

La electroforesis capilar en el control de la calidad de eritropoyetina

Capillary Electrophoresis in Erythropoietin Quality Control

Danais Vidal Rossell^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7745-6802>

Jani Laffitte García¹ <https://orcid.org/0000-0003-4582-8904>

Vladimir Peña Sánchez¹ <https://orcid.org/0009-0005-3179-627X>

Gleydis Ojeda Varela¹ <https://orcid.org/0009-0007-7134-8863>

¹Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: danaisv@cim.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La eritropoyetina humana recombinante es una hormona glicoproteica que estimula la proliferación de células eritroides, producida en el Centro de Inmunología Molecular a partir de células de ovario de hámster chino. El proceso productivo se controla mediante técnicas analíticas que evalúan entre otros atributos de calidad, identidad y potencia descritos en la Farmacopea Europea. Por otra parte, el refinamiento, reducción y reemplazo (3R) de bioensayos por métodos fisicoquímicos menos variables y más exactos constituye objetivo común de la comunidad científica, autoridades regulatorias y compañías farmacéuticas.

Objetivo: Evaluar la técnica de electroforesis capilar descrita para la identificación de eritropoyetina, como método para la determinación de su bioactividad utilizando el modelo de I-number.

Métodos: Se realizó el montaje del método de I-number como método alternativo al ensayo in vivo y se estudiaron parámetros de precisión y exactitud de potencia del estándar fisicoquímico internacional de eritropoyetina (CRS 1.0). Se evaluó la potencia

en diez lotes producidos de ingrediente farmacéutico activo mediante este método y se determinó exactitud con respecto al método convencional.

Resultados: Se obtuvo el perfil tipo del estándar internacional, con un valor de I-number similar al reportado en la literatura. Se encontró variabilidad menor de 1 % y exactitud de 99 % de potencia del estándar mediante el método de I-number. Se cumplió la especificación de potencia en todos los lotes evaluados y se encontró una exactitud entre el 107 % y el 120 %.

Conclusiones: Se demostró que el método de I-number constituye un candidato adecuado para el reemplazo del ensayo in vivo en la determinación de potencia de eritropoyetina que además de reducir considerablemente los costos, disminuye variabilidad y aumenta exactitud de la medición; lo cual posee un impacto directo en la seguridad y eficacia del producto.

Palabras clave: eritropoyetina; electroforesis capilar; bioactividad; I-number.

ABSTRACT

Introduction: Recombinant human erythropoietin is a glycoprotein hormone that stimulates erythroid cell proliferation, produced at the Center for Molecular Immunology from Chinese hamster ovary cells. The production process is controlled by analytical techniques that evaluate, among other quality attributes, identity and potency as described in the European Pharmacopoeia. On the other hand, the refinement, reduction and replacement (3R) of bioassays by less variable and more accurate physicochemical methods is a common objective of the scientific community, regulatory authorities and pharmaceutical companies.

Objective: To evaluate the capillary electrophoresis technique described for the identification of erythropoietin, as a method for the determination of its bioactivity using the I-number model.

Methods: We performed the assembly of the I-number method as an alternative method to the in vivo assay and studied precision parameters and potency accuracy of the international physicochemical standard for erythropoietin (CRS 1.0). Potency was

evaluated in ten batches of active pharmaceutical ingredient produced by this method and accuracy was determined with respect to the conventional method.

Results: The type profile of the international standard was obtained, with an I-number value similar to that reported in the literature. Variability of less than 1 % and accuracy of 99 % of potency of the standard was found by the I-number method. The potency specification was met in all evaluated batches and an accuracy between 107 % and 120 % was found.

Conclusions: It was demonstrated that the I-number method constitutes a suitable candidate for the replacement of the in vivo assay in the determination of erythropoietin potency which, in addition to considerably reducing costs, reduces variability and increases measurement accuracy; which has a direct impact on the safety and efficacy of the product.

Keywords: erythropoietin; capillary electrophoresis; bioactivity; I-number.

