

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DE
POTÊNCIA DE ERITROPOIETINA HUMANA
RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O ENSAIO
BIOLÓGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago Barth

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE.
CORRELAÇÃO COM O ENSAIO BIOLÓGICO**

por

Thiago Barth

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

2007

**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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE
ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO
COM O ENSAIO BIOLÓGICO**

elaborada por
Thiago Barth

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Maria Tereza Ribela, Dr^a (IPEN-USP)

Luiz Augusto Basso, Dr. (PUC-RS)

Santa Maria, 10 de Abril de 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;
aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos
Biológicos e Bioequivalência, pelo auxílio e amizade;
aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;
aos meus pais, Renato e Maria Dolores, pelo amor, educação e incentivo na passagem
de mais uma etapa;
à minha irmã, pelo carinho e incentivo;
à Vanessa, pelo amor, apoio e compreensão;
à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;
A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão
deste trabalho.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O ENSAIO BIOLÓGICO

AUTOR: THIAGO BARTH

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de Abril de 2007.

Eritropoietina é uma glicoproteína que estimula a eritropoiese e é usada clinicamente para o tratamento de anemias associadas à falência renal crônica. No presente trabalho foram validados métodos biológico e cromatográfico para a avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante (rhEPO) em produtos farmacêuticos. O ensaio biológico foi validado em camundongos normocitêmicos, fêmeas, da linhagem BALB/c, com protocolo de injeções múltiplas e contagem automatizada dos reticulócitos por citometria de fluxo. A curva dose-resposta foi linear ($r^2=0,9708$) na faixa de concentração de 1 a 64 UI/mL. Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) empregando coluna Júpiter C₄ (250 mm x 4,6 mm), mantida a temperatura ambiente (25°C). A fase móvel A foi composta de ácido trifluoracético 0,1% e a fase móvel B composta de acetonitrila/ácido trifluoracético 0,08% (70:30, v/v), eluída em gradiente linear: 0,1 – 60 min, 0 – 100% de B, na vazão de 0,5 mL/min e detecção no ultravioleta a 280 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 60 min, sendo linear ($r^2=0,9997$) na faixa de concentração de 10-150 µg/mL. Ambos procedimentos foram validados com base nos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limite de quantificação, bem como limite de detecção, avaliado na validação do método cromatográfico. Os métodos foram aplicados na avaliação de potência de rhEPO alfa e beta em produtos farmacêuticos e estudou-se a correlação entre os métodos. Demonstrou-se que as análises dos produtos farmacêuticos forneceram diferenças médias de potência 11,2 % superiores para o CL-FR. Desse modo, estabeleceu-se alternativa no contexto da substituição do uso de animais, contribuindo para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biológico.

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

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE POTENCY ASSESSMENT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN. CORRELATION WITH THE BIOLOGICAL ASSAY

AUTHOR: THIAGO BARTH

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, April 10th 2007.

Erythropoietin is a glycoprotein which stimulates the erythropoiesis, clinically used for the treatment of renal anaemia. The biological and chromatographic methods for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin (rhEPO) in pharmaceutical products were validated in the present work. The normocythaemic mice bioassay was carried out in female BALB/c strain, with multiple injections schedule and reticulocytes counted by automated flow cytometry. The dose-response curve was linear ($r^2=0.9708$) in the concentration range of 1 to 64 IU/mL. A reversed-phase liquid chromatography method (RP-LC) was developed and validated using a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm), maintained at ambient temperature (25°C). The mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.08% TFA:acetonitrile (30:70, v/v), run in linear gradient: 0.1-60 min, 0.1-100% of B at flow rate of 0.5 mL/min with detection at 280 nm. The chromatographic separation was obtained within 60 min and it was linear ($r^2=0.9997$) in the concentration range of 10-150 µg/mL. The procedures were validated evaluating parameters such as, the specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, and limit of quantitation, as well as, the limit of detection evaluated in the validation of the chromatographic method. The methods were applied for the potency evaluation of the alfa and beta rhEPO in pharmaceutical products, which were analysed by the chromatographic method and compared to the bioassay showing mean differences between the estimated potencies of 11.2% higher for the RP-LC. The alternative established represents a contribution towards the replacement of the animals improving the quality control and assuring the safety and efficacy of the biological product.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto e locais de inserção das cadeias de carboidratos, três *N*-ligadas (*Y*), uma *O*-ligada (-*O*-*), adaptada (GILG et al., 1996).....18

FIGURA 2 – Modelo da estrutura tri-dimensional da eritropoietina humana, adaptada (CHEETHAM et al., 1998).....19

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2

FIGURE 1 – RP-LC chromatogram of rhEPO pharmaceutical formulation (33.6 µg/mL): peak 1, 2 and 4 – excipients, peak 3 – rhEPO.....63

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

TABLE 1 – Repeatability of the normocythaemic mice bioassay for the potency evaluation of rhEPO in pharmaceutical formulation.....	50
TABLE 2 – Inter-assays precision data of the normocythaemic mice bioassay in samples of pharmaceutical formulation	51
TABLE 3 – Between-analysts precision data of the normocythaemic mice bioassay in samples of pharmaceutical formulation.....	52
TABLE 4 – Accuracy of the normocythaemic mice bioassay	53
TABLE 5 – Conditions investigated during the robustness testing of rhEPO bioassay	54
TABLE 6 – Potency, confidence intervals (P=0.95) and precision of the estimates of rhEPO in pharmaceutical products by the normocythaemic mice bioassay.....	55

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2

TABLE 1 – Inter-day precision data of RP-LC for rhEPO in samples of pharmaceutical formulation	64
TABLE 2 – Between-analysts precision data of RP-LC for rhEPO in samples of pharmaceutical formulation	64
TABLE 3 – Accuracy of RP-LC for rhEPO.....	65
TABLE 4 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing...65	
TABLE 5 – Results of the system suitability test	66
TABLE 6 – Determination of the rhEPO potency in pharmaceutical formulations against the biological reference preparation for rhEPO	66

LISTA DE ABREVIATURAS

BHK	Células de rim de hamster jovem
CERA	Ativador contínuo do receptor de eritropoietina
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DEF	Dicionário de Especialidades Farmacêuticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
EP	Farmacopéia Européia
EPO	Eritropoietina humana
ESA	Peptídeo estimulador da eritropoiese
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICH	International Conference on Harmonisation
IEF	Focalização isoelétrica
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	33
4 DISCUSSÃO	69
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A eritropoietina humana (EPO) é um hormônio glicoprotéico composto por 165 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e quatro cadeias polissacarídicas, que representam, aproximadamente, 40% da massa molecular e são fundamentais para a atividade biológica. Os carboidratos são importantes para a secreção celular, solubilidade, estabilidade da molécula e formação de sítios de ligação com o receptor (HIGUCHI et al., 1992; SASAKI, 2003). A presença do ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) nas extremidades dessas cadeias é necessária para que o hormônio alcance os sítios-alvo na medula óssea, evitando a rápida metabolização hepática, influenciando, portanto, a meia-vida biológica na circulação e a eficácia terapêutica (CHOI et al., 1996).

A EPO é produzida no rim de adultos e fígado fetal ou neonatal de mamíferos. Atua sobre as células progenitoras eritróides da medula óssea estimulando sua proliferação, diferenciação e maturação, inibindo também a apoptose celular, e dessa forma, aumentando a produção de eritrócitos (LACOMBE & MAYEUX, 1998; DALLE et al., 2001).

A eritropoietina humana recombinante (rhEPO) é usada clinicamente para o tratamento de anemias associadas à falência renal crônica. Restabelece os níveis de energia, aumenta o bem-estar e a qualidade de vida do paciente. Também tem sido recomendada para o tratamento de anemias associadas ao câncer, infecção por HIV, pré e pós-operatório, artrite reumatóide e transplante de medula óssea (EGRIE & BROWNE, 2001; FISHER, 2003; KAUSHANSKY & KIPPS, 2006).

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a clonagem e expressão do gene humano da EPO em células de mamíferos. A rhEPO apresenta efeito biológico semelhante ao hormônio natural (EDER et al., 1989), porém foram observadas diferenças significativas entre a composição de isoformas, propriedades biológicas e farmacocinéticas das rhEPOs (HALSTENSON et al., 1991; LASNE et al., 2002). A rhEPO encontra-se disponível comercialmente desde 1988, sendo usadas em terapêutica as formas alfa e beta (DCI- USP, 2006; DEF, 2006). No final da década de 90, EGRIE et al. (1997) pesquisaram e desenvolveram uma nova proteína, como análogo hiperglicosilado da rhEPO, porém com meia-vida biológica 3 vezes maior. Além da inclusão de cadeias adicionais de carboidratos, a conjugação de biomoléculas com cadeias de polietilenoglicol também vem sendo empregada para aprimorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, originando as formas

peguiladas (BAILON & BERTHOLD, 1998; HARRIS & CHESS, 2003). A rhEPO peguilada apresenta tempo de meia-vida biológica superior, possibilitando redução na frequência de administração do produto durante o tratamento (MACDOUGALL, 2005; JOLLING et al., 2005). Recentemente, também foi desenvolvido peptídeo estimulador da eritropoiese (ESA), com resposta eritropoiética semelhante as eritropoietinas, porém com tempo de meia-vida superior (FAN et al., 2006; BUNN, 2007).

A estrutura molecular complexa e suas isoformas, bem como as formas alteradas ou degradadas oriundas dos processos de produção e purificação, tornam necessárias diferentes técnicas analíticas para a caracterização e controle da qualidade de rhEPO (JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; EP., 2005). Nesse sentido, adotou-se a combinação de métodos físico-químicos, imunológicos e biológicos. O ensaio biológico de potência fundamenta-se no aumento da contagem de reticulócitos em camundongos policitêmicos ou normocitêmicos. Esse último pode ser realizado com protocolo de injeção de dose única ou múltiplas, influenciando a precisão dos resultados obtidos a partir das contagens por citometria de fluxo (RAMOS, 2001; RAMOS et al., 2003). Os procedimentos fundamentados na cultura de células, primárias ou linhagens, têm sido adotados para pesquisa, porém a sua aplicação no controle da qualidade de produtos farmacêuticos de rhEPO necessita de maiores estudos de validação e correlação com o ensaio *in vivo*, para se constituir em alternativa (MIRE-SLUIS et al., 1996; HAMMERLING & SJÖDIN, 1998, LIEFOOGHE et al., 2005).

Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas nos processos de separação. Os métodos por CL-FR com detecção no ultravioleta têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade e na separação e determinação de formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; AHRER & JUNGBAUER, 2006). Porém, o desenvolvimento de métodos de análise direta de rhEPO em produtos farmacêuticos apresenta dificuldades devido à baixa concentração da glicoproteína na presença de grandes quantidades de excipientes como albumina humana (BIETLOT & GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006). É importante acrescentar que, após o desenvolvimento, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (FDA, 2001; ICH, 2005).

