

Studija prisilne razgradnje adalimumaba primjenom SE HPLC tehnike

Babić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:489127>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Babić

**Studija prisilne razgradnje adalimumaba
primjenom SE-HPLC**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na potpori, pomoći, savjetima i izdvojenom vremenu za izradu ovog diplomskog rada. Puno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali i motivirali tijekom cijelog studija. Rad posvećujem svojoj baki Marici koja je uvijek vjerovala u mene i bila tu za mene u svakom trenutku.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PATOFIZIOLOGIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA	3
1.1.1. TNF- α	4
1.2. TERAPIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA	5
1.2.1. BIOLOŠKA TERAPIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA	6
1.3. ANALITIČKE TEHNIKE ZA ISPITIVANJE BIOLOŠKIH LIJEKOVA	8
1.3.1. IDENTIFIKACIJA	9
1.3.2. ONEČIŠĆENJA	10
1.3.3. SADRŽAJ	10
1.3.4. ISPITIVANJE STABILNOSTI BIOLOŠKIH LIJEKOVA	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	19
3.2. METODE	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. OPTIMIZACIJA METODE	23
4.2. VALIDACIJA METODE	25
4.2.1. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA ZA PROVEDBU VALIDACIJSKOG POSTUPKA	25
4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA	27
4.4. STUDIJA PRISILNE RAZGRADNJE	28
5. ZAKLJUČCI	34
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	36
7. LITERATURA	38
8. SAŽETAK/SUMMARY	43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) je kronična upalna bolest gastrointestinalnog trakta (GIT) (Okobi i sur., 2021). Osim upale GIT-a, dovodi i do izvancrijevnih promjena koje uključuju muskuloskeletalne i kožne promjene, poremećaje jetre i bubrega te mnoge druge. Ovakve promjene su prisutne kod približno trećine pacijenata (Levine i Burakoff, 2011). Upalna bolest crijeva se može podijeliti na Crohnovu bolest (engl. *Crohn's Disease*, CD), ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative Colitis*, UC) i nedeterminirani kolitis (Milaković i Crnčević Urek, 2020). Javlja se u genski podložnih osoba kod kojih dolazi do poremećaja imunskog odgovora. Nije poznat točan uzrok nastanka IBD-a, no poznato je da konzumiranje duhanskih proizvoda povećava rizik od nastanka CD u podložnih osoba dok štiti od nastanka UC-a. Postoje određeni geni koji su povezani s nastankom ove bolesti, no zbog polimorfizama nije moguće utvrditi koji dio GIT-a će biti pogođen. Najbolje je opisana povezanost gena NOD2 s razvojem IBD. Upalna bolest crijeva najviše je zastupljena u visoko razvijenom dijelu svijeta, na sjevernoj polutki te joj incidencija raste (Vucelić i Čučković-Čavka, 2006).

Ulcerozni kolitis zahvaća sluznicu kolona te se promjene javljaju kontinuirano od rektuma. Ova upala je isključivo površinska. CD s druge strane može zahvatiti bilo koji dio GIT-a, od usta pa do rektuma te je upala transmuralna i diskontinuirana, sa zdravim područjima crijeva između zahvaćenih područja. Ipak, najčešće su zahvaćeni terminalni ileum i perianalna regija (Venkateswaran i sur., 2021; Zhang i Li, 2014; Vucelić i Čučković-Čavka, 2006). Razlike između CD i UC, zorno su prikazane u **Tablici 1**. Nedeterminirani kolitis ima obilježja i CD i UC, no često nakon nekog vremena pacijent dobije postavljenu dijagnozu CD ili UC. Takva patofiziologija bolesti se javlja u 5-15 % pacijenata s IBD-om (Venkateswaran i sur., 2021).

Tablica 1. Prikaz razlika između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa kao dvaju entiteta upalne bolesti crijeva.

Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis
Zahvaća cijeli GIT	Zahvaća kolon i rektum
Transmuralne ulceracije	Površinska upala
Diskontinuirana upala	Kontinuirana upala
Pušenje pogoršava bolest	Pušenje štiti od bolesti

1.1. PATOFIZIOLOGIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA

U patofiziologiju IBD-a su uključeni genetika, okolišni faktori, mikrobnih faktori i imunološki faktori. Kod pacijenata s IBD-om dolazi do nepravilnog funkcioniranja urođenog i stečenog imunskog odgovora što dovodi do upalnih promjena u GIT-u (Zhang i Li, 2014).

