

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE ERITROPOIETINA HUMANA
RECOMBINANTE POR MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E CORRELAÇÃO
COM O BIOENSAIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ricardo Machado Ferretto

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**AVALIAÇÃO DE ERITROPOIETINA HUMANA
RECOMBINANTE POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
VALIDADOS E CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO**

por

Ricardo Machado Ferretto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AValiação DE ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE
POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E
CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO**

elaborada por
Ricardo Machado Ferretto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de Março de 2009.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;
aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, em especial Lucélia Magalhães da Silva, Daniele Rubert e Marcela Arend pelo apoio, auxílio e amizade;

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, em especial ao João Luiz Rizzi, Alessandra Fagundes da Costa e Cilene Toniolo;

à Daniani Ferraz, pelo carinho, apoio e compreensão.

aos meus pais, Nelson Ferretto Junior e Rejeane Machado Ferretto, pelo amor, educação e incentivo na passagem de mais uma etapa;

à Esther Menezes, pela atenção, incentivo, compreensão e principalmente pelo carinho;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AValiaÇÃO DE ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO

AUTOR: RICARDO MACHADO FERRETTO

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de Março de 2009.

A eritropoietina é uma proteína endógena que estimula a eritropoiese. É clinicamente usada para o tratamento de anemias associadas à falência renal crônica. No presente trabalho foi validado método cromatográfico por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante (rhEPO) em produtos farmacêuticos, empregando coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm I.D.), mantida a temperatura ambiente (25°C). A fase móvel foi composta de fosfato de potássio monobásico 0,001M, fosfato de potássio dibásico 0,008M e cloreto de sódio 0,2M, pH 7,4, eluída isocraticamente, na vazão de 0,5 mL/min e detecção no ultravioleta a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 30 min, sendo linear na faixa de concentração de 5-150 µg/mL ($r^2=0,9991$). Avaliaram-se os parâmetros de sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estudou-se também a especificidade, através da determinação da pureza do pico da Eritropoietina Humana Recombinante Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia (rhEPO-SBR) submetida à degradação sob condições forçadas. O método proposto foi utilizado para análise de eritropoietina em produtos farmacêuticos, determinando-se as formas diméricas e de alta massa molecular. Paralelamente, efetuaram-se análises por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), determinando-se as formas de sulfóxidos/desamidados. Estabeleceu-se correlação entre os métodos, demonstrando que os produtos farmacêuticos forneceram diferenças médias 2,50% menores pelo bioensaio, e 9,29% maiores para CL-FR, em relação ao método por cromatografia líquida por exclusão molecular, com correlação significativa, conforme calculado pelo coeficiente de correlação de pearson ($r=0,9629$ e $r=0,9422$, respectivamente).

Desse modo, pesquisou-se alternativa no contexto da redução ou substituição do uso de animais, contribuindo para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biológico.

Palavras-chave: camundongos normocitêmicos, cromatografia líquida, ensaio biológico, eritropoietina humana recombinante, reticulócitos, validação.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

ASSESSMENT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN OF CHROMATOGRAPHIC METHOD VALIDATED AND CORRELATION OF BIOASSAY

AUTHOR: RICARDO MACHADO FERRETTO

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, March 13th 2009.

Erythropoietin is an endogenous glycoprotein which stimulates the erythropoiesis. Clinically is used for the treatment of renal anaemia. The chromatographic method for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin (rhEPO) in pharmaceutical products was validated in the present work. A size-exclusion liquid chromatography method (SE-LC) was validated using a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7,8 mm I.D.), maintained at ambient temperature (25°C). The mobile phase consisted of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M dibasic sodium phosphate and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 0.5 mL/min with detection at 214 nm. The chromatographic separation was obtained within 30 min and it was linear in the concentration range of 5-150 µg/mL ($r^2=0.9991$). Validation parameters were evaluated such as sensitivity, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit and robustness. The specificity was evaluated by the peak purity of the Recombinant Human Erythropoietin Biological Reference Preparation of European Pharmacopoeia (rhEPO-SBR) storage under stress conditions. The proposed method was applied for the analysis of erythropoietin in pharmaceutical products, evaluating also the dimmers and high-molecular-mass forms. Moreover, was performed the analysis of erythropoietin by reversed-phase liquid chromatography (RP-LC), evaluating the sulphoxides and deamidates forms. The correlation with the methods was established, showing mean differences between the estimated potencies of 2.50% lower for the bioassay, and 9.29% higher for the RP-LC, compared with the size-exclusion liquid chromatography method, with significant correlation, conform calculated for the Pearson's correlation coefficient ($r=0,9629$ e $r=0,9422$, respectively).

The alternative established represents a contribution towards the reduction or replacement of the animals improving the quality control and assuring the safety and efficacy of the biological product.

Keywords: bioassay, liquid chromatography, normocythaemic mice, recombinant human erythropoietin, reticulocytes, validation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto e locais de inserção das cadeias de carboidratos, três *N*-ligadas (*Y*), uma *O*-ligada (-O-*), adaptada (GILG et al., 1996).....16

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

FIGURE 1 – Representative SE-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Pharmaceutical formulations, Peak 1: aggregates, peak 2: dimer, peak 3: monomer and peak 4: excipients. (B) Pharmaceutical formulations, Peak 1: monomer and peak 2: excipients. (C) Reference substance: Peak 1: monomer and peak 2: excipients.....56

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of SE-LC for rhEPO in pharmaceutical formulations.....	51
TABLE 2 – Accuracy of SE-LC for rhEPO in pharmaceutical formulations.....	52
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing. ...	53
TABLE 4 – Analysis of the rhEPO related proteins and aggregates forms in pharmaceutical dosage forms.....	54
TABLE 5 – Determination of the rhEPO potency in pharmaceutical dosage forms	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CERA	Ativador contínuo do receptor de eritropoietina
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
C _{máx}	Concentração Máxima
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DEF	Dicionário de Especialidades Farmacêuticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
EP	Farmacopéia Européia
EPO	Eritropoietina humana
ESA	Peptídeo estimulador da eritropoiese
Fe	Ferro
FDA	Food and Drug Administration
h	hora
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICH	International Conference on Harmonisation
IEF	Focalização isoeletrica
Kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo
mg	Miligrama

min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mUI	Mili Unidade Internacional
NESP	Nova proteína estimuladora da eritropoiese
nm	Nanômetro
DAD	Detector de arranjo de diodos
pI	Ponto isoelétrico
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r ²	Coefficiente de determinação
rhEPO	Eritropoietina humana recombinante
rhEPO – SBR	Eritropoietina humana recombinante Substância Biológica de Referência
RTC	Reticulócito
RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEP	Proteína eritropoiética sintética
T _{1/2} β	Meia-vida terminal
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
°C	Grau celsius
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	30
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÕES	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A eritropoietina (EPO) é um hormônio endógeno, que atua sobre as células progenitoras eritróides da medula óssea, estimulando sua proliferação, diferenciação e maturação, inibindo também a apoptose celular e, dessa forma, aumentando a produção de eritrócitos. A eritropoiese é controlada por sistema de retroalimentação altamente responsivo em que um sensor nos rins pode detectar alterações no suprimento de oxigênio para aumentar a excreção de eritropoietina que, em seguida, estimula rápida expansão dos progenitores eritróides. É produzida primariamente por células intersticiais peritubulares no rim de adultos e fígado fetal ou neonatal de mamíferos (LACOMBE & MAYEUX, 1998; DALLE et al., 2001).

É uma proteína altamente glicosilada composta por 165 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e quatro cadeias polissacarídicas, que representam, aproximadamente, 40% da massa molecular e são fundamentais para a atividade biológica. Estudos demonstraram que a presença de carboidratos está diretamente ligada à secreção celular, solubilidade, estabilidade da molécula e formação de sítios de ligação com o receptor (HIGUCHI et al., 1992; SASAKI, 2003). A presença de resíduos de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) nas extremidades dessas cadeias é necessária para que o hormônio alcance os sítios-alvo na medula óssea, evitando a rápida metabolização hepática, influenciando, dessa maneira, a meia-vida biológica na circulação e a eficácia terapêutica (CHOI et al., 1996).

Recentemente, o gene humano da EPO, foi clonado e expresso através da tecnologia do DNA recombinante em células de mamíferos para produzir a eritropoietina humana recombinante (rhEPO), cujo efeito biológico é equivalente ao do hormônio natural (EDER et al., 1989). Diferenças significativas entre a composição de isoformas, propriedades biológicas e farmacocinéticas foram observadas entre as rhEPOs (HALSTENSON et al., 1991; LASNE et al., 2002).

As rhEPOs estão disponíveis comercialmente desde 1988 e são usadas na terapêutica sob as formas alfa e beta (DCI-USP, 2006; DEF, 2008-2009). A rhEPO é usada clinicamente no tratamento de anemias associadas à falência renal crônica, restabelecendo os níveis de energia, aumentando o bem-estar e a qualidade de vida do paciente. Tem sido utilizada também no tratamento de anemias associadas ao câncer, infecção por HIV, pré e pós-operatório, artrite reumatóide e transplante de medula óssea (EGRIE & BROWNE, 2001; FISHER, 2003; KAUSHANSKY & KIPPS, 2006).

Diferentes técnicas analíticas tem sido utilizadas para a caracterização e controle da qualidade de rhEPO. Devido a estrutura molecular complexa e suas isoformas, bem como as formas alteradas ou degradadas oriundas dos processos de produção e purificação, diferentemente dos demais medicamentos, em geral é necessária à combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para monitorar a estabilidade física e química e para a completa caracterização desse produto biológico (JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; EP., 2005).

O ensaio biológico de potência fundamenta-se na contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos. Esse, pode ser realizado com protocolo de injeção de doses única ou múltiplas, influenciando a precisão dos resultados obtidos a partir das contagens por citometria de fluxo (RAMOS et al., 2003; BARTH et al., 2008). Ensaio de cultura de células, primárias ou linhagens, têm sido adotados para pesquisa, porém, sua aplicação no controle da qualidade de produtos farmacêuticos de rhEPO necessita de maiores estudos de validação e correlação com o ensaio *in vivo*, para se constituir em alternativa (MIRE-SLUIS et al., 1996; HAMMERLING & SJÖDIN, 1998, LIEFOOGHE et al., 2005).

Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas nos processos de separação, e têm sido amplamente utilizados com detecção no ultravioleta para quantificação de biofármacos, controle de qualidade e na separação e determinação de formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; AHRER & JUNGBAUER, 2006; BARTH et al., 2007). Métodos por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) tem sido utilizados para determinação da integridade das biomoléculas, pois possibilita a avaliação de dímeros e agregados, que, se presentes na formulação farmacêutica, podem causar efeitos imunogênicos e alteração da atividade biológica (GUNTURI et al., 2007). Porém, a baixa concentração da glicoproteína na presença de grandes quantidades de excipientes como albumina humana, dificulta o desenvolvimento de métodos para análise direta de rhEPO em produtos farmacêuticos (BIETLOT & GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006).

Por outro lado, após décadas de pesquisa com produtos biológicos alcançou-se o estágio no qual a atividade de algumas proteínas pôde ser correlacionada com análises físico-químicas. Assim, atualmente as pesquisas direcionam-se no sentido de aprimorar os ensaios e reduzir ou substituir os animais em experimentos biológicos. Nesse contexto, os estudos de correlação têm possibilitado avanços que resultaram no desenvolvimento de novas alternativas para o controle da qualidade (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; HENDRIKSEN et al., 2002; DALMORA et al., 2006). Porém, acrescenta-se que

após o desenvolvimento, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (FDA, 2001; ICH, 2005).

