

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

**VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO POR CULTURA DE
CÉLULAS PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE
RHEPO E CORRELAÇÃO COM BIOENSAIO *IN VIVO* E
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francine Trevisan Machado

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO POR CULTURA DE CÉLULAS
PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE RHEPO E
CORRELAÇÃO COM BIOENSAIO *IN VIVO* E MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS**

Francine Trevisan Machado

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.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Machado, Francine Trevisan

Validação de bioensaio por cultura de células para avaliação de potência de RHEPO e correlação com bioensaio in vivo e métodos cromatográficos / Francine Trevisan Machado.-2014.

82 p.; 30cm

Orientador: Sérgio Luiz Dalmora

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Eritropoietina humana recombinante 2. Bioensaio em camundongos normocitêmicos 3. Bioensaio por cultura de células TF-1 4. Ácidos Siálicos 5. Cromatografia Líquida. Validação I. Dalmora, Sérgio Luiz II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Francine Trevisan Machado. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: fran.tm13@hotmail.com

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


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

**VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO POR CULTURA DE CÉLULAS PARA
AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE RHEPO E CORRELAÇÃO COM
BIOENSAIO *IN VIVO* E MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

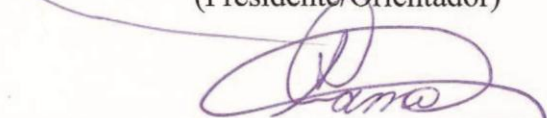
elaborada por
Francine Trevisan Machado

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

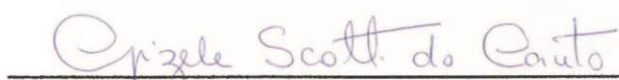
COMISSÃO EXAMINADORA:



Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)



Andréa da Silva Ramos Rocha, Dr^a. (UCPel)



Gizele Scotti do Canto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 12 de agosto de 2014.

*Aos meus pais, **Guilherme e Tânia***

*À minha irmã, **Camila***

*Ao meu namorado, **Gustavo***

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, iluminação, saúde e força para enfrentar os obstáculos;

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pela orientação e revisão crítica;

Aos meus pais, Tânia e Guilherme, pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa; minha irmã Camila, pelo carinho e amizade;

Às minhas madrinhas Iara e Cláudia; aos meus familiares que me apoiaram sempre;

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho, amor, dedicação, incentivo e compreensão;

Aos amigos Diogo, Ricardo e Guilherme pelo apoio, paciência e amizade durante esses anos de convivência;

Às minhas amigas Ana Cláudia, Ana Karolina, Ana Luíza, Adriana, Fernanda, Graciele, Luana, Mayara, Joana e Tuane pelo carinho e amizade;

Aos colegas Cairo, Maurício, Clóvis, Guilherme, Vanessa, Luma, Raphael, Renato e demais bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência Jéssica, Mayara, Rafaela, Bruna, Luis Gustavo, Franciele, Priscila e funcionários do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência pelo apoio, auxílio e amizade;

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

À CAPES, pelo apoio financeiro;

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

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”

(Marcel Proust)

RESUMO

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

VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO POR CULTURA DE CÉLULAS PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE rhEPO E CORRELAÇÃO COM BIOENSAIO *IN VIVO* E MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

AUTORA: FRANCINE TREVISAN MACHADO

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de agosto de 2014.

A eritropoietina é um hormônio hematopoiético cuja principal função fisiológica é a indução da eritropoiese. Através da tecnologia do DNA recombinante foi possível a clonagem e expressão do gene para produzir a eritropoietina humana recombinante (rhEPO). É uma sialoglicoproteína composta por cadeia de 165 aminoácidos e, aproximadamente, 40% da molécula é constituída de carboidratos, importantes para a atividade biológica devido à presença de resíduos de ácidos siálicos nas extremidades das cadeias, que influenciam na meia-vida da biomolécula. No presente estudo foi validado ensaio alternativo baseado na cultura da linhagem de células TF-1 *in vitro*, e método por cromatografia líquida por fase reversa com detecção por fluorescência para determinação de ácidos siálicos, para avaliação em conjunto da potência de rhEPO. Determinaram-se teores de ácidos siálicos acima de 126,83 ng/μg e os produtos biotecnológicos foram submetidos ao bioensaio por cultura de células fornecendo potências $2,91\% \pm 0,85$ menores em relação ao ensaio biológico em camundongos normocitêmicos, com correlação significativa calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,9947$). Paralelamente, determinou-se o teor/potência dos produtos pelas metodologias validadas por cromatografia líquida por fase reversa e por exclusão molecular, que forneceram média de resultados 3,14% maior e 2,87% menor, respectivamente, em relação ao bioensaio *in vitro*. Demonstrou-se que o bioensaio por cultura de células *in vitro*, constitui-se em alternativa ao ensaio biológico *in vivo* para a avaliação de potência de rhEPO, no contexto da redução e/ou substituição do uso de animais. Do mesmo modo, a correlação com os resultados fornecidos pelos métodos físico-químicos, representa avanços para caracterização da biomolécula, que podem ser aplicados nas etapas do processo de produção e para o controle de qualidade, contribuindo para garantir a consistência lote-a-lote da solução concentrada e dos produtos biológicos acabados de rhEPO.

Palavras-chave: Eritropoietina humana recombinante. Bioensaio em camundongos normocitêmicos.

Bioensaio por cultura de células TF-1. Ácidos Siálicos. Cromatografia Líquida. Validação.

ABSTRACT

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

VALIDATION OF A CELL CULTURE BIOASSAY FOR THE POTENCY ASSESSMENT OF rhEPO AND ITS CORRELATION WITH THE *IN VIVO* BIOASSAY AND LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS

AUTHOR: FRANCINE TREVISAN MACHADO

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, August 12th 2014.

Erythropoietin is a hematopoietic hormone and the main physiological function is the induction of erythropoiesis. Recombinant DNA technology enabled cloning and expression of rhEPO gene to produce recombinant human erythropoietin (rhEPO). It is a sialoglycoprotein composed of 165 amino acids chain and about 40% of the molecule consists of carbohydrates, important for biological activity due to the presence of sialic acid residues at the termini of chains affecting its half-life. In the present study an alternative *in vitro* cell culture-based assay using TF-1 cell line was validated, to be used in conjunction with a reversed-phase liquid chromatography method with fluorescence detection (F-RP-LC) validated to determine the content of sialic acids. The values obtained for the sialic acids were higher than 126.83 ng/ μ g, and the biotechnology-derived products were subjected to the cell culture bioassay giving potencies 2.91% \pm 0.85 lower related to the bioassay in normocythaemic mice, with significant correlation calculated by the Pearson coefficient ($r = 0.9947$). In parallel, it was determined the content/potency of the products by the validated reversed-phase and size-exclusion liquid chromatography methods that showed mean results 3.14% higher and 2.87% lower, respectively, compared to the *in vitro* bioassay. It was demonstrated that *in vitro* cell culture bioassay represent a valid alternative to the *in vivo* bioassay for the potency assessment of rhEPO, in the context of the reduction and/or replacement of animals. Likewise, correlation of the results obtained with the physicochemical methods, represents advances for the characterization of the biomolecule, which can be applied to the production steps and for the quality control, contributing to assure the batch-to-batch consistency of the bulk and the finished biological products of rhEPO.

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

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1	32
Table 1 – Comparative potency assessment of rhEPO in biopharmaceutical formulations by in vivo and in vitro bioassays, and determination of sialic acids by the F-RP-LC method.	54
Table 2 – Accuracy of in vitro bioassay method for erythropoietin in the formulations.	55
Table 3 – Conditions and range investigated during robustness testing by in vitro bioassay.....	56
Table 4 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing F-RP-LC sialic acids method.....	57
Table 5 – Statistical parameters, determined according to Bland and Altman, comparing the values of in vivo bioactivity with those predicted via in vitro bioassay.....	58

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 <i>N</i> -ligadas (*Y*), uma <i>O</i> -ligada (-O-), adaptada (GILG et al., 1996).....	19
FIGURA 2 – Cadeias de carboidratos e ramificações de ácidos siálicos ligados na eritropoietina humana, adaptada (EGRIE; BROWNE, 2001).....	21
FIGURA 3 – Estruturas químicas do ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (Neu5Ac) e do ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico (Neu5Gc), adaptadas (SCHAUER, 2009).....	22
PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1.....	32
Figure 1 – Chromatograms of fluorescence F-RP-LC method showing: (a) peaks of <i>N</i> -acetylneuraminic acid; (b) rhEPO biopharmaceutical product: peaks of sialic acids; (c) rhEPO pharmaceutical product after incubation with neuraminidase.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CHO	Células de ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
C _{máx}	Concentração máxima
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Eletroforese capilar
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EP	Farmacopéia européia
EPO	Eritropoietina humana
ESA	Peptídeo estimulador da eritropoiese
F-CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa com detecção por fluorescência
Fe	Ferro
G-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador da colônia de macrófagos
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Albumina humana
IEF	Focalização isoeletrica
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitro

Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazóleo brometo
N	Nitrogênio
NESP	Nova proteína estimuladora da eritropoiese
nm	Nanômetro
ng	Nanôgrama
R	Coeficiente de correlação de Pearson
r ²	Coeficiente de determinação
rhEPO	Eritropoietina humana recombinante
rhEPO – SBR	Eritropoietina humana recombinante Substância Biológica de Referência
RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia americana
UV	Ultravioleta
XTT	Tetrazolium sodium salt
°C	Grau celsius
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	31
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÕES.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção de eritrócitos é regulada pela eritropoietina humana (EPO), hormônio endógeno produzido, principalmente, pelas células peritubulares fibroblásticas do córtex renal de adultos, e, durante a vida fetal pelo fígado. A EPO pertence à família das citocinas e atua sobre as células progenitoras eritróides da medula óssea, estimulando sua proliferação, diferenciação e maturação, inibindo também a apoptose celular (DALLE et al., 2001, FRIED, 2009).

Estruturalmente, é composta por 165 aminoácidos com duas pontes dissulfeto e quatro cadeias polissacarídicas, que constituem, aproximadamente, 40% da massa molecular sendo fundamentais para a atividade biológica. Pesquisas demonstraram que a presença de carboidratos está diretamente ligada à secreção celular, solubilidade, estabilidade da molécula e formação de sítios de ligação com o receptor (HIGUCHI et al., 1992; SASAKI, 2003). A presença de resíduos de ácidos siálicos nas extremidades das cadeias é necessária para que o hormônio alcance os sítios-alvo na medula óssea, evitando a rápida metabolização hepática, influenciando assim a meia-vida biológica e a eficácia terapêutica (CHOI et al., 1996; LUKOWSKY; PAINTER, 1972).

A EPO foi o primeiro fator hematopoiético a ser identificado, purificado e ter seu gene clonado e expresso através da tecnologia do DNA recombinante em células de mamíferos produzindo a eritropoietina humana recombinante (rhEPO), que apresenta efeito biológico equivalente ao hormônio natural. A rhEPO encontra-se disponível comercialmente desde 1988 como produto biofarmacêutico para injeção subcutânea ou intravenosa, sendo usada na terapêutica principalmente nas formas alfa e beta (HALSTENSON et al., 1991; LASNE et al., 2002; BROXMEYER, 2013).

A rhEPO tem sido usada clinicamente por apresentar importantes benefícios na terapêutica de pacientes com anemia associada à falência renal crônica, principalmente aqueles sob diálise, restabelecendo os níveis de energia, reduzindo a fadiga e a depressão. Também é recomendada para o tratamento de anemias associadas ao câncer, infecção por HIV, artrite reumatóide e transplante de medula óssea, pois eleva o nível do hematócrito, reduzindo o número de transfusões sanguíneas. Atualmente, estudos estão sendo realizados para tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico e infarto do miocárdio (FISHER, 2003; PÉREZ – FERRER et al., 2003; TEHRANI; TAJIK, 2013).