Recibido: 25/07/2023

Aprobado: 22/10/2023

Introducción

La eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) es una hormona de naturaleza glicoproteica producida por vía biotecnológica que estimula la proliferación de las células eritroides. Tiene una amplia utilidad a nivel mundial en terapia de enfermedades como la insuficiencia renal y la anemia aplásica, en enfermedades asociadas a bajos niveles de eritropoyetina en plasma y como complemento en terapias para enfermedades de alta incidencia, como el cáncer y el sida.⁽¹⁾

La EPOhr fue comercializada por primera vez en 1989 por Amgen como EPOGEN®, pero en la actualidad se encuentra disponible en diferentes subtipos dependiendo del patrón de glicosilación de la proteína de primera generación (epoetina alfa, beta, delta, theta), de segunda generación (darbaepoetina hiperglicosilada) y Mircera (PEGilada).⁽²⁾

El mecanismo de acción se basa en la unión de la EPOhr a su receptor que desencadena una vía de señalización intracelular altamente dependiente de la secuencia aminoacídica de la proteína y de sus modificaciones postraduccionales (glicosilación y modificaciones de glicanos).⁽³⁾

La glicosilación posee un alto impacto en la actividad biológica de las proteínas y se asocia fundamentalmente a su estabilidad, solubilidad, plegamiento y tiempo de vida media.⁽²⁾

La EPOhr constituye una mezcla altamente heterogénea de diferentes patrones de glicosilación de la proteína, a consecuencia de modificaciones posglicosilacionales, como la sialilación (ácido N-acetil neuramínico y ácido N-glicolil neuramínico), fosforilaciones y O-acetilaciones.⁽⁴⁾

El perfil de glicosilación posee un alto impacto en la eficacia de la proteína y en la seguridad de los pacientes tratados, por lo que la caracterización de su perfil de isoformas es un atributo crítico de calidad,⁽⁵⁾ que ha sido descrito en las monografías internacionales de medicamentos como la *Farmacopea europea (Ph. Eur. por sus siglas en inglés)* para la identificación del producto mediante un método de electroforesis capilar de zona (ECZ).⁽⁶⁾

En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se produce hace más de 25 años una alfa EPOhr a partir de la clonación del gen humano de la proteína en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés, *Chinese hamster ovary cells*) bajo normas de buenas prácticas de producción.

El proceso productivo, el ingrediente farmacéutico activo (IFA) y el producto terminado se controlan con un amplio espectro de técnicas analíticas para chequear los atributos de calidad de la proteína, como la identidad, fortaleza, pureza y actividad biológica que aseguran su uso clínico.

La actividad biológica de EPOhr se evalúa mediante un ensayo in vivo en ratones normocitémicos descrito en la Ph. Eur, que se basa en la medición de la estimulación de reticulocitos.⁽⁶⁾ Este ensayo, por su naturaleza, se considera muy costoso, altamente variable e inexacto.⁽⁷⁾

Por otro lado, el refinamiento, la reducción y el reemplazo (Principio de las 3 Rs) de bioensayos por métodos más exactos y precisos como los métodos físicoquímicos, métodos basados en células u otras alternativas, constituye en la actualidad un objetivo común de sociedades de bienestar animal, grupos de expertos, autoridades regulatorias y compañías farmacéuticas; en particular para EPOhr, fundamentalmente asociado al uso de un gran número de animales de experimentación.⁽⁸⁾

El ensayo de I-number se basa en un modelo matemático que permite estimar la actividad biológica de EPOhr en función del perfil de isoformas obtenido mediante el método de electroforesis capilar al estudio de la glicosilación de albúmina in vitro (ECZ),^(9,10) con el empleo de la bioactividad certificada para un estándar internacional de eritropoyetina.

