% -110.00%.</p> <p>b) El %CV de la relación de áreas deberá ser \leq 10.00 %.</p>	<p><u>Analito:</u> Periodo de estabilidad: 06 h 33 min.</p> <p>Estable a la concentración: 23109.420 ng/mL</p> <p>Evaluado después de diluir a nivel LS</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
		% promedio de exactitud: 99.40% %CV LS (Comparación): 3.14% %CV LS (Estabilidad): 3.27%
Estabilidad de la solución Stock a corto plazo (EI a temperatura ambiente)	<u>En caso de uso de EI Deuterado</u> a) El % de la interferencia promedio del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con respecto al promedio del área obtenida para el STD-1.	<u>EI (Deuterado)</u> Periodo de estabilidad evaluado: 06 h 33 min. No se observan interferencias significativas.
Estabilidad de la solución de carga a corto plazo (Analito)	a) El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% - 110.00%. b) El %CV de la relación de áreas deberá ser ≤ 10.00 % LS ≤ 20.00 % para la muestra control STD 1.	<u>Analito:</u> Periodo de estabilidad: 06 h 42 min. Estable a nivel LS (concentración): 288.868 ng/mL Estable a nivel STD 1 (concentración): 0.241 ng/mL % exactitud promedio STD 1: 100.96 % %CV STD 1 (Comparación): 4.08% % CV STD 1 (Estabilidad): 3.50%