A potência da rhEPO tem sido avaliada por ensaios biológicos baseados no aumento da contagem de reticulócitos, último estágio da série eritróide da medula óssea, determinados no sangue periférico por métodos microscópicos ou citometria de fluxo. O bioensaio pode ser realizado em camundongos policitêmicos ou normocitêmicos, com injeção múltipla ou única (CHOI et al., 1996; RAMOS et al., 2003; BARTH et al., 2008; E.P., 2013).

As pesquisas direcionam-se no sentido de aprimorar, reduzir e/ou substituir os animais de laboratório, com base nos conceitos dos 3Rs. Destacam-se os bioensaios por cultura de células TF-1 e AS-E2 *in vitro*, que, entretanto necessitam estudos adicionais de validação e correlação com o ensaio *in vivo*, para se constituírem em alternativas recomendadas para a avaliação de potência desse produto biotecnológico (KITAMURA et al., 1989a; HAMMERLING; SJÖDIN, 1998; LIEFOOGHE et al., 2005).

Por sua vez, os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizaram a separação, identificação e quantificação de substâncias biotecnológicas, e também têm sido estudados para uso em combinação com os bioensaios. Em especial, os métodos por cromatografia líquida por fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta e fluorescência tem sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; BARTH et al., 2007). A cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) tem sido usada para determinação da integridade das biomoléculas, possibilitando a avaliação de dímeros e agregados, que podem causar efeitos imunogênicos e alterar a atividade biológica (GUNTURI et al., 2007; FERRETO et al., 2009).

Devido à estrutura molecular complexa, presença de isoformas, e formas alteradas ou degradadas oriundas dos processos de produção e purificação, é preconizada a combinação de métodos físico-químicos, biológicos e imunológicos para a completa caracterização e controle da qualidade de rhEPO. Ressalta-se que a avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares, por métodos eficientes e validados é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos (JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIJ et al., 1996).

O presente estudo teve por objetivos a) validar bioensaio alternativo por cultura da linhagem de célula TF-1 *in vitro* para avaliar potência; b) validar método por cromatografia líquida por fase reserva com detecção por fluorescência para determinar o conteúdo de ácidos siálicos; c) avaliar a potência pelo ensaio biológico em camundongos normocitêmicos; d) determinar o teor/potência por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão

molecular; e e) estudar correlação entre os resultados obtidos dos métodos. Neste contexto, pretende-se contribuir para o estabelecimento de métodos alternativos de acordo com os 3Rs, aprimorando o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica da rhEPO em produtos biotecnológicos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A eritropoietina humana (EPO) é uma glicoproteína ácida composta por cadeia única de 165 aminoácidos com massa molecular de 30,4 kDa. Sua estrutura terciária é globular caracterizada por quatro α -hélices e duas folhas- β antiparalelas. Apresenta fórmula química $C_{809}H_{1301}N_{229}O_{240}S_5$, contendo três sítios de glicosilação *N*-ligados (Asn²⁴, Asn³⁸ e Asn⁸³) e um *O*-ligado (Ser¹²⁶), além de duas pontes dissulfeto, sendo uma entre Cys⁷ e Cys¹⁶¹ e outra entre Cys²⁹ e Cys³³ representados na Figura 1. A carga negativa da molécula é devido a presença de resíduos de ácidos siálicos nas extremidades das cadeias glicídicas, apresentando ponto isoelétrico (pI) entre 4,5 e 5,0 (DERBY et al., 1996; CHOI et al., 1996; GILG et al., 1996; SANZ- NEBOT et al., 2003; YU et al., 2005; JELKMANN, 2013).

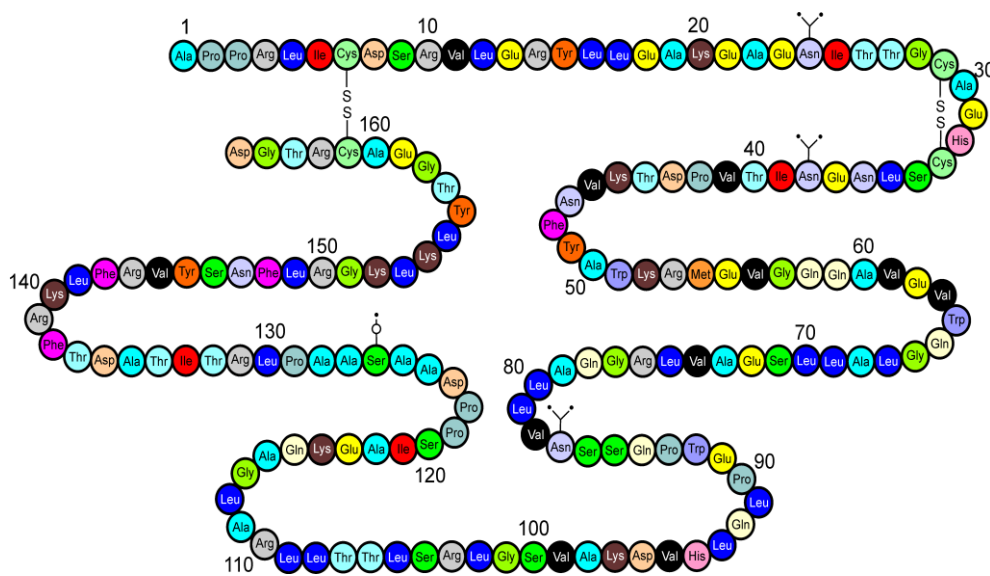


FIGURA 1 – Estrutura primária da eritropoietina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto e sítios de inserção das cadeias de carboidratos, três *N*-ligadas (*Y*), uma *O*-ligada (-O-), adaptada (GILG et al., 1996).

A EPO é um hormônio endógeno produzido principalmente nos rins, e em menor parte por células hepáticas. Sua síntese é estimulada pela baixa concentração de oxigênio nos tecidos (hipóxia), diminuição da concentração de hemácias (anemia de diferentes origens) e maior demanda tecidual por oxigênio. Essas condições acarretam estimulação da eritropoiese, fazendo com que a maior concentração sanguínea de hemácias melhore a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (LACOMBE; MAYEUX, 1998; DALLE et al., 2001).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene humano da EPO em células de mamíferos, como ovário de hamster Chinês (CHO) e rim de hamster jovem (BHK). A eritropoietina humana recombinante (rhEPO) apresenta sequência de aminoácidos idêntica e efeito biológico semelhante ao hormônio endógeno, porém foram observadas diferenças significativas na composição de isoformas, parâmetros farmacocinéticos devido as diferenças nos padrões de glicosilação (TAKEUCHI et al., 1988; ZHANG et al., 1998).

A rhEPO encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intravenosa ou subcutânea. Suas principais formas são a alfa e a beta, produzidas em células de ovário de hamster Chinês (CHO), e também a Omega epoetina, produzida em células BHK. Esta denominação é utilizada para designar as preparações que diferem na composição e natureza das estruturas glicídicas. As duas primeiras formas de rhEPO, são as mais usadas clinicamente não havendo diferenças na terapêutica, porém observou-se que os lotes de EPO alfa diferem significativamente da EPO beta na distribuição de suas isoformas, observando diferenças em alguns sistemas analíticos, o que justifica padrões internacionais diferentes para o cada tipo (STORRING et al., 1998; LASNE et al., 2002; KAUSHANSKY; KIPPS, 2006).

A eritropoietina humana recombinante tem sido utilizada nos últimos 20 anos para tratamento de anemias em pacientes com falência renal pré-diálise e sob diálise, bem como, em anemias causadas pela quimioterapia do câncer, sendo que, com o seu uso, foi reduzida a necessidade de transfusões sanguíneas. Estudos recentes têm demonstrado que além da atividade hematopoiética, a rhEPO, também apresenta efeitos citoprotetores em variadas células e tecidos, com capacidade de aumentar a regeneração das células tubulares renais e reduzir o estresse oxidativo e peroxidação lipídica (FISHER, 2003, PETERSON; KATUSIC, 2007; FOX et al., 2009, TEHRANI; TAJIK, 2013).

Pesquisas têm demonstrado que a eritropoietina e seu receptor também são expressos em outros tecidos e órgãos, como coração e cérebro. O efeito protetor da rhEPO no cérebro foi observado pela administração local que preveniu a morte neuronal induzida por isquemia. O mesmo efeito está sendo investigado em tecido do miocárdico, também após indução de isquemia (MASUDA et al., 1999; TRAMONTANO et al., 2003; CALVILLO et al., 2003; NGUYEN et al., 2014).

A estrutura de carboidratos foi estudada e determinada a extensão da micro-heterogeneidade da rhEPO e do hormônio natural (SASAKI et al., 1988; TSUDA et al., 1988; ELLIOTT et al., 2004). Evidenciaram-se as cadeias de carboidratos *N*-ligados, em que os oligossacarídeos podem conter duas, três ou quatro ramificações, cada qual tipicamente

terminada com uma molécula de ácido siálico (*N*-acetilneuramínico) carregada negativamente. Com exceção desse, que é um glicídio com 11 carbonos, todas as outras moléculas de açúcares da EPO são neutras. Do mesmo modo, a cadeia única de carboidrato *O*-ligada pode conter até duas moléculas de ácidos siálicos. Considerando que cada um dos três oligossacarídeos *N*-ligados pode apresentar até quatro resíduos de ácidos siálicos e a cadeia *O*-ligada única pode possuir dois, a molécula de EPO poderá ter, no máximo, quatorze resíduos de ácidos siálicos, conforme mostrado na Figura 2 (WASLEY et al., 1991; EGRIE; BROWNE, 2001).

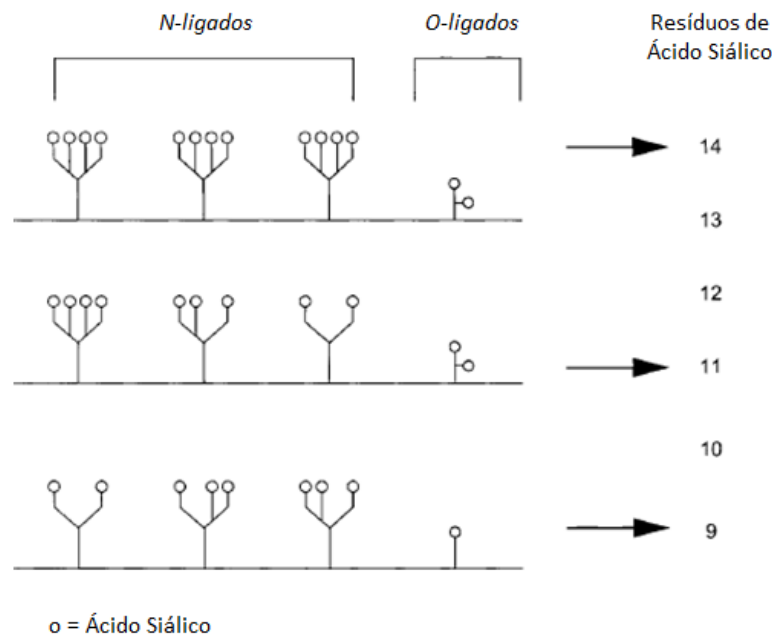


FIGURA 2 – Cadeias de carboidratos e ramificações de ácidos siálicos ligados na eritropoietina humana, adaptada (EGRIE; BROWNE, 2001).