En los últimos años, este tipo de enfoque ha sido publicado para EPOhr por diferentes autores, el ensayo del Z-number basado en una cromatografía de intercambio iónico para el mapeo de glicanos⁽¹¹⁾ y los ensayos basados en electroforesis capilar de I-number, Ibio-number y el modelo de regresión lineal reducido.^(9,11,12)

Este último ha sido empleado en EPOhr beta y existen evidencias de su aprobación por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el análisis del control de calidad en Europa.⁽¹³⁾

A pesar de que se ha probado que el empleo del ensayo del I-number permite calcular de manera precisa la bioactividad de diferentes estándares de referencia de eritropoyetina,⁽⁸⁾ no existen reportes de su empleo en el control de la calidad del ingrediente farmacéutico activo (IFA) y en particular de EPOhr alfa.

El objetivo del trabajo fue evaluar la técnica de electroforesis capilar descrita para la identificación de eritropoyetina, como método para la determinación de su bioactividad utilizando el modelo de I-number.

Métodos

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio físico-químico del departamento de control de la calidad del Centro de Inmunología Molecular (CIM).

Se utilizó el lote 1.0 del estándar de referencia físico-químico internacional de la *Ph. Eur* (CRS, por sus siglas en inglés, *Chemical Reference Standard*) que contiene una mezcla 1:1 de epoetina alfa:beta.

El CRS 1.0 se estableció como estándar de eritropoyetina de la *Ph. Eur.* en el año 2015 y se preparó a partir del lote 3 del estándar de referencia biológico (*BRP, por sus siglas en inglés, Biological Reference Preparation*), trazable al lote vigente BRP 5.^(14,15)

Se emplearon en el estudio 10 lotes de IFA de EPOhr alfa producidos en el CIM, previamente liberados por el departamento de aseguramiento de la calidad y se utilizó el método de determinación de la actividad biológica in vivo en ratones normocitémicos descrito en la *Ph. Eur.*⁽⁶⁾

Se empleó el método de ECZ⁽⁶⁾ utilizando un equipo de electroforesis capilar PA 800 plus (Beckman Coulter, USA) y el programa de operación del equipo y análisis de datos 32 Karat[®] versión 10.1.

El I-number (I) se definió como la suma de los productos del porcentaje de área de cada isoforma (pn) y el número de isoforma correspondiente (n), teniendo en cuenta las ocho isoformas del perfil de EPOhr como se muestra en la ecuación 1.

$$I = p1 \times 1 + p2 \times 2 + p3 \times 3 + p4 \times 4 + p5 \times 5 + p6 \times 6 + p7 \times 7 + p8 \times 8 \quad (1)$$

I: valor de I-number

p: porcentaje de área de cada isoforma

La bioactividad mediante el método del I-number para el CRS 1.0 se calculó utilizando la ecuación 2, a partir del valor de I-number determinado para el CRS 1.0 en el presente estudio, la bioactividad certificada para el lote 3 del estándar biológico internacional de eritropoyetina (BRP, por sus siglas en inglés, *Biological Reference Preparation*), trazable al lote BRP 5: (141,1 UI/ μ g) y el valor de I-number reportado para el BRP 3: (530,9).⁽⁸⁾

$$\text{Bioactividad}_{(\text{CRS 1.0})} = I_{(\text{CRS 1.0})} / I_{(\text{BRP 3})} * \text{Bioactividad}_{(\text{BRP 3})} \quad (2)$$

Para la determinación de la bioactividad de los lotes de IFA producidos en el CIM (EPOhr alfa) se empleó la ecuación 3, a partir del valor de I-number calculado para el CRS 1.0 en este estudio, la bioactividad certificada para el mismo (141,5 UI/mg)⁽¹⁴⁾ y el valor de I-number determinado para cada lote de IFA en el presente estudio.

$$\text{Bioactividad (IFA)} = I_{\text{(IFA)}} / I_{\text{(CRS 1.0)}} * \text{Bioactividad (CRS 1.0)} \quad (3)$$

Montaje del método de I-number

El método de I-number tiene como punto de partida el porcentaje de las isoformas individuales determinado a partir del perfil de ECZ que, al ser un método compendial de acuerdo a las monografías vigentes armonizadas con la guía de validación de métodos analíticos ICH Q2(R1) (del inglés, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use: Validation of Analytical Procedure), no requiere una validación total;⁽¹⁶⁾ sino que se debe realizar una verificación del mismo empleando un estándar de referencia internacional.

