

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

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE POTÊNCIA DE  
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE POR  
BIOENSAIO ALTERNATIVO E CORRELAÇÃO COM  
MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Renato Schutkoski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE POTÊNCIA DE  
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE POR  
BIOENSAIO ALTERNATIVO E CORRELAÇÃO COM  
MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS**

**Renato Schutkoski**

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**

**2012**

**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 Comparativa de Potência de Eritropoietina  
Humana Recombinante por Bioensaio Alternativo e  
Correlação com Métodos Físico-Químicos**

elaborada por  
**Renato Schutkoski**

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, 09 de agosto de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, iluminação, saúde e força para enfrentar os obstáculos;

ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, paciência, confiança, orientação e revisão crítica;

aos meus pais, Martinho Francisco Schutkoski e Odete Schutkoski, e minha irmã Natália Schutkoski, pelo amor, educação e incentivo na passagem de mais uma etapa;

à Luma Ionara Elsenbach, namorada e companheira, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão;

aos colegas, bolsistas e funcionários do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência pelo apoio, auxílio e amizade;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

à CAPES, pelo apoio financeiro;

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 COMPARATIVA DE POTÊNCIA DE ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE POR BIOENSAIO ALTERNATIVO E CORRELAÇÃO COM MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS**

AUTOR: RENATO SCHUTKOSKI

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de agosto de 2012.

A eritropoietina é uma sialoglicoproteína que promove o aumento da eritropoiese. Clinicamente é usada para o tratamento de anemias associadas à falência renal crônica. No presente realizou-se identificação e separação das isoformas de eritropoietina humana recombinante (rhEPO) em produtos biofarmacêuticos de diferentes origens, por focalização isoelétrica (IEF), seguida de imunodeteção, e também por ligação à lectina *Triticum vulgare*, demonstrando a presença de 4 a 7 isoformas, distribuídas na faixa de ponto isoelétrico de 4,4 a 5,2. Quantificou-se o conteúdo de ácido *N*-acetilneuramínico por cromatografia líquida por fase-reversa e detecção por fluorescência obtendo teores acima de 108,74 ng/μg. Avaliou-se a atividade biológica pelo bioensaio em camundongos normocitêmicos e pesquisou-se o ensaio alternativo baseado na cultura da linhagem celular TF-1 *in vitro*. Os resultados dos bioensaios apresentaram correlação significativa, conforme calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r = 0,9967$ ). Paralelamente, determinou-se o teor/potência dos produtos pelas metodologias validadas por cromatografia líquida por fase reversa e por exclusão molecular, que forneceram média de resultados 2,11% e 1,21% menores, respectivamente, em relação ao bioensaio *in vivo*. Submeteu-se amostra à degradação por luz UV para obter as formas desamidadas/oxidadas e tratamento a 65°C por 12 horas para as diméricas e agregadas. Efetuou-se a avaliação pelo bioensaio *in vivo* e *in vitro*, que apresentaram redução média de 14,05% e 32,87% respectivamente, em relação à molécula intacta. Desse modo, o ensaio biológico alternativo *in vitro*, pesquisado no contexto da redução ou substituição do uso de animais, e as avaliações de correlação entre métodos físico-químicos e biológicos, representam aprimoramentos aplicáveis para as etapas do processo de produção e para o controle de qualidade de rhEPO, contribuindo para garantir a consistência lote-a-lote da solução concentrada e dos produtos biológicos acabados.

Palavras-chave: Eritropoietina humana recombinante. Ácido siálico. Cromatografia líquida. Bioensaio em camundongos normocitêmicos. Cultura da linhagem celular TF-1.

## ABSTRACT

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

### COMPARATIVE POTENCY ASSESSMENT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN BY ALTERNATIVE BIOASSAY AND CORRELATION WITH PHYSICOCHEMICAL METHODS

AUTHOR: RENATO SCHUTKOSKI

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, August 09<sup>th</sup> 2012.

Erythropoietin is a sialoglycoprotein which promotes the increase of erythropoiesis. Clinically is used for the treatment of anaemia associated to chronic renal failure. Identification and separation of isoforms of recombinant human erythropoietin (rhEPO) in biopharmaceuticals of different origins, was carried out by isoelectric focusing (IEF) western blotting and, also by lectin binding with *Triticum vulgare*, showing 4-7 isoforms distributed in the isoelectric range of 4.4 to 5.2. N-acetylneuraminic acid content was quantified by reversed-phase liquid chromatography method with fluorescence detection giving values higher than 108.74 ng/μg. Biological activity was evaluated by the normocythaemic mice bioassay, and investigating the TF-1 cell line *in vitro*. The correlation of the results of both of the methods were significant, as calculated by the Pearson's coefficient ( $r = 0.9967$ ). In addition, the content/potency of the biopharmaceutical products was assessed by validated reversed phase and size exclusion liquid chromatography methods, showing mean values 2.11% and 1.21% lower, respectively, related to the *in vivo* bioassay. Sample was degraded under UV light to generate deamidate/sulphoxide forms and treatment at 65°C for 12 hours to produce dimeric and aggregated forms. The potencies were evaluated by the normocythaemic mice assay and the TF-1 cell culture assay giving mean reduction of 14.05% and 32.87%, respectively, related to the intact molecule. The alternative *in vitro* assay investigated in the context of the reduction or replacement of the animals, and the evaluation of the correlations between physicochemical and biological methods, represent improvements which can be applied to the production steps and for the quality control of rhEPO, contributing to ensure the batch-to-batch consistency of bulk and finished biological products.

Keywords: Recombinant human erythropoietin. Sialic acid. Liquid chromatography. Normocythaemic mice bioassay. TF1 cell culture.

## **LISTA DE TABELAS**

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

Table 1 – Comparative potencies evaluation of rhEPO in biopharmaceutical formulations, by normocythaemic mice bioassay and TF-1 proliferation bioassay. ....51

Table 2 – Comparative content/potencies determination of rhEPO, and content of sialic acid in biopharmaceutical formulations, by RP-LC and SE-LC methods.....52

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante, adaptada (GILG et al., 1996).....17

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura oligossacarídea de eritropoietina humana recombinante. (A) cadeia glicídica tetra-ramificada *N*-ligada; (B) cadeia glicídica *O*-ligada, com terminação de ácido *N*-acetilneuramínico, adaptada (SASAKI et al., 1987).....21

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

Figure 1 - Isoelectric focusing of rhEPO preparations: (A) Immunodetection with EPO-specific polyclonal antiserum; and (B) detection with labelled *Triticum vulgare* lectin. Lanes: Std. - Ph. Eur. BRP for EPO, 1.7 µg; Samples 1 - 9, 1.7 µg.....48

Figure 2 - RP-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Ph. Eur. BRP for Erythropoietin, Peak 1: EPO peak (B) Pharmaceutical formulation, Peak 1: EPO peak. (C) Stress of Pharmaceutical formulations with UV light, Peak 1: EPO peak, peak 2: deamidates/sulphoxides.....49

Figure 3 - Representative SE-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Ph. Eur. BRP for Erythropoietin, Peak 3: monomer (B) Pharmaceutical formulation, Peak 3: monomer and peak 4: excipients. (C) Stress conditions with temperature of pharmaceutical formulations, Peak 1: aggregates, peak 2: dimer, peak 3: monomer and peak 4: excipients.....50



## LISTA DE REDUÇÕES

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 <sub>máx</sub>	Concentração Máxima
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EC	Eletroforese capilar
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EP	Farmacopéia Européia
EPO	Eritropoietina humana
ESA	Peptídeo estimulador da eritropoiese
Fe	Ferro
G-CSF	Fator Estimulador da Colônia de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador da Colônia de Macrófagos
h	hora
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Albumina Humana
IEF	Focalização isoelétrica
Kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazóleo brometo
N	Nitrogênio
NESP	Nova proteína estimuladora da eritropoiese
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
O	Oxigênio
pI	Ponto isoelétrico
r	Coefficiente de correlação de Pearson
rhEPO	Eritropoietina humana recombinante
rhEPO – SBR	Eritropoietina humana recombinante Substância Biológica de Referência
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
°C	Grau celsius
µg	Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	29
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

A eritropoietina humana (EPO) é um hormônio glicoproteico produzido pelas células peritubulares do rim de adultos e fígado fetal ou neonatal de mamíferos. Promove aumento da eritropoiese por atuar nas células progenitoras eritróides da medula óssea estimulando sua proliferação, diferenciação, maturação e inibindo também a apoptose celular (TANG et al., 2007; FRIED, 2009).

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, o gene humano da EPO foi clonado e expresso em células de mamíferos, produzindo a eritropoietina humana recombinante (rhEPO). A rhEPO apresenta massa molecular de 30,4 kDa, dos quais 60% correspondem a cadeia polipeptídica com 165 aminoácidos, e aproximadamente 18,4 kDa, contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares. Apresenta três sítios de glicosilação N-ligados (Asn<sup>24</sup>, Asn<sup>38</sup> e Asn<sup>83</sup>) e um O-ligado (Ser<sup>126</sup>). Os carboidratos N-ligados têm resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico nas extremidades das cadeias glicídicas, conferindo carga negativa à molécula, que apresenta ponto isoelétrico (pI) entre 4,42 e 5,11 (EDER et al., 1989; CHOI et al., 1996). A glicosilação é um processo influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa, por fatores fisiológicos e condições de cultura. A composição de carboidratos pode ter diversas funções, entre as quais se incluem efeitos sobre a biossíntese e secreção, estabilidade e atividade biológica das moléculas (SASAKI, 2003). A análise dos carboidratos de rhEPO, produzidas em diferentes sistemas celulares de mamíferos, mostrou diferenças em sua composição, observando-se a presença de 5 a 8 isoformas, por focalização isoelétrica (IEF), devidas ao grau de glicosilação (GOKANA et al., 1997; STORRING et al., 1998).

A rhEPO é utilizada no tratamento de anemias em pacientes com falência renal e sob diálise, anemias associadas ao câncer, em pacientes com mieloma e anemia associada com uso de antirretrovirais para tratamento de HIV. Também tem sido usada em transplante de medula óssea e em doenças como a artrite reumatoide por aumentar a produção de hemácias (EGRIE; BROWNE, 2001; KAUSHANSKY; KIPPS, 2006).

A atividade biológica tem sido avaliada em camundongos normocitêmicos ou policitêmicos. No ensaio em camundongos normocitêmicos a contagem de reticulócitos é realizada por citometria de fluxo, observando-se variação de respostas de acordo com o protocolo de injeção (CHOI et al., 1996; RAMOS et al., 2003; BARTH et al., 2008). Os ensaios por cultura de células, primárias ou linhagens, têm sido pesquisados, necessitando

porém de estudos adicionais de validação e correlação com o ensaio *in vivo*, para se constituir em alternativa para avaliação de potência biológica (KITAMURA et al., 1989a; HAMMERLING; SJÖDIN, 1998; LIEFOOGHE et al., 2005).

Métodos físico-químicos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) têm sido utilizados para quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação de formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; AHRER; JUNGBAUER, 2006; BARTH et al., 2007). Por sua vez, a cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) tem sido usada para determinação da integridade das biomoléculas, possibilitando a avaliação de dímeros e agregados, que podem causar efeitos imunogênicos e alterar a 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 por exclusão molecular de rhEPO em produtos farmacêuticos (LARA-QUINTANAR et al., 2006; FERRETO et al., 2009).