A composição de carboidratos pode ter funções diversas nas diferentes glicoproteínas, 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 foi mostrado que a presença de carboidratos é necessária para a secreção celular, aumento da solubilidade, formação de sítios de ligação com o receptor e aumento da estabilidade da molécula (DUBE et al., 1988; TSUDA et al., 1990; DELORME et al., 1992; SASAKI, 2003). As pesquisas iniciais com EPO de origem natural indicaram que os resíduos de ácidos siálicos eram necessários para a atividade biológica *in vivo* (LOWRY et al., 1960; LUKOWSKY; PAINTER, 1972).

A remoção dos ácidos siálicos da EPO nativa ou recombinante resultou em moléculas com maior atividade *in vitro*, porém reduzida e/ou inativa *in vivo*, devido à ligação da galactose, exposta na ausência dos resíduos de ácidos siálicos, aos hepatócitos, acelerando sua metabolização hepática (FUKUDA et al., 1989; GRIFFITHS, 1991).

Os ácidos siálicos são açúcares carboxilados com nove carbonos, sendo que o mais comum é o ácido *N*-acetilneuramínico, considerado o precursor de outros membros da família, como o ácido *N*-glicolilneuramínico (Figura 3). Eles estão presentes em glicoproteínas e estão envolvidos em funções biológicas, como processos de reconhecimento celular, na meia vida de células e proteínas plasmáticas. As sialidasas ou neuraminidasas são enzimas que catalisam a hidrólise de ácidos siálicos, e nos mamíferos modulam a distribuição de ácidos siálicos na superfície celular (VARKI, 1992; SCHAUER, 2009; SZABO et al., 2012).

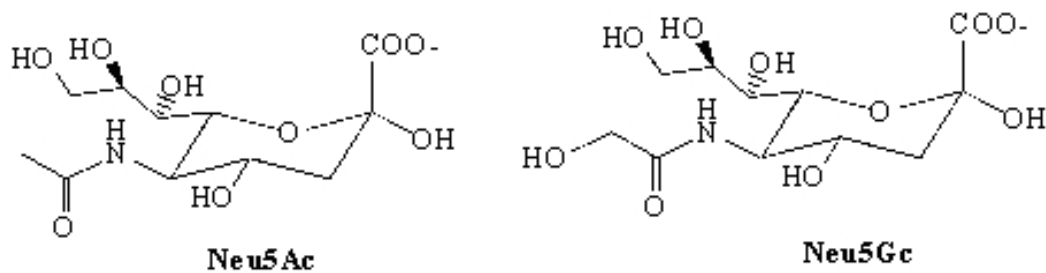


FIGURA 3 – Estruturas químicas do ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e do ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc), adaptadas (SCHAUER, 2009).

A molécula de rhEPO foi desialilada e analisada por eletroforese em gel, focalização isoeletrica, cromatografia líquida em fase reversa e por ensaios *in vivo* para avaliar a atividade biológica, demonstrando a importância dos ácidos siálicos para atividade da biomolécula (IMAI et al., 1990). Liu et al. (2012) pesquisaram a influência dos ácidos siálicos na farmacocinética de eritropoietinas peguilladas, demonstrando maior tempo de meia-vida com o aumento dos níveis de sialilação da molécula.

Anumula et al. (1995) realizaram a determinação de ácidos siálicos em glicoproteínas por CL-FR com detecção por fluorescência através de derivatização com O-fenilenodiamina (OPD). Desse modo separaram os ácidos *N*-acetil e *N*-glicolilneuramínico, presentes na porção terminal, em 20 minutos. A fetuína foi utilizada como substância de referência de glicoproteína e a ovoalbumina como controle negativo. Por sua vez, Damiani et al. (2013),

utilizaram o método descrito acima para a determinação e quantificação de ácidos siálicos em amostras de r-hTSH.

Yanagihara et al. (2010) analisaram quantitativamente a distribuição das isoformas de rhEPO por metodologia de eletroforese capilar (EC) e correlacionaram com a bioatividade *in vivo*, que é dependente dos resíduos de ácidos siálicos.

Szabo et al. (2012) desenvolveram método por EC com detecção por fluorescência para quantificação de ácidos sialícos presentes em glicoproteínas. Foi realizada derivatização com 2-aminoacridona e o método apresentou vantagens se comparado a cromatografia líquida. A 2-aminoacridona devido às suas propriedades fluorescentes foi utilizada também no estudo de alguns derivados de polissacarídicos e os resultados demonstraram sua aplicação para análise de cadeias polissacarídicas (HILL et al., 1998).

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 (eritrócitos imaturos, que correspondem ao último estágio da série eritróide da medula óssea) no sangue periférico de camundongos policitêmicos ou normocitêmicos (BRISTOW et al., 1997; RAMOS et al., 2003). 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. Já o bioensaio em camundongos normocitêmicos, é realizado com animais normais, a atividade é avaliada pelo estímulo da produção de reticulócitos e a contagem é feita na maioria das vezes por citometria de fluxo (BARBONE et al., 1994; CHOI et al., 1996; E.P., 2013).

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. 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.

Schmidt et al. (2003) pesquisaram o ensaio biológico em camundongos normocitêmicos demonstrando que a aplicação de injeções diárias durante quatro dias sucessivos fornecia resultados com intervalos de confiança mais precisos ($P=0,95$).

Barth et al. (2008) validaram o ensaio biológico para a avaliação de potência de rhEPO em camundongos normocitêmicos com 8 semanas de idade, fêmeas, da linhagem BALB/c, utilizando protocolo de administração de doses múltiplas do padrão e da amostra. Os

parâmetros de validação demonstraram a validade do ensaio e sua aplicação para o controle da qualidade dos produtos biofarmacêuticos.

O número de animais de laboratório utilizado na indústria farmacêutica para o controle de qualidade de um biofarmaco é muito grande, principalmente nas etapas finais de seu processo de produção. No intuito de reduzir o número de animais usados, aprimorar ou substituir o ensaio biológico *in vivo*, tem sido pesquisadas alternativas, entre as quais se destaca o bioensaio por cultura de células, baseado na avaliação do crescimento e diferenciação celular (KITAMURA et al., 1989a; MIYAZAKI et al. 1997; HENDRIKSEN; ATLA, 2004).

Pesquisas investigaram o bioensaio *in vitro* usando linhagem estabelecida e caracterizada de eritroleucemia humana TF-1 (ATCC CRL-2003) demonstrando que a proliferação era dependente de três fatores hematopoiéticos, incluindo a eritropoietina. A célula poderia ser útil para análise de receptores humanos, sinais de tradução desses fatores ou em bioensaio a ser desenvolvido. Pesquisas subseqüentes investigaram características biológicas e funcionais de receptores de EPO expressos nas células TF-1, identificaram que a ligação era específica, dependente do tempo e da temperatura (KITAMURA et al., 1989a; KITAMURA et al., 1989b).

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

Miyazaki et al. (1997) estudaram o uso da linhagem AS-E2 eritropoietina dependente, proveniente de leucemia humana. Devido à dependência exclusiva da EPO para seu crescimento, foi sugerida sua utilização para estudos de respostas moleculares e biológicas nas etapas finais da eritropoiese.

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

Bioensaio *in vitro* foi desenvolvido e validado para avaliar a farmacocinética de duas novas proteínas recombinantes (EP1 e EP2) com atividade eritropoiética em ratos. Os autores 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 e exatidão entre 90 – 110%, demonstrando sua aplicabilidade para a determinação de biofármacos com atividade eritropoiética (WEI et al., 2007).

A atividade biológica *in vivo* da eritropoietina é dependente do seu grau de sialilação, que é irrelevante para a sua atividade *in vitro*, razão pela qual os resultados dos bioensaios desenvolvidos *in vitro* não se correlacionavam com os *in vivo*. Nesse contexto, Liefoghe et al. (2005) desenvolveram ensaio por cultura de células sensível a sialilação. Executaram 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.

Schutkoski et al. (2013) realizaram identificação de isoformas por eletroforese e ligação à lectinas, executaram o ensaio biológico com a linhagem TF-1, determinaram o nível de ácidos siálicos e correlacionaram os resultados com o ensaio biológico em camundongos normocitêmicos. Demonstraram a viabilidade do modelo de ensaio pela aplicação à análise de produtos biofarmacêuticos, porém os métodos não foram validados.

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reprodutível, com custo e duração de análise adequados (ALMEIDA et al., 2010). Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas (RIBELA et al., 2006; AHRER; JUNGBAUER, 2006; BARTH et al., 2007).

Wilczynska et al. (2005) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação de rhEPO em produtos farmacêuticos formulados com diferentes estabilizantes. O método validado por CL-FR foi aplicado também para identificação de compostos de alto peso molecular em amostras de solução padrão de rhEPO expostas a 75 °C durante 24 horas. Os resultados foram confirmados por método por cromatografia líquida por exclusão molecular.

Barth et al. (2007) desenvolveram e validaram método por CL-FR demonstrando ser específico, preciso, exato e robusto para análise dos produtos farmacêuticos. Analisaram amostras por CL-FR e compararam os resultados com o bioensaio em camundongos

normocitêmicos, obtendo média da potência estimada, 11,2% maior para o método cromatográfico. O método foi proposto como alternativa ao ensaio biológico, sendo aplicável para os processos de purificação, bem como para o controle de qualidade de produtos biofarmacêuticos de rhEPO.

Shaligram et al. (2012) desenvolveram e validaram métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de ultra eficiência (CLUE) em fase reversa para determinação de rhEPO em formulações biofarmacêuticas contendo albumina humana, demonstrando separação e quantificação de rhEPO.

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). Porém, a baixa concentração da glicoproteína na presença de grandes quantidades de excipientes como albumina humana, dificulta o desenvolvimento de métodos para análise direta por exclusão molecular de rhEPO em produtos farmacêuticos (LARA-QUINTANAR et al., 2006; FERRETO et al., 2009).

Não foram detectados agregados na substância biológica conservada a 4°C ou -70°C, mesmo após quarenta e oito meses. De qualquer modo, temperaturas mais altas e algumas condições de formulação induzem a EPO a, inicialmente, formar dímeros, seguida da formação de agregados de alta massa molecular (DEPAOLIS et al., 1995). No mesmo sentido, dímeros e trímeros de EPO foram produzidos por ligação química cruzada de formas monoméricas, que são biologicamente ativos. Apresentaram meia-vida biológica maior, sendo mais eficazes *in vivo* do que a forma monomérica convencional (DERBY et al., 1996; SYTKOWSKI et al., 1998).

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

Gunturi et al. (2007) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida por exclusão molecular e detecção por fluorescência para determinação de agregados de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo 0,03% de polissorbato 80. O método mostrou-se

adequado para avaliar a estabilidade e quantificação de agregados presentes em concentração de até 0,2%, em relação ao monômero.

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

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação usada para produtos farmacêuticos e proteínas, e quando comparada com a cromatografia líquida, apresenta vantagens como o menor volume de amostras e consumo de solventes, maior rapidez analítica, versatilidade, eficiência e resolução (HOLZGRABE et al., 2006). A literatura descreve métodos desenvolvidos por eletroforese capilar com detecção no UV para a separação e quantificação de isoformas de rhEPO. 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 (SANZ-NEBOT et al., 2003; BENAVENTE et al., 2006).

Zimmermann et al. (2011) desenvolveram método por EC para determinação de isoformas de rhEPO sugerindo como alternativa ao ensaio biológico em camundongos normocitêmicos. Foi empregado capilar de sílica fundida de 70 cm de comprimento, tampão composto por ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES) 70 mmol/L, uréia 7 mol/L e putrescina 2,5 mmol/L, pH 5,8, e detecção a 214 nm.

A quantificação das formas α e β de rhEPO foi estudada por EC e análise multivariada dos dados de mobilidade eletroforética, sugerindo sua aplicação para os produtos biofarmacêuticos (BENAVENTE et al., 2006). Método por EC também foi pesquisado com detecção por fluorescência e aplicado para a forma alfa, em amostras biológicas (SHEN et al., 2010).