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
		% exactitud promedio LS: 97.61% % CV LS (Comparación): 3.14% % CV LS (Estabilidad): 3.02%
Estabilidad de la solución de trabajo a corto plazo (EI a temperatura ambiente)	a) El porcentaje de las interferencias derivadas del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con respecto al área promedio obtenida para el STD 1.	<u>EI Deuterado:</u> Periodo estabilidad: 06 h 42 min. No se observan interferencias significativas.
Estabilidad a largo plazo de la solución Stock (analito) (2-8 °C)	a) El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% - 110.00% b) El % CV de la relación de áreas deberá ser ≤ 10.00	<u>Analito:</u> Periodo de estabilidad: 7 días 22 h 35 min. Estable a nivel LS % exactitud promedio: 99.14% % CV LS (Comparación): 2.01% % CV LS (Estabilidad): 2.09%
Estabilidad a largo plazo de la solución Stock (E.I.) (2-8 °C)	<u>En caso de EI Deuterado</u> a) El porcentaje de las interferencias derivadas del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con	<u>EI Deuterado:</u> Periodo de estabilidad: 7 días 22 h 35 min. No se observan interferencias significativas.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	respecto al área promedio obtenida para el STD 1.	
Estabilidad a largo plazo de la solución de carga del analito (2-8°C)	<p>a) El % de la exactitud promedio para el analito y E.I deberá estar entre 90.00% - 110.00%</p> <p>b) El %CV de la relación de áreas deberá ser ≤ 10.00 LS % y ≤ 20.00% para la muestra control STD 1</p>	<p><u>Analito:</u> Periodo de estabilidad: 7 días 18 h 17 min. Estable a nivel LS (concentración): 288.868 ng/mL Estable a nivel STD 1 (concentración): 0.241 ng/mL</p> <p>% exactitud promedio STD 1: 103.01% %CV STD 1 (Comparación): 2.19% % CV STD 1 (Estabilidad): 3.68%</p> <p>% exactitud promedio LS: 102.50% %CV LS (Comparación): 2.01% % CV LS (Estabilidad): 1.83%</p>
Estabilidad a largo plazo de la solución de carga del EI (2-8°C)	a) El porcentaje de las interferencias derivadas del estándar interno en el tiempo de retención del analito deberá ser menor a 20.00% con	<p><u>EI Deuterado:</u> Periodo estabilidad: 7 días 18 h 17 min. No se observan interferencias significativas.</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	respecto al área promedio obtenida para el STD 1.	
Estabilidad del Analito en Sangre Total a Temperatura Ambiente y Baño de Hielo	a) El % de exactitud deberá estar entre 85.00% – 115.00%	<p>Estable a nivel PCA (concentración): 487.464 ng/mL</p> <p>Estable a nivel PCB (concentración): 1.433 ng/mL</p> <p>Periodo de estabilidad a temperatura Ambiente: 03 h 07 min.</p> <p>% exactitud PCB: 95.67%</p> <p>% exactitud PCA: 113.38%</p> <p>Periodo de estabilidad en baño de hielo: 03 h 02 min.</p> <p>% exactitud PCB: 101.61%</p> <p>% exactitud PCA: 106.56%</p>
Estabilidad de congelación/descongelación (-70± 15 °C)	<p>a) Al menos el 67 % (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% - 115.00%</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA</p>	<p><u>Ciclos congelación-descongelación evaluados: 5</u></p> <p>PCB:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 1.433 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 1.431 ng/mL</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>deberá estar entre 85.00 – 115.00%</p> <p>c) La % CV de las muestras PCB y PCA deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p>% CV (Comparación): 2.81%</p> <p>% CV (Estabilidad): 3.74%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 98.30%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 99.23%</p> <p>PCA:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 487.464 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 486.686 ng/mL</p> <p>% CV (Comparación): 4.03%</p> <p>% CV (Estabilidad): 2.36%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 95.82%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 96.23%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal.</p>
Estabilidad a Temperatura ambiente	<p>a) Al Menos 67% (8 de 12) del total de muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel deberán estar entre 85.00% -115.00%</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA</p>	<p>Periodo de estabilidad: 06 h 28 min.</p> <p>PCB:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 1.433 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 1.431 ng/mL</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>deberá estar entre 85.00% - 115.00%</p> <p>c) La precisión del %CV de las muestras PCB y PCA deberá ser $\leq 15.00\%$.</p>	<p>% CV (Comparación): 3.84%</p> <p>% CV (Estabilidad): 1.41%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 114.50%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 98.93%</p> <p>PCA:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 487.464 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 486.686 ng/mL</p> <p>% CV (Comparación): 1.60%</p> <p>% CV (Estabilidad): 2.82%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 97.64%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 97.60%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal</p>
<p>Estabilidad de Automuestreador ($5\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)</p>	<p>a) Al menos 67% (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel, deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA</p>	<p><u>Periodo estable: 2 días 09 h 06 min</u></p> <p>PCB:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 1.433 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 1.431 ng/mL</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>deberá estar entre 85.00 – 115.00%</p> <p>c) El %CV de precisión para las muestras PCB y PCA deberá ser $\leq 15.00\%$.</p>	<p>% CV (Comparación): 2.81 %</p> <p>% CV (Estabilidad) 3.65 %</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 98.30%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 98.32%</p> <p>PCA:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p> <p>Comparación: 487.464 ng/mL</p> <p>Estabilidad: 486.686 ng/mL</p> <p>% CV (Comparación): 4.03 %</p> <p>% CV (Estabilidad) 2.25%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 95.82%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 94.63%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal</p>
<p>Estabilidad de post-evaporación (Temperatura ambiente y refrigeración)</p>	<p>a) Al menos 67% (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel, deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p>	<p><u>Temperatura ambiente:</u></p> <p>Periodo estable: 05 h 14 min</p> <p>PCB:</p> <p><u>Concentración nominal</u></p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
	<p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA deberá estar entre 85.00 – 115.00%</p> <p>c) El %CV de precisión para las muestras PCB y PCA deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p>Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL %CV (Comparación): 3.84% %CV (Estabilidad): 1.35%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 114.50% % exactitud promedio (Estabilidad): 101.27%</p> <p>PCA: <u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL %CV (Comparación): 1.60% %CV (Estabilidad): 3.04% % exactitud promedio (Comparación): 97.64% % exactitud promedio (Estabilidad): 97.27%</p> <p><u>Condiciones Refrigeración 2 - 8 °C</u> Periodo estable: 04 h 57 min</p> <p>PCB: <u>Concentración nominal</u> Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL %CV (Comparación): 3.84% %CV (Estabilidad): 3.12%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
		<p>% exactitud promedio (Comparación): 114.50%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 101.39%</p> <p>PCA: <u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL %CV (Comparación): 1.60% %CV (Estabilidad): 2.81%</p> <p>% exactitud promedio (Comparación): 97.64%</p> <p>% exactitud promedio (Estabilidad): 97.78%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal.</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
<p>Estabilidad de muestra procesada (Temperatura ambiente y refrigeración)</p>	<p>a) Al menos 67% (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel, deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA deberá estar entre 85.00 – 115.00%</p> <p>c) El %CV de precisión para las muestras PCB y CA deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p><u>Temperatura ambiente:</u> Periodo estable: 03 h 59 min</p> <p>PCB: <u>Concentración nominal</u> Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL %CV (Comparación): 2.81% %CV (Estabilidad): 1.87% % exactitud promedio (Comparación): 98.30% % exactitud promedio (Estabilidad): 97.36%</p> <p>PCA: <u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL %CV (Comparación): 4.03% %CV (Estabilidad): 3.07% % exactitud promedio (Comparación): 95.82% % exactitud promedio (Estabilidad): 96.03%</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
		<p><u>Refrigeración 2-8 °C</u> Periodo estable: 05 h 23 min</p> <p>PCB:</p> <p><u>Concentración nominal</u> Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL %CV (Comparación): 3.84% %CV (Estabilidad): 6.95% % exactitud promedio (Comparación): 114.50% % exactitud promedio (Estabilidad): 101.43%</p> <p>PCA:</p> <p><u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL %CV (Comparación): 1.60% %CV (Estabilidad): 4.32% % exactitud promedio (Comparación): 97.64% % exactitud promedio (Estabilidad): 98.18%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal.</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Estabilidad a Largo Plazo en plasma (-70 ± 15°C)	<p>a) Al menos 67% (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel, deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA deberá estar entre 85.00 - 115.00%</p> <p>c) El %CV de precisión para las muestras PCB y PCA deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p><u>Periodo estable: 213 días 21 h 28 min</u></p> <p><u>PCB:</u> <u>Concentración nominal</u> Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL</p> <p>% CV (Comparación): 2.81% % CV (Estabilidad): 2.82% % exactitud promedio (Comparación): 98.30% % exactitud promedio (Estabilidad): 96.49%</p> <p><u>PCA:</u> <u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL</p> <p>% CV (Comparación): 4.03% % CV (Estabilidad): 1.55% % exactitud promedio (Comparación): 95.82% % exactitud promedio (Estabilidad): 94.66%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal.</p>