Por sua vez, a combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos é necessária para completa caracterização desse produto biológico, devido à estrutura molecular complexa e suas isoformas, bem como as formas alteradas ou degradadas oriundas dos processos de produção e purificação (JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; DALMORA et al., 2009).

O presente trabalho teve por objetivos: a) efetuar análise de isoformas por eletroforese, transferência e ligação à lectinas; b) determinar o conteúdo de ácido siálico; c) avaliar a potência de rhEPO pelo ensaio biológico em camundongos normocitêmicos e pelo ensaio com a linhagem de células TF-1 *in vitro*; d) determinar o teor/potência por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular; e e) avaliar correlação entre os resultados dos métodos. Desse modo, pretende-se contribuir para aprimorar o controle da qualidade e avaliar alternativas no contexto da substituição, redução do uso de animais ou aprimoramento dos ensaios, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

A eritropoietina humana (EPO) é um membro da família de citocinas, que inclui hormônio do crescimento, prolactina, interleucinas 2 a 7, fator estimulador da colônia de granulócitos (G-CSF) e de macrófagos (GM-CSF) entre outras (BUNN et al., 2007). A eritropoietina liga-se ao seu receptor que é um polipeptídeo fosforilado transmembrana. O número de receptores varia durante a diferenciação da eritropoiese e sua ligação resulta na homodimerização do receptor, seguida da ativação de transdução de sinal de várias vias, como o sistema JAK2/STAT5, proteínas-G, canais de cálcio e quinases (TILBROOK; KLINKEN, 1999; NG et al., 2003).

A EPO é uma sialoglicoproteína com massa molecular de 30,4 kDa, composta por cadeia polipeptídica única constituída por 165 aminoácidos que correspondem 60% de massa molecular de aproximadamente 18,4 kDa. A massa adicional de 40% da molécula é constituída de carboidratos (CHOI et al., 1996 ; DERBY et al., 1996; SANZ-NEBOT et al., 2003; YU et al., 2005). Tanto a eritropoietina humana natural como a recombinante apresentam em sua estrutura três cadeias glicídicas *N*-ligados na Asparagina<sup>24,38,83</sup> e uma cadeia *O*-ligada na Serina<sup>126</sup> (BROWNE et al., 1986; EGRIE et al., 1986). A molécula apresenta carga negativa devido a presença de resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico nas terminações das cadeias glicídicas, conferindo-lhe ponto isoelétrico (pI) entre 4,4 e 5,1. Apresenta fórmula química C<sub>809</sub>H<sub>1301</sub>N<sub>229</sub>O<sub>240</sub>S<sub>5</sub> com duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições Cis<sup>7</sup>-Cis<sup>161</sup> e Cis<sup>29</sup>-Cis<sup>33</sup>. A Figura 1 mostra a estrutura primária da EPO, as pontes dissulfeto e as posições de ligação das cadeias glicídicas (GILG et al., 1996).

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a expressão e a clonagem do gene humano da EPO produzindo uma proteína com 165 aminoácidos. A molécula apresenta estrutura peptídica idêntica ao hormônio natural, atividade biológica equivalente, mas a composição de carboidratos é heterogênea (DORDAL et al., 1985; CHOI et al., 1996). O processamento pós-tradução por uma endopeptidase foi observado durante a secreção do hormônio natural com 193 aminoácidos, resultando na clivagem da sequência sinalizadora hidrofóbica de 28 aminoácidos da extremidade *N*-terminal (LAI et al., 1986; ELLIOT et al., 2004). A proteína madura final é intensamente glicosilada e possui peso molecular de, aproximadamente, 30,4 kDa, denominada eritropoietina humana recombinante - rhEPO.



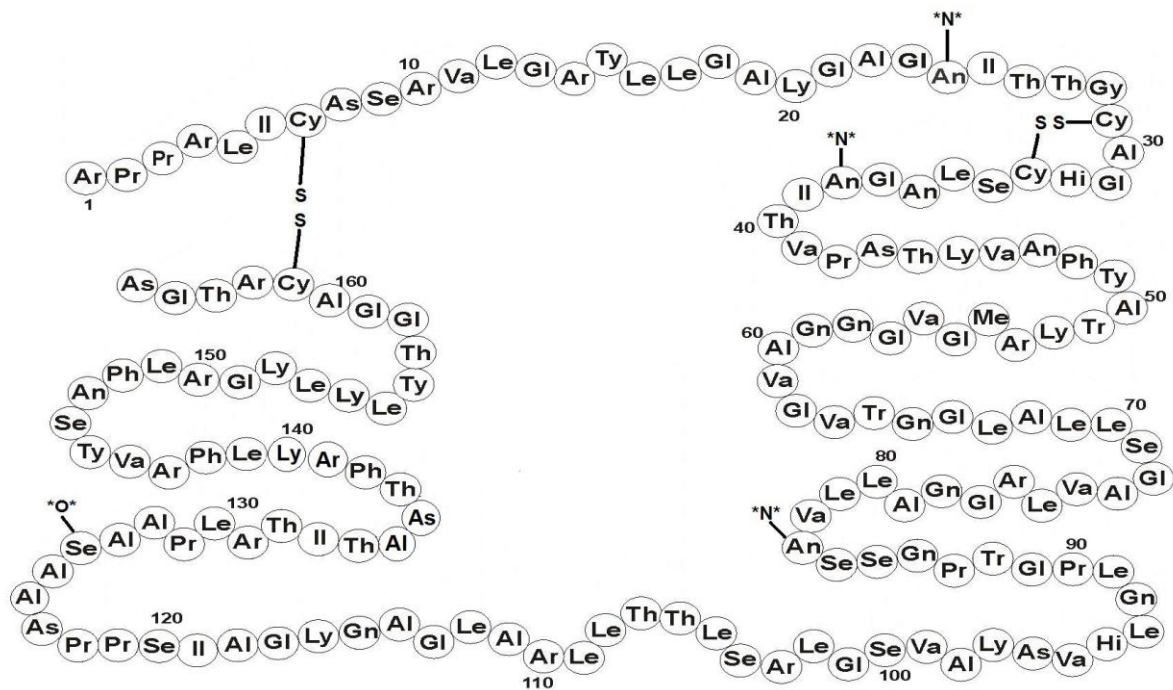


Figura 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante, adaptada (GILG et al., 1996).

Antes da disponibilidade da rhEPO, os tratamentos disponíveis para pacientes com anemia e insuficiência renal crônica eram a transfusão de sangue e a hemodiálise. Com base nos primeiros resultados em modelos animais, a EPO foi considerada candidata a terapia de substituição e foi disponibilizada para estudos clínicos. Os resultados desses ensaios possibilitaram a obtenção de licença como agente terapêutico em 1988, apenas três anos após sua expressão (ESCHBACH et al., 1987; ESCHBACH et al., 1989; NG et al., 2003).

Atualmente, a rhEPO é amplamente utilizada para o tratamento de anemias em pacientes com falência renal pré-diálise e sob diálise, causadas pela quimioterapia de câncer ou associadas com zidovudina na infecção pelo HIV, 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, da gravidez, da síndrome mielodisplástica e de doenças crônicas como a artrite reumatóide (FANDREY et al., 1994; CHEUNG et al., 1998; GOODNOUGH et al., 2000; KAUSHANSKY; KIPPS, 2006). Porém,

alguns efeitos adversos têm sido relatados, como o crescimento do tumor, complicações cardiovasculares, hipercalcemia e aplasia de células vermelhas (NG et al., 2003).

A partir da produção de rhEPO pela tecnologia do DNA recombinante, observou-se a necessidade de ensaios para avaliar a sua bioatividade. O ensaio biológico de potência foi desenvolvido com base na contagem de reticulócitos (eritrócitos imaturos, que correspondem ao último estágio da série eritróide da medula óssea) no sangue periférico. A atividade biológica tem sido realizada pelos ensaios biológicos em camundongos policitêmicos e normocitêmicos (BRISTOW et al., 1997). O ensaio em camundongos policitêmicos baseia-se na incorporação de  $^{59}\text{Fe}$  às células sanguíneas 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, 2011). 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; RAMOS et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003; BARTH et al. 2008; EP., 2011). 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).

Schmidt et al. (2003) otimizaram o ensaio biológico em camundongos normocitêmicos com injeção subcutânea única seguida da coleta da amostra de sangue 96 horas após. Observaram a necessidade da realização de, no mínimo, dois ensaios independentes para obter a precisão especificada.

Barth et al. (2008) validaram ensaio biológico 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. Demonstraram a precisão, exatidão, especificidade e robustez do ensaio.

No intuito de se reduzir o número de animais utilizados, aprimorar ou substituir o ensaio biológico *in vivo*, várias alternativas têm sido estudados, destacando-se os bioensaios por cultura de células. Kitamura et al. (1989a) estabeleceram e caracterizaram linhagem de células TF-1 demonstrando que o crescimento é dependente de três fatores hematopoiéticos, incluindo a eritropoietina. A célula poderia ser útil para análise de receptores humanos, sinais de tradução desses fatores ou em bioensaio a ser desenvolvido. Subsequentemente, Kitamura et al. (1989b) investigaram características biológicas e funcionais de receptores de EPO

expressos nas células TF-1. Demonstraram que a EPO estimula sua proliferação e que a ligação é específica e dependente da temperatura e do tempo.

Hammerling et al. (1996) realizaram bioensaio *in vitro* baseado na proliferação da linhagem eritróide TF-1, que foi adotada para avaliar a influência da micro-heterogeneidade dos carboidratos. Sugerem que o método descrito poderia ser adequado para a determinação de potência de formulações farmacêuticas.

Miyazaki et al. (1997) estudaram a linhagem AS-E2 eritropoietina dependente, proveniente de leucemia humana, sugerindo sua utilização para estudos de respostas moleculares e biológicas nas etapas finais de eritropoiese.

Grossi et al. (1998) observaram que a EPO regula a expressão do seu próprio receptor na linhagem celular TF-1 de eritroleucemia. Células mantidas em condições padrão com IL-3 conservam uma única classe de receptores de EPO. Por outro lado, cultura das células na presença de rhEPO apresentam número elevado de receptores e dois sítios de ligação com diferentes afinidades. Este modelo poderia ser adequado para a investigação da função de proteínas na regulação do número e afinidade dos receptores de EPO.

Wei et al. (2007) desenvolveram e validaram um ensaio por cultura de células da linhagem celular 32D dependente de IL-3 capaz de detectar anticorpos contra rhEPO.

Liefooghe et al. (2005) estudaram o ensaio de proliferação da linhagem AS-E2, incorporando etapa de incubação com a lectina *Erythrina crista-galli* que se liga à galactose em fase sólida, tornando sensível à de-sialilação, mimetizando a passagem hepática. Os resultados foram comparados com o ensaio *in vivo*, demonstrando que o ensaio *in vitro* possibilita prever a atividade de rhEPO.