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

Pesquisas estão sendo realizadas pela conjugação química com o polietilenoglicol, dando origem as suas formas peguilladas, com menor taxa de eliminação plasmática, devido à

menor degradação metabólica e a endocitose da proteína, com meia-vida mais elevada. Estudos têm demonstrado os perfis farmacocinéticos de diferentes eritropoietinas recombinantes peguiladas, assim como a melhora das propriedades farmacodinâmicas e imunológicas da biomolécula (HARRIS et al., 2001; CAO et al., 2014).

Macdougall (2005) desenvolveu a EPO peguilada denominada CERA (Ativador contínuo do receptor de eritropoietina) com peso molecular de 60 kDa, contendo polímeros de metóxi-poli(etilenoglicol) incorporados nas *N*-terminações, bem como nas lisinas das posições 52 ou 45. Estas modificações prolongaram o tempo de meia-vida na circulação, em aproximadamente 135 horas, após administração subcutânea ou intravenosa. A administração subcutânea do CERA, uma ou duas vezes por mês, é suficiente para manter níveis estáveis de hemoglobina em pacientes sob diálise, reduzindo o número de aplicações em comparação com a rhEPO e Darbepoetina alfa (BUNN, 2007; JELKMANN, 2008).

A Darbepoetina alfa é um análogo hiperglicosilado que contém 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). Tem peso molécula de 37 kDa e carga negativa mais elevada. Apresentou meia-vida biológica no soro, aproximadamente, três a quatro vezes superior (em torno de 25h) e maior potência *in vivo*, podendo ser administrada com menor frequência para obter a mesma resposta biológica (EGRIE; BROWNE, 2001; JELKMANN, 2002; EGRIE et al., 2003; JELKMANN, 2008).

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

O Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) orienta sobre os procedimentos para a validação de métodos alternativos, a comparação do novo ensaio com o existente/clássico, e a avaliação de correlação (HARTUNG et al., 2013). Desse modo, para verificar a concordância entre dois métodos se faz necessária análise estatística adequada. Bland e Altman (1986) propuseram uma metodologia para avaliar a concordância entre duas variáveis (*X* e *Y*), no presente estudo identificada como bioensaio *in vivo* e *in vitro*

respectivamente, que parte de uma visualização do gráfico de dispersão entre a diferença das duas variáveis ($X - Y$) e a média das duas $(X + Y)/2$.

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, pessoal e materiais (RIBANI et al., 2004; SHABIR et al., 2007). O processo de validação bem definido e documentado, fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação (ICH, 2005; ROZET et al., 2007). Esses parâmetros encontram-se detalhadamente descritos em dissertações já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e no artigo (**ARTIGO 3.1**). Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SHABIR et al., 2007; ROZET et al., 2007).

A combinação de métodos físico-químicos biológicos e imunológicos é preconizada para a caracterização e análise de qualidade de produtos biotecnológicos. Assim, os estudos de correlação entre os métodos validados com os bioensaios *in vitro* e *in vivo*, são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, das formas de alta massa molecular e da atividade biológica, e podem contribuir pra o estabelecimento de alternativas analíticas que aprimoram o controle da qualidade dos produtos biológicos.

Atualmente, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são também importantes para fundamentar estudos de biosimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMEA, 2005). As estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade dependente do processo de produção de células vivas fazem com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o fármaco de referência. Consequentemente tem sido usada a combinação de métodos para caracterização e estudos de comparabilidade. Os guias oficiais e parâmetros de especificação têm sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (SCHELLEKENS, 2009; SCHELLEKENS; MOORS, 2010).

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

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 – MACHADO, F. T.; SANTOS, F.; SCHRAMM, V. G.; STAMM, F. P.; DALMORA, S. L. Validation of an *in vitro* Cell Culture Bioassay for the Potency Assessment of Recombinant Human Erythropoietin and its Correlation with the *in vivo* Bioassay and Liquid Chromatography Methods. Artigo a ser publicado.

Validation of an *in vitro* Cell Culture Bioassay for the Potency Assessment of Recombinant Human Erythropoietin and its Correlation with the *in vivo* Bioassay and Liquid Chromatography Methods

Francine T. Machado,^b Franciele Santos,^a Vanessa G. Schramm,^b Fernanda P. Stamm,^b and Sérgio L. Dalmora ^{*a}

^a *Department of Industrial Pharmacy, ^b Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 -Santa Maria-RS, Brazil*

*Corresponding author. Phone./Fax: +55 55 3220 8952

E-mail address: sdalmora@terra.com.br (S.L. Dalmora)

Abstract

Biotechnology-derived erythropoietin is a sialoglycoprotein which stimulates the erythropoiesis, and it is clinically used for the treatment of anaemia related to chronic renal failure. An reversed-phase liquid chromatography method with fluorescence detection (F-RP-LC) was validated for the content/potency evaluation of sialic acids in biopharmaceutical formulations giving values higher than $126.83 \text{ ng } \mu\text{g}^{-1}$. An alternative *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay was validated and applied in conjunction with the sialic acids evaluation, for the potency assessment of rhEPO in 50 batches of biopharmaceutical formulations, and the results compared to those of the *in vivo* normocythaemic mice bioassay showing a lower mean differences of the estimated potencies of $2.91\% \pm 0.85$ with non-significant difference ($p > 0.05$). The same batches were also analyzed by validated reversed-phase and size-exclusion liquid chromatography methods and the results compared to those of the *in vitro* bioassay, showing higher of 3.14% and lower of 2.87%, respectively, mean differences of the content/potencies. The validated TF-1 cell culture assay in conjunction with the determination of sialic acids, represent an advance that can be correlated to the normocythaemic mice bioassay and the physicochemical methods, allowing to recommend as alternative assay, that can be applied to monitor the stability and quality, assuring the safety and therapeutic efficacy of the biological medicine.

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

1. Introduction

Assessment of biological potency is essential to assure the therapeutic efficacy of biological medicines. For this purpose mainly *in vivo* bioassays based on the animal models responses have been performed. But, the bioassays can be more imprecise and are in general costly, and due to the ethical and political pressure, efforts has been made in the context of the three Rs, in attempts to develop new alternatives for the characterization and evaluation of biotechnology-derived medicines (HENDRIKSEN et al., 2004). Erythropoietin (EPO) is the main regulator of human erythropoiesis. The human erythropoietin produced by recombinant technology (rhEPO) is now marketed world-wide for the treatment of anaemia associated with chronic renal failure, cancer chemotherapy, and AIDS (KRANTZ, 1991; FRIED, 2009).

The sialoglycoprotein hormone consists of a 165 amino acids polypeptide chain, heavily glycosylated at three *N*-linked and one *O*-linked glycosylation sites with two disulfide bonds, yielding a molecular mass of 30,4 kDa. About 40% of the fully glycosylated EPO molecule consist of carbohydrate. These play an important role in determining the biological activity, which appears to be dependent upon the number of sialic acids residues at the termini of the tri- and tetra-antennary sugar chains (ELLIOTT et al., 2004; YANAGIHARA et al., 2010).

Biological potency of rhEPO is currently assessed by *in vivo* bioassays, which measure relevant biological activity in polycythaemic or normocythaemic mice (E.P., 2013). Polycythaemic assay involves the use of radioactive substance that is a limitation. The normocythaemic mice bioassay has been performed in normal animals using single or multiple daily injection protocols, collecting the blood on the 5th day, and counting the reticulocytes by flow cytometry (RAMOS et al., 2003; BARTH et al., 2008).

The human AS-E2 Epo-dependent cell line was used in a sialylation-sensitive bioassay showing that correlates with the *in vivo* polycythaemic mice assay (LIEFOOGHE et al., 2005). The *in vitro* cell culture bioassay has been investigated using the factor-dependent

erythroleukemia cell line TF-1 (ATCC CRL-2003) established and characterized showing the proliferation dependency on erythropoietin. The binding was specific, time- and temperature-dependent, saturable and rhEPO upregulates the expression of its own receptor (KITAMURA et al., 1989a; KITAMURA et al., 1989b). The cell line TF-1 was used for potency assessment of rhEPO (HAMMERLING et al., 1996) and to evaluate the bioactivity of a new analog of EPO (FARES et al., 2011). TF-1 cell line was also used for the potency assessment of rhEPO in biopharmaceutical formulations showing significant reduced bioactivity of dimers/aggregates and deamidated/sulphoxides forms (SCHUTKOSKI et al., 2013).

Biotechnology laboratories are producing rhEPO for clinical purposes by the expression of EPO in chinese hamster ovary (CHO) or baby hamster kidney (BHK) cells, and the current achievements in the production with an emphasis on glycosylation control was described (CHOI et al., 1996; YANAGIHARA et al., 2010). The dependence of the *in vivo* activity of EPO upon the number of terminal sialic acids residues on the glycan chains has been recognized and the content was estimated by capillary zone electrophoresis indicating that the N-glycan moieties, as well as sialic acids have a significant impact on *in vivo* bioactivity and as regulators of molecular and cellular interactions (LIEFOOGHE et al., 2005; SCHAUER, 2009; HASHII et al., 2014). The impact of sialic acids on the pharmacokinetics was evaluated showing the influence of its glycosylation such as terminal sialylations (LIU et al., 2012). Sialic acids were determined in glycoproteins and rhEPO by reversed-phase liquid chromatography method (RP-LC) with o-phenylenediamine derivatization, and fluorescence detection separating N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids, and other N- and O-acetylated sialic acids (ANUMULA, 1995; FUKUDA, 1989).

Many analytical techniques have been reported as potential alternative methods for the content/potency assessment of biotechnology-derived glycoproteins. RP-LC exploits the hydrophobic properties of the biomolecules in the separation process and offers a high level

of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants which may have reduced activity and altered immunogenicity (WANG et al., 2006; LARA-QUINTANAR et al., 2007). A linear gradient RP-LC method using a C₄ column and UV detection at 280 nm was validated for the analysis of rhEPO in biopharmaceutical formulations and the results compared to the bioassay showing differences 11.2% higher for the LC method (BARTH et al., 2007). A size-exclusion (SE-LC) method was validated for the determination of rhEPO in formulations without serum albumin, using a BioSep-SEC-S 2000 column and detection at 214 nm (FERRETO et al., 2009). Physicochemical techniques cannot yet predict the biological activity of rhEPO, but they can produce information about structure and composition and are used to monitor content, purity, and chemical stability. No single technique can provide sufficient information about the glycoprotein, thus a combination of physicochemical, immunological, and biological methods is recommended (LONGSTAFF et al., 2009; DALMORA et al., 2009). Besides, a capillary zone electrophoresis method for the quantification of the isoforms elucidating their substructures by N-glycan-mapping techniques was developed as alternative model based on the percentage of isoforms and the degree of sialidation (ZIMMERMANN et al., 2011).

The aim of this article was to validate an *in vitro* TF-1 cell culture assay and a F-RP-LC method to be applied in conjunction as alternative method to determine sialic acids and the potency/content assessment of rhEPO; compare the results with the *in vivo* normocythaemic mice bioassay and validated reversed-phase and size-exclusion LC methods, and evaluate correlations between methods. Thus contribute to establish alternative assays in the context of the three Rs, and to assure the quality and efficacy of the biotechnology-derived medicine.

2. Experimental

2.1. Chemicals and Reagents

European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for erythropoietin (250 µg/35 280 IU/vial) was obtained from the European Directorate for the Quality of Medicines – EDQM (Strasbourg, France). A total of fifty batches of biopharmaceutical products, from different manufacturers, were obtained from commercial sources and used within their shelf life period. Acrylamide, BIS-acrylamide, ampholytes pH range 2.5-6.5, sucrose, riboflavin, N,N,N1,N1-tetramethyl-ethylenediamine were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). O-phenylenediamine, Sialic acid (*N*-Acetylneuraminic acid), Neuraminidase were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetrahydrofuran, phosphoric acid, 1-butylamine, acetonitrile and trifluoroacetic acid HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Reagents for automated reticulocytes counting were from HORIBA ABX Diagnostics (Montpellier, France). For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA). All other chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade.