O presente trabalho teve por objetivos: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular para a avaliação da potência e de formas de alta massa molecular de eritropoietina humana recombinante, b) estudar a correlação entre os métodos cromatográficos validados e biológico para a avaliação de produtos farmacêuticos. Desse modo, pretendeu-se contribuir para o controle da qualidade no contexto da redução do uso de animais de laboratório, aprimoramento dos ensaios e estabelecimento de alternativas, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A eritropoietina humana é um hormônio glicoprotéico endógeno com massa molecular de 30,4 kDa, dos quais 60% correspondem a cadeia polipeptídica única com 165 aminoácidos, e aproximadamente 18 kDa. Contém duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições Cis⁷-Cis¹⁶¹ e Cis²⁹-Cis³³, e apresenta fórmula química C₈₀₉H₁₃₀₁N₂₂₉O₂₄₀S₅. A estrutura primária da EPO, as pontes dissulfeto e as posições de ligação das cadeias glicídicas estão representadas na Figura 1 (GILG et al., 1996). A massa adicional de 40% da molécula é constituída de carboidratos (GOLDWASSER et al., 1974; DORDAL et al., 1985; LAI et al., 1986; TRAN et al., 1991; KRANTZ, 1991; CHOI et al., 1996 ; DERBY et al., 1996; SANZ-NEBOT et al., 2003; YU et al., 2005). A eritropoietina humana natural bem como a recombinante contém três cadeias de açúcares *N*-ligados na Asparagina^{24,38,83} e uma cadeia *O*-ligada (tipo mucina) na Serina¹²⁶ (BROWNE et al., 1986; EGRIE et al., 1986). A carga negativa da molécula, é devida a presença de resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico nas extremidades das cadeias glicídicas, que apresenta ponto isoelétrico (pI) entre 4,5 e 5,0.

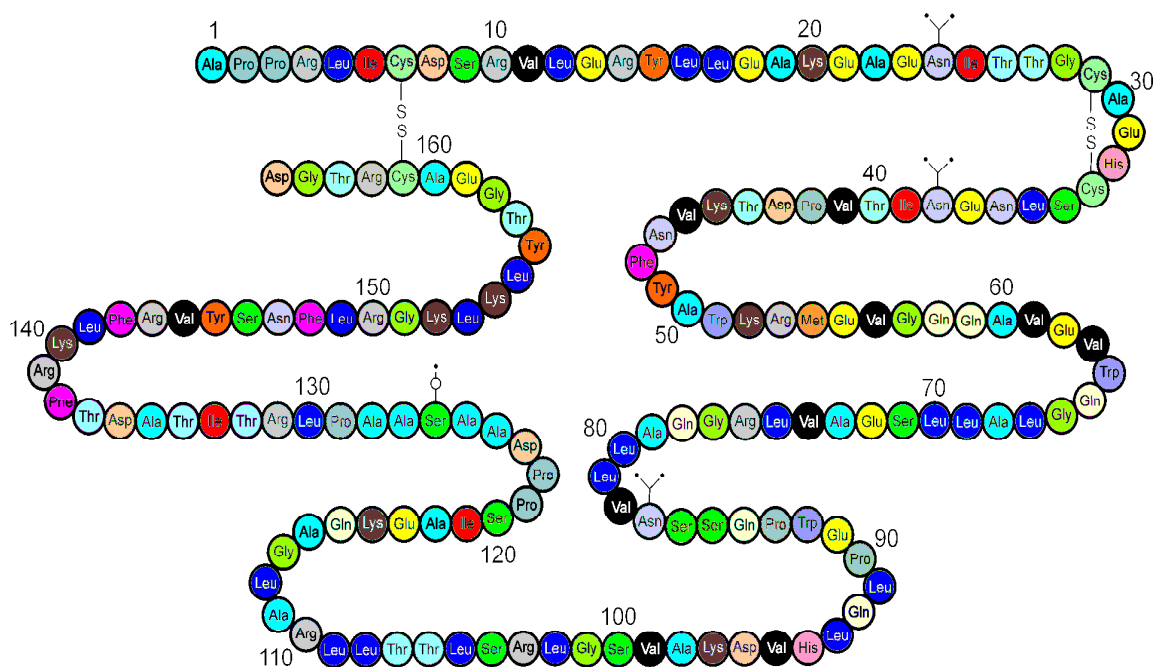


FIGURA 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto e locais de inserção das cadeias de carboidratos, três *N*-ligadas (*Y*), uma *O*-ligada (-O-*), adaptada (GILG et al., 1996).

A eritropoietina é eficaz no tratamento de anemias, em especial as associadas à resposta eritropoiética deficiente. A rhEPO é amplamente utilizada para o tratamento de anemias em pacientes com falência renal pré-diálise e sob diálise, anemias causadas pela quimioterapia de câncer ou associadas com zidovudina na infecção pelo HIV, anemias no pré-operatório e em pacientes de cirurgias eletivas com o intuito de reduzir a frequência de transfusão de sangue. É prescrita no pré-operatório para aumentar a produção de hemácias, permitindo o armazenamento de volumes maiores de sangue para a transfusão autóloga. Além disso, tem sido sugerida sua utilização em transplantes de medula óssea, anemia em prematuros, anemia da gravidez, anemia da síndrome mielodisplástica e em anemias de doenças crônicas como a artrite reumatóide (BARBONE et al., 1994; FANDREY et al., 1994; CHEUNG et al., 1998; GOODNOUGH et al., 2000; SPIVACK, 2000; FISHER, 2003; KAUSHANSKY & KIPPS, 2006).

Atualmente estão sendo estudadas novas aplicações da rhEPO, na redução da inflamação associada à isquemia em casos de lesão cerebral, da coluna vertebral, insuficiência renal aguda e infarto do miocárdio (SHARPLES et al., 2006). Baseado em estudos pré-clínicos, a rhEPO também poderá ser usada em pacientes com síndrome coronária aguda, isquemia renal e doenças hepáticas (JELKMANN, 2008).

A eritropoietina humana recombinante encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intravenosa ou subcutânea. A dose inicial para pacientes com insuficiência renal crônica é de 80 a 120 UI/kg de peso corporal, sendo administrada por via subcutânea três vezes por semana. Nessas condições o hematócrito de pacientes anéfricos se normaliza no período de 2 a 4 meses (KAUSHANSKY & KIPPS, 2006).

No Brasil, na DCB (BRASIL, 1996) e a nível internacional (DCI-USP, 2006), as eritropoietinas estão citadas como epoetina alfa, beta, epsilon, gama e ômega. Esta denominação é utilizada para designar as preparações que diferem na composição e natureza das estruturas glicídicas.

As EPOs α e β são as duas formas de eritropoietina recombinante expressas em células de ovário de hamster Chinês (CHO), usadas em terapêutica. Observou-se que os lotes de EPO α diferem significativamente da EPO β . Suas isoformas estão distribuídas na faixa de ponto isoelétrico (pI) de 4,42 a 5,11, porém a EPO α apresentou cinco componentes distintos com os mais básicos e acídicos presentes em menores concentrações, e os lotes de EPO β mostraram seis a sete componentes diferentes. Cinco desses componentes estavam na mesma posição da EPO α , com maior proporção de isoformas básicas. A densitometria confirmou

que a proporção de isoformas mais básicas (aquelas com pI equivalente ou maior do que o componente mais catódico de EPO α) era significativamente maior na EPO β do que na α . A IEF mostrou variabilidade da composição de isoformas entre lotes de rhEPOs, mas isso não pode ser imediatamente quantificado por densitometria. Não há registros de que a EPO α difere da β em sua eficácia clínica, porém as diferenças observadas em alguns sistemas analíticos poderiam justificar padrões internacionais diferentes para os dois tipos (STORRING et al., 1998; LASNE & CEARRIZ, 2000; LASNE et al., 2002).

A estrutura de carboidratos da EPO foi estudada e determinada a extensão da micro-heterogeneidade da EPO recombinante e do hormônio natural. Destacam-se as cadeias de carboidratos *N*-ligados, em que os oligossacarídeos podem conter duas, três ou quatro ramificações (ou antenas), cada qual tipicamente terminada com uma molécula de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) carregada negativamente. Com exceção desse, que é um glicídio com 11 carbonos, todas as outras moléculas de açúcares da EPO são neutras. Similarmente, a cadeia única de carboidrato *O*-ligada pode conter duas moléculas de ácido siálico ou nenhuma. Por essa razão, devido à variabilidade da estrutura e do número de moléculas de ácido siálico, a carga negativa líquida da molécula pode variar (SASAKI et al., 1987; SASAKI et al., 1988; TAKEUCHI et al., 1988; TSUDA et al., 1988; LASNE et al., 2002; YUEN et al., 2003; ELLIOTT et al., 2004).

Para diferentes glicoproteínas, a composição de carboidratos pode ter funções diversas, entre as quais se incluem efeitos sobre a biossíntese e secreção, proteção imunológica, conformação, estabilidade, solubilidade e atividade biológica das moléculas (SKEHEL et al., 1984; CUMMING, 1991). Para a rhEPO, especificamente, foi mostrado que a presença de carboidratos é necessária para a secreção celular, aumento da solubilidade, formação de sítios de ligação com o receptor e aumento da estabilidade da molécula (DUBE et al., 1988; TSUDA et al., 1990; DELORME et al., 1992; HIGUCHI et al., 1992; SASAKI, 2003). As pesquisas iniciais com EPO de origem natural indicaram que os resíduos de ácido siálico eram necessários para a atividade biológica *in vivo* (LOWRY et al., 1960; LUKOWSKY & PAINTER, 1972; GOLDWASSER et al., 1974). A remoção do ácido siálico da EPO nativa ou recombinante resultou em moléculas com aumentada atividade *in vitro*, mas baixa atividade *in vivo*, presumivelmente, devido à ligação ao receptor da glicoproteína de-sialilada no fígado (FUKUDA et al., 1989; SPIVAK & HOGANS, 1989; GRIFFITHS, 1991; CHOI et al., 1996). Similarmente foi mostrado que moléculas de EPO que foram deglicosiladas (ou produzidas em *E. coli* para possibilitar a expressão somente do polipeptídeo) têm baixa

atividade *in vivo*, mas são ativas *in vitro* devido à maior afinidade de ligação ao receptor de EPO na superfície celular, relativamente ao hormônio intacto (IMAI et al., 1990).

Em coluna cromatográfica, separaram-se as frações de rhEPO, demonstrando-se a micro-heterogeneidade de sua estrutura oligossacarídica e procedendo-se à caracterização físico-química e biológica, inclusive das cadeias oligossacarídicas e do conteúdo de ácido siálico. Foi observado que a bioatividade *in vivo* de algumas frações com baixo conteúdo de ácido siálico aumentava após tratamento com alfa 2,6-sialiltransferase, mas à das outras frações com alto conteúdo diminuía ou não era afetada. Os autores relataram a importância das cadeias de oligossacarídeos na atividade biológica (MORIMOTO et al., 1996). Por outro lado, a avaliação de ácido siálico em produtos farmacêuticos comerciais com baixas concentrações, poderia ser efetuada com lectinas e, principalmente, por métodos de eletroforese capilar, cromatografia líquida (CL) e espectrometria de massa (ROGERIEUX et al., 1993; CHE et al., 1999).

A EPO recombinante produzida em sistemas bacterianos, como *Escherichia coli*, não tem a estrutura de carboidratos. Por essa razão, a atividade biológica *in vivo* é bastante reduzida devido à baixa meia-vida da molécula na circulação (DORDAL et al., 1985; GRIFFITHS, 1991). Em contraste, a análise de cadeias de carboidratos *N*-ligados de rhEPO, produzidas em sistemas de mamíferos, mostrou estruturas bastante similares àquelas que ocorrem na EPO urinária humana (SASAKI et al., 1987).