Vários estudos determinaram a extensão e a micro-heterogeneidade da estrutura de carboidratos do hormônio natural e da recombinante, destacando-se suas cadeias glicídicas *N*-ligadas, nas quais os oligossacarídeos podem conter duas, três ou quatro ramificações, cada qual ramificação com uma molécula de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) na posição terminal, carregada negativamente. Considerando que cada um dos três oligossacarídeos *N*-ligados pode possuir até quatro resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico e a cadeia *O*-ligada dois, a molécula de EPO poderá ter, no máximo, quatorze resíduo de ácido siálico. Desta maneira a carga negativa líquida da molécula pode variar, devido à sua estrutura e número de moléculas de ácido siálico (SASAKI et al., 1988; TAKEUCHI et al., 1988; TSUDA et al., 1988; LASNE et al., 2002; YUEN et al., 2003; ELLIOTT et al., 2004). A figura 2 mostra representação esquemática adaptada dessas estruturas (SASAKI et al., 1987).

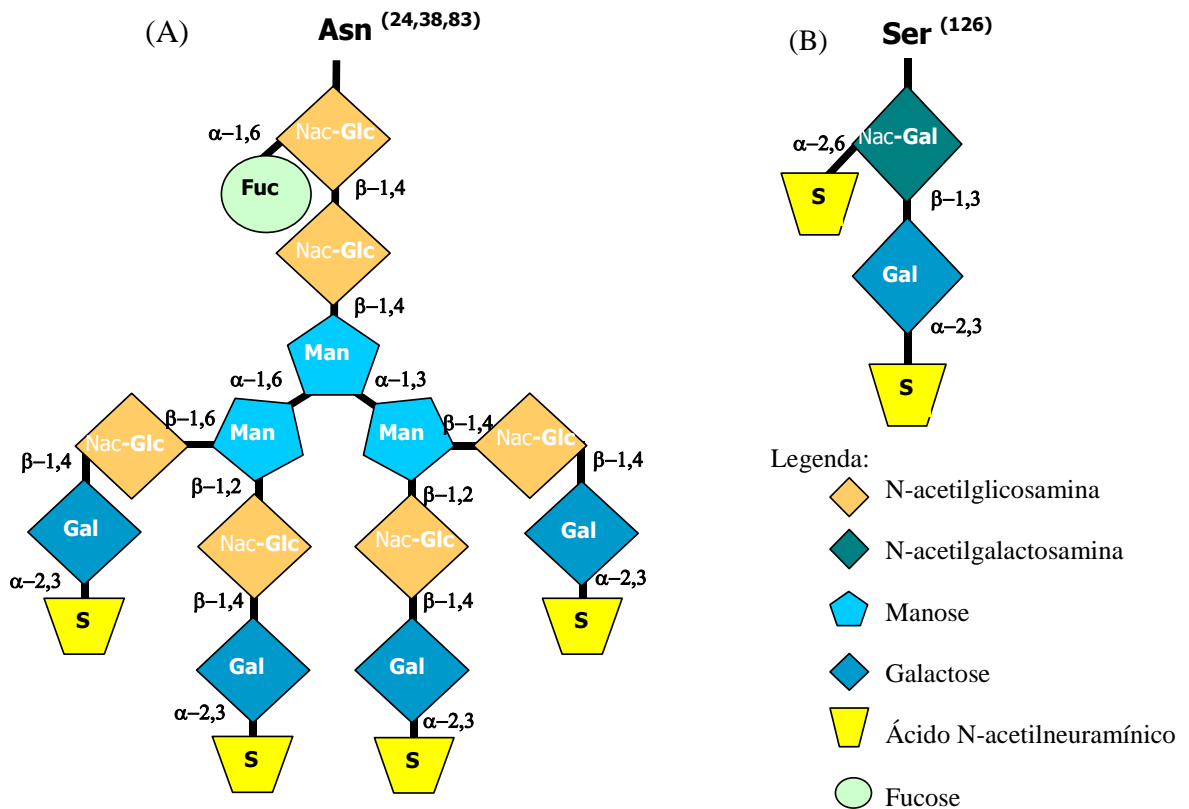


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura oligossacarídica de eritropoietina humana recombinante. (A) cadeia glicídica tetra-ramificada *N*-ligada; (B) cadeia glicídica *O*-ligada, com terminação de ácido *N*-acetilneuramínico, adaptada (SASAKI et al., 1987).

A composição de carboidratos pode ter diversas funções para diferentes glicoproteínas, as quais incluem efeitos sobre a biossíntese e secreção, estabilidade, conformação, proteção imunológica, solubilidade e atividade biológica das moléculas (SKEHEL et al., 1984; CUMMING, 1991). No caso específico da molécula de rhEPO, a presença de carboidratos mostrou ser 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; SASAKI, 2003). Várias pesquisas 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) e a sua remoção resultou em moléculas com elevada atividade *in vitro*, porém baixa atividade *in vivo*, devido à ligação ao receptor da glicoproteína de-sialilada no fígado (FUKUDA et al., 1989; SPIVAK; HOGANS, 1989; GRIFFITHS, 1991; CHOI et al., 1996).

Semelhante a outros hormônios glicoprotéicos, a EPO encontra-se como mistura de isoformas, diferindo principalmente em sua glicosilação que pode influenciar a atividade biológica e a imunoreatividade (GOKANA et al., 1997; STORRING et al., 1998).

As duas formas de rhEPO expressas em células de ovário de hamster Chinês (CHO) - EPOs  $\alpha$  e  $\beta$  - são as mais usadas em terapêutica. Porém observou-se que os lotes de EPO  $\alpha$  diferem significativamente da EPO  $\beta$ , principalmente, na distribuição de suas isoformas, na qual a EPO  $\alpha$  apresentou cinco componentes distintos com os mais básicos e ácidos presentes em menores concentrações, e os lotes de EPO  $\beta$  mostraram seis a sete componentes diferentes. A densitometria confirmou que a proporção de isoformas mais básicas (aquelas com pI equivalente ou maior do que o componente mais catódico) era significativamente maior na EPO  $\beta$  do que na  $\alpha$ . Não há registros de que a EPO  $\alpha$  difere da  $\beta$  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).

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.

Lectinas de plantas tem sido usada para determinar localização, isolar e purificar glicoconjugados em células animais, observando-se que interagem com alta afinidade com determinantes específicos, como o ácido siálico. Demonstraram que as interações do complexo com cadeias de oligossacarídeos ligados à asparagina, com leuco-aglutinina da lectina *Maackia amurensis*, são dependentes das ligações de ácido siálico. Além disso, não dependem das ramificações de resíduos de manose e nem da presença de sequências poli-N-acetil-glicosamina (WANG; CUMMINGS, 1988).

Schmidt et al. (2003) realizaram a caracterização de rhEPO provenientes de diferentes origens e sistemas celulares de expressão por lectinas. Os perfis obtidos foram comparados com os resultados de potência do bioensaio em camundongos normocitêmicos, demonstrando que os produtos com maior proporção de formas ácidas apresentavam maior atividade.

A técnica imuno-cromatográfica de afinidade com lectinas tem sido usada para detectar possíveis diferenças na glicosilação de uma glicoproteína, possibilitando um mapeamento dos sítios glicosilados de moléculas complexas e detectando pequenas alterações que permite distinguir, pelo comportamento cromatográfico, diferenças entre a EPO endógena e a recombinante (FRAGUAS et al., 2008).

O método por cromatografia líquida em fase reversa explora as propriedades hidrofóbicas das moléculas e em combinação com detecção no ultravioleta, têm sido amplamente utilizado 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., 2009).

Wilczynska et al. (2005) validaram método por cromatografia líquida em fase reversa (LC-FR) mostrando resultados satisfatórios para detectar e separar proteínas de alto peso molecular usados como estabilizantes, como a albumina humana, em diferentes amostras de rhEPO.

Barth et al. (2007) desenvolveram e validaram método por CL-FR demonstrando ser específico, preciso, exato e robusto para análise dos produtos farmacêuticos. Analisaram amostras por CL-FR e compararam os resultados com o bioensaio em camundongos normocitêmicos, obtendo média da potência estimada, 11,2% maior para o método cromatográfico. O método proposto, constitui-se em alternativa para o ensaio biológico, sendo aplicável para os processos de purificação, bem como no controle de qualidade de produtos biofarmacêuticos de rhEPO.

A determinação de ácido siálico em glicoproteínas foi realizada por cromatografia líquida em fase reversa e com detecção por fluorescência através de derivatização com o-fenilenodiamina. Desse modo separaram os ácidos N-acetil e N-glicolilneuramínico, presentes na porção terminal, em 20 minutos e os outros ácidos siálicos N- e O-acetilados em 40 minutos (ANUMULA et al., 1995).

A rhEPO é uma glicoproteína relativamente estável que permanece na forma monomérica, quando armazenada sob refrigeração. Sua integridade é rotineiramente monitorada por CL – EM (DEPAOLIS et al., 1995; DERBY et al., 1996).

Sytkowski et al. (1998) sugeriram a hipótese de que formas de EPO com tamanho molecular maior poderiam exibir meia-vida plasmática mais prolongada e, potencialmente, atividade biológica mais elevada. Neste sentido, produziram dímeros e trímeros por reações químicas da rhEPO monomérica. Realizaram caracterização por cromatografia líquida e executaram o bioensaio *in vivo* baseado no aumento do hematócrito de camundongos usando protocolos de injeção única e repetidas. Observaram aumento de 26 vezes na atividade das formas agregadas. Paralelamente, demonstraram aumento da atividade pelo ensaio baseado na incorporação de timidina-tritiada no baço de camundongos tratados com fenilhidrazina. Observaram também que os níveis plasmáticos da forma dimérica eram mais elevados, em relação ao monômero, após injeção intravenosa em coelhos. Concluíram que a exploração

desse modelo poderia contribuir para avanços na compreensão da biologia e farmacocinética do biofármaco, bem como, desempenhar importante função na terapêutica.

A formação de agregados de alta massa, em formas glicosiladas e deglicosiladas de rhEPO, após aquecimento, foi avaliada por CL-EM (ENDO, 1992). O aquecimento a 50°C em pH ácido originou agregados 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 CL – EM com 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.

Ferreto et al. (2009) desenvolveram e validaram metodologia por CL – EM em coluna BioSep-SEC-S-2000 com detecção a 214 nm, obtendo separação em 14,5 minutos. O método foi aplicado para análise de amostras de produtos biotecnológicos sem albumina (HSA), e avaliada correlação dos resultados com o bioensaio da contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos.

Por sua vez, 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.

A análise de rhEPO em formulações farmacêuticas tem sido efetuada, também, por eletroforese capilar (EC) permitindo inclusive observar diferenças qualitativas entre produtos (BIETLOT; GIRARD, 1997).

Kinoshita et al. (2000) realizaram estudos comparativos de glicofomas de sialoglicoproteínas por eletroforese capilar, sugerindo a viabilidade da metodologia para a avaliação da heterogeneidade de produtos glicoprotéicos. Já Sanz-Nebot et al. (2003) investigaram as condições experimentais empregando sistemas de eletrólitos voláteis para conseguir a separação e caracterização das glicofomas de EPO usando metodologias por EC, espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI-TOF-MS). Os dados demonstraram que proporcionou boa aproximação da massa molecular de EPO.

Yu et al. (2005) usaram metodologias por EC para a separação e detecção de eritropoietina e suas isoformas, demonstrando sua utilidade para o controle de doping. A quantificação das formas  $\alpha$  e  $\beta$  de rhEPO foi estudada por eletroforese capilar e análise multivariada dos dados de mobilidade eletroforética, sugerindo sua aplicação para os produtos farmacêuticos (BENAVENTE et al., 2006).