2.2. Apparatus

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10A_{VP} system controller, an LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, an SIL-10AD_{VP} autosampler, and an SPD-M10AVP PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

2.3. Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions of rhEPO were prepared daily by diluting the Ph.Eur. BRP for rhEPO (1 µg – 141.12 IU) and the samples of biotechnology-derived formulations in

water, to a final concentration of $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, for the LC methods, and in phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, to 600 IU mL^{-1} for the *in vivo* bioassay and, in water for injection to 10 IU mL^{-1} for the *in vitro* bioassay.

2.4. Degradation of Sample Solutions

Sample solutions of rhEPO containing $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ with 25 mIU of neuraminidase during 5, 15 and 30 min, respectively.

2.5. Methods

2.5.1. SDS-PAGE, Isoelectric Focusing (IEF) and Immunoblotting

SDS-PAGE and IEF were performed by polyacrylamide slab gel electrophoresis on a Vertical Gel Bio-Rad (Bethesda, USA), followed by immunodetection with specific antibodies, and as described (STORRING et al., 1998; SCHMIDT et al., 2003).

2.5.2. Normocythaemic mice bioassay

The assay was carried out as previously published (BARTH et al., 2008; E.P. 2013). Female 8 week-old BALB/c mice weighing between 18 and 23 g were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomized order and identified by color code for the assay, with usually 6 mice per treatment group. The Ph. Eur. BRP for erythropoietin and test samples were diluted to the concentrations of 4, 12, and 36 IU per mL, with phosphate buffered saline (pH 7.2) containing 0.1% bovine serum albumin. Multiple injections of 0.2 mL rhEPO per mouse 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 were reported as the percentage of reticulocytes. Statistical analyses of the assay data

were carried out by Combistats (EDQM). All the assays were conducted in accordance with the National Protection Laws on Animal Welfare, and the UFSM ethical committee.

2.5.3. In vitro TF-1 cell culture assay

The bioassay was performed based on the growth-promoting activity of the factor-dependent cell line TF-1 (ATCC CRL-2003) by modification of the method described elsewhere (KITAMURA et al., 1989a; SCHUTKOSKI et al., 2013). The cells were maintained in culture medium RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). In addition 3 ng mL⁻¹ of interleukin-3 (Sigma-Aldrich) was added into the culture medium for cell proliferation in 75 cm² flasks for 5 days, seeding at approximately 2.0 x 10⁵ cells mL⁻¹. The assay was designed as a parallel line test, the cells were seeded in 96-well cell culture plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at a density 1.0 x 10⁵ cells mL⁻¹ (3 x 10⁴ cells well⁻¹) and dosed on seeding with five concentrations with two fold dilutions series, between 0.10-1.60 IU mL⁻¹ of rhEPO, in triplicate. The Ph. Eur. BRP for rhEPO was used as standard and the negative control was RPMI 1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 48 h. Then 25 µL per well⁻¹ of tetrazolium sodium salt (XTT) solution 1 mg mL⁻¹, was added and the plates were incubated for overnight. The absorbance was assessed at 450 nm, using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

2.5.4. Determination of sialic acids by F-RP-LC

The analysis was performed by validating the previously published method (ANUMULA, 1995; SCHUTKOSKI et al., 2013). The hydrolysis and derivatization were performed using the reference substance of sialic acids and samples mixed with 0.1 mL of 0.5 M NaHSO₄ in 1.6-mL screw-cap freeze vials and capped tightly. The vials were then heated at 80 °C

(Reacti-Therm heating block, Pierce) for 20 min and allowed to cool to ambient temperature. Then, was mixed with 0.1 mL of the OPD reagent (40 mg mL⁻¹ in 0.25 M NaHSO₄) and capped tightly, and heated again at 80 °C for 40 min. The vials were spun in a microcentrifuge at 3.000 rpm for 5 min to obtain the supernatants for the analysis. The following settings were used on the RF-10AXL spectrofluorometric detector: excitation wavelength, 230 nm; emission wavelength, 425 nm. Excitation and emission maxima for the sialic acids derivatives were determined by trapping the peak in the flow cell and observing its intensity change as a function of wavelength. The experiments were carried out on a reversed-phase Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) . A security guard holder was used to protect the analytical column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25 °C), and run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Mobile phase A consisted of 0.15% 1-butylamine, 0.5% phosphoric acid, and 1% tetrahydrofuran (BHT inhibited) in water and mobile phase B consisted of 50% mobile phase A in acetonitrile (50:50, v/v). The common *N*-acetyl- and *N*-glycolyneuraminic acid derivatives were eluted isocratically with 10% mobile phase B. The mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 75 µL for both standard and samples.

2.5.5. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC).

The assay was carried out as described elsewhere (BARTH et al., 2007). The detector was set at 280 nm for reversed-phase, and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and 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 run at a constant flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, and mobile phase B consisted of 0.08% TFA:acetonitrile (30:70, v/v). The gradient was linear from 0.1-60 min, with 0 to 100% of mobile phase B, and then re-equilibrated with A during 15 min. The injection volume was 50 µL for both standard and samples.

2.5.6. Size-exclusion liquid chromatography (SE-LC).

The experiments were performed as described elsewhere (FERRETO et al., 2009) on a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300mm x 7.8mm i.d.). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at ambient controlled temperature (25 °C), using a phosphate buffered saline mobile phase consisting of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M dibasic sodium phosphate, and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, run at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, and using PDA detection at 214 nm. The temperature of the autosampler was kept at 5 °C and the injection volume was 50 µL for both standard and samples.

2.5.7. Validation of the Methods

The TF-1 cell culture bioassay (Bioassay) and the F-RP-LC method were validated using samples of rhEPO biopharmaceutical formulations with the label claim of 4.000 IU mL⁻¹, by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following the ICH guidelines (ICH, 2005).

Specificity

Specificity is the ability of the method to measure the analyte response in the presence of its potential impurities. To determine the specificity of the bioassay, biopharmaceutical samples were independently spiked with known amounts of recombinant human growth hormone (4 IU mL⁻¹), recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (800 IU mL⁻¹), interleukin-11 (65 IU mL⁻¹) and neuraminic acid 6.4 µg mL⁻¹.

The stability-indicating capability of the F-RP-LC method was determined by subjecting a rhEPO sample solution (40 µg mL⁻¹) to degradation by hydrogen peroxide, which generates deamidated/sulphoxides, and to temperature and vortex-mixing that induce aggregates. Then, samples were incubated and analyzed by the F-RP-LC method. Besides, the samples of biopharmaceutical formulation of rhEPO were incubated with 25 mIU of neuraminidase during 5, 15 and 30 min. and subjected to the *in vitro* and F-RP-LC analysis (IMAI et al., 1990).

Additionally the ability of the method to measure the analyte response in the presence of its potential impurities was determined by subjecting sample solutions of sialic acids and rhEPO (40 µg mL⁻¹), respectively, to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions. After the procedures, the samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 40 µg mL⁻¹. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 0.1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. The solutions were refluxed at 100 °C for 60 min and 15 min, respectively, cooled and neutralized with acid or base, as necessary. For the study under neutral condition, the sample solution was diluted in mobile phase and heated at 80 °C for 2 h. Oxidative degradation was induced by exposing the samples to 20% H₂O₂ for 24 h. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light for 2 h. The interference of the excipients of the biopharmaceutical

formulation was determined by the injection of a sample containing only a placebo added with rhEPO at a concentration of $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with ten concentrations of reference substance concentrations of rhEPO, including the LOQ, over the $0.0125 - 6.4 \text{ IU mL}^{-1}$ range, and over the $0.4 - 51.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ range, respectively for the Bioassay and the F-RP-LC method. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Precision and accuracy

The precision of the assay was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of rhEPO, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analyzing two samples on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of the reference substance added to sample solution to obtain solutions at concentrations of 20, 32, 40, 48 and 64 IU mL^{-1} , equivalent to 50, 80, 100, 120 and 160% of the nominal analytical concentration, respectively, for the Bioassay. Neuraminic acid was added to sample solution to obtain solutions at concentrations of 5.1, 6.4 and $7.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

Limit of detection and limit of quantitation

The limit of detection (LOD) for the F-RP-LC and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH, by using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. For the bioassay, the robustness was determined by analyzing the same samples ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) under a variety of conditions of the bioassay parameters, such as: bovine fetal serum concentration, cells concentrations, incubation time and neuraminidase incubation time. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any changes in the potency evaluation, as compared with freshly prepared solutions/incubations. For the F-RP-LC method the robustness was determined by analyzing the same samples ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, pH of buffer in mobile phase, injection volume and different columns. To assess the stability samples of rhEPO solutions, after incubation were tested after storage at 2-8 °C for 48 h, and also placed in an autosampler at room temperature for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any changes in the chromatographic pattern, as compared with freshly prepared solutions.

System suitability test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the F-RP-LC system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference solution containing $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ of rhEPO. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates and tailing factor (peak symmetry).

2.5.8. Statistical analyzes

The comparison between *in vitro* and *in vivo* bioassay data was made by linear regression analysis and the agreement between the two methods was evaluated as described by Bland and Altman (BLAND; ALTMAN, 1986). Differences between means were assessed by using Student's t-test, two-sided and correlation of Pearson.

3. Results and Discussion

SDS-PAGE of fifty samples of rhEPO followed by western blotting with a EPO-specific anti-serum revealed the same general pattern with a single diffuse band in the molecular weight range 30-40 kDa. The isoform compositions were revealed by IEF after immunoblotting showing the number of components varying from 4 to 7, with the proportion and position of the isoforms differing between preparations (Data not shown).

3.1 Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Acetonitrile and methanol were tested as organic solvent, in different composition mixtures with water. Mobile phase A consisted of 0.15% 1-butylamine, 0.5% phosphoric acid, and 1% tetrahydrofuran (BHT inhibited) in water, with pH 2.0, and mobile phase B consisted of mobile phase A in

acetonitrile (50:50, v/v). Then a mixture composed with mobile phase A and mobile phase B (92:8, v/v) was selected due to peak symmetry (about 1.26), separation time, with appropriate sensitivity. C₁₈ columns with 250 and 150 mm length and different pore size were tested showing for the 250 mm length, higher retention times. Then, due to the best chromatographic performance and better resolution between the peaks of sialic acids, the column Zorbax was selected. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of sialic acids in biopharmaceutical dosage forms.

A typical chromatogram obtained by the proposed F-RP-LC method, demonstrating the resolution of two symmetrical peaks corresponding to sialic acids is shown in *Figure 1a,b,c*. The retention times of 10 and 12 min, respectively, was adjusted to allow the determination of the sialic acids, without interference, which is suitable for quality control laboratories.

3.2 Method validation

Specificity

A stability-indicating method is defined as an analytical procedure that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients or other potential impurities. Under the acidic, basic, neutral and photolytic conditions, significant decrease of the areas was observed, without any additional peak, indicating that the degradation products were not detected after derivatization. Besides, biopharmaceutical formulations incubated with 25 mIU of neuraminidase for 5 min, 15 min and 30 min, respectively, and analyzed by the F-RP-LC method, showed significant reduction of the peaks equivalent to 26.45%, 38.11%, 88.20%, respectively, highly reducing the biological activity as demonstrated in Table 1.