Destaca-se que, após décadas de pesquisas com biofármacos atingiu-se estágio em que a atividade biológica de algumas proteínas pode ser correlacionada com métodos físico-químicos. Assim, atualmente os estudos direcionam-se no sentido de aprimorar os ensaios e

substituir os animais em experimentos biológicos. Nesse contexto, as análises de correlação têm possibilitado avanços que resultaram no desenvolvimento de novas alternativas para o controle da qualidade (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; HENDRIKSEN et al., 2002; DALMORA et al., 2006).

O presente trabalho teve por objetivos: a) validar o ensaio biológico em camundongos normocitêmicos para a avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante, b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante, c) estudar a correlação entre os métodos cromatográfico e biológico para a avaliação de produtos farmacêuticos. Desse modo, pretendeu-se contribuir para o controle da qualidade no contexto da redução do uso de animais de laboratório, aprimoramento dos ensaios e estabelecimento de alternativas, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse medicamento.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A eritropoietina humana é um hormônio glicoprotéico com 30.400 Da, dos quais 60% correspondem a uma cadeia polipeptídica única com 165 aminoácidos, com aproximadamente 18.000 Da contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis^{7,161} e Cis^{29,33}), cuja fórmula química é C₈₀₉H₁₃₀₁N₂₂₉O₂₄₀S₅. A estrutura primária de EPO, as pontes dissulfeto e os locais de inserção das cadeias glicídicas estão representados na Figura 1 (GILG et al., 1996). A massa adicional de 40% da molécula é constituída de carboidratos (GOLDWASSER et al., 1974; DORDAL et al., 1985; LAI et al., 1986; TRAN et al., 1991; KRANTZ, 1991; CHOI et al., 1996 ; DERBY et al., 1996; SANZ-NEBOT et al., 2003; YU et al., 2005). A eritropoietina humana natural bem como a recombinante contêm três cadeias de açúcares *N*-ligados na Asparagina^{24,38,83} e uma cadeia *O*-ligada (tipo mucina) na Serina¹²⁶ (BROWNE et al., 1986; EGRIE et al., 1986). A presença de resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico nas extremidades das cadeias glicídicas confere carga negativa à molécula, que apresenta ponto isoelétrico (pI) entre 4,5 e 5,0. A estrutura tridimensional da EPO está representada na Figura 2 (CHEETHAM et al., 1998).

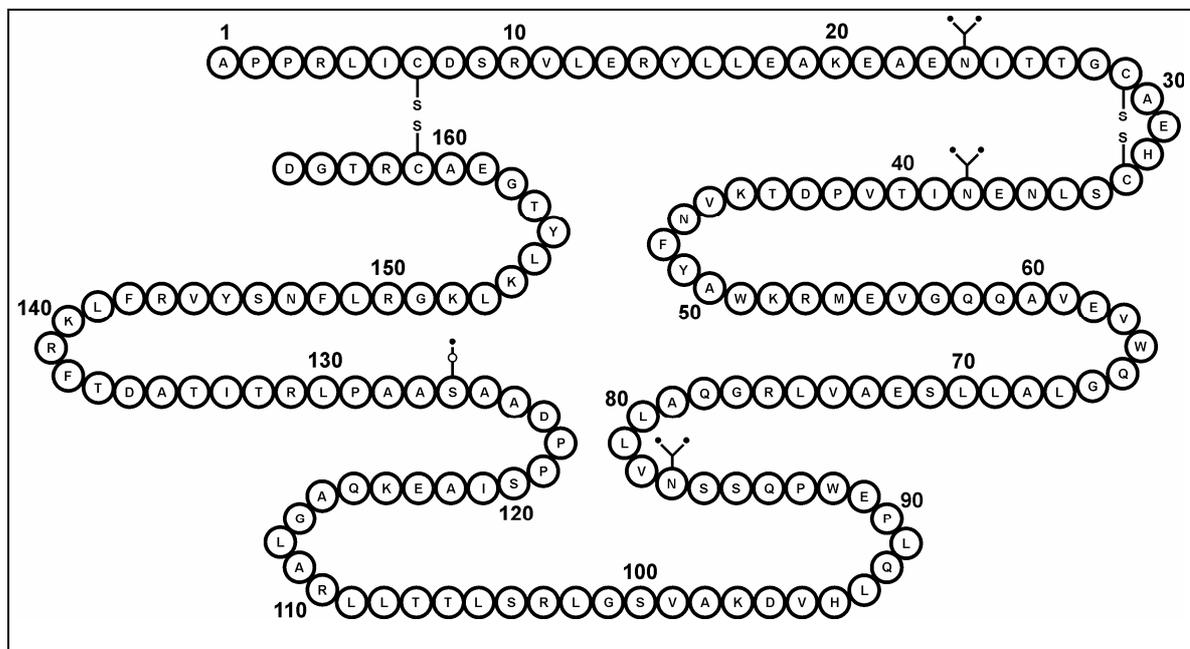


FIGURA 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto e locais de inserção das cadeias de carboidratos, três *N*-ligadas (*Y*), uma *O*-ligada (-O-*), adaptada (GILG et al., 1996).

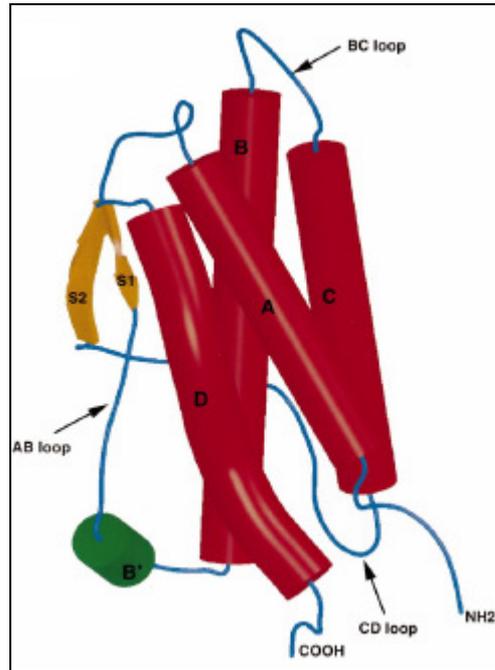


FIGURA 2 – Modelo da estrutura tri-dimensional da eritropoietina humana, adaptada (CHEETHAM et al., 1998).

A estrutura de carboidratos da EPO foi estudada e determinada a extensão da micro-heterogeneidade da EPO recombinante e do hormônio natural (SASAKI et al., 1987; SASAKI et al., 1988; TAKEUCHI et al., 1988; TSUDA et al., 1988; LASNE et al., 2002; YUEN et al., 2003; ELLIOTT et al., 2004). Destacam-se as cadeias de carboidratos *N*-ligados, em que os oligossacarídeos podem conter duas, três ou quatro ramificações (ou antenas), cada qual tipicamente terminada com uma molécula de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) carregada negativamente. Com exceção desse, que é um glicídio com 11 carbonos, todas as outras moléculas de açúcares da EPO são neutras. Similarmente, a cadeia única de carboidrato *O*-ligada pode conter duas moléculas de ácido siálico ou nenhuma. Considerando que cada um dos três oligossacarídeos *N*-ligados pode apresentar até quatro resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico e a cadeia *O*-ligada única pode possuir dois, a molécula de EPO poderá ter, no máximo, quatorze resíduos de ácido siálico. Por essa razão, devido à variabilidade da estrutura e do número de moléculas de ácido siálico, a carga negativa líquida da molécula pode variar.

Demonstrou-se que a composição de carboidratos de diferentes glicoproteínas pode ter funções diversas, entre as quais se incluem efeitos sobre a biossíntese e secreção, proteção imunológica, conformação, estabilidade, solubilidade e atividade biológica das moléculas

(SKEHEL et al., 1984; CUMMING, 1991). Para a rhEPO em particular, foi mostrado que a presença de carboidratos é necessária para a secreção celular, aumentar a solubilidade, formação de sítios de ligação com o receptor e aumentar a estabilidade da molécula (DUBE et al., 1988; TSUDA et al., 1990; DELORME et al., 1992; HIGUCHI et al., 1992; SASAKI, 2003). As pesquisas iniciais com EPO de origem natural indicaram que os resíduos de ácido siálico eram necessários para a atividade biológica *in vivo* (LOWRY et al., 1960; LUKOWSKY & PAINTER, 1972; GOLDWASSER et al., 1974). A remoção do ácido siálico da EPO nativa ou recombinante resultou em moléculas com aumentada atividade *in vitro*, mas baixa atividade *in vivo*, presumivelmente, devido à ligação ao receptor da glicoproteína desialilada no fígado (FUKUDA et al., 1989; SPIVAK & HOGANS, 1989; GRIFFITHS, 1991; CHOI et al., 1996). Similarmente foi mostrado que moléculas de EPO que foram deglicosiladas (ou produzidas em *E. coli* para possibilitar a expressão somente do polipeptídeo) têm baixa atividade *in vivo*, mas são ativas *in vitro* devido à maior afinidade de ligação ao receptor de EPO na superfície celular, relativamente ao hormônio intacto (IMAI et al., 1990).

A EPO recombinante produzida em sistemas bacterianos, como *Escherichia coli*, não tem a estrutura de carboidratos e, por essa razão, sua atividade *in vivo* é bastante reduzida devido à baixa meia-vida biológica na circulação (DORDAL et al., 1985; GRIFFITHS, 1991). Em contraste, a análise de cadeias de carboidratos *N*-ligados de rhEPO, produzidas em sistemas de mamíferos, mostrou estruturas bastante similares àquelas que ocorrem na EPO urinária humana (SASAKI et al., 1987). A principal diferença observada nas cadeias de açúcares de rhEPO, produzida em células CHO, é que elas contêm somente ligações α -2,3 na galactose das cadeias oligossacarídicas terminais, diferentemente daquelas de EPO urinária, que contêm ambas as ligações α -2,3 e α -2,6. Todos os oligossacarídeos encontrados na rhEPO também foram encontrados na EPO urinária. A expressão estável da atividade da sialiltransferase α -2,6 em células CHO possibilitou o estudo da função e da bioatividade dessa forma de sialilação (TAKEUCHI et al., 1988; ZHANG et al., 1998).

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

descritos por eletroforese capilar com EPO purificada (STORRING & GAINES DAS, 1992; GOKANA et al., 1997).