Para ello, se realizaron cinco corridas del estándar físico-químico internacional CRS 1.0 bajo las condiciones experimentales del laboratorio físico-químico del CIM.

Se evaluó primeramente la obtención del perfil tipo y el cumplimiento de las especificaciones para esta técnica analítica de acuerdo a su certificado de calidad.

Se estudió la precisión de la determinación del valor de I-number bajo condiciones de precisión intermedia y la exactitud de la bioactividad estimada mediante ambos métodos, a partir del valor de actividad biológica certificada para el estándar internacional CRS 1.0.⁽¹⁴⁾

Evaluación de la actividad biológica en lotes de EPOhr mediante el método de I-number

En una segunda fase del estudio se evaluó la actividad biológica de 10 lotes de IFA de EPOhr alfa producidos en el CIM mediante el ensayo del I-number y el ensayo in vivo en ratones normocitémicos.

Se estudió la exactitud de la bioactividad determinada por el método físico-químico del I-number asumiendo como "valor verdadero" la bioactividad determinada mediante el ensayo *in vivo*. Ya que a pesar de estar reportadas sus limitaciones en términos de precisión y exactitud de la medición⁽⁷⁾, es el método establecido en la Ph. Eur. para la evaluación de la potencia en el IFA del producto.

Resultados

Se obtuvieron en las cinco corridas realizadas perfiles típicos para el estándar internacional físico-químico de eritropoyetina CRS 1.0 por el método de ECZ (fig. 1). Los perfiles obtenidos fueron similares entre sí y se correspondieron con el electroferograma descrito para el CRS 1.0 durante su caracterización.

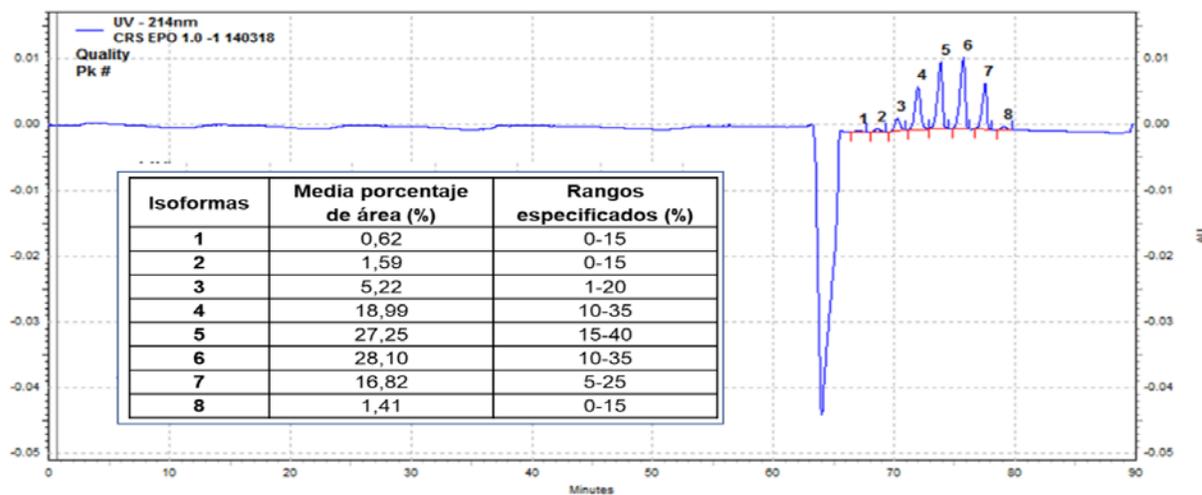


Fig. 1 - Perfil tipo y porcentajes de isoformas obtenidos para el estándar internacional de eritropoyetina CRS 1.0 mediante el método de electroforesis capilar de zona (n = 5).