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Estabilidad a Largo Plazo en plasma (-20 ± 10°C)	<p>a) Al menos 67% (8 de 12) del total de las muestras QC y 50% (3 de 6) de cada nivel, deberán estar entre 85.00% - 115.00%.</p> <p>b) El % de exactitud promedio para las muestras PCB y PCA deberá estar entre 85.00 – 115.00%</p> <p>c) El %CV de precisión para las muestras PCB y PCA deberá ser ≤ 15.00 %.</p>	<p><u>Periodo estable: 213 días 21 h 23 min</u></p> <p><u>PCB:</u> <u>Concentración nominal</u> Comparación: 1.433 ng/mL Estabilidad: 1.431 ng/mL % CV (Comparación): 2.81% % CV (Estabilidad): 4.90% % exactitud promedio (Comparación): 98.30% % exactitud promedio (Estabilidad): 97.13%</p> <p><u>PCA:</u> <u>Concentración nominal</u> Comparación: 487.464 ng/mL Estabilidad: 486.686 ng/mL % CV (Comparación): 4.03% % CV (Estabilidad): 1.75% % exactitud promedio (Comparación): 95.82% % exactitud promedio (Estabilidad): 96.71%</p> <p>El % de exactitud promedio fue calculado contra su concentración QC nominal.</p>

Anexo 2. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 10 mg, dosis única en condiciones de ayuno para el medicamento de prueba (A) vs. tiempos de muestreo.

Tiempo (h)	Concentración media (ng/mL)	SD	% CV	Media Geométrica	%CV Media Geométrica
00.00	0.000	0.0000	---	---	---
00.30	21.952	24.1088	109.80	---	---
00.67	79.044	38.7384	49.00	66.407	78.70
01.00	96.782	37.4310	38.70	86.816	59.40
01.33	102.152	35.5358	34.80	92.594	57.10
01.67	103.227	33.8647	32.80	95.355	49.70
02.00	107.498	37.5388	34.90	99.287	48.10
02.50	107.979	36.6670	34.00	101.309	40.20
03.00	108.744	36.5533	33.60	103.520	32.40
03.50	109.673	39.2843	35.80	103.350	36.30
04.00	101.38	38.2576	37.70	95.005	37.80
05.00	68.273	26.2882	38.50	63.578	40.30
06.00	53.122	19.6099	36.90	49.552	40.50
08.00	40.227	13.5962	33.80	37.787	38.90
10.00	26.623	9.6982	36.40	24.585	46.30
12.00	25.398	9.0411	35.60	23.517	45.40
16.00	17.567	6.2762	35.70	16.189	47.40
24.00	12.367	5.9074	47.80	11.030	53.50
36.00	4.477	3.2212	71.90	3.525	81.90
48.00	1.771	1.9736	111.40	---	---

Anexo 3. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 10 mg, dosis única en condiciones de ayuno para el medicamento de referencia (B) vs. tiempos de muestreo.