A heterogeneidade de EPO urinária humana altamente purificada e de rhEPO produzida na linhagem de células CHO foi observada por focalização isoelétrica (IEF), sendo separadas 5 a 8 isoformas, devido ao grau de glicosilação, bem como aos resíduos de ácido siálico com ou sem *N*-acetil-lactosamina. Os mesmos perfis foram detectados em amostras de soro com uso de eletroforese capilar de zona e por focalização isoelétrica. Resultados similares foram descritos por eletroforese capilar com EPO purificada (STORRING & GAINES DAS, 1992; GOKANA et al., 1997).

A comparação de eritropoietinas de soro e urina humana (LASNE & CEAURRIZ, 2000) foi realizada por IEF na faixa de pH de 2,0 a 5,0. Foram observadas diferenças de isoformas, destacando-se a forma nativa de EPO urinária que tem sido purificada e utilizada para comparação com a produzida por engenharia genética (TAM et al., 1991; KAWASAKI et al., 2000). A estrutura de carboidratos da rhEPO, expressa em células CHO, já havia sido estudada por Sasaki et al. (1987), demonstrando que a EPO urinária era indistinguível da recombinante, exceto por pequena diferença na sialilação. Por outro lado, o efeito da estrutura de carboidratos foi estudado por Narhi et al. (1991) que observaram sua importância para a

estabilidade da molécula sob condições desnaturantes, estabilidade essa que independe da presença de ácido siálico. Sugerem que as cargas líquidas, e não apenas a molécula integral, desempenha função na estabilidade da proteína.

A glicosilação da EPO é um processo pós-tradução que é influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa, fatores fisiológicos e condições de cultura (RADEMACHER et al., 1988; CUMMING, 1991). A composição pode ser posteriormente afetada pela seletividade de processos de isolamento usados para purificação (STORRING, 1992).

A partir da produção de EPO pela tecnologia do DNA recombinante, observou-se a necessidade de ensaios para avaliar a atividade dos produtos farmacêuticos comerciais. O ensaio biológico de potência foi desenvolvido com base na contagem de reticulócitos no sangue periférico (BARBONE et al., 1994; CHOI et al., 1996).

Os reticulócitos (RTC) são eritrócitos imaturos, que correspondem ao último estágio da série eritróide da medula óssea (RAPAPORT, 1990), sua determinação pode ser realizada por método automatizado por citometria de fluxo fluorescente (CHANG & KASS, 1997; RUDENSKY, 1997; SANDBERG et al., 1998; FERRAZOLI & CESCO, 1999, RAMOS et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003; BARTH et al., 2008).

Visando a avaliação de potência de preparações farmacêuticas, foram estudados ensaios biológicos em camundongos policitêmicos e normocitêmicos (BRISTOW, 1997). O ensaio em camundongos policitêmicos baseia-se na incorporação de ^{59}Fe às células sangüíneas dos animais, previamente colocados sob pressão atmosférica reduzida. Esse procedimento utiliza radioisótopos, é de longa duração e seu custo é elevado (COTES & BANGHAM, 1961; KAWAMURA et al., 1991; HAYAKAWA et al., 1992; BARBONE et al., 1994; CHOI et al., 1996; EP., 2005). Já o bioensaio em camundongos normocitêmicos, é executado usando animais normais e a atividade é avaliada pelo estímulo da produção de reticulócitos (HAYAKAWA et al., 1992; STORRING & GAINES DAS, 1992; BRISTOW, 1997; EP., 2005; RAMOS et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003). A contagem tem sido realizada por métodos microscópicos e, mais recentemente, por citometria de fluxo, no qual a intensidade da fluorescência na célula é proporcional à quantidade de RNA do retículo endoplasmático remanescente (BARBONE et al., 1994; YU et al., 1999).

Lopes (2004) avaliou a potência biológica de rhEPO em camundongos normocitêmicos fêmeas de 8 semanas de idade da linhagem Swiss Webster, utilizando protocolo de administração de doses múltiplas selecionados com fator geométrico 3. A contagem dos reticulócitos foi efetuada pelo método microscópico da hemólise seletiva. Além disso, avaliou

as respostas das linhagens B6D2F1, preconizada pela Farmacopéia Européia (EP., 2005) e Swiss Webster, destacando a maior sensibilidade da primeira, 24% superior. Sugere a utilização da linhagem Swiss Webster, como alternativa válida para o ensaio biológico de potência de rhEPO.

Barth et al. (2008) validaram ensaio biológico para avaliação de potência de rhEPO em camundongos normocitêmicos, fêmeas, da linhagem BALB/c, utilizando protocolo de administração de doses múltiplas do padrão e da amostra e contagem dos reticulócitos por citometria de fluxo. O método apresentou-se preciso, exato, específico e robusto para avaliação de potência de rhEPO, servindo como alternativa para garantir a segurança e a eficácia de formulações farmacêuticas.

Alternativa *in vitro*, é o bioensaio por cultura de células, baseado na proliferação da linhagem eritróide TF-1, que foi adotada para avaliar a influência da micro-heterogeneidade dos carboidratos. Conclui-se que o método descrito poderia ser adequado para a determinação de potência de formulações farmacêuticas (HAMMERLING et al., 1996). Miyazaki et al. (1997) estudaram o uso da linhagem AS-E2 eritropoietina dependente, proveniente de leucemia humana. Devido à dependência exclusiva da EPO para seu crescimento, foi sugerida sua utilização para estudos de respostas moleculares e biológicas nas etapas finais de eritropoiese. No mesmo sentido, foram pesquisadas respostas celulares *in vitro* para citocinas e eritropoietina com a linhagem TF-1 de eritroleucemia humana, avaliando-se como resposta o crescimento celular (KITAMURA et al., 1989; HAMMERLING & SJÖDIN, 1998).

A atividade biológica *in vivo* da eritropoietina é dependente do seu grau de sialilação, que é irrelevante para a sua atividade *in vitro*. Como consequência, os ensaios biológicos desenvolvidos *in vitro* não se correlacionam com os *in vivo*. Nesse contexto, Liefooghe et al. (2005) desenvolveram ensaio por cultura de células sensível a sialilação. Efetuaram a avaliação da atividade biológica *in vitro* com a linhagem celular AS-E2 e o ensaio biológico em camundongos policitêmicos. As amostras foram previamente incubadas em agarose conjugada com a lectina *Erythrina crista-galli*, que mimetiza o mecanismo hepático de primeira passagem. O ensaio *in vitro*, forneceu resultados comparáveis ao *in vivo*, podendo constituir-se em alternativa para determinação da atividade biológica.

Bioensaio *in vitro* foi desenvolvido e validado para avaliar a farmacocinética de duas novas proteínas recombinantes (EP1 e EP2) com atividade eritropoiética em ratos. Utilizaram nos bioensaios o sub-clone da linhagem celular 32D de camundongo. O efeito proliferativo sobre a linhagem celular foi medido pela incorporação de timidina tritiada ao DNA celular. O bioensaio apresentou linearidade significativa, superior a 0,99 e exatidão entre 90 – 110%,

demonstrando sua aplicabilidade para a determinação de biofármacos com atividade eritropoiética (WEI et al., 2007).

Schimidt et al. (2003) avaliaram a composição de isoformas de rhEPO em produtos farmacêuticos de diferentes laboratórios produtores. Ensaio realizado por IEF e imunoensaio com lectinas específicas observaram a presença de 5 a 8 isoformas na faixa de pI de 4,4 – 5,5 e diferenças na proporção e distribuição das bandas. A atividade biológica foi avaliada pelo bioensaio em camundongos normocitêmicos e correlacionada com a IEF e ligação às lectinas. As preparações com maior proporção de isoformas ácidas apresentaram maior potência biológica.

Lara-Quintanar et al. (2006) desenvolveram método imuno-cromatográfico para remoção de albumina de produtos farmacêuticos de rhEPO, bem como procedimento preparativo de concentração de amostra para a análise por eletroforese capilar de zona. Empregaram tampão pH 5,5 e capilar de sílica fundida. A metodologia foi sugerida para o controle de qualidade de rhEPO em produtos farmacêuticos.

A rhEPO é uma glicoproteína relativamente estável que permanece na forma monomérica, quando armazenada sob refrigeração. Sua integridade é rotineiramente monitorada por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM). Não foram detectados agregados na substância biológica conservada a 4°C ou -70°C, mesmo após quarenta e oito meses. De qualquer modo, temperaturas mais altas e algumas condições de formulação induzem a EPO a, inicialmente, dimerizar, seguida da formação de agregados de alta massa molecular. Para proteger o produto contra tais agregações, é importante conhecer seu mecanismo, razão pela qual os autores efetuaram a caracterização dos dímeros de EPO por diferentes técnicas físico-químicas (DEPAOLIS et al., 1995). No mesmo sentido, dímeros e trímeros de EPO foram produzidos por ligação química cruzada de formas monoméricas, que são biologicamente ativos. Exibiram meia-vida biológica aumentada, sendo mais eficazes *in vivo* do que a forma monomérica convencional. Essas formas diméricas e oligoméricas talvez possam desempenhar papel importante em terapia (DERBY et al., 1996; SYTKOWSKI et al., 1998).

A formação de agregados de alta massa, em formas glicosiladas e deglicosiladas de rhEPO, após aquecimento, foi avaliada por CL-EM (ENDO et al., 1992). O aquecimento a 60°C em pH neutro resultou em agregados formados por aproximadamente 20 monômeros. O aquecimento a 50°C em pH ácido originou agregados de alta massa com tamanhos variados. Os autores constataram que a concentração de sais aumenta a agregação, além disso,

moléculas deglicosiladas de rhEPO foram mais suscetíveis à agregação após aquecimento, indicando que as cadeias de carboidratos são essenciais para a estabilidade de rhEPO.

Gunturi et al. (2007) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida por exclusão molecular e detecção por fluorescência para a determinação de agregados de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo 0,03% de polissorbato 80. O método mostrou-se adequado para avaliar a estabilidade e quantificação de agregados presentes em concentração de até 0,2%, em relação ao monômero.

Luikx et al. (2005) desenvolveram método por cromatografia líquida por troca-iônica e detecção por fluorescência para a determinação de eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos encontrando diferenças 12% superiores, em relação à potência declarada.

Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e em combinação com detecção no ultravioleta, têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas (RIBELA et al., 2006; AHRER & JUNGBAUER, 2006; DALMORA et al., 2006).

Barth et al. (2007) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para avaliação de formulações farmacêuticas de rhEPO alfa e beta. O método apresentou-se específico, preciso, exato e robusto para análise dos produtos em questão. As amostras farmacêuticas foram analisadas por CL-FR e comparadas com o bioensaio em camundongos normocitêmicos, apresentando uma média da potência estimada, 11,2% maior para o método cromatográfico. O método proposto, representa uma importante alternativa para substituição do ensaio biológico, e pode ser aplicado nos processos de purificação, bem como no controle de qualidade de produtos biofarmacêuticos de rhEPO.

As pesquisas com biofármacos atingiram estágio no qual a atividade biológica de algumas proteínas pode ser correlacionada com métodos físico-químicos (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; DALMORA et al., 2006; LOCATELLI et al., 2006). Porém, o desenvolvimento de métodos de análise direta de rhEPO em produtos farmacêuticos podem apresentar dificuldades devido à baixa concentração da glicoproteína na presença de quantidades significativas de excipientes, adicionados para prevenir a adsorção da proteína nas paredes dos recipientes, aumentando dessa forma, a estabilidade do produto durante o armazenamento. Os problemas são ainda maiores, quando os excipientes são também proteínas, tais como, a albumina de soro humano, que não pode ser considerada

quimicamente homogênea, pois geralmente é obtida de plasma humano de grande número de doadores (BIETLOT & GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006).