En todos los casos, las corridas cumplieron con las pruebas de idoneidad del sistema establecidas para este método en la Ph. Eur.⁽⁶⁾ El análisis cuantitativo para determinar el porcentaje de área de las isoformas individuales separadas del CRS 1.0 arrojó que en todos los casos se cumplió con el rango especificado para las isoformas 1-8, (fig. 1).

Desarrollo del método del I-number empleando el estándar físico-químico internacional de eritropoyetina (CRS 1.0)

Se aplicó el método del I-number utilizando los datos obtenidos en el CIM mediante ECZ para las cinco réplicas del estándar internacional CRS 1.0 evaluadas. Como se muestra en la tabla 1, se obtuvo un valor de I-number promedio de las cinco réplicas del CRS 1.0 de 530,9, una variabilidad del 0,5 % bajo condiciones de precisión intermedia y una exactitud del 99,9 %. La bioactividad estimada para el CRS 1.0 empleando el I-number calculado a partir de los datos de ECZ del CIM fue de 140,9.

Tabla 1- Determinación del I-number y bioactividad del estándar internacional físico-químico de eritropoyetina CRS 1.0

Parámetro (n=5)	Valores obtenidos	Valores reportados
<i>I-number</i>	530,9	530,6
<i>Variabilidad (%)</i>	0,5	1
<i>Bioactividad I-number (UI/mg)</i>	140,9	141,5
<i>Exactitud (%)</i>	99,9	99,8

Tomando como punto de partida los resultados del desarrollo del método con el estándar internacional CRS 1.0; se evaluó la bioactividad de 10 lotes de IFA de EPOhr alfa producidos en el CIM mediante el método del I-number y el método *in vivo* simultáneamente.

Determinación de la bioactividad en lotes de Ingrediente Farmacéutico Activo de eritropoyetina alfa con el empleo del método del I-number

Para la determinación del I-number en muestras de IFA de EPOhr alfa producidos en el CIM, se aplicó como punto de partida el método compendial de identificación mediante ECZ. El porcentaje de isoformas de la proteína para cada lote de IFA empleado se muestra en la tabla 2.

En todos los casos las corridas cumplieron con los criterios de adecuación del sistema y las muestras cumplieron con los criterios de aceptación descritos en la versión vigente de la *Ph. Eur.*

Tabla 2 - Porcentajes de isoformas obtenidos mediante electroforesis capilar de zona para lotes de ingrediente farmacéutico activo de EPOhr alfa producidos en el CIM.

Lote	Isoforma 1	Isoforma 2	Isoforma 3	Isoforma 4	Isoforma 5	Isoforma 6	Isoforma 7	Isoforma 8
Rango	0-15 %	0-15 %	1-20 %	10-35 %	15-40 %	10-35 %	5-25 %	0-15 %
IFA 1	1,81	7,52	19,01	23,29	22,02	16,74	7,66	1,96
IFA 2	0,77	9,53	20,02	22,42	21,70	16,13	7,53	1,64
IFA 3	1,08	9,27	19,42	22,00	21,05	16,82	8,11	2,24
IFA 4	1,34	4,29	14,26	26,91	26,87	17,48	7,27	1,58
IFA 5	0,24	3,33	16,43	29,33	27,01	16,80	5,99	0,88
IFA 6	1,79	10,34	19,00	22,56	20,47	16,02	8,16	1,67
IFA 7	0,96	8,24	19,27	22,93	21,49	17,00	8,25	1,87
IFA 8	0,33	4,01	17,42	29,48	26,25	15,90	5,77	0,84
IFA 9	0,29	3,71	17,44	29,46	25,68	15,94	6,36	1,11
IFA 10	0,24	3,33	16,43	29,33	27,01	16,80	5,99	0,88

Se calcularon los valores de I-number para cada lote de IFA y la bioactividad a partir de los valores de I-number y los resultados de potencia determinados en el laboratorio del CIM para el CRS 1.0.