Zhang et al. (2009) desenvolveram um método por EC para análise da distribuição das isoformas da EPO alterando o condicionamento do capilar e removendo o polissorbato 80 presente nas formulações de EPO  $\alpha$ . O método apresentou melhor reprodutibilidade e precisão, em relação ao da Farmacopéia Européia sendo adequado para controle de qualidade. Metodologia por EC também foi pesquisado com detecção por fluorescência e aplicado para a forma  $\alpha$ , em amostras biológicas (SHEN et al., 2010).

Yanagihara et al. (2010) analisaram quantitativamente a distribuição das isoformas de rhEPO por metodologia de EC e correlacionaram com a bioatividade *in vivo*. Apesar de os resíduos de ácido siálico serem críticos para a bioatividade *in vivo* da rhEPO, os resultados indicaram que a bioatividade das subfrações rhEPO não foi correlacionado com o nível de sialilação das isoformas, devido, provavelmente, a complexidade da estrutura de carboidratos dessa molécula.

Giménez et al. (2011) pesquisaram método por eletroforese capilar acoplado com espectrometria de massas MALDI-TOF para análise de O e N-glicopeptídios de rhEPO, demonstrando que pode constituir-se em modelo para mapeamento de glicoproteínas complexas como a rhEPO. Do mesmo modo, Giménez et al. (2012) adotaram eletroforese capilar acoplada com espectrometria de massas MALDI-TOF para detectar e caracterizar variedade de O e N-glicopeptídios de rhEPO e obter as massas moleculares exatas. Concluem que o modelo poderia ser adotado para análise de rhEPO em matriz biológica.

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; LOCATELLI et al., 2006, ; DALMORA et al., 2009). Porém, o desenvolvimento de métodos de análise direta de rhEPO em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida de alta eficiência apresenta 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 do plasma



humano (BIETLOT; GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006; FERRETO et al., 2009).

Cheung et al. (1998) avaliaram a farmacocinética e a farmacodinâmica da rhEPO em humanos por via subcutânea após administração de dose única ou múltiplas. 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. Ramakrishan et al. (2004) estudaram a farmacocinética e a farmacodinâmica em voluntários sadios 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.

Halstenson et al. (1991) avaliaram a farmacocinética e farmacodinâmica das EPOs  $\alpha$  e  $\beta$  em voluntários sadios do sexo masculino após a administração de doses pelas vias intravenosa e subcutânea. A EPO  $\beta$  apresentou tempo de meia-vida 20% superior ao da  $\alpha$  após administração intravenosa, bem como, maior contagem absoluta de reticulócitos após administração subcutânea. Essas diferenças podem ser oriundas da composição variável de carboidratos.

O desenvolvimento da forma conjugada de diferentes proteínas e peptídios, incluindo a rhEPO, com polietilenoglicol apresentou maior atividade e melhores parâmetros farmacocinéticos nos estudos em ratos (HARRIS; CHESS, 2003). A forma monopeguilada foi preparada a partir da expressão de análogos contendo resíduos de cisteína como alvo. Com base na avaliação da atividade e dos parâmetros farmacocinéticos em ratos é sugerida a viabilidade do modelo sitio-específico, inclusive para estudo de outros polímeros (JOLLING et al., 2005). Um peptídio dimérico foi sintetizado e conjugado com polietilenoglicol. Submetido à análises pré-clínicas, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos e imunoensaios, demonstrando-se sua atividade eritropoiética com meia-vida prolongada e redução da eliminação renal, e possíveis vantagens terapêuticas (FAN et al., 2006).

Egrie e Browne (2001) desenvolveram um análogo hiperglicosilado da rhEPO, uma nova proteína estimuladora da eritropoiese (NESP), a Darbepoetina  $\alpha$ , com massa molecular de aproximadamente 38,5 kDa. Apresenta cinco cadeias de carboidratos N-ligadas, ou seja, duas a mais que a rhEPO. Possui meia-vida três vezes superior e atividade biológica aumentada em relação a rhEPO. A cromatografia líquida combinada à espectrometria de

massa permite evidenciar a diferença estrutural desta molécula (EGRIE et al., 2003; LAMON, et al. 2007).

Catlin et al. (2002) compararam experimentalmente os perfis de focalização isoelétrica da darbepoetina  $\alpha$ , rhEPO e eritropoietina de urina humana, observando os padrões de migração e pIs. A darbepoetina  $\alpha$  apresentou quatro isoformas determinantes na região acídica, com a densidade aumentando da banda menos para mais ácida. Foi detectada na urina dos pacientes com o mesmo perfil, demonstrando a possibilidade de identificar rhEPO e darbepoetina  $\alpha$  na urina após tratamento. Metodologia por eletroforese capilar foi adaptada para separação de isoformas pela otimização do pH e utilizando detecção por espectrometria de massas MALDI-TOF, sendo o método sugerido para o controle da qualidade e anti-doping (SANZ-NEBOT et al., 2005).

Já Dehnes et al. (2010) validaram metodologia usando colunas de imunoafinidade, que é importante para detectar rhEPO em amostras de urina.

A Farmacopéia Européia 2011 (EP, 2011), 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 os intervalos de confiança (P=0,95) de 64 – 156%. A Farmacopéia Americana (USP 35, 2012) não faz referência à rhEPO.

## **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**

---

### **3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**

---

3.1 – SCHUTKOSKI, R.; SOUTO, R. B.; CALEGARI, G. Z.; ELSENBACH, L. I.; PORTO, L. P.; DALMORA, S. L. Comparative Potency Assessment of Recombinant Human Erythropoietin by Alternative Bioassay and Correlation with Physicochemical Methods. Artigo a ser publicado.

## **Comparative Potency Assessment of rhEPO by Alternative Bioassay and Correlation with Physicochemical Methods**

Renato Schutkoski<sup>b</sup>, Ricardo Bizogne Souto<sup>b</sup>, Guilherme Zanini Calegari<sup>b</sup>, Luma Ionara Elsenbach<sup>a</sup>, Larissa Pereira Porto<sup>a</sup> and Sérgio Luiz Dalmora<sup>a\*</sup>

*Department of Industrial Pharmacy<sup>a</sup> and Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences<sup>b</sup>, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

\*Corresponding author. Tel./fax: + 55 55 32208952

*E-mail address:* [sdalmora@terra.com.br](mailto:sdalmora@terra.com.br) (Sérgio Luiz Dalmora)

**Abstract:**

Biotechnology-derived erythropoietin is a sialoglycoprotein which stimulates the erythropoiesis, clinically used for the treatment of anemia associated with chronic renal failure. N-acetylneuraminic acid content was quantified by reversed-phase liquid chromatography method with fluorescence detection giving values higher than 108.74 ng/μg. The alternative *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay was studied showing a lower mean difference of the estimated potencies of 2.67% compared to the normocythaemic mice bioassay, with non-significant difference, as calculated by the Student's t-test ( $p > 0.05$ ). Biopharmaceutical products were analyzed by validated reversed-phase and size-exclusion liquid chromatography methods and compared to the normocythaemic mice bioassay, showing mean content/potencies 2.11 and 1.21%, lower, respectively. Bioactivity of deamidates/sulphoxides and of dimmers/aggregates demonstrated mean reduction of 14.05% and 32.87%, respectively. The TF-1 *in vitro* assay represents an advance that can be used in combination with the normocythaemic mice bioassay and physicochemical methods, contributing to establish alternatives to be applied during the biotechnology steps and for the quality control, assuring the therapeutic efficacy.

**Keywords:** Recombinant human erythropoietin, Normocythaemic mice bioassay, TF1 cell culture, Sialic acid, liquid chromatography.

## 1. Introduction

Erythropoietin (EPO) is the main regulator of human erythropoiesis. The human erythropoietin produced by recombinant technology (rhEPO) is now marketed world-wide for the treatment of anaemia associated with chronic renal failure, cancer chemotherapy, and AIDS (1, 2).

The sialoglycoprotein hormone 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. About 40% of the fully glycosylated EPO molecule consists of carbohydrate. These play an important role in determining the biological activity, which appears to be dependent upon the number of sialic acid residues at the termini of the tri- and tetra-antennary sugar chains (3, 4).

Currently the potency of rhEPO biotechnology-derived products is assessed by *in vivo* bioassays, which measure relevant biological activity in polycythaemic or normocythaemic mice (5). The normocythaemic mice bioassay has been performed in normal animals using single or multiple daily injection protocols, collecting the blood on the 5<sup>th</sup> day, and counting the reticulocytes by flow cytometry (6).

The *in vitro* cell culture bioassay has been investigated using the factor-dependent erythroleukemia cell line TF-1 (ATCC CRL-2003) established and characterized showing the proliferation dependency on three hematopoietic factors including erythropoietin. The binding was specific, time- and temperature-dependent, saturable and rhEPO upregulates the expression of its own receptor (7-9). The cell line TF-1 was used for potency assessments of rhEPO and the results were balanced against quantitative densitometry analyses of the isoforms, separated by two dimensional electrophoresis (10). The human AS-E2 Epo-dependent cell line was used in a sialylation-sensitive bioassay showing that correlates with the *in vivo* polycythaemic mouse assay (11).

Several biotechnology laboratories are producing rhEPO for clinical purposes by the expression of EPO in Chinese hamster ovary (CHO) or baby hamster kidney (BHK) cells (12, 4). The two main forms, epoetin alfa ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ), possesses similar isoelectric patterns (both have a pI in the range 4.4-5.1), although the isoelectric focusing (IEF) demonstrated that epoetin  $\beta$  contain a wider spectrum of isoforms, with a greater proportion of more basic isoforms than epoetin  $\alpha$ . Isoform heterogeneity may introduce different biological activity, pharmacokinetic and immunogenic characteristics. However, there are no reports that epoetin  $\alpha$  differs from epoetin  $\beta$  in its clinical efficacy (13, 14). Although differences in isoforms composition have usually been investigated using IEF or capillary electrophoresis, the carbohydrate-binding properties of lectins, specific for different areas of the glycan chains, can also be used to discriminate between them (15, 16). The interaction between lectins and glycoproteins it is depending on the reaction conditions and the affinity and avidity, and this may be the reasons for the different interactions reported between EPOs and a particular lectin (17)

The dependence of the *in vivo* activity of EPO upon the number of terminal sialic acids residues on the glycan chains has been recognized and the content was estimated by capillary zone electrophoresis indicating that the N-glycan moieties as well as sialic acid have a significant impact on *in vivo* bioactivity (4). The sialic acids were also determined in glycoproteins by reversed-phase liquid chromatography method with a sensitive fluorescence detection with o-phenylenediamine derivatization, separating the N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids with 20 minutes and the other N- and O-acetylated sialic acids were separated in 40 minutes (18).

Many analytical techniques have been reported as potential alternative methods for determining the content/potency of biotechnology-derived glycoproteins. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) exploits the hydrophobic properties of the biomolecules in



the separation process and offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants which may have reduced activity and altered immunogenicity (19, 20). A linear gradient RP-LC method using a C<sub>4</sub> column and UV detection at 280 nm was validated for the analysis of rhEPO in biopharmaceutical formulations and the results compared to the bioassay showing differences 11.2% higher for the LC method (21). An isocratic size exclusion (SE-LC) method was validated for the determination of rhEPO in formulations without serum albumin, using a BioSep-SEC-S 2000 column and detection at 214 nm (22). Physicochemical techniques cannot yet predict the biological activity of rhEPO, but can produce information about structure and composition and are used to monitor content, purity, and chemical stability. No single technique can provide sufficient information about the glycoprotein. Thus a combination of physicochemical, immunological, and biological methods is recommended (23, 24).