A comparação de eritropoietinas de soro e urina humana (LASNE & CEAURRIZ, 2000) foi realizada por IEF na faixa de pH de 2,0 a 5,0. Foram observadas diferenças de isoformas, destacando-se a forma nativa de EPO urinária que tem sido purificada e utilizada para comparação com a produzida por engenharia genética (TAM et al., 1991; KAWASAKI et al., 2000). A estrutura de carboidratos da rhEPO, expressa em células CHO, já havia sido estudada por SASAKI et al. (1987), demonstrando que a EPO urinária era indistinguível da recombinante, exceto por pequena diferença na sialilação. Por outro lado, o efeito da estrutura de carboidratos foi estudado por NARHI et al. (1991) que observaram sua importância para a estabilidade da molécula sob condições desnaturantes, estabilidade essa que independe da presença de ácido siálico. Sugerem que as cargas líquidas, e não apenas a molécula integral, desempenha função na estabilidade da proteína.

A glicosilação da EPO é um processo pós-tradução que é influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa, fatores fisiológicos e condições de cultura (RADEMACHER et al., 1988; CUMMING, 1991). A composição pode ser posteriormente afetada pela seletividade de processos de isolamento usados para purificação (STORRING, 1992). Em estudos com rhEPOs de quatro laboratórios produtores, candidatos a padrão internacional, foram utilizadas duas EPO α e EPO β , expressas em célula CHO, uma em BHK e outra em linhagem C127 de fibroblastos de camundongo. Demonstrou-se diferirem em sua composição de isoformas, conforme avaliado por IEF, PAGE e ensaios de ligação a lectinas, e em suas propriedades biológicas e imunológicas (STORRING et al., 1996; STORRING et al., 1998).

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

As EPOs α e β são as duas formas de eritropoietina recombinante expressas em células de ovário de hamster Chinês, usadas em terapêutica. Observou-se que os lotes de EPO α diferem significativamente da EPO β . Suas isoformas estão distribuídas na faixa de ponto isoelétrico (pI) de 4,42 a 5,11, porém a EPO α apresentou cinco componentes distintos com os mais básicos e acídicos presentes em menores concentrações, e os lotes de EPO β mostraram seis a sete componentes diferentes. Cinco desses componentes estavam na mesma posição da EPO α , com maior proporção de isoformas básicas. A densitometria confirmou que a proporção de isoformas mais básicas (aquelas com pI equivalente ou maior do que o componente mais catódico de EPO α) era significativamente maior na EPO β do que na α . A IEF mostrou variabilidade da composição de isoformas entre lotes de rhEPOs, mas isso não pode ser imediatamente quantificado por densitometria. Não há registros de que a EPO α difere da β em sua eficácia clínica, porém as diferenças observadas em alguns sistemas analíticos poderiam justificar padrões internacionais diferentes para os dois tipos (STORRING et al., 1998; LASNE & CEAURRIZ, 2000; LASNE et al., 2002).

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

Atualmente estão sendo estudadas novas aplicações da rhEPO, na redução da inflamação associada à isquemia em casos de lesão cerebral, da coluna vertebral, insuficiência renal aguda e infarto do miocárdio (SHARPLES et al., 2006).

A eritropoietina humana recombinante encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intravenosa ou subcutânea. A dose inicial para pacientes com insuficiência renal crônica é de 80 a 120 UI/kg de peso corporal, sendo administrada por via

subcutânea três vezes por semana. Nessas condições o hematócrito de pacientes anéfricos se normaliza no período de 2 a 4 meses (KAUSHANSKY & KIPPS, 2006).

As eritropoietinas estão citadas na DCB (BRASIL, 1996), bem como a nível internacional (DCI-USP, 2006), como epoetina alfa, beta, epsilon, gama e ômega, denominação esta, utilizada para designar as preparações que diferem na composição e natureza das estruturas glicídicas.

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

RAMAKRISHNAN et al. (2004) avaliaram 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.

Recentemente, foi estudado modelo farmacocinético e farmacodinâmico, em voluntários sadios, para descrever as variações nas concentrações plasmáticas de rhEPO alfa e suas repostas farmacológicas de porcentagem de reticulócitos, número de eritrócitos e níveis de hemoglobina. Após administração de doses únicas e múltiplas de rhEPO alfa, observaram-se respostas semelhantes para os esquemas de administração (KRZYZANSKI et al., 2005).

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

A farmacocinética e farmacodinâmica de EPO α e β foram avaliadas em voluntários sadios do sexo masculino após a administração de doses pelas vias intravenosa e subcutânea.

A EPO β apresentou tempo de meia-vida 20% superior ao da α após administração intravenosa, bem como, maior contagem absoluta de reticulócitos após administração subcutânea. Essas diferenças podem ser oriundas da composição variável de carboidratos (HALSTENSON et al., 1991).

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

O reticulócito (RTC) corresponde ao último estágio da série eritróide da medula óssea (RAPAPORT, 1990), sua determinação pode ser realizada por método automatizado por citometria de fluxo fluorescente (CHANG & KASS, 1997; RUDENSKY, 1997; BRUGNARA, 1998; SANDBERG et al., 1998; FERRAZOLI & CESCO, 1999, RAMOS et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003).

Sucessivamente os ensaios foram estudados em camundongos policitêmicos e normocitêmicos visando a avaliação de potência de preparações farmacêuticas (BRISTOW, 1997). O ensaio em camundongos policitêmicos baseia-se na incorporação de ^{59}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., 2005). O bioensaio em camundongos normocitêmicos é executado, usando animais normais e a atividade é avaliada pelo estímulo da produção de reticulócitos (HAYAKAWA et al., 1992; STORRING & GAINES DAS, 1992; BRISTOW, 1997; EP., 2005; RAMOS et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003). A contagem tem sido realizada por métodos microscópicos e, mais recentemente, por citometria de fluxo, no qual a intensidade da fluorescência na célula é proporcional à quantidade de RNA do retículo endoplasmático remanescente (BARBONE et al., 1994; YU et al., 1999).

RAMOS et al. (2003) realizaram a avaliação de potência biológica em camundongos normocitêmicos com 8 semanas de idade, utilizando protocolos de administração única e múltipla. Compararam também, os métodos manuais para contagem de células por coloração com azul de cresil brilhante e por hemólise seletiva com o método automatizado por citometria de fluxo. Empregando o protocolo de administração única, observaram a necessidade da realização de no mínimo dois ensaios independentes para atingir precisão preconizada enquanto que para o protocolo de administração múltipla um único ensaio foi

suficiente. Constataram que a combinação entre protocolo de administração múltipla e contagem de reticulócitos por citometria de fluxo forneceu resultados mais precisos e reprodutíveis.

LOPES (2004) avaliou a potência biológica de rhEPO em camundongos normocitêmicos fêmeas de 8 semanas de idade da linhagem Swiss Webster, utilizando protocolo de administração de doses múltiplas selecionados com fator geométrico 3. A contagem dos reticulócitos foi efetuada pelo método microscópico da hemólise seletiva. Além disso, avaliou as respostas das linhagens B6D2F1, preconizada pela Farmacopéia Européia (EP., 2005) e Swiss Webster, destacando a maior sensibilidade da primeira, 24% superior. Sugere a utilização da linhagem Swiss Webster, como alternativa válida para o ensaio biológico de potência de rhEPO.

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

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

WEI et al. (2007) desenvolveram e validaram bioensaio *in vitro* para avaliar a farmacocinética de duas novas proteínas recombinantes (EP1 e EP2) com atividade eritropoietica em ratos. Utilizaram nos bioensaios o sub-clone da linhagem celular 32D de

camundongo. O efeito proliferativo sobre a linhagem celular foi medido pela incorporação de timidina tritiada ao DNA celular. O bioensaio apresentou linearidade significativa, superior a 0,99 e exatidão entre 90 – 110%, demonstrando sua aplicabilidade para a determinação de biofármacos com atividade eritropoiética.

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

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

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

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

avaliada com base nos efeitos sobre o hematócrito de camundongos (EGRIE & BROWNE, 2001; JELKMANN, 2002; EGRIE et al., 2003).

MACDOUGALL et al. (1999) realizaram estudos farmacocinéticos da nova proteína estimuladora de eritropoiese (NESP) em pacientes sob diálise, comparando-a com a EPO alfa, concluindo que a meia-vida biológica mais longa, provavelmente conferiria vantagens clínicas com redução na frequência de dosagem em pacientes anêmicos. MACDOUGALL (2001) confirmou suas observações, demonstrando a eficácia e inocuidade da Darbepoetina alfa, que apresentou boa tolerância e efeitos colaterais semelhantes aos observados com rhEPO, não havendo formação de anticorpos nos pacientes tratados. Posteriormente a farmacocinética e a farmacodinâmica da Darbepoetina alfa foram avaliadas em pacientes sob diálise, em relação à rhEPO alfa. Empregaram dois esquemas de administração, três vezes por semana e semanal para a Darbepoetina alfa. Os autores observaram tempo de meia-vida da Darbepoetina alfa duas a três vezes superior ao da rhEPO, e que ambos os esquemas de administração eram seguros e efetivos na manutenção dos níveis de hemoglobina, mas destacam vantagens da menor frequência de administrações da Darbepoetina alfa (ALLON et al., 2002).

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

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

Recentemente as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e imunológicas das biomoléculas foram melhoradas pela adição de cadeias de polietilenoglicol que origina as formas peguiladas (BAILON & BERTHOLD, 1998; HARRIS et al., 2001; ROBERTS et al., 2002; HARRIS & CHESS, 2003). Neste contexto, MACDOUGALL (2005) desenvolveu a EPO peguilada denominada CERA (Ativador contínuo do receptor de eritropoietina) com peso molecular de 60 kDa. Contém polímeros de metóxi-polietilenoglicol incorporados nas N-terminações, bem como nas lisinas das posições 52 ou 45. Estas modificações prolongaram o tempo de meia-vida na circulação, em aproximadamente 135 horas, após administração subcutânea ou intravenosa (BUNN, 2007). JOLLING et al. (2005) desenvolveram modelo farmacocinético utilizando diferentes espécies animais com a finalidade de prever a farmacocinética da eritropoietina humana peguilada no homem. A aplicação do modelo sugeriu o uso de menor frequência de administrações em comparação com a eritropoietina humana recombinante e darbepoetina, simplificando o tratamento da anemia.