Entre os métodos descritos pela literatura para a análise qualitativa e quantitativa de rhEPO, destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), freqüentemente combinada com transferência e imunodeteção (SASAKI et al., 1987; FUKUDA et al., 1989), focalização isoelétrica (BRISTOW, 1997; GOKANA et al., 1997; STORRING et al., 1998), eletroforese capilar (WATSON & YAO, 1993; BIETLOT & GIRARD, 1997; CIFUENTES et al., 1999; LÓPEZ-SOTO-YARRITU et al., 2002; EP., 2008; LARA-QUINTANAR et al., 2006), eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de massas (SANZ-NEBOT et al., 2003; NEUSÜß et al., 2005), cromatografia líquida por exclusão molecular (ENDO et al., 1992; TSUJI, 1994; DEPAOLIS et al., 1995; DERBY et al., 1996; GUNTURI et al., 2007), cromatografia líquida em fase reversa (BARTH et al., 2007), cromatografia líquida por troca-iônica (LUYKX et al., 2005) e o ensaio biológico, com dose única, (STORRING & GAINES DAS, 1992; BRISTOW, 1997; EP., 2005) e dose múltipla em camundongos normocitêmicos ou policitêmicos (RAMOS et al., 2003; LOPES, 2004; BARTH et al., 2008).

No estudo colaborativo que estabeleceu a substância biológica de referência de EPO da Farmacopéia Européia, foi selecionada a preparação composta pela mistura (50:50) de Eritropoietina alfa e beta, e foram realizados ensaios biológicos com injeção de dose única em camundongos policitêmicos e normocitêmicos (BRISTOW, 1997; EP., 2005). A Farmacopéia Européia 2005 (EP., 2005), em sua monografia da solução concentrada, especifica que a rhEPO deve ter potência de não menos do que 100.000 UI/mg. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e intervalo de confiança ($P=0,95$) de 64 – 156%. A Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) não faz referência à rhEPO.

Método por eletroforese capilar (EC) foi pesquisado, visando determinar a distribuição de isoformas de rhEPO e o estabelecimento de alternativa *in vitro*. Observou-se que a técnica de focalização isoelétrica (IEF) é mais robusta do que os outros métodos analíticos físico-químicos, e que a EC é reprodutível e sensível, com vantagens em relação à IEF, sendo sugerida para análise de distribuição de isoformas em produtos farmacêuticos (BRISTOW & CHARTON, 1999).

Sucessivamente foram desenvolvidos métodos por eletroforese capilar com detecção no UV para a separação e quantificação de isoformas de rhEPO (CIFUENTES et al., 1999; LÓPEZ-SOTO-YARRITU et al., 2002). Além disso, foi utilizado o acoplamento da

eletroforese capilar ao espectrômetro de massas, que possibilitou resolução de um maior número de isoformas com melhor sensibilidade (BOSS et al., 1998; SANZ-NEBOT et al., 2003; NEUSÜß et al., 2005).

BIETLOT & GIRARD (1997) desenvolveram método por eletroforese capilar de zona para a análise de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo albumina de soro humano, como excipiente. Empregaram tampão fosfato 200 mM com 1 mM de cloreto de níquel, pH 4,0 e capilar com revestimento interno de amina. O método foi linear na faixa de concentração de 0,03 – 1,92 mg/mL, com limite de detecção e quantificação de 0,01 e 0,03 mg/mL, respectivamente. O procedimento foi aplicado para a análise de produtos de dois laboratórios detectando diferenças qualitativas e quantitativas entre as preparações.

A estrutura de carboidratos de oito preparações de rhEPO foi avaliada por espectrometria de massas no modo de ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo (MALDI-TOF). A atividade biológica foi avaliada por bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Concluíram que as cadeias de carboidrato *N*-ligadas com quatro ramificações e quatro resíduos de ácido siálico influenciam significativamente a atividade biológica (YUEN et al., 2003).

Estudos realizados com rhEPO, demonstraram que a meia-vida biológica no soro e a atividade biológica *in vivo*, estão diretamente relacionadas ao conteúdo de ácido siálico ligado a molécula do carboidrato, porém, inversa com a afinidade de ligação ao receptor. Essas observações levaram à hipótese de que, aumentando o teor de carboidratos e, conseqüentemente, de ácido siálico, em relação ao encontrado naturalmente, seria possível originar uma molécula com maior atividade biológica (EGRIE et al., 1997).

EGRIE & BROWNE (2001) desenvolveram análogo hiperglicosilado de rhEPO, com a finalidade de que, com mais carboidratos, a nova molécula poderia apresentar maior atividade biológica. A Darbepoetina alfa foi, portanto, planejada de modo a conter cinco cadeias de carboidratos *N*-ligadas (nas posições 30, 32, 87, 88 e 90, duas a mais que a rhEPO) e foi submetida a estudos pré-clínicos como uma nova proteína estimuladora da eritropoiese (NESP). Devido ao seu conteúdo maior de ácido siálico, é bioquimicamente diferente da rhEPO, com peso molecular maior, de 37 kDa, e carga negativa mais elevada. Comparada com a rhEPO, apresentou meia-vida biológica no soro, aproximadamente, três a quatro vezes superior (em torno de 25h) e maior potência *in vivo*, podendo ser administrada menos freqüentemente para obter a mesma resposta biológica. O produto foi submetido a experimentos clínicos, visando à prevenção e tratamento de anemia. A atividade biológica das isoformas de rhEPO foi também avaliada com base nos efeitos sobre o hematócrito de

camundongos (EGRIE & BROWNE, 2001; JELKMANN, 2002; EGRIE et al., 2003; JELKMANN, 2008).

A farmacocinética e a farmacodinâmica da rhEPO foram avaliadas em humanos após administração de dose única ou múltiplas por via subcutânea. A administração repetida de rhEPO foi mais eficaz na estimulação de reticulócitos do que a injeção única, observando-se que a resposta farmacológica está associada à concentração e esquema de dosagem (CHEUNG et al., 1998). Além disso, a farmacocinética e a farmacodinâmica foram avaliadas após a administração subcutânea de doses semanais únicas de 40.000 UI e múltiplas de 150 UI/kg, três vezes por semana, em voluntários saudáveis, durante quatro semanas. Os autores destacam que as respostas farmacodinâmicas foram semelhantes para os dois grupos e que os dois esquemas de dosagem podem ser considerados clinicamente equivalentes (CHEUNG et al., 2001).

Outro estudo avaliou a farmacocinética e a farmacodinâmica em voluntários saudáveis de ambos os sexos, com administrações pelas vias intravenosa e subcutânea em diferentes esquemas de dosagem. Não verificaram diferenças de resposta entre os sexos, porém observaram maior eficácia, ou seja, estimulação mais prolongada da produção de reticulócitos, para as doses administradas por via subcutânea em relação à intravenosa (RAMAKRISHNAN et al., 2004).

Parnham et al., (2007) estudaram modelo farmacocinético e farmacodinâmico em ratos Wistar, após administrações subcutânea e intravenosa do medicamento referência e um biosimilar de rhEPO. Avaliaram variações na concentração plasmática de rhEPO e suas respostas farmacológicas de porcentagem de reticulócitos, número de eritrócitos e níveis de hemoglobina, não encontrando diferenças significativas entre os dois produtos.

A rhEPO alfa após administração intravenosa apresenta tempo de meia-vida na circulação ($t_{1/2 \beta}$) de 4 – 11 horas. A biodisponibilidade após administração subcutânea foi 21% e o tempo para atingir a concentração máxima (C_{max}), 18 horas. A concentração plasmática máxima avaliada, após administração subcutânea de 120 UI/Kg foi de 176 ± 75 mUI/mL (MACDOUGALL et al., 1999; ALLON et al., 2002; JELKMANN, 2002).

As eritropoietinas mais usadas na terapêutica, EPO α e β , tiveram a farmacocinética e farmacodinâmica avaliadas em voluntários saudáveis do sexo masculino após a administração de doses pelas vias intravenosa e subcutânea. A EPO β apresentou tempo de meia-vida 20% superior ao da α após administração intravenosa, bem como, maior contagem absoluta de

reticulócitos após administração subcutânea. Essas diferenças podem ser oriundas da composição variável de carboidratos (HALSTENSON et al., 1991).

A farmacocinética e a farmacodinâmica da darbepoetina alfa foram avaliadas em pacientes sob diálise, em relação à rhEPO alfa. Empregaram dois esquemas de administração, três vezes por semana e semanal. Os autores observaram tempo de meia-vida da darbepoetina alfa duas a três vezes superior ao da rhEPO, e que ambos os esquemas de administração eram seguros e efetivos na manutenção dos níveis de hemoglobina (Hb), destacando vantagens da menor frequência de administrações da darbepoetina alfa (ALLON et al., 2002). A administração de darbepoetina alfa, também apresentou boa tolerância mostrando-se eficaz e com efeitos colaterais semelhantes aos observados com rhEPO, não havendo formação de anticorpos em pacientes tratados (MACDOUGALL, 2001).

Catlin et al., (2002) compararam experimentalmente os perfis de focalização isoeletrica da darbepoetina alfa, rhEPO e eritropoietina de urina humana, observando-se os padrões de migração e pIs. A darbepoetina alfa apresentou quatro isoformas determinantes na região acídica, com a densidade aumentando da banda menos para mais ácida. A darbepoetina, usada no tratamento de câncer, foi detectada na urina dos pacientes com o mesmo perfil, demonstrando a possibilidade de identificar a rhEPO e a darbepoetina alfa na urina após tratamento. Metodologia por eletroforese capilar foi adaptada para separação de isoformas de darbepoetina alfa. Através da otimização do pH e utilizando detecção por espectrometria de massas no modo de ionização MALDI-TOF foi possível obter a resolução de sete isoformas de darbepoetina alfa, sendo o método sugerido para o controle da qualidade e anti-doping (SANZ-NEBOT et al., 2005).

Lamon et al. (2007) realizaram identificação dos perfis isoeletricos da Darbepoetina Alfa e da rhEPO- β na urina por IEF, após injeção de 40 μ g de Aranesp[®] e 4.000 UI de Recormon[®], respectivamente. O método é sugerido para ser usado no controle anti-doping.

Kochendoerfer et al. (2003) desenvolveram proteína eritropoiética sintética (SEP) com 50.8 kDa, estrutura composta por 166 aminoácidos, pI 5,0 e estrutura semelhante, mas não idêntica a EPO natural. Apesar de ser negativamente carregada não contém carboidratos, mas polímeros ramificados quimicamente ligados em dois sítios. A SEP apresentou atividade biológica *in vitro* semelhante, e *in vivo* superior à EPO. A farmacocinética foi avaliada através da injeção intravenosa em ratos observando-se tempo de meia-vida duas a três vezes superior a EPO.

A adição de cadeias de polietilenoglicol, que origina as formas peguiladas, melhorou as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e imunológicas das biomoléculas

(BAILON & BERTHOLD, 1998; HARRIS et al., 2001; ROBERTS et al., 2002; HARRIS & CHESS, 2003). Nesse contexto, Macdougall (2005) desenvolveu a EPO peguilada denominada CERA (Ativador contínuo do receptor de eritropoietina) com peso molecular de 60 kDa. Contém polímeros de metóxi-polietilenoglicol incorporados nas N-terminações, bem como nas lisinas das posições 52 ou 45. Estas modificações prolongaram o tempo de meia-vida na circulação, em aproximadamente 135 horas, após administração subcutânea ou intravenosa. A administração subcutânea do CERA, uma ou duas vezes por mês, é suficiente para manter níveis estáveis de Hemoglobina em pacientes sob diálise, reduzindo o número de aplicações em comparação com a rhEPO e darbepoetina (JOLLING et al., 2005; BUNN, 2007; JELKMANN, 2008).