Linearity

For the F-RP-LC method, the analytical curves constructed for sialic acids were found to be linear over the 0.4 – 51.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9951$), $y = (101016.35 \pm 623.96) x + (1220.53 \pm 8.45)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area indicated the linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the bioassay, the analytical curves were found to be linear over the 0.0125 – 6.4 IU mL^{-1} range. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9944$), $y = 0.171 x + 0.806$ indicated linearity of the dose-response curve of the assay.

Precision

The precision was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%), for six analyses at a concentration of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of rhEPO, (equivalent to 6.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of sialic acids), performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD was 0.81% and 0.92%, respectively for the F-RP-LC method and bioassay. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-day), giving RSD values of 1.23 and 0.98% for the F-RP-LC method and 0.55 and 0.70% for the bioassay. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 0.74 and 1.02%, respectively, for the F-RP-LC method and 0.96 and 1.15%, for bioassay.

Accuracy

The accuracy of the F-RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 5.1, 6.4 and 7.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of sialic acids, respectively. In addition, the accuracy of the bioassay was assessed from five solutions containing 2000, 3200, 4000,

4800 and 6400 IU mL⁻¹ of rhEPO. The absolute means obtained with a mean value of 100.69% and 98.93%, respectively, for the F-RP-LC and bioassay (Table 2), with bias lower than 0.74% and 0.60%, show that the methods are accurate within the desired ranges.

Limits of detection and quantitation

The LOD and LOQ of the F-RP-LC method and bioassay were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values of sialic acids were 0.15 and 0.48 µg mL⁻¹ respectively.

For the bioassay, the LOQ was determined from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained value of rhEPO was 0.0125 IU mL⁻¹.

Robustness

The results of the bioassay and F-RP-LC methods and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Tables 3 and 4, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when modifications were introduced into the experimental conditions, thus showing the methods to be robust. The stability of the rhEPO sample solutions was assessed and the data obtained showed non-significant changes (RDS<2%), relative of freshly prepared samples, as recommended, after the stability for 24 h in an auto sampler and for 48 h when maintained at 2–8 °C.

The growth of TF-1 cell line is dependent on either IL-3 or hGM-CSF and these factors have synergistic effects on proliferation. Then, IL-3 was selected for the assay approach, with the cells viability sustained only by rhEPO, giving the correlations and the advances none previously achieved.

System suitability

A system suitability test of the chromatographic method was performed and the RSD values calculated for the retention time, tailing factor and peak area were 0.46, 0.37 and 0.23%, respectively. The number of theoretical plates was about 4648, with RSD of 0.95%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Method application

The validated F-RP-LC method was applied for the determination of sialic acids in injectable dosage forms of rhEPO, without prior separation of the excipients of the formulation, giving concentrations higher than 126.83 ng μg^{-1} (Table 1) meeting the specifications of minimum of 10 mol of sialic acids per mol of rhEPO, equivalent to 101 ng μg^{-1} . The results cannot be directly correlated to the bioactivity, but the content assessment is necessary to assure the therapeutic efficacy, which is dependent on its being adequately sialylated. Apart from being essential for normal cellular secretion, intact carbohydrate moieties protect EPO from a rapid degradation *in vivo*. Then, a correlation of an *in vitro* stimulatory effect of rhEPO to its potency *in vivo* requires information about the carbohydrate configuration.

Subsequently, to the sialic acids determination, the same batches of biopharmaceutical samples were subjected to the *in vitro* TF-1 assay and the *in vivo* normocythaemic mice bioassay. The statistical analyses of the assays data were performed by a parallel line method, giving the values shown for 15 batches in Table 1, which showed a mean lower difference of $2.31\% \pm 0.79$, related to the *in vivo* bioassay, with significant correlation as calculated by the Pearson's coefficient ($r=0.9970$). But both of the assays were performed using a total of 50 batches (data not shown), and the mean lower difference was calculated as $2.91\% \pm 0.85$, related to the *in vivo* assay ($r=0.9947$). In addition, some samples were treated with 25 mIU of

neuraminidase and incubated during 5, 15 and 30 min, and subjected to the *in vitro* and *in vivo* assay, showing reduction of the *in vivo* biological activities as shown in table 1, but with non-altered *in vitro* activity. These results, are according to previously published data, that showed the *in vivo* activity was progressively abolished by controlled desialylation, whereas the *in vitro* activity was essentially unaffected or increased. Thus, the conjunction of the determination of the content of sialic acids with the *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay, was studied and recommended as a valid alternative approach for the assessment of the biotechnology-derived medicine (IMAI et al., 1990; HAMMERLING et al., 1998; LIEFOOGHE et al., 2005).

To evaluate the potential of *in vitro* bioassay for accurately predicting the *in vivo* bioactivity according to Bland-Altman analysis (BLAND; ALTMAN, 1986; ALMEIDA et al., 2011), a comparison between the *in vivo* bioactivity estimated by *in vitro* bioassay from the equation ($y=1.0386x - 322.5388$, $R^2=0.9925$) with that estimated by the normocythaemic bioassay was carried out. Thirty five samples that had not been used for the correlation analysis were employed. This analysis revealed a mean percentage difference (\bar{d}) between the predicted and the mean of the bioactivities obtained by the two methods of -2.41% , well within the 95% confidence limits ($\bar{d} \pm 2SD$) of -10.1 to $+6.2\%$. A Student's t-test performed on the average \pm SD of the *in vivo* and predicted bioactivities indicated that the calculated t -value of 0.037 is much smaller than the theoretical t -value of 2.14, at the 0.05 significance limit for 5 degrees of freedom, indicating that the results of the two methodologies were not significantly different. To evaluate how precise the determinations were, the standard error of \bar{d} source, defined as SD/n source and the standard error of $d \pm 2DS$ source, defined as $3SD^2/n$ source, were determined as 1.48% and 2.35%, respectively. Then the 95% confidence interval for the bias $\bar{d} \pm t SD^2/n$ source, for the lower limit of agreement (LL) and for the upper limit of agreement (UL) were calculated. All of these statistical parameters are shown in Table 5.

Moreover, the content/potencies of the samples were assessed by validated RP-LC and SE-LC methods, giving mean higher and lower difference of $3.14\% \pm 0.81$, and $2.87\% \pm 0.79$ related to the *in vitro* bioassay, with significant correlation as calculated by the Pearson's coefficient ($r=0.9964$) and ($r=0.9981$). The results demonstrated the stability-indicating capability and the application of the methods, which could be useful for correlation studies trying to develop alternatives in the context of the refinement, reduction and replacement of the animals (3Rs) and, also to support biosimilarity studies of the biomolecule (HENDRIKSEN, 2004; KRESSE, 2009).

4. Conclusions

An *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay was validated for the potency assessment of rhEPO and used in conjunction with a validated F-RP-LC for the determination of sialic acids, showing a lower mean difference of the estimated potencies of $2.91\% \pm 0.85$, compared to the normocythaemic mice bioassay, with non-significant differences, as calculated by the Student's t-test ($p > 0.05$). Moreover, the same biopharmaceutical products were analyzed by validated reversed-phase and size-exclusion liquid chromatography methods showing higher and lower mean differences of the content/potencies of 3.14 and 2.87%, respectively, compared to the *in vitro* bioassay. It is concluded that the TF-1 cell culture assay and the correlation studies between bioassays and physicochemical methods represent contribution for the establishment of alternative methods in the context of the 3Rs. Moreover, the combination of methods allows a great improvement which can be applied for the characterization of rhEPO, by monitoring its stability during the purification steps and by ensuring batch-to-batch consistency of the bulk and finished biotechnology-derived products.

Acknowledgments

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

Table 1. Comparative potency assessment of rhEPO in biopharmaceutical formulations by *in vivo* and *in vitro* bioassays, and determination of sialic acids by the RP-LC method.

Sample	Theoretical amount IU mL ⁻¹	Mice bioassay		TF-1 proliferation bioassay ^a		Sialic Acids ^c (ng µg ⁻¹ rhEPO)
		Potency (%)	Confidence intervals (P=0,95)	Potency (%)	Confidence intervals (P=0,95)	
1	10.000	98,10	83,90–114,80	97,50	94,10–101,80	168,50
2	10.000	95,70	74,90–122,10	95,20	91,30–100,50	153,11
3	10.000	108,50	86,40–126,70	106,40	102,80–111,20	177,49
4	4.000	113,80	95,00–124,10	114,30	109,10–119,60	156,28
5	10.000	104,80	88,40–124,40	103,10	99,60–105,90	149,34
6	4.000	93,30	80,50–113,70	91,50	84,20–98,30	162,25
7	10.000	88,60	83,20–104,30	87,30	85,80–109,70	151,72
8	10.000	117,70	99,60–127,90	116,20	95,10–122,50	196,30
9	10.000	105,20	90,80–122,00	103,80	96,90–109,50	178,12
10	40.000	109,60	94,50–127,30	107,00	104,60–115,30	160,29
11	10.000	90,20	74,60–108,80	89,60	85,10–98,90	155,67
12	10.000	100,50	92,30–111,60	98,70	93,80–106,20	142,81
13	4.000	92,70	86,00–101,50	89,10	87,10–100,30	126,83
14	10.000	115,30	95,10–140,10	113,60	107,40–119,90	138,99
15	10.000	99,00	81,80–119,90	96,50	91,30–107,10	167,48
Mean	-	102,43	-	100,15	-	156,28
SD ^b	-	9,14	-	9,36	-	17,25
16*	10.000	72,70	-	102,20	-	89,75
16*	10.000	42,90	-	104,00	-	65,38
16*	10.000	16,90	-	101,90	-	37,03

a. Mean of three replicates. b. SD, standard deviation. c. Mean of two independent determination
* Desialylated erythropoietin.

Table 2. Accuracy of *in vitro* bioassay method for erythropoietin in the formulations.

Nominal concentration (IU mL ⁻¹)	Mean concentration measured ^a (IU mL ⁻¹)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
2000	1936	0.45	99.80	0.32
3200	3192	0.14	99.75	0.25
4000	3976	0.42	99.40	0.60
4800	4776	0.41	99.50	0.50
6400	6368	0.23	99.20	0.50

^a Mean of three replicates.

^b RSD = Relative standard deviation.

^c Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100

Table 3. Conditions and range investigated during robustness testing by *in vitro* bioassay.

Variable	Range investigated	rhEPO ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Cell concentration (x10 ⁵)	0.5	95.90	0.97	1.0
	1.0	99.40	0.28	
	2.0	97.00	0.85	
	48	95.50	0.88	
Incubation Time (h)	72	101.80	0.45	72
	96	96.30	0.79	
Fetal bovine serum (%)	1.0	93.40	1.04	2.0
	2.0	98.50	0.66	
	3.0	95.10	0.93	
Wavelength (nm)	310-520	-	-	450

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

Table 4. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing F-RP-LC sialic acids method.

Variable	Range investigated	Sialic Acids ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.6	97.45	1.24	0.8
	0.8	101.54	0.35	
	1.0	98.87	0.68	
Mobile phase pH	1.5	99.50	0.68	2.0
	2.0	100.31	0.49	
	2.5	98.14	0.83	
Injection volume	50	98.36	0.98	75
	75	99.14	0.54	
	100	101.88	0.86	
Solution stability	Autosampler 24 h	98.68	0.45	-
	2-8 °C 24 h	99.05	0.98	-

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 5. Statistical parameters, determined according to Bland and Altman, comparing the values of *in vivo* bioactivity with those predicted via *in vitro* bioassay.