Outra classe de agentes que estimulam a eritropoiese, pesquisada recentemente, é a dos peptídeos estimuladores da eritropoiese (ESA). O Hematide consiste de um peptídeo dimérico, peguilado, obtido por síntese química com massa molecular aproximada de 5 kDa. Sua atividade foi avaliada em diferentes sistemas celulares, demonstrando-se a ativação dos receptores humanos da eritropoietina e a estimulação da eritropoiese em células precursoras eritróides humanas *in vitro*, com respostas semelhantes à eritropoietina natural e recombinante (BUNN, 2007). A resposta eritropoiética do Hematide foi também avaliada em ratos e macacos, e comparada com a das eritropoietinas natural e recombinante apresentando respostas semelhantes. Foi avaliada também, a farmacocinética do Hematide em ratos e macacos apresentando tempo de meia-vida superior a rhEPO e a Darbepoetina alfa, sugerindo uma menor frequência de administrações para o tratamento da anemia (FAN et al., 2006).

STEAD et al. (2006) avaliaram a segurança e a farmacodinâmica do Hematide pela administração de dose intravenosa única em 28 voluntários saudáveis do sexo masculino. A dose de 0,1 mg/kg apresentou aumento estatisticamente significativo nos níveis de hemoglobina.

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

Sucessivamente foram desenvolvidos métodos por eletroforese capilar com detecção no UV para a separação e quantificação de isoformas de rhEPO (CIFUENTES et al., 1999; LÓPEZ-SOTO-YARRITU et al., 2002). Além disso, foi utilizado o acoplamento da eletroforese capilar ao espectrômetro de massas, que possibilitou resolução de um maior número de isoformas com melhor sensibilidade (BOSS et al., 1998; SANZ-NEBOT et al., 2003; NEUSÜß et al., 2005).

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

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

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

ENDO et al. (1992) avaliaram a formação de agregados de alta massa, em formas glicosiladas e deglicosiladas de rhEPO, após aquecimento, por CL-EM. O aquecimento a

60°C em pH neutro resultou em agregados formados por aproximadamente 20 monômeros. O aquecimento a 50°C em pH ácido originou agregados de alta massa com tamanhos variados. Os autores constataram que a concentração de sais aumenta a agregação, além disso, moléculas deglicosiladas de rhEPO foram mais suscetíveis à agregação após aquecimento, indicando que as cadeias de carboidratos são essenciais para a estabilidade de rhEPO.

GUNTURI et al. (2007) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida por exclusão molecular e detecção por fluorescência para a determinação de agregados de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo 0,03% de polisorbato 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.

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

As pesquisas com biofármacos atingiram estágio no qual a atividade biológica de algumas proteínas pode ser correlacionada com métodos físico-químicos (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996; DALMORA et al., 2006). Porém, o desenvolvimento de métodos de análise direta de rhEPO em produtos farmacêuticos podem apresentar dificuldades devido à baixa concentração da glicoproteína na presença de quantidades significativas de excipientes, adicionados para prevenir a adsorção da proteína nas paredes dos recipientes, aumentando dessa forma, a estabilidade do produto durante o armazenamento. Os problemas são ainda maiores, quando os excipientes são também proteínas, tais como, a albumina de soro humano, que não pode ser considerada quimicamente homogênea, pois geralmente é obtida de plasma humano de grande número de doadores (BIETLOT & GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006).

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

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

No estudo colaborativo que estabeleceu a substância biológica de referência de EPO da Farmacopéia Européia, foi selecionada a preparação composta pela mistura (50:50) de Eritropoietina alfa e beta, e foram realizados ensaios biológicos com injeção de dose única em camundongos policitêmicos e normocitêmicos (BRISTOW, 1997; EP., 2005). A Farmacopéia Européia 2005 (EP., 2005), em sua monografia da solução concentrada, especifica que a rhEPO deve ter potência de não menos do que 100.000 UI/mg. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e os limites de confiança ($P=0,95$) de 64 – 156%. A Farmacopéia Americana (USP 29, 2005) não faz referência à rhEPO.

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

expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. Desse modo, demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (FDA, 2001; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005).

As duas publicações científicas efetuadas no contexto da dissertação estão anexadas a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 – 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**, submetido.

**Validation of the normocythaemic mice bioassay for the potency assessment of
recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations**

Thiago Barth, Paulo R. Oliveira, Felipe B. D'Avila and Sérgio L. Dalmora*

Department of Industrial Pharmacy

Health Science Centre

Federal University of Santa Maria

97.105-900 – Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding author. Phone/fax: + 55 (55) 3220 8952.

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

Abstract

The normocythaemic mice bioassay was validated for the potency evaluation of the recombinant human erythropoietin (rhEPO) against the European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation for erythropoietin. The bioassays were carried out in eight-week old female BALB/c mice, which received multiple daily injections of standard or sample solutions (3+3), during four days. The blood sampling was performed 24 hours after the last injection and the reticulocytes counted by automated flow cytometry. Method validation investigated parameters such as the linearity, precision, accuracy, specificity, and robustness giving results within the acceptable range. The dose-response curve was linear in the concentration range of 1 to 64 IU/mL and the value of the determination coefficient (r^2) was 0.9708. The bioassay was applied for the potency evaluation of rhEPO pharmaceutical products containing alfa or beta forms, expressed in different cell lines, giving biological potencies within 82.79 and 119.70%, of the stated potency. The precision index calculated by the weight for the independent assays was higher than 247. The results demonstrated the validity of the bioassay for the potency assessment of pharmaceutical formulations contributing to assure the therapeutic efficacy of the biological medicine.

Keywords: Bioassay, Normocythaemic mice, Recombinant human erythropoietin, Validation

1. Introduction

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone that is the primary regulator of the rate of erythropoiesis. The recombinant human erythropoietin (rhEPO) consists of a 165 amino acids polypeptide chain (*pI* 4.4-5.1) heavily glycosylated at three N-linked and one O-linked glycosylation sites with two disulfide bonds yielding a molecular mass of 30-34 kDa. About 40% of the fully glycosylated EPO molecule consists of carbohydrate. These play an important role in determining the biological activity of EPO, which appears to be dependent upon the number of sialic acid residues at the termini of the tri- and tetra-antennary sugar chains (1-3).

Therapeutically, rhEPO has proven beneficial for treating renal anaemia as well as anaemia of other chronic disorders, including autoimmune diseases, malignancies, and AIDS (4, 5).

The in-vivo bioassays have been widely applied in standardisation studies and for the potency evaluation of pharmaceutical preparations (6-10). The assay carried out using the polycythaemic mice is based on the stimulation of reticulocyte production and ⁵⁹Fe incorporation into circulating red blood cells of mice made polycythaemic by exposure to reduced atmospheric pressure. Although the bioassay is normally sensitive, precise and specific, the procedure has a number of drawbacks such as, the use of a radioisotope and elaborated animal preparation. Otherwise, currently, the normocythaemic mice bioassay has been carried out in normal animals using single or multiple daily injection protocols and for both models, the blood was collected on day 5. The reticulocytes counted by flow cytometry that has greatly improved the precision and accuracy of the method. However, some improvement is needed with regard to the response variability and accuracy, most importantly when assessing the potency of widely-sourced commercial batches of rhEPO, and as well to the validation parameters of the bioassay (11-13), not published by the literature.

Investigations of rhEPO activity have been carried out using cell culture assays based on different cell lines, including AS-E2, TF1, and UT-7 (14-16). However, these in vitro assays are unable to discriminate between intact EPO and its asialo- or aglycosylated variants, which have a much shorter half-life and, therefore, a greatly reduced bioactivity when administered in-vivo. Although there is a drive to replace in-vivo bioassays with non-animal based assays, this is not feasible in the case of EPO as the two do not correlate (11, 12).

Several biotechnology laboratories are producing the rhEPO for clinical purposes by the expression of EPO cDNA clones in eukaryotic cell lines, most commonly in Chinese hamster ovary (CHO) or baby hamster kidney (BHK) cells. The two main forms, epoetin alfa and beta, possess a similar isoelectric patterns, although the isoelectric focusing demonstrated that epoetin beta contain a wider spectrum of isoforms, with a greater proportion of more basic isoforms than epoetin alfa. EPOs differing in their isoform composition have also differed in their biological activities, immunoreactivities, and pharmacokinetics. However, there are no reports that epoetin alfa differs from epoetin beta in its clinical efficacy (17, 2, 18). It is well recognised that the type of host cell line used for its production, the culture conditions employed and the purification processes applied may all affect the glycosylation profile of the preparations and thus influence the final biopotency. Therefore, it is essential that a robust, well-characterised and validated methodology is applied to ensure batch-to-batch consistency from the different manufacturers in order to guarantee high quality and therapeutic efficacy (17, 19).

The aim of the present study was to validate the normocythaemic mice bioassay by linearity, precision, accuracy, robustness, and specificity to be applied for the biological potency assessment of the recombinant human erythropoietin, assuring the quality and therapeutic efficacy of the pharmaceutical formulations.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for erythropoietin (250 µg/vial=32,500 IU/vial) was obtained from the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM, Strasbourg, France). A total of twelve batches of erythropoietin commercial formulations were obtained from different manufacturers, identified by arabic numbers: 1 to 4 alfa epoetin containing 2,000 IU/mL, 4,000 IU/mL and 10,000 IU/mL, expressed in CHO.K1 cell line; 5 to 7 epoetin alfa containing 4,000 IU/mL and 10,000 IU/mL, expressed in CHO-dhfr cell line; 8 and 9 epoetin alfa containing 2,000 IU/mL and 4,000 IU/mL, expressed in CHO, pSR cell line and 10 to 12, epoetin beta available with the expression potency of 10,000 IU/0.6 mL equivalent to 16,667 IU/mL, cell line protected by patent. All preparations were within their shelf-life period. Sodium pentobarbitone and ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt were from (Merck, Darmstadt, Germany) and reagents for automated counting were from (HORIBA ABX Diagnostics, Montpellier, France). All other reagents were of the highest purity available from commercial sources.

2.2. Laboratory animals

All the assays were conducted in accordance with the national protection laws on animal welfare. Female 8-week-old BALB/c mice were housed in air conditioned controlled conditions (room temperature $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 65%; artificial illumination, 12 hours per day) and they were used weighting between 18 and 23 g. They were given free access to food and water.

2.3. Normocythaemic mice bioassay

The assay was carried out as previously published by Ramos et al. 2003 (11). The animals were allocated to sample, standard and control groups in a fully randomised order and identified by colour code for the assay, with usually 6 mice per treatment group. The Ph. Eur. BRP for erythropoietin and test samples were diluted to the concentrations of 4, 12 and 36 IU per mL with phosphate buffered saline (pH 7.2) containing 0.1% bovine serum albumin (10).

Multiple injections of 0.2 mL rhEPO working solutions per mice were injected subcutaneously once per day, during four consecutive days. On day 5 peripheral blood was collected. All the injections and blood collection were carried out between 9 a.m. and 11 a.m. Reticulocytes were counted by the automated flow cytometry method.