En paralelo, se determinó la bioactividad de los lotes de IFA mediante el método *in vivo* en ratones normocitémicos descrito en la *Ph. Eur.*

Los resultados de la determinación de la bioactividad por ambos métodos y la exactitud de la bioactividad calculada a partir del método de I-number, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 - Bioactividad evaluada en lotes de EPOhr alfa producida en el CIM mediante el método in vivo y el método físico-químico de I-number.

Lotes	I-number	Bioactividad (I-number) (UI/mg)	Bioactividad (in vivo) (UI/mg)	Exactitud (%)
IFA 01	446,9	118,6	106,0	112
IFA 02	441,5	117,2	103,4	113
IFA 03	446,7	118,6	108,0	110
IFA 04	463,1	122,9	109,9	112
IFA 05	458,3	121,6	104,1	117
IFA 06	438,6	116,4	108,5	107
IFA 07	449,1	119,2	101,7	117
IFA 08	452,3	120,0	100,5	119
IFA 09	455,4	120,9	100,5	120
IFA 10	458,3	121,6	104,1	117

Discusión

El perfil tipo estándar internacional físico-químico de eritropoyetina CRS 1.0 por el método de ECZ se correspondió con el obtenido durante su caracterización⁽¹⁴⁾ y cumplió con las especificaciones establecidas lo que demostró que bajo las condiciones analíticas del laboratorio del CIM fue posible ejecutar de manera adecuada el procedimiento descrito en las farmacopeas; lo cual constituyó el punto de partida para el desarrollo del método de I-number.

Desarrollo del método del I-number empleando el estándar físico-químico internacional de eritropoyetina (CRS 1.0)

Durante el desarrollo del método, el valor promedio de I-number obtenido para el CRS 1.0 fue muy similar al valor reportado para este estándar por *Hermentin*⁽⁹⁾ en su estudio en el año 2017. Por lo que la determinación del valor de I-number del estándar

internacional (CRS) pudiera constituir una herramienta útil en la comparación de los resultados de verificación del método compendial de ECZ para la identificación de EPOhr en los diferentes laboratorios.

El certificado de calidad del estándar CRS 1.0 muestra el perfil tipo de ECZ, pero no proporciona valores certificados del porcentaje de cada una de las ocho isoformas del perfil, solo el cumplimiento de los amplios rangos especificados para cada una.

El I-number del CRS, en cambio, constituye un único valor numérico que pudiera permitir establecer un único rango para comparar cuan similar se realiza en los diferentes laboratorios la cuantificación del porcentaje de las isoformas del perfil de este estándar. El valor de I-number fue descrito por primera vez en el año 2006 como un atributo físico químico para evaluar la calidad de eritropoyetina en un producto que contenía una mezcla alfa:beta en una relación 1:1.⁽⁹⁾

Fue concebido como un modelo matemático para “describir” el grado de glicosilación de las isoformas de la proteína, que por concepto posee una relación directa con su actividad biológica; sin embargo, esta teoría fue demostrada más de 10 años después.⁽⁸⁾

La determinación del I-number en sí, sin la estimación de la potencia a partir de él, podría constituir un buen indicador de la estabilidad de la proteína, que refleja directamente posibles modificaciones en los patrones de glicosilación y sialilación de la molécula. En este sentido, los criterios muy amplios que emplea la Ph. Eur. para la identificación de EPOhr mediante el método de ECZ para cada una de las isoformas del perfil, podrían reemplazarse por un rango único y bastante estrecho de I-number, lo que pudiera proporcionar un aumento significativo en la precisión y exactitud del ensayo, con un impacto directo en la seguridad y eficacia del producto.

El desarrollo del método de I-number en el CIM mostró excelentes resultados en términos de precisión y exactitud. En estudios anteriores, se ha reportado una alta precisión inter laboratorio para la determinación del I-number (<1 %), en un análisis retrospectivo realizado a partir de los datos de ECZ proporcionados para el establecimiento de este estándar internacional en un estudio colaborativo entre diferentes laboratorios.⁽⁹⁾

Esta alta precisión se basa fundamentalmente en la precisión y exactitud del método de ECZ, por lo que se pudiera inferir que simultáneamente también deberá verse manifestada en la determinación de la bioactividad de esta proteína.