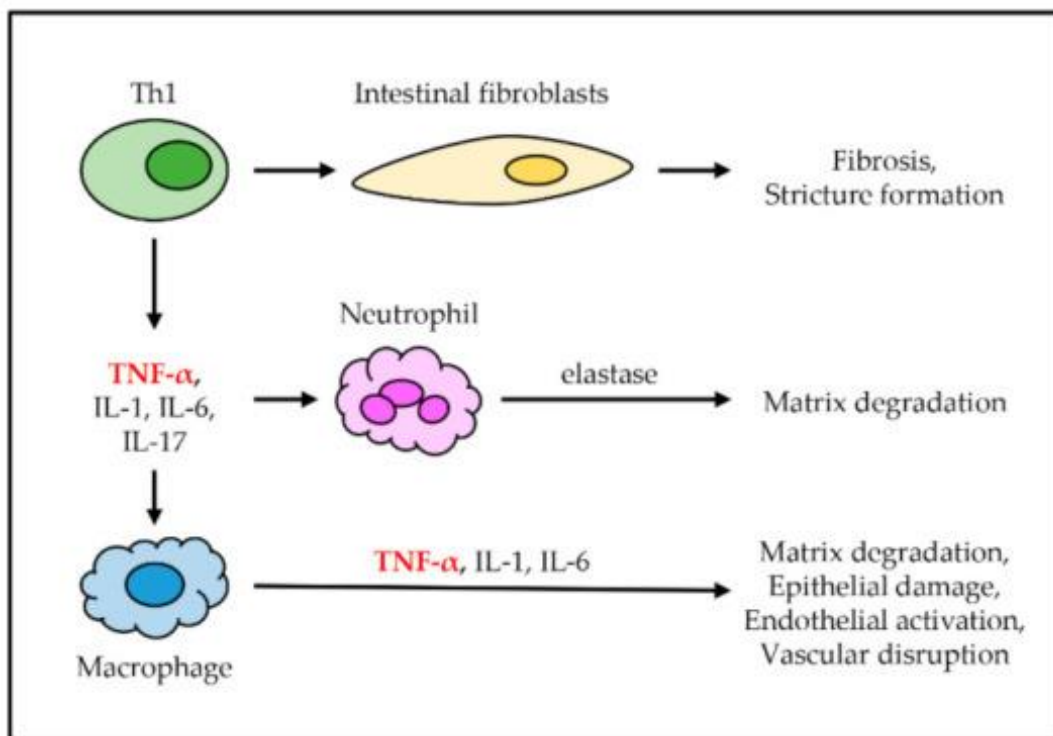
Ekspresija i funkcija Toll-like receptora (TLR) i NOD-like receptora značajno su promijenjene kod osoba s IBD. Mutacije NOD-like receptora dovode do nepravilnog odgovora crijeva na LPS (lipopolisaharid), smanjene aktivacije NF- κ B (nuklearni faktor κ B) što dovodi do smanjene proizvodnje antibakterijskih molekula i invazije patogenih mikroorganizama, smanjene inhibicije TLR2 što vodi prejakom Th1 odgovoru. Zbog mutacija u NOD2 nema ni imunostne memorije te dolazi do poremećaja u autofagiji. Primijećeni su i polimorfizmi citokina interleukina-23 (IL) koji je važan za indukciju Th17 citokina. Nefunkcionalna epitelna barijera i povećana propusnost crijeva su također dio patofiziologije IBD-a. Epitelne stanice služe kao fizička barijera bakterijama, ali i izlučuju razne antimikrobne peptide. Kod pacijenata s CD je zamijećena defektna ekspresija antimikrobnih peptida (Zhang i Li, 2014).

Dugo se smatralo da se kod CD javlja isključivo Th1 imunostni odgovor, a kod UC Th2 odgovor, no to se danas smatra kontroverznim. IL-12 inducira Th1 stanice na stvaranje velikih količina interferona γ (IFN), a Th2 stanice na produkciju IL-4, IL-5 i IL-13. Pokazano je da kod CD T-stanice proizvode više IL-2 i IFN- γ nego kod UC i kontrola, a atipične NKT stanice kod UC pacijenata proizvode više Th2 citokina IL-13 nego kod CD pacijenata i kontrola. No, u mukozi su zamijećene i drugačije razine ovih citokina. Kod *in vitro* biopsija UC i CD su primijećene slične količine IFN- γ , dok je kod UC primijećena manja koncentracija mukoznog IL-13. Za IL-13 se smatra da ima protuupalno djelovanje te su pronađene manje koncentracije ovog citokina nego IFN- γ kod obje skupine pacijenata. Dodatno, kod IBD-a je prisutan i Th17 odgovor koji je također dio upalnog odgovora u crijevima. IL-6 i transformirajući faktor rasta β induciraju otpuštanje IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22 čiju ekspanziju potom promovira IL-23. Kod pojedinaca s IBD-om utvrđene su znatno veće razine ekspresije IL-17A nego u zdravih pojedinaca (Zhang i Li, 2014).