2.4. Automated fluorescence flow cytometry reticulocytes counting

After anesthetizing the mices intraperitoneally with sodium pentobarbitone (40 mg/Kg) the blood samples were collected from the orbital venous sinus using a glass capillary tubes into a disposable tube containing 5% sodium EDTA. Samples of 130 μ L of blood were aspirated into the automated reticulocyte counter (HORIBA ABX Diagnostics, Montpellier, France). In this method, a maximum of 32,000 red cells are analysed and the instrument, using customised gating for each sample, separates the mature red cells, reticulocytes, white blood cells, and, on the lower threshold setting, the platelets. Results were reported as the percentage of reticulocytes.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses of the assay data were carried out according to Finney (20), by parallel line methods (3 x 3), using PLA 1.2 software (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany). Analysis of variance was performed for each assay and the assumption of linearity and

parallelism of the log dose-log response lines was tested. Statistical weights were computed as the reciprocal of the variance of the log potency. Estimates of log potency were examined for heterogeneity using a χ^2 test and were combined as weighted geometric means of homogeneous estimates. The outlier data were calculated by Dixon's test using the PLA 1.2.

2.6. Procedure

2.6.1. Preparation of reference and sample solutions

The reference solutions of rhEPO were obtained by diluting the Ph. Eur. BRP for erythropoietin with 1 mL of phosphate buffered saline pH 7.2 containing 0.1% bovine serum albumin yielding the concentration of 32,500 IU/mL. The working reference and samples solutions were prepared from the stock solutions containing 250 IU/mL and diluted in the same phosphate buffer to final concentrations of 4, 12 and 36 IU/mL. These solutions were stored at 2 – 8°C, for one week.

2.6.2. Preparation of the dose-response curve solutions

Appropriate amounts of the reference solution were diluted in the same buffer yielding concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 64 IU/mL for rhEPO.

2.7. Validation of the bioassay

The method was validated using samples of pharmaceutical formulations of rhEPO and the parameters evaluated according to the FDA guidelines (13).

2.7.1. Linearity and limit of quantitation

The range of linearity was determined by constructing three independent dose-response curves. For the construction of each dose-response curve seven concentrations of Ph. Eur. BRP for erythropoietin in the range from 1 to 64 IU/mL were prepared. The concentrations of the reference solutions were subjected to regression analysis to calculate calibration equation and correlation coefficients. The limit of quantitation (LOQ) was determined experimentally based on the lowest concentration of the standard in the linear range of the dose-response curve which gives responses capable of being quantitated with accuracy and precision with RSD of $\pm 20\%$

2.7.2. Precision

The precision of the method was determined by repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay). Repeatability was determined by performing six repeated analysis of the same sample of erythropoietin under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on two different assays (inter-assays) and also by another analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).

2.7.3. Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the formulation excipients with known amounts of the reference preparation, corresponding to the concentrations of 80, 100 and 120%, of the nominal analytical concentration. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from formulation matrix.

2.7.4. Robustness

The robustness was assessed, analysing the same samples, by altering the following experimental conditions such as: animal strain, animal age (weeks), the pH of the buffer solution, volume of injection, stability of the solutions, injection protocol, and number of the animals per treatment group.

2.7.5. Specificity

To determine the specificity of the normocythaemic mice bioassay three commercial samples of rhEPO were independently spiked with known amounts of 225 µg/mL, 36 µg/mL, and 5 µg/mL of recombinant human growth hormone, recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, respectively.

2.8. Potency assessment of rhEPO

The potency evaluation of pharmaceutical formulations of rhEPO was carried out by the validated normocythaemic mice biological assay against the Ph. Eur. BRP for erythropoietin.

3. Results and discussion

The bioassay was validated to demonstrate that the performance characteristics of the assay meet the requirements for the potency evaluation of rhEPO biological medicine. The validation parameters were established based on the inherent variability responses of the animal model and the existing guidelines, not detailed for the bioassays, and performed following the good laboratory practices.

The dose-response curves (n=3) were constructed by plotting the experimental values as percent of reticulocytes versus the concentrations of the Ph. Eur. BRP for erythropoietin that

demonstrated significant linearity in the 1 - 64 IU/mL range. A linear regression line calculated by the least squares method was applied and the value of the determination coefficient calculated ($r^2=0.9708$, $y=0.2553x + 7.0794$), indicated significant linearity of the dose-response curve for the assay based on the biological responses in-vivo. The LOQ evaluated in an experimental assay was found to be 1 IU/mL.

The precision of the analytical method was studied as the repeatability by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations in the concentration of 4,000 IU/mL, as shown in Table 1. The mean of the determinations of rhEPO in the samples of pharmaceutical formulation was 4,086 IU/mL, with the RSD calculated as 3.09%.

TABLE 1

The intermediate precision was assessed by analysing two samples of the pharmaceutical formulation on two different assays on different days (inter-assays, Table 2); the RSD value obtained were 3.05% and 3.45%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by two analysts; the values were found to be 2.73% and 3.39% (Table 3).

TABLE 2

TABLE 3

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different potency levels, 3,200, 4,000 and 4,800 IU/mL, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal

analytical concentration. The absolute means obtained, as shown in Table 4, were equivalent to 98.65, 100.1, and 102.33%, with a mean value of 100.36% and an RSD of 1.84%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

TABLE 4

The robustness was determined by analysing the same pharmaceutical samples under the variety of conditions described. The potency and the confidence intervals obtained according to each variable are given in Table 5 together with the optimized conditions. The results obtained analysing samples of beta rhEPO identified as 10 to 12 in Table 6, demonstrated also the robustness of the bioassay for the evaluation of this form.

TABLE 5

The specificity of the normocythaemic mice bioassay was evaluated with pharmaceutical samples of rhEPO spiked with known amounts of hormones giving non significant differences potencies lower than 4%, showing that there was no interference in the biological potencies assessment.

The validated normocythaemic mice bioassay was applied for the potency evaluation of alfa and beta rhEPO pharmaceutical formulations, giving biological potencies within 82.79% and 119.70%, of the stated potency. As shown in Table 6, the samples met the potency specifications claimed between 80 and 125% (10). The precision of the independent assays was calculated by the statistical weight yielding values higher than 247. Due to the responses variability and to show improved precision, some of the samples were also submitted to two or three independent assays, identified by asterisk number, and the potencies statistically

combined. The results of the bioassay are more precise and reproducible compared to the single injection protocol previously studied (11), with advantages for the quality control also in the context of the reduction of the use of the animals for the assays.

TABLE 6

4. Conclusion

The multiple daily injection normocythaemic mice bioassay was validated demonstrating acceptable results for the precision, accuracy, specificity, and robustness. The precision and reproducibility was higher compared to the existing procedures, being robust for the potency assessment of alfa and beta rhEPO. Moreover, represents a contribution in the context of the refinement of the assays, with advantages for the quality control of the biological medicine assuring the safety and clinical efficacy.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, projects 402615/2005-0 and 305148/2005-2) for the financial support.

References

- (1) Tran, A.D., Park, S., Lisi, P.J., Huynh, O.T., Ryall, R.R., Lane, P.A. (1991) *J. Chromatogr. A* **542**, 459-471
- (2) Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., de Ceaurriz, J. (2002) *Anal. Biochem.* **311**, 119-126
- (3) Elliot, S., Egrie, J., Browne, J., Lorenzini, T., Busse, L., Rogers, N., Ponting, I. (2004) *Exp. Hematol.* **32**, 1146-1155
- (4) Egrie, J.C., Dwyer, E., Browne, J.K., Hitz, A., Lykos, M.A. (2003) *Exp. Hematol.* **31**, 290-299
- (5) Ramakrishnan, R., Cheung, W.K., Wacholtz, M.C., Minton, N., Jusko, W.J. (2004) *J. Clin. Pharmacol.* **44**, 991-1002
- (6) Storrington, P.L., Gaines Das, R.E. (1992) *J. Endocrinol.* **134**, 459-484
- (7) Choi, D., Kim, M., Park, J. (1996) *J. Chromatogr. B* **687**, 189-199
- (8) Bristow, A. (1997) *Pharmeuropa* **2**, 31-47
- (9) Schmidt, C.A., Codevilla, C.F., Fronza, M., Casali, R.G., Dalmora, S.L. (2003) *Acta Farm. Bonaerense* **22**, 343-350

- (10) *European Pharmacopoeia* (2005) 5th Ed., Council of Europe, Strasbourg, France, pp 1528-1532
- (11) Ramos, A.S., Schmidt, C.A., Andrade, S.S., Fronza, M., Rafferty, B., Dalmora, S.L. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 1561-1569
- (12) Liefoghe, E.C., Tiplady, R., Gerson, P., Lloyd, P., Heath, A., Bristow, A.F. (2005) *Biologicals* **33**, 161-167
- (13) Guidance for industry: Bioanalytical method validation (2001), US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD
- (14) Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F. (1989) *Blood* **73**, 375-380
- (15) Miyazaki, Y., Kuriyama, K., Higuchi, M., Tsushima, H., Sohda, H., Imai, N., Saito, M., Kondo, T., Tomonaga, M. (1997) *Leukemia* **11**, 1941-1949
- (16) Qiu, H., Belanger, A., Yoon, H.P., Bunn, H.F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11173-11176
- (17) Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Gaines Das, R.E., Stenning, B.E., Lamikanra, A., Rafferty, B., Lee, J. (1998) *Br. J. Haematol.* **100**, 79-89
- (18) Gascon, P. (2005) *Eur. J. Cancer* **41**, 2601-2612

(19) Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M.V., Frutos, M., Diez-Masa, J.C. (1999) *J. Chromatogr. A* **830**, 453-463

(20) Finney, D.J. (1978) *Statistical methods in biological assay*. Charles Griffin, London, UK

Table 1. Repeatability of the normocythaemic mice bioassay for the potency evaluation of rhEPO in pharmaceutical formulation.

Sample Assay	Potency			Combined	
	Stated IU/mL	Found IU/mL	Confidence intervals ^a	potency IU/mL	RSD ^b %
1	4,000	4,208	3,240 – 5,520	4,086	3.09
2	4,000	4,152	3,120 – 5,560		
3	4,000	3,936	2,920 – 5,280		
4	4,000	3,916	2,880 – 5,240		
5	4,000	4,164	3,080 – 5,680		
6	4,000	4,140	3,200 – 5,400		

^a P = 0.95.

^b RSD = Relative standard deviation.

Table 2. Inter-assays precision data of the normocythaemic mice bioassay in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Assay	Potency			Combined	
		Stated IU/mL	Found IU/mL	Confidence intervals ^a	potency ^b IU/mL	RSD ^c %
1	1	4,000	3,912	2,960 – 5,320	3,996	3.05
	2		4,084	3,080 – 5,560		
2	1	4,000	3,924	2,760 – 5,640	4,022	3.45
	2		4,120	2,880 – 5,880		

^a P = 0.95.