De igual manera, en el análisis de la exactitud de la bioactividad estimada para el CRS 1.0 empleando el método del I-number con respecto a la potencia determinada en el ensayo *in vivo*; se determinó un porcentaje de recobrado del 99,9 %, muy similar a lo reportado anteriormente;^(8,9) lo cual comprueba que la medición de la bioactividad empleando este método, además de ser altamente precisa, es muy exacta.

Los resultados a partir de la evaluación de la bioactividad del CRS 1.0, mediante el método del I-number en el laboratorio de control de la calidad del CIM y su similitud con los valores reportados, demuestran que pudiera ser una alternativa para sustituir el ensayo *in vivo* con una mejoría considerable en la precisión y la exactitud de la medición.

Determinación de la bioactividad en lotes de Ingrediente Farmacéutico

Activo de eritropoyetina alfa con el empleo del método del I-number

Para todos los lotes incluidos en el estudio se cumplió la especificación de potencia establecida en la *Ph. Eur* para el IFA de eritropoyetina (no menor de 100 000 UI/mg de proteína) determinada por ambos métodos analíticos. Se encontró una exactitud de la bioactividad determinada a partir del método de I-number entre el 107 % y el 120 %, valores que se encuentran dentro del rango descrito por diferentes autores para la exactitud de la determinación de la potencia de eritropoyetina (70-130 %).⁽⁷⁾

Es válido comentar que, de acuerdo a los resultados presentados, se considera que el método del I-number solo es adecuado para la estimación de la actividad biológica de EPOhr alfa, en lotes que cumplan con las especificaciones establecidas de identidad mediante el método de ECZ, cuyo resultado constituye el punto de partida para su aplicación.

En este estudio solo se empleó el método del I-number en lotes que cumplieron con los rangos de identificación establecidos en la *Ph. Eur.* para las isoformas de eritropoyetina, por lo que no se conoce hasta el momento si es adecuada la estimación de la bioactividad en lotes que no cumplan los criterios de identificación.

La verificación del desempeño del método compendial de electroforesis capilar de zona para la identificación de eritropoyetina bajo las condiciones experimentales del laboratorio del Centro de Inmunología Molecular, demostró que el método de I-number pudiera constituir una herramienta útil para comparar la cuantificación del porcentaje de las isoformas del estándar físico-químico internacional CRS entre diferentes laboratorios y para el análisis de la estabilidad de la EPOhr.

Los resultados de esta investigación demuestran que el método físico-químico del I-number es adecuado para determinar la bioactividad del ingrediente farmacéutico activo de eritropoyetina alfa con alta precisión y exactitud por lo que constituye una alternativa en el reemplazo del método *in vivo* en ratones normocitémicos para realizar el control de la calidad del producto.

Todo lo cual permite concluir que este método es un candidato adecuado para el reemplazo del ensayo *in vivo* en la determinación de potencia de eritropoyetina que además de reducir considerablemente los costos, disminuye variabilidad, aumenta la exactitud de la medición y posee impacto directo en la seguridad y eficacia del producto.

Referencias bibliográficas

1. Guan Y, Zhang M, Manasi G, Voss H, Fazel R, Ansari S, et al. An integrated strategy reveals complex glycosylation of erythropoietin using top-down and bottom-up mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2021;20(7):3654-63 DOI: [10.1021/acs.jproteome.1c00221](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00221)
2. Cowper B, Li X, Yu L, Zhou Y, Fan W, Rao C. Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan. *J. Pharm. And Biomed. Analysis.* 2018;153:214-20. DOI: [10.1016/j.jpba.2018.02.043](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.043)
3. Grampp G, McElroy P, Camblin G, Pollock A. Structure-Function Relationships for Recombinant Erythropoietin's: A Case study from a proposed manufacturing change with implications for erythropoietin biosimilar study designs. *J. Pharm. Sci.* 2018;107(6): 1512-20. DOI: [10.1016/j.xphs.2018.01.018](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.018)