The aim of this article was to assess the potency/content of rhEPO by the normocyaemic mice bioassay and the *in vitro* TF-1 cell culture assay; to perform validated reversed-phase and size-exclusion LC methods and to correlate the results to the bioassays, and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of the related and aggregated proteins, thus contributing to the study of alternatives in the context of the 3Rs, to improve quality control and to assure the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals and reagents*

European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for erythropoietin (250 µg/32,500 IU/vial) was obtained from the European Directorate for the

Quality of Medicines – EDQM (Strasbourg, France). A total of nine batches of pharmaceutical products were obtained from commercial sources and used within their shelf life period. Acrylamide, BIS-acrylamide, ampholytes pH range 2.5-6.5, sucrose, riboflavin, N,N,N1,N1-tetramethyl-ethylenediamine were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). O-phenylenediamine and Lectins *Triticum vulgare* were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetrahydrofuran, phosphoric acid, 1-butylamine, acetonitrile and trifluoroacetic acid HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Reagents for automated reticulocytes counting were from HORIBA ABX Diagnostics (Montpellier, France) For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA). All other chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade.

## 2.2. Apparatus

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, an LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, a DGU-14A degasser, an SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and an SPD-M10A<sub>VP</sub> PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.14 software program.

## 2.3. Samples and standard solutions

Working standard and sample solutions of rhEPO were prepared daily by diluting the *Ph.Eur. BRP for rhEPO* and the samples of biotechnology-derived formulations in water, to a final concentration of 33.6 µg/mL, for the LC methods, and in phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, to 600 IU/mL for the *in vivo* bioassay and, in water for injection to 10 IU/mL for the *in vitro* bioassay.

### *2.3.1. Degradation of sample solutions*

Sample solutions of rhEPO containing 33.6 µg/mL were subjected to 65°C temperature for 10 hours to obtain dimmers/aggregate forms and, photodegradation was induced by exposing in a photostability chamber to 200 Wh m<sup>-2</sup> of near ultraviolet light for 12 hours to obtain deamidates/sulphoxides, identified respectively, by SE-LC and by RP-LC.

## *2.4. Methods*

### *2.4.1. Isoelectric focusing (IEF) and Lectin Blotting*

IEF was performed by polyacrylamide slab gel electrophoresis on a Vertical Gel Bio-Rad (Bethesda, USA), as described (13). Briefly, 1.5 mm thick slab gels (17x13 cm) contained 7.36% (w/v) acrylamide, 0.23% (w/v) BIS-acrylamide, 15% (w/v) sucrose, 0.0002% (w/v) riboflavin, 0.028% (v/v) N,N,N1,N1-tetramethyl-ethylenediamine and 2.5% (v/v) ampholyte pH range 2.5-6.5. The cathode buffer and anode buffer consisted of 20 mmol/l sodium hydroxide and 10 mmol/l phosphoric acid, respectively. Sucrose was added to the rhEPO samples to reach a final concentration of 20% and 1.7 µg loaded per well. The gel was run overnight at a constant 340 V and, the following morning transferred onto a nitrocellulose membrane, that was boiled for 6 min in PBS buffer (50 mM Tris + 0.15 M NaCl, pH 7.5). The membrane was blocked in 3% (w/v) BSA (dissolved in PBS-Tween 20, 0.3%) and incubated for 6 hours with selected biotinylated lectin (1:100 dilution) in blocking buffer. This was followed by a 3 times washing with PBS and by a 1-h incubation with peroxidase-conjugated Avidin Dako (Glostrup, Denmark) (1:5000). Colour was developed using substrate containing 10 mg of chloronaphthol Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 5.5 ml of methanol, 17 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 27.9 ml of PBS buffer.

#### 2.4.2. Normocythaemic Mice Bioassay

The assay was carried out as previously published (6). 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 color 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 (27), by parallel line methods (3 x 3), using PLA 2.0 software (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany).

#### 2.4.3. *In vitro* TF-1 cells

The bioassay was performed and partially validated based on the growth-promoting activity of the factor-dependent cell line TF-1 (ATCC CRL-2003) described elsewhere (7-9). The cells were maintained in culture medium RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). In addition 3 ng/mL of interleukin-3 Sigma-Aldrich was included in the culture medium for cell proliferation in 75 cm<sup>2</sup> flasks for 5 days, seeding at approximately  $2.0 \times 10^5$  cells/mL. The assay was designed as a parallel line test, the cells were seeded in 96-well cell culture plates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density  $1.5 \times 10^5$  cells/mL ( $3 \times 10^4$  cells/well) and dosed on seeding with three or four concentrations with two fold dilutions series, between 0.10 - 0.80 IU/mL of rhEPO, in

triplicate. The Ph. Eur. BRP for rhEPO was used as standard and the negative control was RPMI 1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for a minimum of 48 h. Then 25 µL/well of MTT solution (5 mg/mL) was added and the plates were incubated for a further 5 h. Following the addition of 100 µL/well of sodium dodecyl sulphate (240 mg/mL) overnight, the absorbance was assessed at 570 nm, using microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

#### 2.4.4. *In vitro* cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere (25), based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of rhEPO. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and positive and diluents controls were included in the assay together with Ph. Eur. BRP EPO solution. The NRU assay was performed on 96-well microplates, maintained at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator for 24 h, with a cell suspension density of approximately  $2 \times 10^5$  cells/mL. Neutral red release was evaluated by the addition of an extractant solution, and the absorbance was measured at 540 nm.

#### 2.4.5. RP-LC analysis of OPD Sialic acid derivatives

The analysis was performed as previously published (18), adapted. The hydrolysis and derivatization was performed using the Reference substance and Samples mixed with 0.1 ml of 0.5 M NaHSO<sub>4</sub> in 1.6-ml screw-cap freeze vials and capped tightly. The vials were then heated at 80°C (Reacti-Therm heating block, Pierce) for 20 min and allowed to cool to ambient temperature. Then, was mixed with 0.1 ml of the OPD reagent (20 mg/ml in 0.25 M NaHSO<sub>4</sub>) and capped tightly, and heated again at 80°C for 40 min. After cooling to ambient

temperature, the samples were brought to 1.0 ml with HPLC solvent A and mixed vigorously on the vortex mixer. The vials were spun in a microcentrifuge at 3.000 rpm for 5 min. to obtain the supernatants for the analysis.

The following settings were used on the RF-10AXL spectrofluorometric detector: excitation wavelength, 230 nm; emission wavelength, 425 nm; photo multiplier tube gain, 14; lamp, 2.5 W; response time, 1000 ms. Excitation and emission maxima for the sialic acid derivatives were determined by trapping the peak in the flow cell and observing its intensity change as a function of wavelength. The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 Å). A security guard holder (4.0 mm x 3.0 mm i.d.) was used to protect the analytical column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25°C), and run at a flow rate of 1.0 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.15% 1-butylamine, 0.5% phosphoric acid, and 1% tetrahydrofuran (BHT inhibited) and mobile phase B consisted of 50% mobile phase A in acetonitrile (50:50, v/v). The common N-acetyl- and N-glycolyneuraminic acid derivatives were eluted isocratically with either 13% solvent B for 25-cm column. The mobile phases were filtered through a 0.22 μm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 400 μL for both standard and samples.

#### 2.4.6. Reversed-Phase Chromatography (RP-LC)

The assay was carried out as described elsewhere (21). The detector was set at 280 nm for reverse phase, and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.14 software program. The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) and C<sub>4</sub> Kit Security Guard Cartridges was used to protect the analytical

column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25°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 injection volume was 50 µL for both standard and samples.

#### *2.4.7. Size-exclusion liquid chromatography (SE-LC)*

The experiments were performed as described elsewhere (22) on a size exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300mm x 7.8mm 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 consisting of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M dibasic sodium phosphate, and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, run at a flow rate of 0.5 mL/min., and using PDA detection at 214 nm., The temperature of the autosampler was kept at 5° C and the injection volume was 50 µL for both standard and samples.

### **3. Results and discussion**

SDS-PAGE of nine samples of rhEPO followed by western blotting with a EPO-specific anti-serum revealed the same general pattern with a single diffuse band in the molecular weight range 30-40 kDa. The isoform compositions were revealed by IEF after immunoblotting (panel A) showing the number of components varying from 4 to 7, with the proportion and position of the isoforms differing between preparations (Fig.1). Probing of the IEF blots with lectins (panel B) showed isoforms containing terminal sialic acid linked to N-

Acetylglucosamine and this was clearly detected with biotinylated *Triticum vulgare*. It was particularly evident that samples 2 and 9 contained the most basic isoforms and fewer acidic components. Visual inspection showed that these samples had a higher number of sialic acid-containing isoforms, staining more densely, and a greater proportion of biantennary glycan forms relative to the more acidic samples.

Apart from being essential for normal cellular secretion, intact carbohydrate moieties protect EPO from a rapid degradation *in vivo* (16). Then, a correlation of an *in vitro* stimulatory effect of rhEPO to its potency *in vivo* requires information about the carbohydrate configuration. Notably, the sialic acid residues provide a limited proportion of the rhEPO molecular weight but confer acidic properties and, considerable charge heterogeneity. The content of sialic acid was assessed by RP-LC after OPD derivatization giving concentrations higher than 108.74 ng/ $\mu$ g, meeting the specifications of minimum of 10 mol of sialic acid per mole of rhEPO, equivalent to 101 ng/ $\mu$ g (5). Desialylation results in complete loss of biological activity. The results cannot be only directly correlated to the bioactivity but the content assessment is necessary to assure the quality and therapeutic efficacy.

The potency of rhEPO was assessed by the *in vivo* normocythaemic mice bioassay and the *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay based on the dose-dependent growth curve of the cells, measuring the responses with MTT. The statistical analysis of the assay data was performed by a parallel line method, which gave the values shown in Table 1 with mean differences of 2.67%  $\pm$ 0.77, related to the normocythaemic mice bioassay, with significant correlation as calculated by the Pearson's coefficient (R=0.9967). The *in vitro* assay was previously suggested for the potency assessment of biopharmaceutical formulations, but the validation and the correlations studies remained to be explored (10, 11). Moreover, growth of TF-1 cell line is dependent on either IL-3 or hGM-CSF (8) and these factors have synergistic



effects on proliferation. IL-3 was selected for the assay development, with cells viability sustained by rhEPO alone improving the results.

Samples were also artificially degraded, analyzed by the RP-LC and SE-LC as shown in Figure 2 and 3 respectively, and subjected to the *in vitro* and to the *in vivo* bioassays to evaluate the bioactivity of the deamidated/sulphoxides forms, giving mean potencies of 84.93% (76.00 – 95.00%) and 86.70% (64.60 – 115.40),  $p=0.05$ , respectively. The same assessment was performed for the aggregates/dimmers showing mean potencies of 69.86% (64.40 – 82.90%) and 64.40% (50.90 – 80.30%),  $p=0.05$ , respectively. The changes were significant related to the intact molecule as calculated for the degraded forms by the Student's t test ( $P=0.05$ ). The results are different of that previously published (26), where dimmers and trimers were produced by chemical crosslinking of the conventional monomeric forms, but the *in vivo* bioactivity was evaluated by the increase of the hematocrits in mice, showing 26-fold higher activity than did the monomers.