^b Combined results from 2 assays.

^c RSD = Relative standard deviation.

Table 3. Between-analysts precision data of the normocythaemic mice bioassay in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Analyst	Potency			Combined	
		Stated IU/mL	Found IU/mL	Confidence intervals ^a	potency ^b IU/mL	RSD ^c %
1	A	4,000	4,018	3,040 – 5,680	4,097	2.73
	B		4,176	3,160 – 5,840		
2	A	4,000	3,908	2,760 – 5,560	4,002	3.39
	B		4,100	2,880 – 5,840		

^a P = 0.95.

^b Combined results from 2 analysts.

^c RSD = Relative standard deviation.

Table 4. Accuracy of the normocythaemic mice bioassay.

Stated		Potency		Combined		Mean	RSD ^c
IU/mL	%	IU/mL	%	potency ^a	RSD ^c	Accuracy ^b %	%
		3,316	82.92				
3,200	80	3,008	75.19	3,157	4.88		
		3,148	78.70				
		3,924	98.11				
4,000	100	3,972	99.29	4,004	2.49	100.36	1.84
		4,116	102.91				
		5,028	125.71				
4,800	120	4,968	124.20	4,912	3.09		
		4,740	118.49				

^a Calculated from three independent assays.

^b Mean Accuracy: obtained potency expressed as % of the nominal potency.

^c RSD = Relative standard deviation.

Table 5. Conditions investigated during the robustness testing of rhEPO bioassay.

Variables		Potency found	Confidence intervals ^a	Optimized
		IU/mL		conditions
Animal strain	CF1	3,972	3,240 – 5,040	BALB/c
	BALB/c	4,036	3,560 – 4,840	
Animal age (weeks)	7	4,156	3,320 – 5,880	8
	8	4,056	3,160 – 5,400	
	9	3,936	2,760 – 5,960	
Buffer (pH)	7.0	4,132	3,360 – 5,040	7.2
	7.2	4,044	3,320 – 5,000	
	7.4	3,868	3,200 – 4,840	
Injection (mL)	0.1	4,112	2,760 – 5,880	0.2
	0.2	3,984	3,040 – 5,200	
	0.3	3,932	2,960 – 5,360	
Solutions stability, prepared	Daily	4,032	3,200 – 5,160	Weekly
	Weekly	3,988	3,160 – 5,000	
Injection protocol	Single	4,088	2,360 – 6,400	Multiple
	Multiple	3,972	3,040 – 5,560	
Animals per group	4	3,936	2,440 – 6,360	6
	6	4,092	2,840 – 5,800	
	8	4,024	3,080 – 5,480	

^aP = 0.95.

Table 6. Potency, confidence intervals (P=0.95) and precision of the estimates of rhEPO in pharmaceutical products by the normocythaemic mice bioassay.

Sample					
N°	Potency	Potency Found		Confidence intervals	Statistical Weight
	Stated	IU	%		
	IU/mL ^a				
1**	2,000	2,238	111.88	90 – 141	434
2	4,000	3,848	96.19	73 – 126	302
3	2,000	2,052	102.62	81 – 138	397
4	10,000	11,970	119.70	98 – 152	306
5	10,000	9,810	98.10	77 – 125	329
6	4,000	4,184	104.59	78 – 141	253
7**	4,000	3,312	82.79	66 – 105	448
8***	4,000	4,176	104.41	86 – 127	560
9	2,000	1,988	99.38	77 – 129	325
10	16,667	17,650	105.90	69 – 122	278
11**	16,667	16,016	96.10	77 – 118	484
12	16,667	16,383	98.30	71 – 135	247

^a Calculated as 100%.

* Number of assays combined.

3.2 – 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**, 30: 1277-1288, 2007.

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies[®], 30: 1277–1288, 2007
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN 1082-6076 print/1520-572X online
DOI: 10.1080/10826070701274668

Assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations by a Reversed-Phase Liquid Chromatography Method and Bioassay

Thiago Barth, Maximiliano da Silva Sangoi,
Lucélia Magalhães da Silva, Ricardo Machado Ferretto
and Sérgio Luiz Dalmora

Department of Industrial Pharmacy, Health Science Centre,
Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

Abstract: A gradient reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) was developed for the analysis of alpha and beta rhEPO in pharmaceutical formulations. The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm × 4.6 mm I.D., with a pore size of 300 Å). 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), using a photodiode array (PDA) detection at 280 nm. The chromatographic separation was obtained within 60 min and was linear in the concentration range of 10–150 µg/mL. The parameters validated, such as the specificity, precision, accuracy, and robustness gave results within the acceptable range. The pharmaceutical samples were analysed by the chromatographic method and compared to the normocythaemic mice bioassay, showing the mean difference between the estimated potencies of 11.2% ± 1.8 higher for the RP-LC, with significant correlation ($r = 0.9799$) as calculated by the Pearson's coefficient. The proposed RP-LC method represents an alternative to the bioassay that can be applied for the potency assessment, improving the quality control of rhEPO in pharmaceutical dosage forms.

Keywords: Recombinant human erythropoietin (rhEPO), Normocythaemic mice bioassay, Reversed-phase liquid chromatography, Validation

Address correspondence to Sérgio Luiz Dalmora, Department of Industrial Pharmacy, Health Science Centre, Federal University of Santa Maria, 97.105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: sdalmora@terra.com.br

INTRODUCTION

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone produced primarily by the kidneys, which regulates the production of the red blood cells in mammals. The erythropoietin consists of a 165 amino acids polypeptide chain (pI 4.4–5.1), heavily glycosylated at three N-linked and one O-linked glycosylation sites with two disulfide bonds, yielding a molecular mass of 30–34 kDa. About 40% of the fully glycosylated EPO molecule consists of carbohydrate. These play an important role in determining the biological activity of EPO, which appears to be dependent upon the number of sialic acid residues at the termini of the tri- and tetra-antennary sugar chains.^[1,2]

Since its cloning and subsequent recombinant production on an industrial scale, recombinant human erythropoietin (rhEPO) has become one of the most successful biopharmaceutical products. Therapeutically, rhEPO has proven beneficial for treating renal anaemia as well as anaemia of other chronic disorders, including autoimmune diseases, malignancies, and AIDS.^[3–5]

Currently the content/potency of rhEPO preparations is tested by *in vivo* bioassays, which measure relevant biological activity. The assay carried out using the polycythaemic mice is based on the stimulation of reticulocyte production and ⁵⁹Fe incorporation into circulating red blood cells of mice made polycythaemic by exposure to reduced atmospheric pressure.^[6–8] Otherwise, the normocythaemic mice bioassay has been performed in normal animals using single or multiple injection protocols and the reticulocytes counted by flow cytometry.^[9–11]

There have been decades of research on biologicals to reach a stage where the biological activity of some proteins could be correlated with physicochemical assays.^[12–14] The development of analytical methods for the direct analysis of rhEPO in pharmaceutical preparations may present some difficulties due to the low dose of the micro-heterogeneous glycoprotein in the presence of relatively large amounts of the excipients, added to prevent adsorptions of the proteins to the vial walls and to increase stability during storage. Particular difficulties arise when the excipients are also proteins, such as human serum albumin (HSA), which can not be considered chemically homogeneous.^[15,16]

Liquid chromatography (LC) is a well established technique, which has been successfully used to monitor the purity, identity, chemical stability, and potency of biopharmaceuticals obtained through recombinant technology.^[17–19] Size exclusion liquid chromatography (SE-LC) may be used for quantitation, but is usually applied to determine the native size of the protein and to reveal possible dimmers, oligomers, and aggregates. A SE-LC with fluorescence detection was applied for the quantitation of rhEPO aggregates in formulated products containing 0.03% polysorbate 80, with high sensitivity and robustness.^[20] A high performance anion exchange chromatography method combined with intrinsic fluorescence detection was also developed for the determination of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical preparations, showing a difference of 12% higher than

Reversed-Phase Liquid Chromatography Method

1279

claimed potency.^[21] Besides, the reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) exploits the hydrophobic properties of the molecules in the separation process and offers a high level of accuracy and sensitivity. The RP-LC method in combination with UV-detection, has been widely used for the quantitation of biological medicines, quality control, and for the analysis of closely related protein variants or degradation products, such as oxidised and deamidated forms.^[19,22] At present, there is no published RP-LC method validated for the evaluation of rhEPO in pharmaceutical formulations.

The aim of the present study was to develop a RP-LC method validated by linearity, precision, accuracy, robustness, specificity, limit of detection, and limit of quantitation, to be applied for the potency assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations; moreover, to evaluate the correlation between the chromatographic method and the biological assay, seeking for alternatives that can contribute to replace the bioassay and to improve the quality control of the biological medicine.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for erythropoietin (250 µg/32,500 IU/vial), of a mixture of equal amounts of alpha and beta epoetins, was obtained from the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM, Strasbourg, France). A total of ten batches of erythropoietin commercial formulations were obtained from different manufacturers, identified by arabic numbers: 1 to 7 alpha epoetin containing 2,000 IU/mL and 4,000 IU/mL corresponding to 16.8 and 33.6 µg/mL, respectively; samples 8 to 10 of beta epoetin containing 10,000 IU/0.6 mL, corresponding to 138.33 µg/mL. All preparations were within their shelf life period. Hydrogen peroxyde 30% in aqueous solution, HPLC grade acetonitrile, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium EDTA, sodium chloride, and trifluoroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). For all analyses, ultrapure water (Millipore, Bedford, MA, USA) filtered through a 0.22 µm membrane filter was used, and reagents for automated counting were from HORIBA ABX Diagnostics (Montpellier, France). All other reagents were of the highest purity available from commercial sources.

Laboratory Animals

Female 8 week-old BALB/c mice were housed in air conditioned, controlled conditions (room temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity of 65%; artificial illumination, 12 hours per day) and used weighing between 18 and 23 g. They were given food and water ad libitum.

Normocythaemic Mice Bioassay

The assay was carried out as previously published by Ramos et al. 2003.^[10] The animals were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomised order and identified by colour code for the assay, with usually 6 mice per treatment group. The Ph. Eur. BRP for erythropoietin and test samples were diluted to the concentrations of 4, 12, and 36 IU per mL, with phosphate buffered saline (pH 7.2) containing 0.1% bovine serum albumin. Multiple injections of 0.2 mL rhEPO per mice were injected subcutaneously from day 1 to day 4. On day 5, peripheral blood was collected. Reticulocytes were counted by the automated flow cytometry method and the results reported as the percentage of reticulocytes.