4. Varas N, Camacho F, Sánchez O. Recombinant Human Erythropoietin. The problem of glycosylation. *Bionatura*. 2018;3(3):683-88. DOI: [10.21931/RB/2018.03.03.10](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.10)
5. Cowper B, Li X, Yu L, Zhou Y, Fan WH, Rao CM. Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan. *J. Pharm. Bio. Anal.* 2018;153:214-20. DOI: [10.1016/j.jpba.2018.02.043](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.043)
6. European Pharmacopeia. Erythropoietin concentrated solution 1316. Monograph Ph. Eur. 10.0. 2020 [acceso 19/02/2024]. Disponible en: <https://n9.cl/6ndahe>
7. Machado F, Maldaner F, Perobelli R, Xavier B, da Silva F, de Freitas G, et al. Evaluation of an in vitro cell culture assay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin. *Altern. Lab. Anim.* 2016;44(2):113-20. DOI: [10.1177/026119291604400207](https://doi.org/10.1177/026119291604400207)
8. Hermentin P. I-number Assay - A Physicochemical Assay That Predicts the Bioactivity of EPO Samples: Proof of Principle. *Int J Chromatogr Sep Tech.* 2017:107. DOI: [10.29011/IJCST-107.000007](https://doi.org/10.29011/IJCST-107.000007)
9. Hermentin P. I-Number Assay and Erythropoietin Potency: Retrospective Capillary Zone Electrophoresis Data Analysis of the Biological Reference Preparations of Erythropoietin. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 2017 [acceso 24/03/2024];1:2. Disponible en: <https://n9.cl/kk2c1>
10. Castañón MM, Steyerthal N, Castagnino JM, Garbossa G. Aplicación de un método de electroforesis capilar al estudio de la glicosilación de albúmina in vitro *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2006 [acceso 24/03/2024];40(4):473-82. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53540407.pdf>
11. Hermentin P. Ibio-number assay: A physicochemical assay that predicts the bioactivity of erythropoietin with high precision and accuracy and may replace the mouse bioassay in the quality control of EPO batch release. *Pharm. Anal. Acta.* 2017;8:1-533. DOI: [10.4172/2153-2435.1000533](https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000533)
12. Zimmermann H, Gerhard D, Hothorn L, Dingermann A. An Alternative to Animal Testing in the Quality Control of Erythropoietin. *Pharmeur. Bio. Sci Notes.* 2011 [acceso 19/02/2024];1:66-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21619857/>

13. Schnuriger F. CMC Strategy Forum Europe, May 6-8; Hilton 13. Old Town, (Prague, Czech Republic). 2013. [acceso 19/02/2024]. Disponible en: <https://n9.cl/vlbw8f>
14. Burns C, Bristow A, Buchheit K, Daas A, Wierer M. Establishment of the Ph. Eur. erythropoietin chemical reference substance batch 1. Pharmeuropa Bio. Sci. Notes. 2015 [acceso 19/02/2024];2:99-117. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26830161/>
15. Ferguson J, Burns CJ, Regourd E, Costanzo A. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 5. Pharmeur. Bio. Sci. Notes. 2019 [acceso 19/02/2024];27-33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30880683/>
16. American Pharmacopoeia. Validation of compendial procedures. 2021 [acceso 19/02/2024];USP44:1225. Disponible en: http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1225.html

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García, Vladimir Peña Sánchez.

Curación de datos: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García.

Análisis formal: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García, Vladimir Peña Sánchez, Gleydis Ojeda Varela.

Investigación: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García, Vladimir Peña Sánchez, Gleydis Ojeda Varela.

Metodología: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García.

Supervisión: Danais Vidal Rossell, Jani Laffitte García, Vladimir Peña Sánchez.

Validación: Danais Vidal Rossell, Danais Vidal Rossell.

Redacción: Danais Vidal Rossell.

Financiación

Estudio financiado por el Centro de Inmunología Molecular.