Cytotoxicity was evaluated on altered forms of dimmers/aggregates, and deamidated/sulfoxides versus the intact molecule, in order to detect possible effects resulting from the instability of the samples during storage. However, this showed results higher than  $IC_{50} > 11.000$  IU/mL, probably due to the multiple cytoprotective pathways governed by EPO (MAIESE et al., 2008), with significant differences ( $p < 0.05$ ) only for deamidates/sulfoxides. Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns related to possible human undesirable effects of the degraded forms.

Validated RP-LC and SE-LC methods were applied for the content/potency determination of rhEPO in biopharmaceutical formulations, giving content/potencies within 91.98% and 121.86%, and 92.76% and 122.49% of the stated potency, respectively, corresponding to mean values 2.11% and 1.21%, lower, compared to the *in vivo* bioassay as shown in Table 2. The results demonstrated the stability-indicating capability and the

application of the methods, which could be applied to correlation studies trying to develop alternatives in the context of the 3Rs and, also to support biosimilarity studies of the biomolecule (29).

#### **4. Conclusion**

The alternative *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay was studied showing a lower mean difference of the estimated potencies of 2.67% compared to the normocythaemic mice bioassay, with non-significant difference, as calculated by the Student's t-test ( $p > 0.05$ ) and sialic acid content higher than 108.74 ng/ $\mu\text{g}$ . Biopharmaceutical products were analysed by validated reversed-phase and size-exclusion liquid chromatography methods showing mean content/potencies of 2.11% and 1.21%, lower, respectively, compared to the *in vivo* bioassay. Deamidates/sulphoxides and dimmers/aggregates showed mean reduction of *in vitro* and *in vivo* bioactivities of 14.05% and 32.87%, respectively. The TF-1 *in vitro* assay represents an improvement that can be used in combination with the normocythaemic mice bioassay and the sialic acid evaluation, in the context of the reduction or replacement of the animals. Moreover, the correlations studies between physicochemical and biological methods, may contribute to monitor its stability during the purification steps and to assure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biological products.

**Acknowledgments**

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projects 477013/2011- and 306898/2011-0 for it financial support.

## References

- (1) KRANTZ, S. B. Erythropoietin. **Blood**, v. 77, p. 419 – 434, 1991.
- (2) FRIED, W.; Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, v. 37, p. 1007-1015, 2009.
- (3) ELLIOTT, S., EGRIE, J., BROWNE, J., LORENZINI, T., BUSSE, L., ROGERS, N., PONTING, I. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 1146-1155, 2004.
- (4) YANAGIHARA, S.; TANIGUSHI, Y.; HOSONO, M.; YOSHIOKA, E.; ISHIKAWA, R.; SHIMADA, Y. KADOYA, T.; KUTSUKAKE, K. Measurement of Sialic Acid content is insufficient to assess Bioactivity of Recombinant Human Erythropoietin. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 1596 – 1599, 2010.
- (5) European Pharmacopoeia 7 ed. Council of Europe: Strasbourg, **2011**.
- (6) 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. **Journal of AOAC International**, v.91, p. 285-291, 2008.
- (7) KITAMURA, T.; TOJO, A.; KUWAKI, T., CHIBA, S., MIYAZONO, K., URABE, A., TAKAKU, F. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. **Blood**, v. 73, p. 375 – 380, 1989a.
- (8) KITAMURA, T., TANGE, T., TERASAWA, T., CHIBA, S., KUWAKI, T., MIYAGAWA, K., PIAO, Y.F., MIYAZONO, K., URABE, A., TAKAKU, F. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 323 – 334, 1989b.

- (9) GROSSI, A.; VANNUCCHI, A. M.; BACCI, P.; CAPORALE, R.; CAPPELLI, G.; VISCONTI, G.; PAGLIAI, G.; FERRINI, P. R. Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. **Leukemia Research**, v. 22, p. 145-151, 1998.
- (10) HAMMERLING, U; KROON, R.; WILHELMSSEN, T.; SJÖDIN L. *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.
- (11) LIEFOOGHE, 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**, v. 33, p. 161-167, 2005.
- (12) CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico-and biochemical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 687, p. 189-199, 1996.
- (13) STORRING, P. L.; TIPLADY, R. J.; GAINES DAS, R. E.; STENNING, B. E.; LAMIKANRA, A.; RAFFERTY, B.; LEE, J. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. **British Journal of Haematology**, v. 100, p. 79-89, 1998.
- (14) LASNE, F.; CEAURRIZ, J. Recombinant erythropoietin in urine. **Nature**, v. 405, p. 635, 2000.
- (15) STORRING, P.L.; TIPLADY, R. J.; GAINES DAS, R. E.; RAFFERTY, B.; MISTRY, Y. G. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. **The Journal of Endocrinology**, v. 150, p. 401 – 412, 1996.
- (16) FUKUDA, M. N., SASAKI, H., LOPEZ, L., FUKUDA, M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 84-89, 1989.

- (17) FRAGUAS, L. F., CARLSSONB, J., LÖNNBERGB, M. Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. **Journal of Chromatography A**, v.1212, p. 82-88, 2008.
- (18) ANUMULA, K. R. Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with sensitive fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p. 24 – 30, 1995.
- (19) WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v.185, p. 129 – 88, 1999.
- (20) LARA-QUINTANAR, P., LACUNZA, I., SANZ, J., DIEZ-MASA, J. C., FRUTOS, M. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 227-234, 2007.
- (21) 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 chromatographic method and bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 1277-1288, 2007.
- (22) FERRETO, R. M.; LEAL, D. P.; MAGALHAES, L. S.; 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**, v. 32, p. 1392–1406, 2009.
- (23) LONGTAFF, C. WHITTON, C. M., STEBBINGS, R., GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 50 - 55, 2009.
- (24) DALMORA, S. L., D'AVILA, F. B., SILVA, L. M., BERGAMO, A. C., ZIMMERMANN, E. S. development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in

pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. **Journal Chromatography B**, v. 24, p. 2471-76, 2009.

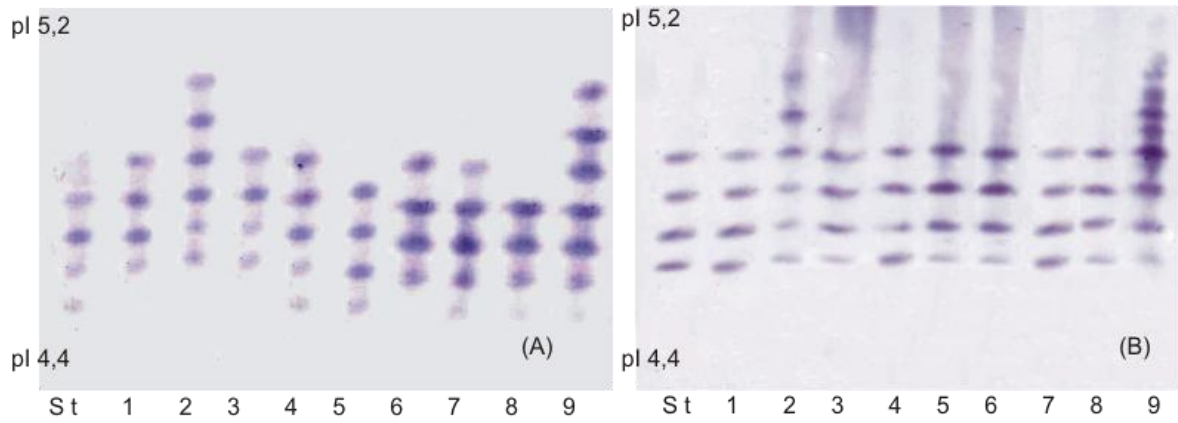
(25) NOGUEIRA, D. R.; SANGOI, M. S.; SILVA, L. M.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S. L. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3098–3105, 2008.

(26) SYTKOWSKI, A. J.; LUNN, E. D.; DAVIS, K. L.; FELDMAN, L.; SIEKMAN, S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced *in vivo* activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 1184 – 1188, 1998.

(27) FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. Charles Griffin, London, UK, 1978.

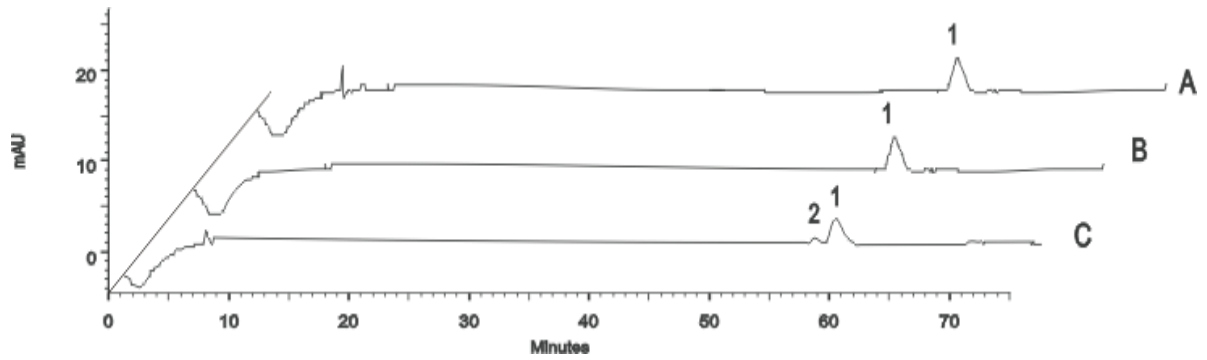
(28) MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; SHANG, Y. C. Raves and Risks for Erythropoietin. **Cytokine Growth Factor**, v. 19, p. 145–155, 2008.

(29) KRESSE, G. B. Biosimilars--science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 479 – 486, 2009.

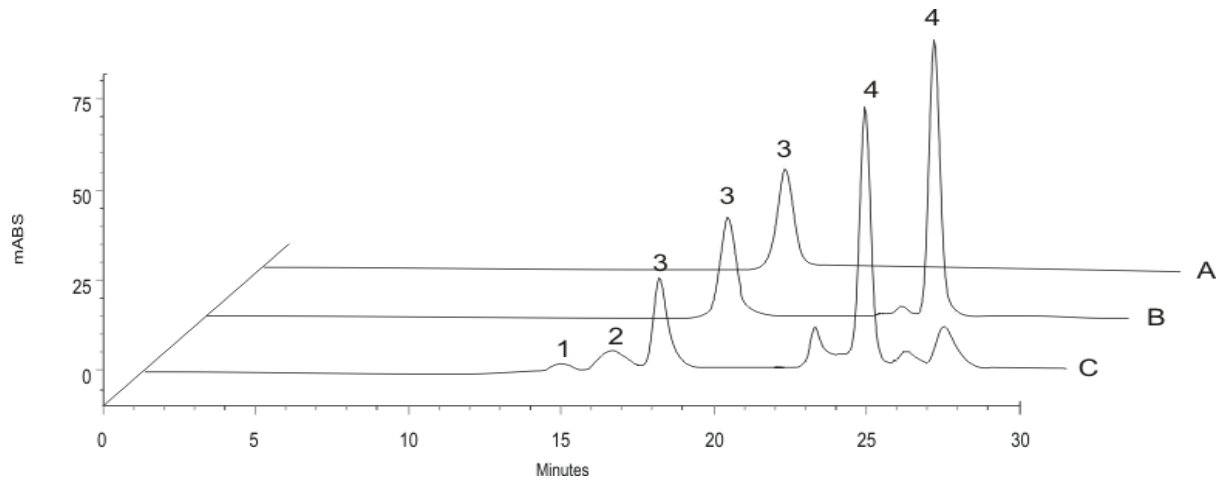


**Figure 1.** Isoelectric focusing of rhEPO preparations: **(A)** Immunodetection with EPO-specific polyclonal antiserum; and **(B)** detection with labelled *Triticum vulgare* lectin. Lanes: St. - Ph. Eur. BRP for EPO, 1.7  $\mu\text{g}$ ; Samples 1 - 9, 1.7  $\mu\text{g}$ .