Statistical Analysis

Statistical analyses of the assay data were carried out according to Finney,^[23] by parallel line methods (3×3), using PLA 1.2 software (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany). Analysis of variance was performed for each assay and the assumption of linearity and parallelism of the log dose-log response lines was tested. Statistical weights were computed as the reciprocal of the variance of the log potency. Estimates of log potency were examined for heterogeneity using a χ^2 test, and were combined as weighted geometric means of homogeneous estimates. The outlier data were calculated by Dixon's test using the PLA 1.2. All the assays were analysed at a significance level of $P = 0.05$.

Apparatus and Reversed-Phase Liquid Chromatography Conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with an SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, DGU-14A degasser, CTO-10A_{VP} column oven, SIL-10AD_{VP} autosampler, and an SPD-M10A_{VP} photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 280 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.12 software program.

The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm \times 4.6 mm I.D., with a pore size of 300 Å) and C₄ Kit Security Guard Cartridges was used to protect the analytical column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25°C) and the refrigerated autosampler maintained at approximately 5°C. The elution was performed by a gradient at a constant flow rate of 0.5 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.08% TFA:acetonitrile (30:70, v/v).

Reversed-Phase Liquid Chromatography Method

1281

The gradient was linear with 0 to 100% of B from 0.1–60 min, and then re-equilibrated with mobile phase A during 15 min. The mobile phases were filtered through a 0.22 μm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The injection volume was 50 μL for both standard and samples.

Procedure

Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions of rhEPO were prepared daily by diluting the Ph. Eur. BRP for erythropoietin and the sample of pharmaceutical formulation in water, to a final concentration of 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the LC method, and in phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, to appropriate concentrations for the bioassay.

Validation of the RP-LC Method

Once the chromatographic and the experimental conditions were optimized, the method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ), following the ICH guidelines.^[24]

Specificity

Specificity of the method towards the drug was established through the determination of the peak purity of samples of pharmaceutical formulation of rhEPO (33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) subjected to degradation by oxidative conditions, by adding 30 μL of hydrogen peroxide 30% during 1 and 2 hours. Besides, the in-house mixture of the pharmaceutical formulations, excipients were also analysed by the RP-LC method using a PDA detector.

Linearity

The range of linearity was determined by constructing three calibration curves. For the construction of each calibration curve, seven concentrations of the Ph. Eur. BRP for erythropoietin in the range of 10–150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 30 min with the mobile phase following through the system. Each measurement was carried out in three replicates of 50 μL injection for the standard solution, to verify the repeatability of the detector response at each concentration. The peak areas of the chromatograms were plotted against the concentrations of Ph. Eur. BRP for erythropoietin to obtain the calibration

1282

T. Barth et al.

curve. The seven concentrations of the standard solution were subjected to regression analysis to calculate calibration equations and correlation coefficients.

Precision

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Repeatability was determined by performing six repeated analysis of the same samples of rhEPO, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-day) and also by another analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).

Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the formulation excipients with known amounts of the reference drug, to obtain solutions at concentrations of 26.88, 33.60, and 40.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalent to 80, 100, and 120%, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

Robustness

The robustness was assessed by altering the following experimental conditions such as: by changing the flow rate from 0.45 to 0.55 mL/min, the injection volume from 30 to 50 μL , the wavelength in the range of 210 to 320 nm, the percent of acetonitrile from 68 to 72%, and stability of the analytical solution in the autosampler maintained at approximately 5°C.

Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)

For the calculation of the LOD and the LOQ, a calibration equation was generated by using the mean values of the three independent calibration curves. The LOD and the LOQ were obtained by using the mean of the slope, and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as defined by ICH.^[24]

System Suitability

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50 μL of the working standard solution containing 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used for the evaluation of the system suitability parameters, such as asymmetry,

number of theoretical plates, retention time, and area, through the CLASS-VP® V 6.12 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the RP-LC Method

A typical chromatogram was obtained by the proposed RP-LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to rhEPO with a retention time of 49.9 min, and no interfering peaks due to the excipients are shown in Figure 1. The specificity of the analytical method was indicated by the oxidative conditions that generated no additional peaks. The studies with the PDA detector showed that the rhEPO peak was free from any coeluting peak, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of rhEPO.

The calibration curves for rhEPO were constructed by plotting the area of the peaks versus concentration. Linearity was observed in the concentration range from 10 to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The value of the determination coefficient ($r^2 = 0.9997$, $y = 3744.1 \pm 135.1x - 11.695 \pm 4687.45$) indicated significant linearity of the calibration curve for the method.

The precision of an analytical method was studied as the repeatability by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The mean of the determinations of rhEPO in the samples of pharmaceutical formulation was 100.06%, with the RSD calculated as 0.70%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day, Table 1); the RSD values obtained were 1.27 and 1.04%, respectively. Between analysts, precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by two analysts, and the values were found to be 0.46 and 0.25%, respectively (Table 2).

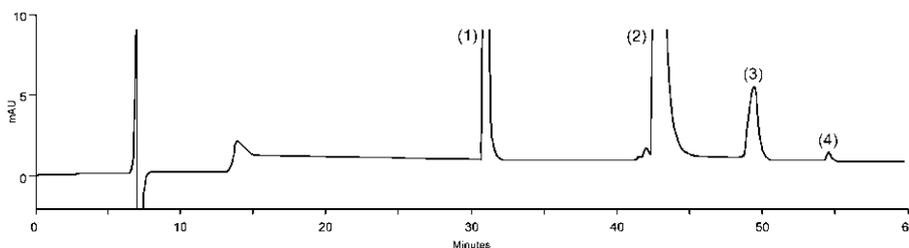


Figure 1. RP-LC chromatogram of rhEPO pharmaceutical formulation (33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$): peak 1, 2 and 4 – excipients, peak 3 – rhEPO.

Table 1. Inter-day precision data of RP-LC for rhEPO in samples of pharmaceutical formulation

Sample	Day	Recovery ^a (%)	Mean ^b (%)	RSD ^c (%)
1	1	100.49	100.70	1.27
	2	102.08		
	3	99.54		
2	1	100.88	100.52	1.04
	2	99.34		
	3	101.34		

^aMean of three replicates.^bMean of three days.^cRSD = Relative standard deviation.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 26.88, 33.60, and 40.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The absolute means obtained were 99.81, 101.13, and 100.96%, respectively, with a mean value of 100.66% and RSD of 0.72% as shown in Table 3. It is evident that the method is accurate within the desired range.

The robustness was determined by analyzing the same pharmaceutical samples under the variety of conditions described. The results and the experimental range of the selected variables are given in Table 4, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the above modifications were made in the experimental conditions, thus showing that the method is robust.

The LOD and the LOQ calculated were 3.75 and 12.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed. Results of

Table 2. Between-analysts precision data of RP-LC for rhEPO in samples of pharmaceutical formulation

Sample	Analyst	Recovery ^a (%)	Mean ^b (%)	RSD ^c (%)
1	A	100.49	100.82	0.46
	B	101.15		
2	A	100.64	100.46	0.25
	B	100.28		

^aMean of three replicates.^bMean of two analysts.^cRSD = Relative standard deviation.

Reversed-Phase Liquid Chromatography Method

1285

Table 3. Accuracy of RP-LC for rhEPO

Nominal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Mean concentration found ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)
26.88	26.83		
33.60	33.98	0.72	100.66
40.32	40.71		

^aMean of three replicates.^bRSD = Relative standard deviation.

the system suitability test are given in Table 5, showing that the parameters are within the suitable range.

Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms by Physicochemical and Biological Methods

The content/potency of the rhEPO pharmaceutical preparations usually range from 2,000 to 16,666 IU/mL, which is equivalent to 16.8–138.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrating that the linearity range evaluated from 10 to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is sensitive enough to assay the licensed pharmaceutical products. The same ten commercial batches of alpha and beta rhEPO forms in pharmaceutical formulations containing HSA or polysorbate 20, were analysed in parallel by the RP-LC method and the normocythaemic mice bioassay against the Ph. Eur.

Table 4. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	rhEPO ^a (%)	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.45	101.83	
	0.5	99.98	0.5
	0.55	99.64	
Injection volume (μL)	30	99.42	50
	40	99.74	
	50	100.12	
Acetonitrile (%)	68	100.65	
	70	99.97	70
	72	99.75	
Solution stability	Autosampler		
	24 h	99.7	—
	48 h	99.3	—
Wavelength (nm)	210–320	—	280

^aMean of three replicates.

Table 5. Results of the system suitability test

Parameter	Minimum	Maximum	RSD ^a (%)	Status
Asymmetry	1.03	1.05	0.87	Passed
Theoretical plates	42069	42718	0.77	Passed
Retention time	49.82	49.99	0.17	Passed
Area	135668	138031	0.86	Passed

^aRSD = Relative standard deviation.

BRP for erythropoietin, giving the mean difference between estimated potencies of $11.2\% \pm 1.8$ lower for the bioassay compared to the RP-LC, as shown in Table 6. The values obtained from the two methods were compared statistically by the Pearson's correlation coefficient, showing significant correlation ($r = 0.9799$). Therefore, the RP-LC method is suggested as an alternative to the bioassay of rhEPO in pharmaceutical formulations, in the context of the reduction and replacement of the animal models for the biological assay.

Table 6. Determination of the rhEPO potency in pharmaceutical formulations against the biological reference preparation for rhEPO

Sample	Nominal concentration		RP-LC ^a (%)	Bioassay	
	IU/mL	$\mu\text{g/mL}$		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	2000	16.8	104.4	91.9	70–125
2	4000	33.6	121.4	108.1	84–147
3	4000	33.6	129.8	118.4	92–152
4	4000	33.6	121.7	108.4	84–149
5	4000	33.6	100.9	91.2	68–128
6	4000	33.6	115.1	105.7	74–139
7	4000	33.6	106.8	95	71–129
8	16666	138.33	112.9	103.9	81–144
9	16666	138.33	116.6	103.4	78–149
10	16666	138.33	107.2	98.3	72–139
Mean			113.6	102.4	
SD ^b			9.0	8.5	

^aMean of three replicates.

^bSD = Standard deviation.

CONCLUSION

The proposed RP-LC method was optimized and validated by the specificity, accuracy, and precision, demonstrating acceptable results. The separation was achieved with the retention time of 49.9 min, and the method has been successfully used for the analysis of commercial pharmaceutical formulations, with advantages, also, of lower time consumption related to the biological assay. Moreover, the RP-LC can represent an important alternative to the bioassay improving the existing procedures for the potency evaluation of rhEPO, which can be applied to the purification process and to the quality assessment of rhEPO biopharmaceutical products.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, projects 402615/2005-0 and 305148/2005-2) for the financial support.