Os peptídeos estimuladores da eritropoiese (ESA), pertencem a outra classe de agentes que estimulam a eritropoiese. O Hematide consiste de um peptídeo dimérico, peguilado, obtido por síntese química com massa molecular aproximada de 5 kDa. Sua atividade foi avaliada em diferentes sistemas celulares, demonstrando-se a ativação dos receptores humanos da eritropoietina e a estimulação da eritropoiese em células precursoras eritróides humanas *in vitro*, com respostas semelhantes à eritropoietina natural e recombinante, porém, apresentou tempo de meia-vida superior a rhEPO e a Darbepoetina alfa, sugerindo uma menor frequência de administrações para o tratamento da anemia (FAN et al., 2006; BUNN, 2007).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas

ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação da resolução e reprodutibilidade do procedimento analítico, sendo realizado através da análise de parâmetros como simetria, fator de capacidade, pratos teóricos, resolução, área e tempo de retenção. Desse modo, demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (FDA, 2001; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; SWARTZ & KRULL, 1998; ICH, 2005).

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 – FERRETTO, R. M.; LEAL, D. P.; SILVA, L. M.; NOGUEIRA, D. R.; DALMORA, S. L. Validation of a Size-Exclusion LC Method and assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, aceito para publicação.

**Validation of a Size-Exclusion LC Method and
Assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations
by Liquid Chromatography and Biological Assay**

Ricardo Machado Ferretto, Diogo Paim Leal, Lucélia Magalhães da Silva, Daniele Rubert
Nogueira and Sérgio Luiz Dalmora*

*Department of Industrial Pharmacy
Federal University of Santa Maria
97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

Running Title: "Erythropoietin SE-LC Method"

*Corresponding author. Tel./fax: + 55 55 3220 8952

E-mail adress: sdalmora@terra.com.br

Abstract

A size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was validated for the determination of erythropoietin in pharmaceutical formulations without serum albumin. The LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm I.D.) using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The mobile phase consisted of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M dibasic sodium phosphate and 0.2M sodium chloride buffer, pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 0.5 mL/min. The chromatographic separation was obtained with retention time of 14.5 min, and was linear in the range of 5-150 µg/mL ($r^2 = 0.9991$). The accuracy was 101.07% with bias lower than 1.36%. The limits of detection and quantitation were 0.28 and 1 µg/mL, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The proposed method was applied for the analysis of the erythropoietin in pharmaceutical dosage forms, and the content/potencies correlated to the bioassay, contributing to establish alternatives which improve the quality control assuring the therapeutic efficacy.

Keywords: Erythropoietin, size exclusion liquid chromatography, pharmaceutical formulations, validation

Introduction

Erythropoietin (EPO) is an endogenous glycoprotein that is produced primarily by the interstitial cells in the kidneys and is a main hormone involved in regulating red cells production. The human erythropoietin produced by recombinant technology (rhEPO) is now marketed worldwide with increasing clinical use for the treatment of anemia associated with chronic renal failure, cancer chemotherapy and AIDS ^[1-3].

The EPO molecule consists of a 165 amino acids polypeptide chain, heavily glycosylated at three N-linked and one O-linked glycosylation sites with two disulfide bonds, yielding a molecular mass of 34 kDa, and the carbohydrates comprising 40% of the weight. These play an important role in determining the biological activity of EPO, which appears to be dependent upon the number of sialic acid residues at the termini of the tri- and tetra-antennary sugar chains ^[4-6].

The bioassays are useful to assess the quality, safety, and efficacy of those proteins, which can not be adequately characterized only by physicochemical tests. At moment, the bioactivity of rhEPO has been determined by the normocythaemic and polycythaemic mice bioassays ^[7-12]. Today, many analytical techniques ^[7-12] are available to monitor the purity, the chemical stability, and the potency of pharmaceutical proteins obtained through recombinant technology, but no single technique can satisfactorily provide sufficient information about a protein. Thus, a combination of physicochemical, immunological, and biological methods is recommended for the characterization and to monitor protein instability ^[13, 14].

The development of analytical methods for the direct analysis of rhEPO in pharmaceutical preparations present some difficulties due to the low dose of the micro-heterogeneous glycoprotein in the presence of relatively large amounts of the excipients, added to prevent

adsorptions of the proteins to the vial walls and to increase stability during storage. Particular difficulties arise when the excipients are also proteins, such as human serum albumin ^[15, 16]. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) exploits the hydrophobic properties of the molecules in the separation process and offers a high level of accuracy and sensitivity. A RP-LC method was validated for the analysis of rhEPO in pharmaceutical formulations, compared to the bioassay, and demonstrating it to be able to detect, separate and quantify oxidized and deamidated proteins ^[17]. The EPO molecule is a stable molecule that remains predominantly in monomeric form when stored at 2-8°C. However, when the product is exposed to higher temperatures or to certain stress conditions, dimer and higher molecular weight aggregates can be formed and may have no or reduced activity, and altered immunogenicity ^[13]. The stability of the protein can be monitored by Size exclusion liquid chromatography (SE-LC) which resolves the possible dimers and aggregates. A stability-indicating SE-LC method with fluorescence detection and isocratic elution with isopropyl-alcohol in the mobile phase was applied for the quantitation of rhEPO aggregates in formulated products containing 0.03% polysorbate 80, with high sensitivity and robustness, and the run time of 60 min ^[18]. A high performance anion exchange chromatography method combined with intrinsic fluorescence detection was also developed for the determination of rhEPO in pharmaceutical preparations, showing a difference of 12% higher related to the claimed potency ^[19].

The aim of the present study was to validate a sensitive and specific SE-LC method that can be used in combination with the RP-LC for the analysis of the rhEPO in pharmaceutical formulations, without serum albumin; moreover evaluate the correlations between the physicochemical methods and the biological assay, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of this biotherapeutic.

Experimental

Chemicals and reagents

European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for erythropoietin (250 µg/32,500 IU/vial), of a mixture of equal amounts of alpha and beta epoetins, was obtained from the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM, Strasbourg, France). A total of four batches of Eprex[®] (Roche, Rio de Janeiro, Brazil), containing 3,000 IU/0.3mL (84 µg/mL) of erythropoietin were identified by Arabic numbers from 1 to 4, and four batches containing 10,000 IU/0.6mL (138.33 µg/mL) were identified by Arabic numbers 5 to 8. The samples were obtained from commercial sources and used within their shelf life period. Monobasic potassium phosphate, dibasic sodium phosphate, sodium chloride, HPLC grade acetonitrile, sodium hydroxide, sodium EDTA and trifluoroacetic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, MA, USA) and reagents for automated counting were from HORIBA ABX Diagnostics (Montpellier, France). All other reagents were of the highest purity available from commercial sources. All chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade.

Normocythaemic Mice Bioassay

The assay was carried out as previously published^[11]. Female 8 week-old BALB/c mice weighing between 18 and 23 g were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomized order and identified by colour code for the assay, with usually 6 mice per treatment group. The Ph. Eur. BRP for erythropoietin and test samples were diluted to the concentrations of 4, 12, and 36 IU per mL, with phosphate buffered saline (pH 7.2) containing 0.1% bovine serum albumin. Multiple injections of 0.2 mL rhEPO per mice were injected

subcutaneously from day 1 to day 4. On day 5, peripheral blood was collected. Reticulocytes were counted by the automated flow cytometry method and the results reported as the percentage of reticulocytes. Statistical analyses of the assay data were carried out according to Finney, by parallel line methods (3 x 3), using PLA 2.0 software (Stegmann System-beratung, Rodgau, Germany).

Apparatus and Chromatographic Conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with an SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, DGU-14A degasser, CTO-10A_{VP} column oven, SIL-10AD_{VP} autosampler, and an SPD-M10A_{VP} photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 214 nm for size exclusion and 280 nm for reverse phase, and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

Reversed-Phase Chromatography (RP-LC)

The assay was carried out as described elsewhere^[17]. The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm I.D., with a pore size of 300 Å) and C₄ Kit Security Guard Cartridges was used to protect the analytical column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25°C) and the refrigerated autosampler maintained at approximately 5°C. The elution was performed by a gradient at a constant flow rate of 0.5 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.08% TFA:acetonitrile (30:70, v/v). The gradient was linear with 0 to 100% of B from 0.1-60 min, and then re-equilibrated with mobile phase A during 15 min. The mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The injection volume was 50 µL for both standard and samples.

Size-Exclusion Chromatography (SE-LC)

The experiments were performed on a size exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm I.D.). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at ambient controlled temperature (25°C) using a phosphate buffered saline mobile phase consisted of 0.001M monobasic potassium phosphate, 0.008M dibasic sodium phosphate and 0.2M sodium chloride buffer, pH 7.4 and using PDA detection at 214 nm. This was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA), and run at a flow rate of 0.5 mL/min. The temperature of the autosampler was kept at 5 °C and the injection volume was 50 µL for both standard and samples.

Preparation of Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions of rhEPO were prepared daily by diluting the Ph. Eur. BRP for erythropoietin and the samples of pharmaceutical formulation in mobile phase, to a final concentration of 33.6 µg/mL for the RP-LC method and 25 µg/mL for the SE-LC method, and in phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, to appropriate concentrations for the bioassay.

Validation of the SE-LC method

Once the chromatographic and the experimental conditions were optimized, the method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, and system suitability test following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines ^[20].

Specificity

Specificity of the method towards the drug was established through the determination of the peak purity of samples of pharmaceutical formulation of erythropoietin (25 µg/mL) subjected to degradation by maintaining the sample in water bath at 65°C during 6 h. Besides, the interference of the excipients of the pharmaceutical formulations was also analyzed by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the pharmaceutical formulation excipients). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of erythropoietin in the samples using a PDA detector.

Linearity

Linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight reference substance concentrations of the Ph. Eur. BRP for erythropoietin in the range of 5-150 µg/mL prepared in mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicate of 50 µL injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of Ph. Eur. BRP for erythropoietin to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Precision

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of rhEPO, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same

laboratory (between-analysts). Intra- and inter-day precision were expressed as relative standard deviation (RSD).

Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the formulations excipients with known amounts of the reference drug, to obtain solutions at concentrations of 20, 25 and 30 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

Limits of detection and quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH ^[20], using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis ^[21, 22]. The robustness was determined by analyzing the same samples of rhEPO containing 25 $\mu\text{g/mL}$ in triplicate by the one-variable-at-a-time approach changing column temperature, injection volume, mobile phase pH and flow rate. To assess the stability of sample solutions of erythropoietin, the samples were tested maintained at 2-8 °C for 48 h

and also placed into the autosampler at 5 °C, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

System suitability test

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50 µL of the working standard solution containing 25 µg/mL were used for evaluation of the system suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, retention time, and area, through the CLASS-VP® V 6.14 software.

Analysis of rhEPO in pharmaceutical formulations

For the quantitation of erythropoietin in the pharmaceutical formulations, eight batches containing respectively 84 or 138.33 µg/mL were diluted to appropriate concentration (25 µg/mL) with mobile phase, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance. The results were compared to those obtained using validated RP-LC and bioassay methods.

Results and Discussion

Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. The use of phosphate buffered saline as mobile phase resulted in better sensitivity compared with phosphate buffer and phosphoric acid, improving the peak symmetry (about 1.07) with the retention time suitable for the separation also of dimers and aggregate forms. For the selection of the best wavelength detection a PDA

detector was used. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of rhEPO in pharmaceutical formulations due to the capability and application for the quality control.