**Figure 2.** RP-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Ph. Eur. BRP for Erythropoietin, Peak 1: EPO peak (B) Biopharmaceutical formulation, Peak 1: EPO peak. (C) Stress of Biopharmaceutical formulations with UV light, Peak 1: EPO peak, peak 2: deamidated/sulphoxides.



**Figure 3.** SE-LC chromatograms of erythropoietin. (A) Ph. Eur. BRP for Erythropoietin, Peak 3: monomer (B) Biopharmaceutical formulation, Peak 3: monomer and peak 4: excipients. (C) Stress conditions with temperature of biopharmaceutical formulations, Peak 1: aggregates, peak 2: dimer, peak 3: monomer and peak 4: excipients.

**Table 1.** Comparative potencies evaluation of rhEPO in biopharmaceutical formulations, by normocythaemic mice bioassay and TF-1 proliferation bioassay.

Sample	TF-1 proliferation bioassay <sup>a</sup>		Normocythaemic bioassay	
	Potency (%)	Confidence intervals (P=0.95)	Potency (%)	Confidence intervals (P=0.95)
1	94.20	71.5 – 139.85	96.00	69.3 – 138.64
2	108.40	72.6 – 140.13	110.00	75.6 – 141.47
3	90.50	64.5 – 131.50	93.30	67.5 – 136.72
4	93.10	66.9 – 131.84	96.50	69.9 – 134.06
5	102.50	70.2 – 132.41	105.30	75.1 – 138.23
6	99.30	72.9 – 130.17	102.90	74.2 – 131.59
7	96.30	71.9 – 128.12	98.00	71.2 – 129.32
8	93.00	68.8 – 130.26	96.40	70.8 – 133.84
9	120.60	80.7 – 151.48	123.50	82.5 – 155.40
Mean <sup>a</sup>	99.76	-	102.43	-
SD <sup>b</sup>	9.59	-	9.52	-

a. Mean of three replicates.

b. SD, standard deviation.

**Table 2.** Comparative content/potencies determination of rhEPO, and content of sialic acid in biopharmaceutical formulations, by RP-LC and SE-LC methods.

Sample	RP-LC <sup>a</sup>			SE-LC <sup>a</sup>		
	Main peak (%)	Deamidated/Sulphoxides (%)	Sialic Acid (ng/μg EPO)	Monomer (%)	Dimer (%)	HMM (%)
1	94.12	0.19	140.61	95.34	0.10	0.23
2	107.78	0.28	171.54	107.98	0.17	0.31
3	91.98	0.22	108.74	92.76	0.08	0.21
4	93.42	0.39	115.38	95.54	0.06	0.22
5	101.55	0.42	150.42	102.97	0.12	0.11
6	100.92	0.35	145.46	101.99	0.09	0.29
7	97.40	0.31	144.90	97.56	0.05	0.32
8	93.91	0.45	122.67	94.36	0.15	0.35
9	121.86	0.68	188.15	122.49	0.20	0.49
Mean	100.32	0.36	143.09	101.22	0.11	0.28
SD <sup>b</sup>	9.53	0.15	20.21	8.82	0.05	0.10

a. Mean of three replicates.

b. SD, standard deviation.

## **DISCUSSÃO**

---

## 4 DISCUSSÃO

---

A expressão de glicoproteínas de interesse terapêutico evoluiu significativamente nos últimos anos, devido à tecnologia do DNA recombinante e viabilizou amplo uso clínico da rhEPO. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza e potência dos produtos biotecnológicos fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, imunológicas e físico-químicas, necessárias para a sua caracterização e para possibilitar avanços nos estudos de alternativas analíticas.

Realizou-se estudo de bioensaio alternativo para avaliação de rhEPO e analisou-se correlação de resultados com métodos físico-químicos conforme apresentado no **ARTIGO 3.1**. A identificação e separação das isoformas de rhEPO por focalização isoelétrica (IEF) em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando anfólinas na faixa de pH 2,5 – 6,5. Os perfis obtidos das amostras e do Padrão de rhEPO demonstraram similaridade de ponto isoelétrico, compreendido entre 4,4 e 5,2, porém pode-se observar uma variação no número de isoformas entre 4 a 7, na proporção (intensidade de coloração) e na posição dos componentes (refletindo a natureza básica/ácida do material). Após a separação das isoformas, as amostras e o Padrão de rhEPO foram submetidas ao ensaio de ligação às lectinas, que fornecem informações sobre a estrutura glicídica dos biofármacos, por reconhecerem diferentes características presentes em oligossacarídeos. Destacaram-se os perfis obtidos com as lectinas *Triticum vulgare*, que interage com alta afinidade com o complexo oligossacarídeo na presença de ácido N-acetilneuramínico terminal ligado à galactose, e *Canavalia ensiformis* (figura não mostrada), que se liga a glicanos bi-ramificados, por reconhecer resíduos de manose  $\alpha$ -ligados (CUMMINGS et al., 1987). Demonstrou-se variação na posição e na intensidade das isoformas dos produtos biofarmacêuticos de diferentes laboratórios produtores (Figura 1). Tais observações nos permitem evidenciar e comprovar a diferença existente nas cadeias glicídicas, provenientes, provavelmente, dos diferentes processos de purificação e expressão nas células de mamíferos para produção de rhEPO pelos laboratórios.

As estruturas de carboidratos intactas protegem a EPO da rápida degradação *in vivo* (FUKUDA et al., 1989). Modificações com menos ácido N-acetilneuramínico no penúltimo resíduo de galactose, podem suprimir a ação fisiológica desse hormônio (BROWNE et al., 1986). Por conseguinte, correlação do efeito estimulatório *in vitro* da rhEPO com sua potência *in vivo* requer informações sobre a configuração dos carboidratos. Desse modo, o conteúdo de ácido siálico presente nas amostras de rhEPO foi determinado com base na curva-padrão da

solução de referência de ácido N-acetilneuramínico, conforme descrito por Anumula et al. (1995). Os resultados obtidos apresentaram concentrações superiores a 108,74 ng/μg e estão de acordo com a especificação (EP, 2011), que preconiza o teor mínimo de 10 moles de ácido siálico por mol de EPO, equivalente a 101 ng/μg. Por sua vez, pode-se observar que as amostras com teor mais elevado (2 e 9), também apresentaram maior número de isoformas e atividade biológica superior, conforme Tabela 2. Porém, serão necessários estudos adicionais para avaliar melhor esta correlação.

O ácido siálico é importante para a atividade biológica *in vivo* e as isoformas contendo nível mais elevado de ácido siálico poderiam apresentar atividade biológica maior, meia-vida mais prolongada e eliminação mais lenta. Porém, as estruturas de carboidratos juntamente com os resíduos de ácido siálico é que têm impacto significativo sobre a bioatividade, conforme observado (GOLDWASSER et al., 1974; YANAGIHARA et al., 2010; LIEFOOGUE et al. 2005). Por sua vez, a de-sialilação resulta em perda da atividade biológica *in vivo*, que o bioensaio *in vitro* quantifica como sendo completamente ativa. Desse modo, optou-se por combinar a identificação de isoformas por imunodeteção e ligação com lectinas e determinação do conteúdo de ácido siálico com o bioensaio por cultura de células *in vitro*.

Tendo em vista os aspectos éticos relacionados ao uso de animais, custo dos ensaios e variabilidade das respostas, tem sido pesquisado ensaios alternativos, especialmente por cultura de células *in vitro*. Neste sentido, selecionou-se a linhagem de células eritroleucêmicas humanas TF-1, e planejou-se o ensaio baseado no crescimento em meio com interleucina-3, ao invés de rhGM-CSF previamente usado (HAMMERLING et al., 1996) e avaliou-se a proliferação celular pela reação com MTT e leitura de absorbâncias. Elaborou-se a curva dose-resposta selecionando-se três a quatro doses em progressão geométrica, com fator 2, e executaram-se os ensaios em triplicata. Submeteram-se à análise diferentes amostras que forneceram resultados de potência entre 90,50 e 120,60%, conforme demonstrado na Tabela 1. Correlacionando os resultados pode-se deduzir que o bioensaio em células TF-1 apresentou diferenças médias de 2,67% ± 0,77 menores em relação ao bioensaio em camundongos normocitêmicos. Calculou-se a correlação pelo coeficiente de Pearson, que foi significativo em relação ao bioensaio *in vivo* ( $r = 0,9967$ ).

A potência biológica dos produtos biofarmacêuticos foi avaliada pelo bioensaio *in vivo* 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 Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia de Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO-SBR). Os valores encontrados variaram entre 93,30% e

123,50%, cumprindo as especificações (EP, 2011) que preconiza potências de 80 – 125% e intervalos de confiança ( $P = 0,95$ ) de 64 – 156%.

A avaliação do teor/potência de rhEPO foi também realizada por CL-FR, previamente validada por Barth et al. (2007). As análises foram efetuadas em relação à rhEPO-SBR, e os resultados foram expressos em percentagens obtendo valores entre 91,98% e 121,86% para o teor/potência, e 0,19% a 0,68% para formas oxidadas e desamidadas, em relação ao pico principal. Por sua vez, a metodologia por CL-EM permite separar e quantificar agregados de alta massa molecular, como dímeros, agregados e monômeros de diferentes glicoproteínas. A rhEPO e a HSA apresentam pesos moleculares próximos, o que dificulta sua separação por CL-EM. Optou-se por analisar amostras de rhEPO, que não apresentam HSA em sua formulação, conforme Ferreto et al. (2009), que forneceram resultados entre 92,76% e 122,49%. As formas diméricas e agregadas foram calculadas e expressas como percentagem da área total obtida no cromatograma, apresentando valores inferiores a 0,49%, conforme descrito na Tabela 2. A bioatividade das formas oxidadas e desamidadas foram determinadas por degradação sob exposição à luz UV, obtendo potências de 86,70% pelo bioensaio *in vivo* e 84,93% pelo *in vitro*, em relação à forma íntegra. Do mesmo modo, determinaram-se as formas diméricas e agregadas por degradação a 65°C por 12 horas, obtendo potências de 64,40% e 69,86%, respectivamente.

A citotoxicidade foi avaliada nas formas alteradas de dímeros/agregados e desamidados/sulfóxidos contra a molécula intacta, a fim de detectar possíveis efeitos resultantes da instabilidade das amostras durante seu armazenamento. Obtiveram-se resultados com  $IC_{50} > 11.000$  UI/mL, provavelmente devido às múltiplas vias citoprotetoras influenciadas pela EPO (MAIESE et al., 2008), com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) apenas para os desamidados/sulfóxidos. Essas avaliações são necessárias, principalmente devido às informações recentes relacionadas a possíveis efeitos indesejáveis das formas degradadas.