Tiempo (h)	Concentración media (ng/mL)	SD	% CV	Media Geométrica	CV% Media Geométrica
00.00	0.000	0.0000	---	---	---
00.30	25.191	30.9995	123.10	---	---
00.67	85.446	41.5694	48.70	76.188	54.50
01.00	103.040	35.4073	34.40	97.138	36.90
01.33	110.219	34.0255	30.90	105.019	33.10
01.67	111.754	38.2299	34.20	105.839	34.50
02.00	112.054	39.4226	35.20	105.983	34.70
02.50	109.948	35.4438	32.20	104.590	33.40
03.00	111.466	37.5527	33.70	105.270	36.40
03.50	106.454	40.6858	38.20	98.647	42.90
04.00	97.189	36.1011	37.10	89.770	44.90
05.00	63.180	20.5286	32.50	59.539	38.30
06.00	48.851	15.3585	31.40	46.261	36.60
08.00	35.328	11.6882	33.10	33.336	37.80
10.00	24.169	7.5988	31.40	22.750	40.60
12.00	23.393	7.0874	30.30	22.207	35.70
16.00	17.377	6.9138	39.80	16.135	41.90
24.00	11.619	5.2178	44.90	10.279	58.20
36.00	4.447	3.6516	82.10	---	---
48.00	1.533	1.9290	125.80	---	---

Anexo 4. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 20 mg, dosis única en estado postprandial para el medicamento de prueba (A) vs. Tiempos de muestreo.

Tiempo (h)	Concentración media (ng/mL)	SD	% CV	Media Geométrica	%CV Media Geométrica
00.00	0.000	0.000	0.000	---	---
00.50	7.129	17.1956	241.2	---	---
01.00	58.989	79.7008	135.1	---	---
01.50	136.731	84.2958	61.6	99.205	153.3
02.00	184.386	73.9379	40.1	167.935	51.4
02.50	213.394	54.9851	25.8	206.275	27.7
03.00	225.14	52.8228	23.5	218.445	26.5
03.50	226.088	55.7008	24.6	218.771	27.6
04.00	233.496	62.1376	26.6	224.276	31.2
04.50	218.264	58.8694	27.0	209.162	32.4
05.00	180.275	53.109	29.5	171.404	35.3
05.50	156.423	47.2335	30.2	148.94	36.9
06.00	137.202	46.2567	33.7	129.407	36.9
07.00	107.75	38.7279	35.9	100.582	40.8
08.00	88.077	34.2981	38.9	81.31	44
10.00	57.063	26.3416	46.2	51.572	48.7
12.00	43.271	20.515	47.4	39.227	47
16.00	22.764	9.0382	39.7	21.239	38.9
24.00	12.717	5.2504	41.3	11.647	46.3
36.00	5.096	3.1221	61.3	4.073	89.2
48.00	1.988	1.5884	79.9	---	---

Anexo 5. Concentraciones promedio de Rivaroxabán 20 mg, dosis única en estado postprandial para el medicamento de referencia (B) vs. tiempos de muestreo.

Tiempo (h)	Concentración media (ng/mL)	SD	% CV	Media Geométrica	%CV Media Geométrica
00.00	0.000	0.0000	0.0	---	---
00.50	27.774	52.8601	190.3	---	---
01.00	93.144	85.2687	91.5	---	---
01.50	155.521	77.0499	49.5	---	---
02.00	198.29	54.3448	27.4	171.108	110.6
02.50	215.154	50.9564	23.7	192.902	84
03.00	224.466	64.7081	28.8	208.234	53.5
03.50	232.717	66.7947	28.7	223.546	29.7
04.00	227.608	71.107	31.2	217.058	32.3
04.50	219.019	77.2021	35.2	204.803	40
05.00	189.155	71.4951	37.8	175.275	42.7
05.50	161.1	58.1982	36.1	150.211	40.8
06.00	142.594	56.4166	39.6	131.224	44.9
07.00	111.274	45.6501	41.0	101.948	45.8
08.00	96.976	47.2712	48.7	86.044	54.3
10.00	65.136	33.2819	51.1	57.639	54.4
12.00	51.368	28.2157	54.9	44.984	56.4
16.00	28.146	12.5598	44.6	25.595	48
24.00	16.779	6.659	39.7	15.601	40.2
36.00	7.219	5.3199	73.7	5.963	68.2
48.00	2.642	2.0364	77.1	---	---