Method validation

Specificity

The analysis of the degraded forms showed the specificity of the analytical method. Typical chromatograms obtained with the resolution of the symmetrical peak corresponding to rhEPO, with the retention time of 14.5 min were shown in Fig 1, demonstrating also that the proposed method is able to detect and separate dimers, related substances of higher molecular mass and the monomeric intact protein (Fig. 1A). Besides, no interference from formulation excipients was found, showing that the peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index in the range of 0.999-1.000, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of erythropoietin.

Linearity

The analytical curves constructed for rhEPO were found to be linear in the 5-150 $\mu\text{g/mL}$ range. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9991$, $y = (61422.53 \pm 94.82)x + (281740.55 \pm 5854.54)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method.

Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$

performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.55%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-day); the mean values obtained were 103.04 and 102.95% with RSD 1.72 and 1.23%, respectively. Between analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 102.14 and 102.69% with RSD 1.36 and 1.06%, respectively. The results are shown in Table 1.

Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 20, 25 and 30 µg/mL. The absolute means obtained erythropoietin are shown in Table 2 with a mean value of 101.07% and bias lower than 1.36%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Limits of detection and quantitation

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation, $y = 61422.53x + 281740.55$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope, 61422.53 ± 94.82 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 5854.54. The LOD and LOQ calculated were 0.28 and 0.95 µg/mL, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be 1 µg/mL.

Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were made in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained showed the stability during 24 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2-8°C.

System suitability

The system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference substance solution containing 25 µg/mL of rhEPO. The RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.09, 1.10 and 0.76%, respectively. The number of theoretical plates was about 6089.8, with RSD of 1.17%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Method application

The proposed method was applied for the determination of rhEPO in pharmaceutical formulations against the Ph. Eur. BRP giving results in accordance with the label claim amounts, between 100.50 and 101.97% as shown in Table 4. The higher molecular aggregates and dimeric forms were calculated and expressed as percentage of the total area obtained in the respective chromatographic procedure, showing values lower than 0.56%, and demonstrating the quality of the pharmaceutical samples and the applicability of the method for the quality control laboratories. Moreover, the estimated potency were compared to the normocythaemic mice bioassay and to the RP-LC method, performed in parallel, showing

mean difference, respectively of $2.50\% \pm 1.07$ higher, and $9.29\% \pm 0.73$ lower, as shown in Table 5. The correlation between the methods was calculated by the Pearson's correlation coefficient, showing significant correlation with the bioassay ($r = 0.9629$) and with the RP-LC ($r = 0.9422$), in accordance also with the previously published data ^[17]. A current concern in the administration of recombinant derived proteins, is that presence of rhEPO related contaminants can have undesirable side effects and usually may have no or reduced activity. So, the proper quality controls were taken to ensure that the levels of such forms were accurately determined, according to the limits for pharmaceutical products.

Conclusion

The results of the validation studies show that the SE-LC method is sensitive with a LOQ of $1\mu\text{g/mL}$, accurate with a mean value of 101.07% , and possesses significant linearity ($r^2 = 0.9991$), and without any interference from the excipients. The separation was achieved with the retention time of 14.5 min, and the method has been successfully used for analysis of pharmaceutical formulations without albumin, improving the quality control with advantages, also, of lower time consumption related to the *in vivo* biological assay. Moreover, based on the correlation between the SE-LC and the normocythaemic mice bioassay, the combination of the validated physicochemical techniques employed, offered a high degree of resolving power and selectivity and is suggested as an alternative in the context of the 3R's, contributing to improve the quality control of rhEPO in pharmaceutical dosage forms.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), project 475029/2007-0 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

References

- [1] RamaKrishnan, R.; Cheung, W.K.; Wacholtz, M.C.; Minton, N.; Jusko, W.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 991-1002.
- [2] Gascón, P. Evaluating erythropoietic agents for the treatment of anaemia in the oncology setting. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2601-2612.
- [3] Ruifrok, W.T.; Boer, R.A.; Westenbrink, B.D.; van Veldhuisen, D.J.; vsn Gilst, W.H. Erythropoietin in cardiac disease: New features of an old drug. *European J. Pharmacol.*, **2008**, *585*, 270-277.
- [4] Krantz, S.B. Erythropoetin. *Blood* **1991**, *77*, 419-434.
- [5] Elliot, S.; Egrie, J.; Browne, J.; Lorenzini, T.; Busse, L. ; Rogers, N. ; Ponting, I. Control of rhuEPO biological activity : The role of carbohydrate. *Exp. Hematol.* **2004**, *32*, 1146-1155.
- [6] Parnham, M. J.; Schindler-Horvat, J.; Kozlovic, M. Non-Clinical Safety Studies on Biosimilar Recombinant Human Erythropoietin. *Basic Clin. Pharm. Toxic.* **2007**, *100*, 73-83.
- [7] Storring, P.L.; Gaines Das, R.E. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoetins. *J. Endocrinol.*, **1992**, *134*, 459-484.

- [8] Bristow, A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa*, **1997**, 2, 31-47.
- [9] Liefoghe, E.C.; Tiplady, R.; Gerson, P.; Lloyd, P.; Heath, A.; Bristow, A.F. A sialylation-sensitive cell-based in vitro bioassay for erythropoietin; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. *Biologicals*, **2005**, 33, 161-167.
- [10] Ramos, A.S.; Schmidt, C.A.; Andrade, S.S.; Fronza, M.; Rafferty, B.; Dalmora, S.L. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, 36, 1561-1569.
- [11] Barth, T.; Oliveira, P.R.; D'Avila, F.B., Dalmora, S.L. Validation of the normocythaemic mice bioassay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J. AOAC International*. **2008**, 91, 285-291.
- [12] EUROPEAN Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2008.
- [13] Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Intl. J. Pharm.* **1999**, 185, 129-188.
- [14] Longstaff, C.; Whitton, C.M.; Stebbings, R.; Gray, E. How do we assure the quality of biological medicines? *Drug Discov. Today*, **2008**, IN PRESS.
- [15] Bietlot, H.P.; Girard, M. Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1997**, 759, 177-184.

- [16] Lara-Quintanar, P.; Lacunza, I.; Sanz, J.; Diez-Masa, J.C.; de Frutos, M. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1153*, 227-234.
- [17] Barth, T.; Sangoi, M.S.; Silva, L.M.; Ferretto, R.M.; Dalmora, S.L. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **2007**, *30*, 1277-1288.
- [18] Gunturi, S.R.; Ghobrial, I.; Sharma, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin r-HuEPO aggregates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 213-221.
- [19] Luykx, D.M.A.M.; Dingemans, P.J.; Goerdal, S.S.; Jongen, P.M.J.M. High-performance anion-exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1078*, 113-119.
- [20] ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, **1997**.
- [21] Injac, R.; Boskovic, M.; Kocevar, N.; Vovk, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 150-161.

- [22] Dejaegher, B.; Heyden, Y.V. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 138-157.

Table 1. Inter-day and between-analysts precision data of SE-LC for rhEPO in pharmaceutical formulations

Sample	Day	Inter-day		Between-analysts		
		Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)	Analysts	Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)
	1	102.33		A	101.98	
1	2	105.06	1.72	B	103.61	1.36
	3	101.73		C	100.84	
	1	102.02		A	102.84	
2	2	104.40	1.23	B	103.70	1.06
	3	102.44		C	101.54	

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 2. Accuracy of SE-LC for rhEPO in pharmaceutical formulations

Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean concentration found ^a ($\mu\text{g/mL}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
20	20.15	1.28	100.73	0.75
25	25.27	1.25	101.10	1.08
30	30.41	0.71	101.37	1.36

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	Erythropoietin ^a (%)	RSD ^b %	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.45	97.45	1.47	0.50
	0.50	101.54	0.10	
	0.55	99.72	0.91	
Injection volume (μL)	30	98.18	0.79	50
	40	99.08	0.61	
	50	101.46	0.32	
Mobile phase pH	7.2	97.00	1.01	7.4
	7.4	101.31	0.75	
	7.6	99.86	1.44	
Solution stability	Autosampler 24 h	101.11	0.57	-
	2-8°C 24 h	100.55	1.02	-
	2-8°C 48 h	100.18	0.30	-

^aMean of three replicates.

^bRSD. = Relative standard deviation.

Table 4. Analysis of the rhEPO related proteins and aggregates forms in pharmaceutical dosage forms

Sample	SE-LC ^a			RP-LC ^a	
	Monomer (%)	Dimer (%)	HMM (%)	Main peak (%)	Deamidates/sulphoxides (%)
1	100.54	0.05	0.21	111.21	0.24
2	101.75	0.16	0.18	113.59	0.10
3	101.59	0.00	0.12	109.56	0.35
4	100.54	0.12	0.35	112.54	0.74
5	101.23	0.00	0.56	113.26	0.23
6	100.50	0.18	0.00	111.23	0.41
7	101.97	0.12	0.10	112.48	0.11
8	100.86	0.04	0.31	113.65	0.29
Mean	101.12	0.08	0.23	112.19	0.31
SD ^b	0.59	0.07	0.17	1.43	0.20

^aMean of three replicates.

^bSD = Standard deviation.

Table 5. Determination of the rhEPO potency in pharmaceutical dosage forms

Sample	SE-LC ^{a,b} (%)	RP-LC ^{a,b} (%)	Bioassay ^a	
			Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	102.50	112.30	100.21	75 – 139
2	102.71	111.91	99.85	68 – 145
3	99.83	108.25	97.50	71 – 138
4	102.75	112.20	100.11	79 – 129
5	105.40	113.65	102.90	81 – 152
6	98.45	108.55	96.55	69 – 144
7	101.22	110.14	97.54	68 – 139
8	103.32	113.48	101.50	74 – 131
Mean	102.02	111.31	99.52	-
SD ^c	2.16	2.09	2.17	-