Avaliou-se correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos biológicos e cromatográficos por CL-FR e CL-EM, observando que apresentam diferenças médias de  $2,11\% \pm 0,93$  e  $1,21\% \pm 0,72$  respectivamente, menores em reação ao bioensaio *in vivo*. Calculou-se a correlação entre os métodos pelo coeficiente de Pearson, mostrando correlação significativa para CL-FR ( $r = 0,9952$ ) e para CL-EM ( $r = 0,9973$ ).

A substância biológica de rhEPO está descrita na literatura oficial (EP, 2011), porém não há referência ao produto acabado. Neste contexto, a pesquisa de métodos biológicos, imunológicos e físico-químicos é importante para aprimorar a caracterização e controle de



qualidade do biofármaco. Ao mesmo tempo, os estudos visando o desenvolvimento de bioensaio por cultura de células *in vitro*, constituem-se em avanço importante no contexto de alternativas para a avaliação de potência. Paralelamente, os estudos de correlação dos resultados das diferentes metodologias contribuem para as análises de comparabilidade das novas biomoléculas, garantindo sua segurança e eficácia terapêutica.

## **CONCLUSÕES**

---

## 5 CONCLUSÕES

---

- ✓ O ensaio de ligação às lectinas demonstrou a presença de oligômeros de *N*-acetilglicosamina nas cadeias *N*-glicídicas detectados especialmente com *Triticum vulgare*, que evidencia diferenças de cadeias glicídicas entre as amostras e pode constituir-se em teste inicial da qualidade de rhEPO.
- ✓ Quantificou-se o conteúdo de ácido *N*-acetilneuramínico, que pode ser relacionado com as isoformas e atividade biológica, mas serão necessários estudos adicionais para estabelecer melhor correlação.
- ✓ Avaliou-se a potência pelo ensaio em camundongos normocitêmicos *in vivo* e pela cultura da linhagem celular TF-1 *in vitro*, que forneceram valores médios 2,67% inferiores. Demonstrou-se a viabilidade e importância do ensaio alternativo desenvolvido no contexto dos 3Rs, justificando estudos subsequentes de validação para estabelecer seu uso para avaliação de potência de produtos biofarmacêuticos.
- ✓ Os métodos validados por cromatografia líquida por fase reversa e por exclusão molecular forneceram resultados de potência, em média 2,11% e 1,21% inferiores em relação ao ensaio biológico *in vivo*, respectivamente, e são necessários para determinar desamidados/ sulfóxidos e dímeros/agregados.
- ✓ Avaliou-se a atividade biológica dos desamidados/sulfóxidos e dímeros/agregados, pelos bioensaios *in vivo* e *in vitro*, obtendo-se redução média das potências de 14,05% e 32,87%, respectivamente, em relação à forma íntegra.
- ✓ Os estudos de correlação dos resultados fornecidos pelos métodos biológicos e físico-químicos, e a pesquisa de procedimentos alternativos contribuem para melhorar o controle de qualidade, a caracterização das biomoléculas e fundamentar análises de comparabilidade desse produto biológico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, p. 110-22, 2006.

ANUMULA, K. R. Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with sensitive fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p. 24 – 30, 1995.

BARBONE, A. G. et al. Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, p. 515-22, 1994.

BARTH, T. et al. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatographic method and bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 1277-88, 2007.

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

BENAVENTE, F. et al. Estimation of the composition of recombinant human erythropoietin mixtures using capillary electrophoresis and multivariate calibration methods. **Electrophoresis**, v.27, p. 4000-15, 2006.

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. 177-84, 1997.

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. 221-31, 1992.

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

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.

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, p. 868-73, 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. 2057-59, 2002.

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, p. 412-23, 1998.

CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 687, p. 189-99, 1996.

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, p. 1065-67, 1961.

CUMMING, D. A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. **Glycobiology**, v. 1, p. 115-30, 1991.

DALMORA, S. L. et al. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. **Journal Chromatography B**, v. 24, p. 2471-76, 2009.

DENHES, Y.; LAMON, S.; LÖNNBERG, M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns--a powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 1028-32, 2010.

DELORME, E.; LORENZINI, T.; GIFFIN, J. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. **Biochemistry**, v. 1, p. 9871-76, 1992.

DEPAOLIS, A. M.; ADVANI, J. V.; SHARMA, B. G. Characterization of erythropoietin dimerization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 1280-84, 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, p. 201-08, 1996.

DORDAL, M. S.; WANG, F. F.; GOLDWASSER, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. **Endocrinology**, v. 116, p. 2293-99, 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. 17516-21, 1988.

EDER, H.; ROBLENBROICH, B.; FAILING, K. A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. **Blut**, v. 59, p. 184-87, 1989.

EGRIE, J. C. et al. Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. **Immunobiology**, v. 172, p. 213-24, 1986.

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 – 99, 2003.

ELLIOTT, S. et al. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 1146-55, 2004.

ENDO, Y. 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, p. 700-06, 1992.

ESCHBACH, J. W.; EGRIE, J. C.; DOWNING, M. R. Correction of the anaemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinical trial. **New England Journal of Medicine**. v. 316, p. 73–8, 1987.

ESCHBACH, J. W.; ABDULHADI, M. H.; BROWNE, J. K. Recombinant human erythropoietin in anemic patient with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. **Annals of Intern Medicine**, v. 111, p. 992 – 1000, 1989.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

FAN, Q. et al. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. **Experimental Hematology**, v. 34, p. 1303-11, 2006.

FANDREY, J.; FREDE, S; JELKMANN, W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia induced erythropoietin production. **Journal of Biochemistry**, v. 303, p. 507-10, 1994.

FERRETO, R. M. et al. 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**, v. 32, p. 1392–06, 2009.

FRAGUAS, L. F.; CARLSSONB, J.; LÖNNBERGB, M. Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. **Journal of Chromatography A**, v.1212, p. 82-88, 2008.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, vol. 37, p. 1007–15, 2009.

FUKUDA, M. N. et al. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood**, v. 73, 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 Helvetica**, v. 71, p. 383-94, 1996.

GIMENEZ, E. et al. Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for a confident elucidation of a glycopeptide map of recombinant human erythropoietin. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 25, p. 2307 – 16, 2011.

GIMENEZ, E. et al. Analysis of recombinant human erythropoietin glycopeptides by capillary electrophoresis electrospray–time of flight-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, vol. 709, p. 81 – 90, 2012.

GOKANA, A. et al. Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. **Journal of Chromatography A**, v. 791, p. 109-18, 1997.

GOLDWASSER, E.; KUNG C. K.-H.; ELIASON J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 4202-06, 1974.



GOODNOUGH, L. T.; SKIKNE, B.; BRUGNARA, C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. **Blood**, v. 96, p. 823-32, 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.

GROSSI, A. et al. Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. **Leukemia Research**, v. 22, p. 145-51, 1998.

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. 213-21, 2007.

HALSTENSON, C. E. et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 50, p. 702-12, 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. 1455-69, 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.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 214-21, 2003.

HAYAKAWA, T. et al. Simple *in vivo* bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. **Biologicals**, v. 20, p. 243-51, 1992.

JEFFCOATE, S. L. New biotechnologies: challenges for the regulatory authorities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 191-94, 1992.

JOLLING, K. et al. Mixed-effects modelling of the interspecies pharmacokinetic scaling of pegylated human erythropoietin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 465-75, 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, cap. 53, p. 1292-96, 2006.

KAWAMURA, A. et al. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. **British Journal of Haematology**, v. 77, p. 424-30, 1991.

KINOSHITA, M. et al. Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 866, p. 261 – 271, 2000.

KITAMURA, T. et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 323 – 34, 1989a.

KITAMURA, T. et al. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. **Blood**, v. 73, p. 375 – 80, 1989b.

LAMON, S. et al. Detection window of Darbepoetin-alfa following one single subcutaneous injection. **Clinica Chimica Acta**, v. 379, p. 145-49, 2007.

LAI, P.-H.; EVERETT, R.; WANG, F.-F. Structural characterization of human erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 7, p. 3116-21, 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. 227-34, 2006.

LASNE, F.; CEAURRIZ, 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. 119-26, 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. 161-67, 2005.

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

LOWRY, P. H.; KEIGHLEY, G.; BORSOOK, H. Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and mild substitution reactions. **Nature**, v. 185, p. 102-03, 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. 909-17, 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. 113-19, 2005.

MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; SHANG, Y. C. Raves and Risks for Erythropoietin. **Cytokine Growth Factor**, v. 19, p. 145–155, 2008.

MIRE-SLUIJ, A. R. et al. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals**, v. 24, p. 351-62, 1996.

MIYAZAKI, Y. et al. Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukemia cell line, AS-E2. **Leukemia**, v. 11, p. 1941-49, 1997.

NG, T. et al. Recombinant erythropoietin in clinical practice. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, p. 367-76, 2003.

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, p. 1561-69, 2003.

RIBELA, M. T. C. P. et al. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 103-26, 2006.

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, p. 5220-29, 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. 1451-56, 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, p. 12059-76, 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. 8618-26, 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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, p. 343-50, 2003.

SHEN, R. et al. Highly sensitive determination of recombinant human erythropoietin- $\alpha$  in aptamer-based affinity probe capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5635-41, 2010.

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. 1779-83, 1984.

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

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, p. 459-84, 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**, v. 95, p. 1184 – 1188, 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, p. 3657-63, 1988.

TANG, Y.; RINDER, H. M.; KATZ, S. D. Effects of recombinant human erythropoietin on antiplatelet action of aspirin and clopidogrel in healthy subjects: Results of a double-blind, placebo-controlled randomized Trial. **American Heart Journal**, v. 154, p. 494-97, 2007.

THE UNITED States Pharmacopeia. 35. ed. Rockville: The United states Pharmacopeial Convention, 2012.

TILBROOK, P. A.; KLINKEN, S. P. The erythropoietin receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 31, p. 1001–5, 1999.

TSUDA, E. et al. Comparative structural study of *N*-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. **Biochemistry**, v. 27, p. 5646-54, 1988.

TSUDA, E. et al. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. **European Journal of Biochemistry**, v. 188, p. 405-11, 1990.

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

WANG, W. C.; CUMMINGS, R. D. The immobilized leucoagglutinin form the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked  $\alpha$ -2,3 to penultimate galactose residues. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 263, p. 4576 – 85, 1988.

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. 666-76, 2007.

WILCZYNSKA, J. D.; ROMAN, I.; ANUSZEWSKA, E. The separation of EPO from other proteins in medical products formulated with different stabilizers. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 62, p. 177 – 82, 2005.

YANAGIHARA, S. et al. Measurement of Sialic Acid content is insufficient to assess Bioactivity of Recombinant Human Erythropoietin. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 1596 – 99, 2010.

YU, P. H. Automated reticulocyte counting – an evaluation of GEN-S, Cell-Dyn 3500 and Cell-Dyn 4000. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 21, p. 145-47, 1999.

YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 350-57, 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. 511-26, 2003.

ZHANG, J. et al. Optimization and qualification of capillary zone electrophoresis method for glycoprotein isoform distribution of erythropoietin for quality control laboratory. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 50, p. 538–43, 2009.