Parameter	Determinate value (%)
Mean difference (\bar{d})	-2.41
Standard deviation (SD)	3.85
Range ($\bar{d} \pm 2SD$)	-10.1 to + 6.2
$\sqrt{DP^2/n}$	1.48
$\sqrt{3DP^2/n}$	2.35
Range ($\bar{d} \pm t \sqrt{DP^2/n}$)	-5.58 to + 0.76
Range ($LI \pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	-13.9 to -1.8
Range ($LS \pm t \sqrt{3DP^2/n}$)	-0.43 to + 9.2

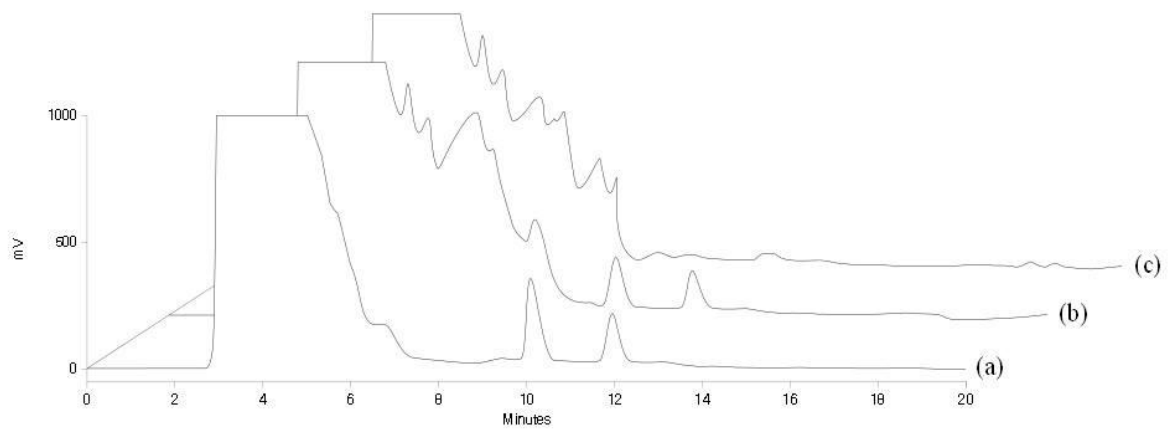


Figure 1. Chromatograms of F-RP-LC method showing: (a) peaks of N-acetylneuraminic acid; (b) rhEPO biopharmaceutical product: peaks of sialic acids; (c) rhEPO pharmaceutical product after incubation with neuraminidase.

5. References

- ALMEIDA, B. E. et al. A pilot study on potency determination of human follicle-stimulating hormone: A comparison between reversed-phase high-performance liquid chromatography method and the in vivo bioassay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, 681-686, 2011.
- ANUMULA, K. R. Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with sensitive fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p. 24 – 30, 1995.
- BARTH, T. et al. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatographic method and bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 1277-88, 2007.
- BARTH, T. et al. Validation of the normocythaemic mice bioassay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v.91, p. 285-91, 2008.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, 1, 307 – 310, 1986.
- CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 687, p. 189-99, 1996.
- DALMORA, S. L. et al. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2471–2476, 2009.
- ELLIOTT, S. et al. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 1146-55, 2004.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013.
- FARES, F., HAVRON, A., FIMA, E. Designing a Long Acting Erythropoietin by Fusing Three Carboxyl-Terminal Peptides of Human Chorionic Gonadotropin β Subunit to the N-Terminal and C-Terminal Coding Sequence. **International Journal of Cell Biology**. v. 2011, 2011.

FERRETO, R. M. et al. Validation of a Size-Exclusion LC Method and Assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 1392–06, 2009.

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

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

HAMMERLING, U. et al. *In vitro* bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1455-69, 1996.

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

HASHII, N. et al. Characterization of N-glycan heterogeneities of erythropoietin products by liquid chromatography/mass spectrometry and multivariate analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v.28, p 921-932, 2014.

HENDRIKSEN, C. F. M.; ATLA, H. M. Reduction of numbers of animals used in the quality control of biological. **Alternative Laboratory Animal Supplement**, v. 2, p.53 – 58, 2004.

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.

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

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

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

KRESSE, G. B. Biosimilars-science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 479-486, 2009.

LARA-QUINTANAR, P. et al. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 227-34, 2006.

LIEFOOGHE, E. C. et al. A sialylation-sensitive cell-based *in vitro* bioassay for erythropoietin: incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. **Biologicals**, v. 33, p. 161-67, 2005.

LIU et al. The impact of sialic acids on the pharmacokinetics of a PEGylated erythropoietin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 4414-18, 2012.

LONGSTAFF, C.; WHITTON, C. M.; STEBBINGS, R.; GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1-2, p. 50-55, 2009.

RAMOS, A. S. et al. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1561-69, 2003.

SCHAUER, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, p. 507 – 514, 2009.

SCHUTKOSKI, R. et al. Assessment of recombinant human erythropoietin by alternative bioassay and its correlation with liquid chromatography methods. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4238 – 4243, 2013.

SCHMIDT, C. A. et al. Physico-Chemical Characterization and Biological Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Products. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, p. 343-50, 2003.

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.

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

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

ZIMMERMANN et al. An alternative to animal testing in the quality control of erythropoietin. **Pharmeuropa Bio & Scientific Notes**, v.1 p. 66-80, 2011.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a expressão de rhEPO em sistemas celulares e seu amplo uso terapêutico. Nesse contexto, é necessário o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade dos produtos biotecnológicos, que se fundamenta na combinação de métodos biológicos, imunológicos e físico-químicos.

Neste trabalho, realizou-se a validação do bioensaio por cultura da linhagem de células TF-1 e do método por cromatografia líquida por fase reversa com detecção por fluorescência (F-CL-FR) para determinação de ácidos siálicos, para serem usados em combinação como alternativa para avaliação de potência de rhEPO. Analisou-se correlação de resultados entre os bioensaios *in vitro* e *in vivo* e com os métodos físico-químicos conforme apresentado no ARTIGO 3.1.

Inicialmente executou-se a identificação por SDS PAGE e separação das isoformas de rhEPO por focalização isoeletrica (IEF) em gel de poliacrilamida utilizando anfólicas na faixa de pH 2,5 – 6,5. Após a separação das isoformas efetuou-se a transferência e ligação com anticorpos específicos. Os perfis obtidos das amostras e do Padrão de rhEPO demonstraram similaridade de ponto isoeletrico, compreendido entre 4,4 e 5,2, porém com variação no número de isoformas entre 4 e 7, na proporção (intensidade de coloração) e na posição dos componentes (refletindo a natureza básica/ácida) de cada produto biofarmacêutico de diferentes laboratórios produtores. Evidenciam-se assim, diferenças existentes nas cadeias glicídicas, provenientes provavelmente, dos diferentes processos de expressão em células de mamíferos, e purificação, adotados pelos laboratórios.

As estruturas de carboidratos intactas protegem a EPO da rápida degradação *in vivo* (FUKUDA et al., 1989). Modificações que resultam em menos ácido *N*-acetilneuramínico no penúltimo resíduo de galactose, podem suprimir a ação fisiológica desse hormônio (BROWNE et al., 1986). Por conseguinte, a análise da configuração de carboidratos e do nível de sialilação é importante para os estudos de correlação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.

Desse modo, validou-se método cromatográfico para determinação do conteúdo de ácidos siálicos nos produtos biotecnológicos de rhEPO. Elaborou-se a curva padrão utilizando como substância de referência o ácido *N*-acetilneuramínico, conforme descrito por Anumula

et al. (1995). Os resultados obtidos apresentaram concentrações superiores a 126,83 ng/μg e estão de acordo com a especificação (E.P., 2013), que preconiza o teor mínimo de 10 moles de ácido siálico por mol de EPO, equivalente a 101 ng/μg. Resultados prévios demonstraram que amostras com teor mais elevado de ácidos siálicos, podem apresentar maior número de isoformas e atividade biológica superior (SCHUTKOSKI et al., 2013).

Os ácidos siálicos são essenciais para a atividade biológica *in vivo* e as isoformas contendo nível mais elevado de ácidos siálicos poderiam apresentar atividade biológica maior, meia-vida prolongada e eliminação mais lenta. Porém, as estruturas de carboidratos juntamente com os resíduos de ácidos siálicos são os que têm impacto significativo sobre a bioatividade, conforme observado (GOLDWASSER et al., 1974; LIEFOOGUE et al., 2005; YANAGIHARA et al., 2010). Neste contexto, amostras de rhEPO foram tratadas com neuraminidase para retirar os ácidos siálicos da estrutura, demonstrada pela análise pelo método por F-CL-FR. Realizou-se, então, a avaliação de potência pelo bioensaio por cultura de células TF-1 e pela contagem de reticulócitos em camundongos normocitêmicos. Observou-se que a de-sialilação resulta em perda da atividade biológica *in vivo*, mas não pelo bioensaio *in vitro*, que fornece resultado de quantificação como sendo completamente ativa, de acordo com a Tabela 1 do artigo. Desse modo, estudou-se como procedimento alternativo ao bioensaio *in vivo*, a combinação do método cromatográfico para determinação do conteúdo de ácidos siálicos e bioensaio por cultura de células TF-1 *in vitro*.

A pesquisa de métodos alternativos está sendo sucessivamente recomendada devido ao aspecto ético relacionado ao uso de animais, custo dos ensaios e variabilidade das respostas biológicas (HENDRIKSEN; ALTA, 2004). Neste sentido, selecionou-se a linhagem de células eritroleucêmicas humanas TF-1, e planejou-se o bioensaio baseado no crescimento em meio enriquecido com interleucina-3, diferentemente do uso de rhGM-CSF previamente descrito (HAMMERLING et al., 1996). Aprimorou-se também a avaliação da proliferação celular pela reação com corante azul de tetrazólio (XTT) e leitura de respostas em absorbâncias. O bioensaio foi validado com base na adaptação do GUIA do ICH (ICH, 2005) avaliando parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (**ARTIGO 3.1**). Elaborou-se a curva dose-resposta selecionando três a quatro doses em progressão geométrica, com fator 2, e os ensaios foram executados em triplicata. Analisaram-se 50 lotes de produtos biofarmacêuticos provenientes de três laboratórios obtendo resultados de potência entre 87,30 e 116,20%, observando que a Tabela 1 (**ARTIGO 3.1**), ilustra os resultados de 15 lotes.

Os mesmos lotes de produtos biofarmacêuticos foram submetidos à avaliação de potência biológica pelo bioensaio *in vivo* em camundongos normocitêmicos, da linhagem BALB/c, com administração de doses múltiplas do padrão e da amostra e contagem dos reticulócitos por citometria de fluxo. A potência foi calculada em relação à Substância Biológica de Referência da Farmacopéia Européia de Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO-SBR). Os valores encontrados variaram entre 88,60% e 117,70%, cumprindo as especificações (E.P., 2013) que preconiza potências de 80 – 125% e intervalos de confiança (P= 0,95) de 64 – 156%. Avaliou-se então a correlação dos dados observando que o bioensaio em células TF-1 *in vitro*, apresentou diferenças médias de $2,91\% \pm 0,85$ menores em relação ao bioensaio em camundongos normocitêmicos. Calculou-se a correlação pelo coeficiente de Pearson, que foi significativo em relação ao bioensaio *in vivo* ($r = 0,9947$).

Paralelamente, realizou-se a comparação dos dados fornecidos pelo bioensaio *in vitro* e *in vivo*, por regressão linear, segundo o modelo de Bland-Altman (1986), utilizando 15 amostras dos lotes de produtos biofarmacêuticos e efetuando o cálculo da equação para avaliar a concordância dos dados *in vitro* com os do bioensaio *in vivo*. Observou-se diferença percentual média (\bar{d}), entre a bioatividade predita pela equação estabelecida e a média da bioatividade obtida pelos dois métodos de $-2,41\%$ com intervalos de confiança de 95% ($\bar{d} \pm 2DP$) de $-10,1 - 6,2\%$. Calculou-se também a diferença entre as duas metodologias pelo teste “t-Student”, que foi não significativa ($p > 0,05$) (**ARTIGO 3.1**). Portanto, a validação do modelo de regressão utilizando amostras íntegras e alteradas de lotes de produtos biofarmacêuticos de rhEPO, que não tinham sido utilizadas para construir a curva de correlação, mostrou um acordo aceitável entre os dois bioensaios. A potência estimada pelo método alternativo *in vitro* variou de 85% a 120% da potência estimada pelo bioensaio *in vivo*, estando de acordo com os limites farmacopêicos que preconizam limites entre 80 – 125%. Os resultados obtidos permitem concluir que o bioensaio por cultura de células TF-1 *in vitro* pode se constituir em alternativa ao bioensaio em camundongos normocitêmicos para a avaliação da potência de rhEPO.