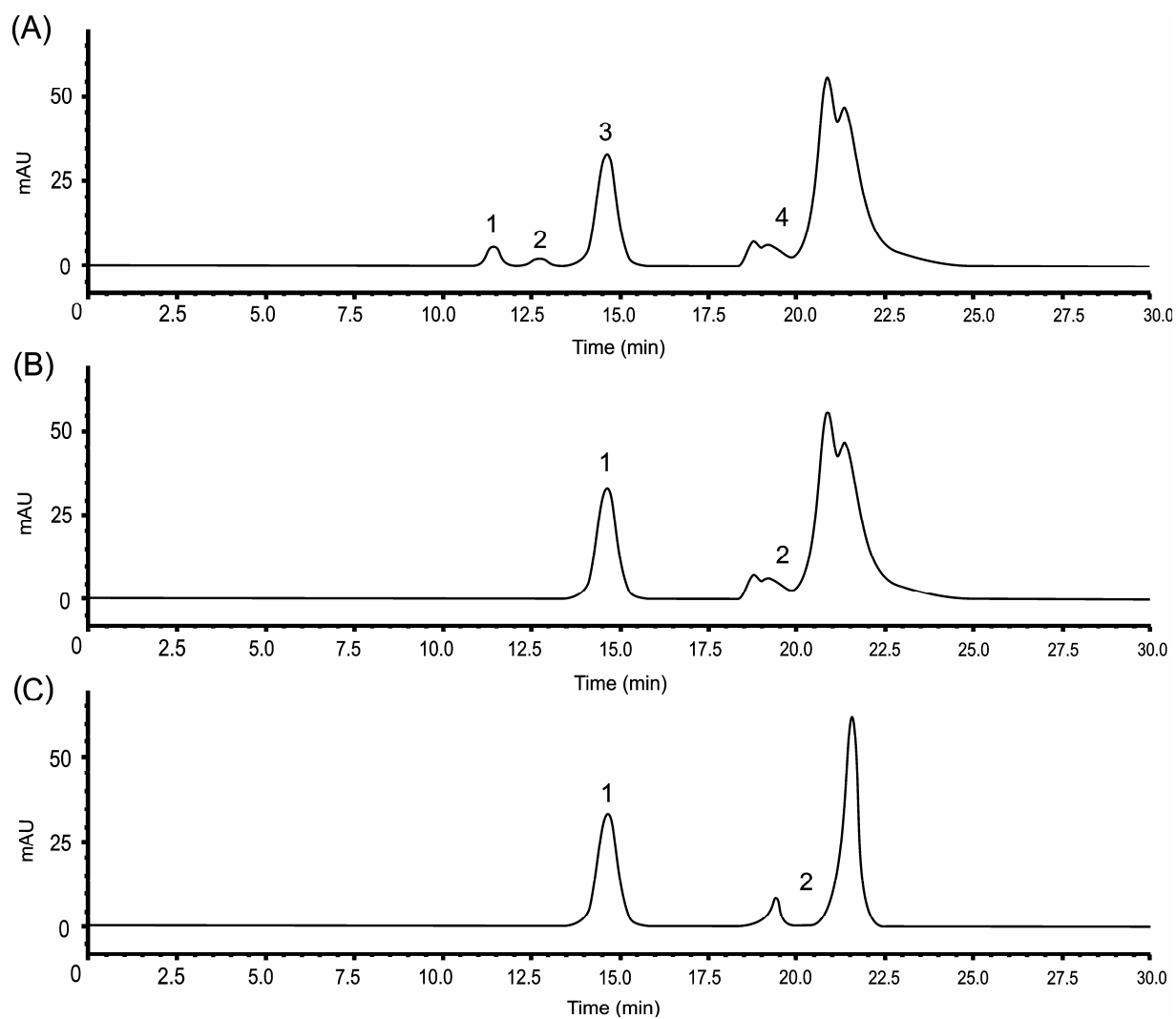
^aNon-significant difference (P > 0.05).

^bMean of three replicates.

^cSD = Standard deviation

Figure Caption

Figure 1. Representative SE-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Pharmaceutical formulations, Peak 1: aggregates, peak 2: dimer, peak 3 monomer and peak 4: excipients. (B) Pharmaceutical formulations, Peak 1: monomer and peak 2: excipients. (C) Reference substance: Peak 1: monomer and peak 2: excipients.



DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a expressão de glicoproteínas em células de mamíferos e a produção de biomoléculas de interesse terapêutico. Nesse contexto, são importantes os procedimentos para determinação da identidade, pureza e potência dos produtos biotecnológicos. Porém, diferentemente dos demais medicamentos é necessária a combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para a caracterização integral dessas biomoléculas de uso clínico.

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento por cromatografia líquida por exclusão molecular para a determinação de rhEPO em produtos farmacêuticos (**ARTIGO 3.1**). A separação do monômero foi alcançada com tempo de corrida de 30 minutos (figura 1), que poderia ser considerado alto, porém na correlação com o ensaio biológico, que tem duração de uma semana, e com o método por cromatografia em fase reversa, que apresenta tempo de corrida de 60 minutos, apresenta vantagens e justifica sua importância. A especificidade do método foi testada sob condições forçadas de degradação, e também, através da análise de amostra preparada somente com os excipientes, demonstrando a ausência de picos com o mesmo tempo de retenção de rhEPO. Os estudos com o detector de arranjo de diodos (DAD) mostraram o pico de rhEPO livre de picos co-eluídos, confirmando a especificidade do procedimento proposto para a análise de produtos farmacêuticos. O método apresentou regressão linear significativa, na faixa de concentração de 5 – 150 µg/mL ($r^2=0,9991$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV inferiores a 1,72%, o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na tabela 2, o valor médio experimental de 101,07%, confirmando exatidão significativa. Por sua vez, os valores calculados (ICH, 2005) para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 0,28 e 0,95 µg/mL, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade rhEPO na maioria das apresentações comerciais. O LQ encontrado experimentalmente, com CV menor que 5%, foi de 1 µg/mL. As potências obtidas na execução das análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto,

conforme demonstra a tabela 3. Por sua vez, os dados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005). Demonstrou-se portanto que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise de rhEPO em produtos acabados sem a presença de albumina de soro humano como excipiente da formulação.

Realizou-se a avaliação de potência de rhEPO por método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), previamente desenvolvido e validado por Barth et al. (2007). Efetuaram-se as análises em relação à Eritropoietina Humana Recombinante Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia (rhEPO-SBR), determinando-se também os teores de picos adicionais relativos aos desamidados e sulfóxidos. Os resultados foram expressos em percentagens em relação à potência declarada obtendo a média de 111,31% (tabela 5).

Os produtos farmacêuticos também foram submetidos ao ensaio biológico da contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos, fêmeas, da linhagem BALB/c, com administração de doses múltiplas do padrão e da amostra e contagem dos reticulócitos por citometria de fluxo, em relação à Eritropoietina Humana Recombinante Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia (rhEPO-SBR). Realizou-se avaliação de potência de rhEPO em produtos farmacêuticos, obtendo-se valores entre 96,55 e 102,90% com intervalos de confiança demonstrados na tabela 5. Esses dados estão de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 80 – 125% (EP., 2005). A precisão dos ensaios independentes calculada pela ponderação foi superior a 324.

Avaliou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e biológico nas amostras selecionadas. A potência encontrada por CL-EM foi comparada com o bioensaio em camundongos normocitêmicos e com CL-FR, apresentando diferenças médias de $2,50\% \pm 1,07$ maior e $9,29\% \pm 0,73$ menor, respectivamente. A correlação entre os métodos foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson, mostrando significativa correlação com o bioensaio ($r = 0,9629$) e com o CL-FR ($r = 0,9422$).

A rhEPO, matéria-prima, está descrita na literatura oficial (EP., 2005), porém nenhuma referência é feita para o produto acabado. Nesse sentido, foi validado método por cromatografia líquida por exclusão molecular, para determinação do monômero, dímeros e agregados de alta massa molecular. Além disso, destaca-se a correlação entre os resultados encontrados por CL-EM com o ensaio biológico da contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos e por cromatografia líquida em fase reversa. Dessa maneira,

sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos em combinação com o bioensaio, como alternativas que aprimoram a avaliação da macromolécula durante as etapas do processo de purificação e no controle da qualidade dos produtos farmacêuticos. Acrescenta-se também sua importância para os estudos de comparabilidade realizados no contexto de produtos biológicos similares, em conformidade com os avanços recomendados internacionalmente. Além disso, a execução de estudos sucessivos em produtos de uso terapêutico com as análises estatísticas de correlação, contribuirão para o estabelecimento dessas alternativas altamente recomendadas com base nos conceitos de redução, substituição e aprimoramento dos ensaios biológicos.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular, que se mostrou específico, preciso, exato e robusto para a avaliação de potência de rhEPO, bem como para determinação de dímeros e agregados de alta massa molecular, em produtos farmacêuticos sem albumina.
- ✓ Demonstrou-se que o método validado por cromatografia líquida por exclusão molecular forneceu resultados de potência, em média 2,50% superiores em relação ao ensaio biológico.
- ✓ Utilizou-se o ensaio por cromatografia líquida por fase reversa, encontrando valores, em média, 9,29% maiores, em relação ao método por CL-EM.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos por cromatografia líquida por exclusão molecular, em combinação com a fase reversa para avaliação de potência de rhEPO, como alternativa ao bioensaio em camundongos normocitêmicos, para o controle de qualidade dos produtos biotecnológicos.
- ✓ Contribuiu-se para o estabelecimento de procedimentos alternativos importantes para a caracterização de biomoléculas, com possível aplicação nos estudos de comparabilidade de produtos biológicos fundamentando estudos futuros de biosimilares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, p. 110-122, 2006.

ALLON, M. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin in patients undergoing dialysis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 72, p. 546-555, 2002.

BAILON, P.; BERTHOLD, W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 8, p. 352-356, 1998.

BARBONE, A. G. et al. Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 4, p. 515-522, 1994.

BARTH, T. et al. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p. 1277-1288, 2007.

BARTH, T. et al. Validation of the normocythaemic mice bioassay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. **Journal AOAC International**, v.91, p. 285-291, 2008.

BIETLOT, H.; P. GIRARD, M. Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 177-184, 1997.

BOSS, H. J.; WATSON, D. B.; RUSH, R. S. Peptide capillary zone electrophoresis mass spectrometry of recombinant human erythropoietin: an evaluation of the analytical method. **Electrophoresis**, v. 19, n. 15, p. 2654-2664, 1998.

BRASIL. Portaria n. 1.179 de 17 de junho de 1996. Determina a lista das denominações comuns brasileiras. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 116, p. 10707-10742, 18 de junho de 1996. Seção 1.

BRISTOW, A. F.; JEFFCOATE, S. L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: Report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. **Biologicals**, v. 20, p. 221-231, 1992.

BRISTOW, A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. **Pharmeuropa**, v. 2, p. 31-48, 1997.

BRISTOW, A.; CHARTON, E. Assessment of the suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining isoform distribution of erythropoietin. **Pharmeuropa**, v. 11, n. 2, p. 290-300, 1999.

BROWNE, J. K. et al. Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 693-702, 1986.

BUNN, H. F. New agents that stimulate erythropoiesis. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 868-873, 2007.

CATLIN, D. H. et al. Comparison of the isoelectric focusing patterns of darbepoetin alfa, recombinant human erythropoietin, and endogenous erythropoietin from human urine. **Clinical Chemistry**, v. 48, p. 2057-2059, 2002.

CHANG, C. -C.; KASS, L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 108, n. 1, p. 69-73, 1997.

CHE, F.-Y. et al. Characterization of derivatization of sialic acid with 2-aminoacridone and determination of sialic acid content in glycoproteins by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 20, n. 14, p. 2930-2937, 1999.

CHEUNG, W. K. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n. 4, p. 412-423, 1998.

CHEUNG, W.; MINTON, N.; GUNAWARDENA, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 411-418, 2001.

CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 687, p. 189-199, 1996.

CIFUENTES, A. et al. Capillary isoelectric focusing of erythropoietin glycoforms and its comparison with flat-bed isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 453-463, 1999.

COTES, P. M.; BANGHAM, D. R. Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at a reduced pressure. **Nature**, v. 191, n. 4973, p. 1065-1067, 1961.

CUMMING, D. A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. **Glycobiology**, v. 1, p. 115-130, 1991.

DALLE, B. et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3776-3782, 2001.

DALMORA, S.L. et al. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1753-1767, 2006.

DELORME, E.; LORENZINI, T.; GIFFIN, J. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. **Biochemistry**, v. 1, p. 9871-9876, 1992.

DEPAOLIS, A. M.; ADVANI, J. V.; SHARMA, B. G. Characterization of erythropoietin dimerization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 11, p. 1280-1284, 1995.

DERBY, P. L. et al. Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 47, n. 3, p. 201-208, 1996.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 37^a ed. Rio de Janeiro: JBM, 2008-2009.

DORDAL, M. S.; WANG, F. F.; GOLDWASSER, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. **Endocrinology**, v. 116, p. 2293-2299, 1985.

DUBE, S.; FISHER, J. W.; POWELL, J. S. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 17516-17521, 1988.

EDER, H.; ROBLENBROICH, B.; FAILING, K. A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. **Blut**, v. 59, p. 184-187, 1989.

EGRIE, J. C. et al. Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. **Immunobiology**, v. 172, p. 213-224, 1986.