REFERENCES

1. Krantz, S.B. Erythropoietin. *Blood* **1991**, *77*, 419–434.
2. Elliot, S.; Egrie, J.; Browne, J.; Lorenzini, T.; Busse, L.; Rogers, N.; Ponting, I. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. *Exp. Hematol.* **2004**, *32*, 1146–1155.
3. Egrie, J.C.; Dwyer, E.; Browne, J.K.; Hitz, A.; Lykos, M.A. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant human erythropoietin. *Exp. Hematol.* **2003**, *31*, 290–299.
4. Ramakrishnan, R.; Cheung, W.K.; Wacholtz, M.C.; Minton, N.; Jusko, W.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 991–1002.
5. Gascón, P. Evaluating erythropoietic agents for the treatment of anaemia in the oncology setting. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2601–2612.
6. Storing, 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. *J. Endocrinol.* **1992**, *134*, 459–484.
7. Bristow, A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa* **1997**, *2*, 31–47.
8. Liefoghe, E.C.; Tiplady, R.; Gerson, P.; Lloyd, P.; Heath, A.; Bristow, A.F. A sialylation-sensitive cell-based *in vitro* bioassay for erythropoietin; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. *Biologicals* **2005**, *33*, 161–167.
9. Kawamura, A.; Imai, N.; Kawaguchi, T.; Hayakawa, T. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. *Br. J. Haematol.* **1991**, *77*, 424–430.
10. Ramos, A.S.; Schmidt, C.A.; Andrade, S.S.; Fronza, M.; Rafferty, B.; Dalmora, S.L. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 1561–1569.

11. *European Pharmacopoeia*, 5th Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2005.
12. Bristow, A.F.; Jeffcoate, S.L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: Report of an inter-laboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. *Biologicals* **1992**, *20*, 221–231.
13. Mire-Sluis, A.R.; Gerrard, T.; Das, R.G.; Padilha, A.; Thorpe, R. Biological assays: Their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. *Biologicals* **1996**, *24*, 351–362.
14. Dalmora, S.L.; Masiero, S.M.K.; Oliveira, P.R.; Sangoi, M.S.; Brum Junior, L. Validation of an RP-LC Method and Assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2006**, *29*, 1753–1767.
15. Bietlot, H.P.; Girard, M. Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1997**, *759*, 177–184.
16. Lara-Quintanar, P.; Lacunza, I.; Sanz, J.; Diez-Masa, J.C.; de Frutos, M. Immuno-chromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2006**, in press.
17. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Intl. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129–188.
18. Rao, R.N.; Nagaraju, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 335–377.
19. Ribela, M.T.C.P.; Gout, P.W.; Oliveira, J.E.; Bartolini, P. HPLC Analysis of Human Pituitary Hormones for Pharmaceutical Applications. *Curr. Pharm. Anal.* **2006**, *2*, 103–126.
20. Gunturi, S.R.; Ghobrial, I.; Sharma, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 213–221.
21. Luykx, D.M.A.M.; Dingemanse, P.J.; Goerdayal, S.S.; Jongen, P.M.J.M. High-performance anion-exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1078*, 113–119.
22. Ahrer, K.; Jungbauer, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. *J. Chromatogr. B* **2006**, *841*, 110–122.
23. Finney, D.J. *Statistical Methods in Biological Assay*; Charles Griffin: London, 1978.
24. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), November 2005; 1–13.

Received January 13, 2007

Accepted February 18, 2007

Manuscript 6027

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A produção de proteínas e glicoproteínas de interesse terapêutico têm evoluído significativamente nos últimos anos, devido à tecnologia do DNA recombinante. Nesse contexto, o controle da qualidade é fundamental para a determinação da identidade, pureza e potência, que necessita da combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para a completa caracterização dos medicamentos para uso clínico.

Realizou-se a validação do ensaio biológico da contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos previamente descrito por RAMOS et al. (2003) e apresentada no **ARTIGO 3.1**. Os bioensaios foram realizados em relação a Eritropoietina Humana Recombinante Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia (rhEPO-SBR) 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. A validação do método investigou os parâmetros de linearidade, da curva dose-resposta, precisão, exatidão, especificidade e robustez, baseados nos guias existentes (FDA, 2001; ICH, 2005), embora não específicos para ensaios biológicos. A especificidade do método foi avaliada através da contaminação de amostras comerciais de rhEPO com quantidades conhecidas de hormônio do crescimento humano recombinante, fator estimulador da colônia de granulócitos humanos e fator estimulador da colônia de granulócitos/macrófagos humanos recombinante, resultando em diferenças de potência não significativas, inferiores a 4%, quando comparadas a amostras não contaminadas. A curva dose-resposta apresentou regressão linear significativa $r^2=0,9708$, para o método proposto (FDA, 2001), na faixa de concentração de 1 a 64 UI/mL. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação (CV) inferiores a 3,45% (tabelas 1, 2 e 3), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 15% (FDA, 2001). Pode ser observado na tabela 4, o valor médio experimental de 100,36% que demonstra exatidão significativa. O limite de quantificação (LQ) de 1 UI/mL foi determinado experimentalmente baseado na menor concentração da região linear da curva dose-resposta que gerou respostas capazes de serem quantificadas com precisão e exatidão com CV de $\pm 20\%$. As potências obtidas na execução dos ensaios não apresentaram diferenças significativas, porém a precisão dos ensaios foi alterada quando se modificaram número e idade dos animais, bem como o protocolo de injeções (tabela 5), no teste de

robustez. O bioensaio validado foi aplicado na análise de potência de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo formas alfa e beta, expressas em diferentes sistemas celulares, obtendo-se valores de potência entre 82,79 e 119,70% (tabela 6). Esses dados estão de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 80 – 125% (EP., 2005). A precisão dos ensaios independentes calculada pela ponderação foi superior a 247.

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de formas alfa e beta de rhEPO em produtos farmacêuticos (**ARTIGO 3.2**), na presença de albumina de soro humano. A separação foi alcançada com tempo de corrida de 60 min (figura 1), que poderia ser considerado alto, porém na correlação com o ensaio biológico, que tem duração de uma semana, apresenta vantagens e justifica sua importância. A especificidade do método foi testada sob condições oxidativas que não originaram picos adicionais, e também, através da análise de amostra preparada com os excipientes, a qual também não apresentou picos no mesmo tempo de retenção de rhEPO. Os estudos com o detector de arranjo de diodos (PDA) mostraram o pico de rhEPO livre de picos co-eluídos, confirmando a especificidade do procedimento proposto para a análise de produtos farmacêuticos. O método apresentou regressão linear significativa $r^2=0,9997$, na faixa de concentração de 10 – 150 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV inferiores a 1,27% (tabelas 1 e 2) o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na tabela 3, o valor médio experimental de 100,66%, confirmando exatidão significativa. Por sua vez, os valores calculados (ICH, 2005) para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 3,75 e 12,51 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade rhEPO na maioria das apresentações comerciais. As potências obtidas na execução das análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a tabela 4. Por sua vez, os dados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico (tabela 5) mostraram que o equipamento e as condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005).

Avaliou-se a correlação entre os resultados fornecidos pela execução dos métodos cromatográfico e biológico nas amostras selecionadas (tabela 6). As potências por CL-FR foram em todas as análises superiores com valor médio de 11,2% \pm 1,8 maior em relação ao

bioensaio em camundongos normocitêmicos, com correlação significativa $r=0,9799$ ($P=0,95$), conforme calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson.

A rhEPO, matéria-prima, está descrita na literatura oficial (EP., 2005), porém nenhuma referência é feita para o produto acabado. Além disso, não há nenhuma correlação publicada entre métodos físico-químicos e bioensaio, o que é altamente recomendado no contexto da substituição dos bioensaios e redução dos animais em experimentação (HENDRIKSEN et al., 2002). Nesse sentido, foi validado o ensaio biológico em camundongos normocitêmicos, com protocolo de injeções múltiplas para a análise das formas alfa e beta de rhEPO em produtos farmacêuticos. Destaca-se também, a correlação entre os resultados do ensaio biológico em camundongos normocitêmicos e do método por cromatografia líquida em fase reversa, o qual pode ser aplicado durante as etapas do processo de purificação e para o controle da qualidade dos produtos farmacêuticos acabados, como alternativa para determinação da potência. Nesse contexto, justifica-se a realização de análises sucessivas em paralelo a fim de ampliar os estudos de correlação para os produtos disponíveis e estabelecer especificações e parâmetros de qualidade.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Validou-se o ensaio biológico da contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos, com protocolo de injeções múltiplas que se mostrou específico, preciso, exato e robusto para a avaliação de potência de rhEPO em produtos farmacêuticos.
- ✓ O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida em fase reversa apresentou especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de potência de rhEPO.
- ✓ O método validado por cromatografia líquida em fase reversa forneceu resultados de potência superiores, em média 11,2% maiores em relação ao ensaio biológico.
- ✓ Sugere-se a aplicação do método por cromatografia líquida em fase reversa para avaliação de potência de rhEPO em produtos farmacêuticos, como alternativa ao bioensaio para o controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BRUGNARA, C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 28, n.1, p. 1-11, 1998.

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

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

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

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

CHEETHAM, J. C. et al. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 10, p. 861-866, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 34^a ed. Rio de Janeiro: JBM, 2005-2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005, p. 1528-1532.

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

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

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

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

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

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

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

GASCÓN, P. Evaluating erythropoietic agents for the treatment of anaemia in the oncology setting. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2601-2612, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KRZYZANSKI, W. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after multiple subcutaneous doses in healthy subjects. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 295-306, 2005.

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

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

LARA-QUINTANAR, P. et al. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 2006. *In Press*

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. 119-126, 2002

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

QIU, H. et al. Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11173-11176, 1998.

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

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

RAMOS, A. S. **Avaliação biológica, caracterização físico-química e imunológica de eritropoietina humana recombinante**. 2001. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

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

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335-377, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STEAD, R. B. et al. Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers. **Blood**, 108, n. 6, p. 1830-1834, 2006.

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

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

STORRING, P. L. et al. Lectin-binding assays for the isoforms of humans erythropoietins: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. **Journal of Endocrinology**, v. 150, p. 401-412, 1996.

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

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

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

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

THE UNITED States Pharmacopeia. 29. ed. Rockville: The United states Pharmacopeial Convention, 2005.

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

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

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

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

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

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p. 129-188, 1999.

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

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

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

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

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

ZHANG, X.; LOK, S. H. L.; KON, O. L. Stable expression of human α -2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1425, p. 441-452, 1998.