A avaliação do teor/potência de rhEPO foi também realizada por CL-FR, previamente validada por Barth et al. (2007). As análises foram efetuadas em relação à rhEPO-SBR, e os resultados foram expressos em percentagens obtendo valores entre 90,74% e 118,59% para o teor/potência, e 0,39% a 1,51% para formas oxidadas e desamidadas, em relação ao pico principal. Por sua vez, a metodologia por CL-EM permite separar e quantificar agregados de alta massa molecular, como dímeros, agregados e monômeros de diferentes glicoproteínas, porém a rhEPO e a HSA apresentam pesos moleculares próximos, o que dificulta sua

separação por CL-EM. Optou-se por analisar amostras de rhEPO, que não apresentam HSA em sua formulação, conforme Ferreto et al. (2009), que forneceram resultados entre 88,54% e 116,10%. As formas diméricas e agregadas foram calculadas e expressas como percentagem da área total obtida no cromatograma, apresentando valores inferiores a 1,25%.

Avaliou-se correlação entre os resultados fornecidos pelos ensaios biológicos e métodos cromatográficos por CL-FR e CL-EM, observando que apresentam diferenças médias de $3,14\% \pm 0,81$ maior e $2,87\% \pm 0,79$ menor, respectivamente, em relação ao bioensaio *in vitro*. Calculou-se a correlação entre os métodos pelo coeficiente de Pearson, mostrando correlação significativa para CL-FR ($r = 0,9964$) e para CL-EM ($r = 0,9981$).

A substância biológica de rhEPO está descrita na literatura oficial (E.P., 2013). Porém, os estudos que visam o estabelecimento de bioensaio por cultura de células *in vitro*, constituem-se em avanço importante no contexto de alternativas para a avaliação de potência. Paralelamente, os estudos de correlação dos resultados das diferentes metodologias contribuem para as análises de comparabilidade das novas biomoléculas, garantindo sua segurança e eficácia terapêutica.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Validou-se método por cromatografia líquida por fase reversa, com detecção por fluorescência para quantificação do conteúdo de ácidos siálicos em formulação biofarmacêutica de rhEPO.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se bioensaio por cultura de células TF-1 *in vitro*, demonstrando sua especificidade, precisão, exatidão e robustez para avaliação da potência de eritropoietina humana recombinante.
- ✓ Avaliou-se a potência de rhEPO pelo ensaio em camundongos normocitêmicos da linhagem BALB/c *in vivo*, utilizando protocolo de administração de doses múltiplas do padrão e da amostra.
- ✓ Correlacionaram-se os resultados fornecidos pelo bioensaio por cultura de células, que apresentou, para os 50 lotes selecionados, potência média 2,91% menor na comparação com o bioensaio em camundongos normocitêmicos.
- ✓ Os resultados do bioensaio *in vitro* foram comparados com os fornecidos pelos métodos por cromatografia líquida por fase reversa e por exclusão molecular, observando que apresentou potência/teor 3,14% maior e 2,87% menor, respectivamente.
- ✓ Recomenda-se o uso do bioensaio por cultura de células *in vitro* combinado com a determinação de ácidos siálicos, por F-CL-FR, como método alternativo para avaliação de potência dos produtos biotecnológicos de rhEPO.
- ✓ A avaliação de correlação dos resultados dos bioensaios *in vitro* e *in vivo* com os métodos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular, demonstram concordância significativa ($p > 0,05$), sugerindo que podem ser aplicados em estudos visando seu uso em combinação com os métodos existentes, aprimorando o controle da qualidade.

- ✓ O presente estudo constitui-se em contribuição para o estabelecimento de métodos alternativos no contexto dos 3Rs, aprimorando o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia da biomolécula viabilizando também, estudos de comparabilidade de produtos biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1-2, p. 110-122, 2006.

ALMEIDA, B. E. et al. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 1, p. 90-97, 2010.

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

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

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

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

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

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, **Lancet**, v. 1, p. 307 – 310, 1986.

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

BROXMEYER, E. H. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 205-208, 2013.

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

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

CALVILLO, L. et al. Recombinant Human Erythropoietin Protects the Myocardium From Ischemia Reperfusion Injury And Promotes Beneficial Remodeling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA Apr 15;100(8):4802-6, 2003.

CAO, X.; CHEN, Z. Y.; YONGHONG, G. E.; ZENG, X. Pharmacokinetics of pegylated recombinant human erythropoietin in rats. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. v. 2, p. 156-164, 2014.

CHMP – Committee for medicinal products for human use, “Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues”. London, October 2005.

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

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

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

DAMIANI, R. et al. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1658-1672, 2013.

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

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

DERBY, P. L. et al. Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 47, p. 201-08, 1996.

DUBE, S.; FISHER, J. W.; POWELL, J. S. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 17516-21, 1988.

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. 1146-55, 2004.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues**”. London, 30 June 2005.

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. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013.

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.

FERRETO, R. M. et al. Validation of a size-exclusion LC method and assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 1392–06, 2009.

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

- FOX, A. C.; COOPERSMITH, C. M. Erythropoietin in sepsis: a new use for a familiar drug? **Critical Care Medicine**, Mar; 37(3):1138-9, 2009.
- FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, v. 37, p. 1007–15, 2009.
- FUKUDA, M. N. et al. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood**, v. 73, p. 84-89, 1989.
- GILG, D. et al. Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 71, p. 383-94, 1996.
- GOLDWASSER, E.; KUNG, C. K.-H.; ELIASON, J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 4202-06, 1974.
- GRIFFITHS, E. Polypeptide production by recombinant DNA technology. In: **Polypeptide and proteins drugs production, characterization and formulation**. England: Ellis Horwood Limited, cap. 5, p. 82-102, 1991.
- GROSSI, A. et al. Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. **Leukemia Research**, v. 22, p. 145-51, 1998.
- GUNTURI, S. R.; GHOBRIAL, I.; SHARMA, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 213-221, 2007.
- HALSTENSON, C. E. et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 50, p. 702-12, 1991.
- HAMMERLING, U. et al. *In vitro* bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1455-69, 1996.
- HAMMERLING, U.; SJÖDIN, L. In vitro cellular responses to cytokines and erythropoietin. **Toxicology In Vitro**, v. 12, p. 599-605, 1998.

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

HARTUNG, T.; HOFFMANN, S.; STEPHENS, M. Mechanistic validation. **Altex**. v. 30, n. 2, p. 119-130, 2013.

HENDRIKSEN, C. F. M.; ATLA, H. M. Reduction of numbers of animals used in the quality control of biological. **Alternative Laboratory Animal Supplement**, v. 2, p. 53 – 58, 2004.

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.

HILL, E. K. et al. Steady state and time-resolved fluorescence of 2-aminoacridone sugar derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, p. 2337-2342, 1998.

HOLZGRABE, U. et al. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v. 27, n. 12, p. 2283-2292, 2006.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

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

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

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

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

JELKMANN, W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 40(5): 302–309, 2013.

KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T. J. Agentes Hematopoiéticos: Fatores de crescimento, minerais e vitaminas. In: **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, cap. 53, p. 1292-96, 2006.

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

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

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

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

LASNE, F. et al. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine : differentiation of natural and administered recombinant hormones. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 119-26, 2002.

LIEFOOGHE, E. C. et al. A sialylation-sensitive cell-based *in vitro* bioassay for erythropoietin: incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. **Biologicals**, v. 33, p. 161-67, 2005.

LIU et al. The impact of sialic acids on the pharmacokinetics of a PEGylated erythropoietin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 101, p. 4414-18, 2012.

LOWRY, P. H.; KEIGHLEY, G.; BORSOOK, H. Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and mild substitution reactions. **Nature**, v. 185, p. 102-03, 1960.

LUKOWSKY, W. A.; PAINTER, R. H. Studies on the role of sialic acid in the physical and biological properties of erythropoietin. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 50, p. 909-17, 1972.

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.

MASUDA, S.; NAGAO, M.; SASAKI, R. Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. **Journal of Hematology**, Jul; 70(1):1-6, 1999.

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. 1941-49, 1997.

NGUYEN, A. Q.; CHERRY, B. H.; SCOTT, G. F.; RYOU, M.; MALLET, R. T. Erythropoietin: Powerful protection of ischemic and post-ischemic brain. **Experimental Biology and Medicine**, Maio, 2014.

PÉREZ – FERRER, A.; DE VICENTE, J.; GOLDMAN, J. L. et al. Use of erythropoietin for bloodless surgery in a Jehovah's witness infant. **Pediatric Anesthesia**, v. 13, p. 633 – 636, 2003.

PETERSON, T. E; KATISIC, Z. S. EPO tecting the Endothelium. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 823 – 825, 2007.

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.

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.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.

SANZ-NEBOT, V. et al. Separation of recombinant human erythropoietin glycoforms by capillary electrophoresis using volatile electrolytes. Assessment of mass spectrometry for the characterization of erythropoietin glycoforms. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5220-29, 2003.

SASAKI, H. et al. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 27, p. 8618-26, 1988.

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

SCHAUER, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, p. 507 – 514, 2009.

SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider? **Nephrology Dialysis Transplantation Plus**, v. 2, n. 1, p. 27-36, 2009.

SCHELLEKENS, H.; MOORS, E. Clinical comparability and European biosimilar regulations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 28-31, 2010.

SCHMIDT, C. A. et al. Physico-Chemical Characterization and Biological Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Products. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, p. 343-50, 2003.

SCHUTKOSKI, R. et al. Assessment of recombinant human erythropoietin by alternative bioassay and its correlation with liquid chromatography methods. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4238 – 4243, 2013.

SHALIGRAM et al. Development and validation of RP-HPLC and RP-UPLC methods for quantification of erythropoietin formulated with human serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 160–165, 2012.

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

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

SKEHEL, J. J. et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 1779-83, 1984.

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.

SZABO, Z. et al. Sialic Acid Speciation Using Capillary Electrophoresis: Optimization of Analyte Derivatization and Separation. **Analytical chemistry**, v. 84, p. 7638 – 7642, 2012.

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

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

TEHRANI, K. H.; TAJIK, A. Efficacy of erythropoietin in patients with ischemic stroke. **Iranian Journal of Neurology**, 12(Suppl 1): 132 – 2013.

TRAMONTANO, A. F. et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia induced apoptosis through an Aktdependent pathway. **Biochemistry Biophysical Res Commun**, Sep 5;308(4):990, 2003.

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

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

VARKI, A. Diversity in the sialic acids. Mini Review. **Glycobiology**, v. 2, p. 25 – 40, 1992.

WASLEY, L. C. et al. The importance of *N*- and *O*-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biologic activities of erythropoietin. **Blood**. v. 77, n. 12, p. 2624-2632, 1991.

WEI, X. et al. Development and validation of a quantitative cell-based bioassay for comparing the pharmacokinetic profiles of two recombinant erythropoietic proteins in serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 666-76, 2007.

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

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

YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 350-57, 2005.

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

ZIMMERMANN et al. An alternative to animal testing in the quality control of erythropoietin. **Pharmeuropa Bio & Scientific Notes**, v. 1 p. 66-80, 2011.