EGRIE, J. C. et al. Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo biological activity than recombinant human erythropoietin (rHuEPO). **Blood**, v. 90, p. 56, 1997.

EGRIE, J. C.; BROWNE, J. K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 16, p. 3-13, 2001.

EGRIE, J. C. et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 290-299, 2003.

ELLIOTT, S. et al. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 1146-1155, 2004.

ENDO, Y. et al. Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosylated states as monitored by gel permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique. **Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 700-706, 1992.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

FAN, Q. et al. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. **Experimental Hematology**, v. 34, p. 1303-1311, 2006.

FANDREY, J.; FREDE, S; JELKMANN, W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia induced erythropoietin production. **Journal of Biochemistry**, v. 303, p. 507-510, 1994.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FERRAZOLI, C. R. P.; CESCÓN, E. M. B. Estudo preliminar comparativo entre reagentes hematológicos. **Laes & Haes**, p. 132-144, 1999.

FINNEY, D. J. **Statistical Methods in Biological Assay**. 3rd ed. London: Charles Griffin, 1978. 508 p.

FISHER, J. W. From the Elusive Hemopoietine to the anti-anemic drug rErythropoietin. In :____. **Erythropoietin: Molecular biology and clinical use**. Mountain Home : FP Graham Publishing Co, 2003. cap. 1, p. 19-18.

FUKUDA, M. N. et al. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 84-89, 1989.

GILG, D. et al. Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 71, p. 383-394, 1996.

GOKANA, A. et al. Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. **Journal of Chromatography A**, v. 791, p. 109-118, 1997.

GOLDWASSER, E.; KUNG C. K.-H.; ELIASON J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 13, p. 4202-4206, 1974.

GOODNOUGH, L. T.; SKIKNE, B.; BRUGNARA, C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. **Blood**, v. 96, p. 823-832, 2000.

GRIFFITHS, E. Polypeptide production by recombinant DNA technology. In:____ **Polypeptide and proteins drugs production, characterization and formulation**. England: Ellis Horwood Limited, 1991. cap. 5, p. 82-102.

GUNTURI, S. R.; GHOBRIAL, I.; SHARMA, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 213-221, 2007.

HALSTENSON, C. E. et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 50, n. 6, p. 702-712, 1991.

HAMMERLING, U. et al. In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1455-1469, 1996.

HAMMERLING, U.; SJÖDIN, L. In vitro cellular responses to cytokines and erythropoietin. **Toxicology In Vitro**, v. 12, p. 599-605, 1998.

HARRIS, J. M.; MARTIN, N. E.; MODI, M. Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 7, p. 539-551, 2001.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 214-221, 2003.

HAYAKAWA, T. et al. Simple *in vivo* bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. **Biologicals**, v. 20, p. 243-251, 1992.

HENDRIKSEN, C.; CUSSLER, K.; HALDER, M. ECVAM's role in the implementation of the three rs concept in the field of biologicals. In____: **Alternatives to animal experiments: progress made and challenges ahead**, v. 30, s. 2, p. 41-46, 2002.

HIGUCHI, M. et al. Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 7703-7709, 1992.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human use, “**Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**”, 2005.

IMAI, N. et al. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, v. 194, n. 2, p. 457-462, 1990.

JEFFCOATE, S. L. New biotechnologies: challenges for the regulatory authorities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 191-194, 1992.

JELKMANN, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (EPO) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEPO and NESP. **European Journal of Haematology**, v. 69, p. 265-274, 2002.

JELKMANN, W. Development in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents. **British Journal of Haematology**, v.141, p. 287-297, 2008.

JOLLING, K. et al. Mixed-effects modelling of the interspecies pharmacokinetic scaling of pegylated human erythropoietin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 465-475, 2005.

KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T. J. Agentes Hematopoiéticos: Fatores de crescimento, minerais e vitaminas. In:____. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 53, p. 1292-1296.

KAWAMURA, A. et al. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. **British Journal of Haematology**, v. 77, p. 424-430, 1991.

KAWASAKI, N. et al. Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of the site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin. **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 1, p. 82-91, 2000.

KITAMURA, T. et al. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. **Blood**, v. 73, p. 375-380, 1989.

KOCHENDOERFER, G. G. et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. **Science**, v. 299, p. 884-887, 2003.

KRANTZ, S. B. Erythropoietin. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 419-434, 1991.

LAMON, S. et al. Detection window of Darbepoetin-alfa following one single subcutaneous injection. **Clinica Chimica Acta**, v. 379, p. 145-149, 2007.

LACOMBE, C.; MAYEUX, P. Biology of erythropoietin. **Haematologica**, v. 83, p. 724-732, 1998.

LAI, P.-H.; EVERETT, R.; WANG, F.-F. Structural characterization of human erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 7, p. 3116-3121, 1986.

LARA-QUINTANAR, P. et al. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 227-234, 2006.

LASNE, F.; CEARRIZ, J. Recombinant erythropoietin in urine. **Nature**, v. 405, p. 635, 2000.

LASNE, F. et al. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine : differentiation of natural and administered recombinant hormones. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 119-126, 2002.

LIEFOOGHE, E. C. et al. A sialylation-sensitive cell-based in vitro bioassay for erythropoietin ; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. **Biologicals**, v. 33, p. 161-167, 2005.

LOCATELLI, F.; ROGER, S.; Comparative testing and pharmacovigilance of biosimilars. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p. 13-16, 2006.

LOPES, M. A. **Avaliação da potência biológica da eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos: Estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e Swiss Webster.** 2004. 73f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

LÓPEZ-SOTO-YARRITU, P. et al. Comparison of different capillary electrophoresis methods for analysis of recombinant erythropoietin glycoforms. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 1112-1118, 2002.

LOWRY, P. H.; KEIGHLEY, G.; BORSOOK, H. Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and mild substitution reactions. **Nature**, v. 185, p. 102-103, 1960.

LUKOWSKY, W. A.; PAINTER, R. H. Studies on the role of sialic acid in the physical and biological properties of erythropoietin. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 50, p. 909-917, 1972.

LUYKX, D. M. A. M. et al. High-performance anion-exchange chromatography combined with fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, p. 113-119, 2005.

MACDOUGALL, I. C. et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 2392-2395, 1999.

MACDOUGALL, I. C. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 16, p.14-21, 2001.

MACDOUGALL, I. C. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): A new Erythropoiesis-Stimulating Agent for the Treatment of Anemia. **Current Hematology Reports**, v. 4, p. 436-440, 2005.

MIRE-SLUIS, A. R. et al. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals**, v. 24, p. 351-362, 1996.

MIYAZAKI, Y. et al. Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukemia cell line, AS-E2. **Leukemia**, v. 11, p. 1941-1949, 1997.

MORIMOTO, K. et al. Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. **Glycoconjugate Journal**, v. 13, p. 1013-1020, 1996.

NARHI, L. O. et al. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23022-23026, 1991.

NEUSÜß, C.; DEMELBAUER, U.; PELZING, M. Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, p. 1442-1450, 2005.

PARNHAM, M. J.; SCHINDLER-HORVAT, J.; KOZLOVIC, M. Non-Clinical Safety Studies on Biosimilar Recombinant Human Erythropoietin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.100, p. 73-83, 2007.

RADEMACHER, T. W.; PAREKH, R. B.; DWEK, R. A. Glycobiology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 785 – 838, 1988.

RAMAKRISHNAN, R. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, p. 991-1002, 2004.

RAMOS, A. S. et al. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 11, p. 1561-1569, 2003.

RAPAPORT, S. I. **Introdução a Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1990. 450 p.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBELA, M. T. C. P. et al. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 103-126, 2006.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein pegylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 459-476, 2002.

ROGERIEUX, F. et al. Determination of the sialic acid linkage specificity of sialidases using lectins in a solid phase assay. **Analytical Biochemistry**, v. 211, p. 200-204, 1993.

RUDENSKY, B. Comparison of a semi-automated new Coulter methylene blue method with fluorescence flow cytometry in reticulocyte counting. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 57, n. 4, p. 291-296, 1997.

SANDBERG, S. et al. Within-subject biological variation of reticulocytes and reticulocyte-derived parameters. **European Journal of Haematology**, v. 61, n. 1, p. 42-48, 1998.

SANZ-NEBOT, V. et al. Separation of recombinant human erythropoietin glycoforms by capillary electrophoresis using volatile electrolytes. Assessment of mass spectrometry for the characterization of erythropoietin glycoforms. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5220-5229, 2003.

SANZ-NEBOT, V. et al. Capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for analysis of the novel erythropoiesis-stimulating protein (NESP). **Electrophoresis**, v. 26, p. 1451-1456, 2005.

SASAKI, H. et al. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 25, p. 12059-12076, 1987.

SASAKI, H. et al. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 27, p. 8618-8626, 1988.

SASAKI, R. Bioengineering of Recombinant Human Erythropoietin. In :____. **Erythropoietin: Molecular biology and clinical use**. Mountain Home : FP Graham Publishing Co, 2003. cap. 12, p. 309-310.

SCHMIDT, C. A. et al. Physico-chemical characterization and biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 4, p. 343-350, 2003.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHARPLES, E. J.; THIEMERMANN, C.; YAQOUB, M. M. Novel applications of recombinant erythropoietin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 184-189, 2006.

SKEHEL, J. J. et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 1779-1783, 1984.

SPIVAK, J. L.; HOGANS, B. B. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 90-99, 1989.

SPIVAK, J. L. The blood in systemic disorders. **The Lancet**, v. 355, p. 1707 – 1712, 2000.

STORRING, P. L. Assaying glycoprotein hormones – the influence of glycosylation on immunoreactivity. **Tibtech**, v. 10, p. 427-432, 1992.

STORRING, P. L.; GAINES DAS, R. E. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. **Journal of Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 459-484, 1992.

STORRING, P. L. et al. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. **British Journal of Haematology**, v. 100, p. 79-89, 1998.

SYTKOWSKI, A. J. et al. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced *in vivo* activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1184-1188, 1998.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, p. 12-20, 1998.

TAKEUCHI, M. et al. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 8, p. 3657-3663, 1988.

TAM, R. C. et al. Comparisons of human, rat and mouse erythropoietins by isoelectric focusing: differences between serum and urinary erythropoietins. **British Journal of Haematology**, v. 79, n. 3, p. 504-511, 1991.

THE UNITED States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: The United states Pharmacopeial Convention, 2007.

TRAN, A. D. et al. Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives. **Journal of Chromatography A**, v. 542, n. 2, p. 459-471, 1991.

TSUDA, E. et al. Comparative structural study of *N*-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. **Biochemistry**, v. 27, p. 5646-5654, 1988.

TSUDA, E. et al. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. **European Journal of Biochemistry**, v. 188, p. 405-411, 1990.

TSUJI, K. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and replaceable polymer-filled capillary electrophoresis for molecular mass determination of proteins of pharmaceutical interest. **Journal of Chromatography B**, v. 662, p. 291-299, 1994.

USP Dictionary of USAN and International Drug Names. 37th ed. Rockville: United States Pharmacopeia, 2006.

WATSON, E.; YAO, F. Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) glycoforms. **Analytical Biochemistry**, v. 210, n. 2, p. 389-393, 1993.

WEI, X. et al. Development and validation of a quantitative cell-based bioassay for comparing the pharmacokinetic profiles of two recombinant erythropoietic proteins in serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 666-676, 2007.

YU, P. H. et al. Automated reticulocyte counting – an evaluation of GEN-S, Cell-Dyn 3500 and Cell-Dyn 4000. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 21, n. 2, p. 145-147, 1999.

YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 350-357, 2005.

YUEN, C-T. et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. **British Journal of Haematology**, v. 121, p. 511-526, 2003.