1.1.1. TNF- α

Faktor tumorske nekroze α (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) proizvode stanice urođenog i stečenog imuniteta te neimunološke stanice (Milaković i Crnčević Urek, 2020). Neprimjerena ili prejaka aktivacija TNF- α dovodi do kronične upale i razvoja bolesti. TNF- α inhibitori su razvijeni temeljem poznavanja signalizacije TNF- α te se ti lijekovi sada uspješno koriste u terapiji mnogih bolesti. TNF- α kao citokin ima pleiotropne učinke na različite stanice. Regulator je upalnih odgovora te je dio patogeneze određenih autoimunskih i upalnih bolesti, uključujući IBD (Jang i sur., 2021). Topljivi oblik TNF-a nastaje nakon proteolize prekursora pomoću TNF-konvertirajućeg enzima. Takav topljivi oblik zatim oligomerizira i nastaje biološki aktivni homotrimer (Gerriets i sur., 2023). TNF- α se u svojem aktivnom obliku veže za svoje receptore, od kojih su najvažniji TNF receptori 1 i 2 (TNFR1 i TNFR2). TNFR1 je važan za citotoksične i proupalne odgovore TNF- α dok je TNFR2 uglavnom uključen u aktivaciju stanica, migraciju i proliferaciju (Jang i sur., 2021). Vezanje za receptore dovodi do aktivacije signalnih puteva. Posljedično dolazi do aktivacije ciljnih stanica što vodi upalnim i imunskim odgovorima uslijed lučenja citokina i započinjanja apoptoze (Gerreits i sur., 2023). Kod obje bolesti dolazi do otpuštanja TNF- α iz Th1 stanica koji uz ostale citokine dovodi do akumulacije imunskih stanica u crijevima: intestinalnih fibroblasta, neutrofila i makrofaga. Tako dolazi do fibroze i formacije striktura te do sekrecije elastaze, a posljedično i do degradacije intestinalnog matriksa. Makrofagi proizvode dodatne proupalne citokine TNF- α , IL-1 i IL-6 koji pogoršavaju upalu degradacijom intestinalnog matriksa, oštećenjem epitela, aktivacijom endotela i vaskularnom disrupcijom. Na **Slici 1.** je vidljiv dijagram koji prikazuje ulogu TNF- α u IBD-u (Jang i sur., 2021). Uslijed povišene razine TNF- α dolazi do nedovoljne apoptoze limocita T te posljedično to njihovog nekontroliranog širenja u lamini proprijji. To doprinosi kroničnoj upali i nepravilnoj funkciji mukoze (Marušić i Mihaljević, 2013). Sve više se istražuju novi TNF-inhibitori, a poznavanje signalizacije TNF-a bit će korisno u budućnosti (Jang i sur., 2021).

Poznavanje citokina uključenih u patogenezu IBD-a pomoglo je da se razviju nove strategije liječenja. Terapijski potencijal ima i modificiranje mikrobiote te terapija matičnim stanicama (Schreiner i sur., 2019).



Slika 1. Uloga TNF- α u patofiziologiji upalne bolesti crijeva (preuzeto iz Jang i sur., (2021)).

1.2. TERAPIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Blaži oblici UC-a se liječe aminosalicilatima, kao što je mesalazin, koji se primjenjuju oralno ili rektalno. Nakon neuspjeha takvom vrstom terapije, podliježe se terapiji oralnim kortikosteroidima. Ukoliko bolest postane refraktorna uz upotrebu kortikosteroida, terapija se usmjerava na tiopurine, anti-TNF- α inhibitore, vedolizumab ili tofacitinib. Kada pacijent postane rezistentan na svu farmakološku terapiju, ima nepodnošljive nuspojave ili po život opasna stanja, pribježe se kirurškom liječenju, odnosno kirurškom odstranjivanju pogođenih dijelova probavnog sustava. Postoje i alternativne metode liječenja kao što je fekalna transplantacija, korištenje medicinske marihuane, biljnih dodataka prehrani (kurkuma, indijski tamjanovac, justicija...), probiotika i prebiotika. Također su učinke pokazali i resveratrol, elagična kiselina te bromelain (Amidžić Klarić i sur., 2023; Okobi i sur., 2021).

„Step-up“ pristup u početku liječenja koristi sigurnije, manje učinkovite terapijske opcije prije nego što se započne s liječenjem učinkovitijim, ali riskantnijim terapijskim rješenjima. Alternativa je „Top-down“ pristup za koji je karakteristično da se odmah na početku liječenja započne s korištenjem potentnijih lijekova. To uključuje započinjanje s biološkim lijekovima i/ili imunomodulatorima odmah po dijagnozi bolesti. **Slika 2.** je vizualni prikaz „Step-up“ i „Top-down“ metoda u liječenju IBD (Tsui i Huynh, 2018).



Slika 2. „Step-up“ i „Top-down“ metode liječenja upalne bolesti crijeva. (Dijagram je kreiran po uzoru na Tsui i Huynh (2018)).

Uvođenje bioloških lijekova ranije u terapiju IBD poboljšava ishode liječenja i sprječava progresiju do ireverzibilnog oštećenja crijeva. Ovakva vrsta terapije ima puno dokaza za CD, no postoji malo dokaza za UC. Biološki lijekovi kod pacijenata s CD kontroliraju upalu i sprječavaju napredovanje do ireverzibilnih stiktura i penetracije tkiva. Kod UC je upala samo mukozalna pa se striktore rijetko događaju (Berg i sur., 2019).

1.2.1. BIOLOŠKA TERAPIJA UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Biološki lijekovi su lijekovi koji se dobivaju iz bioloških izvora koji mogu biti ljudskog (inzulin, eritropoetin i hormon rasta), životinjskog ili mikrobiološkog podrijetla. Ti izvori proizvode ili se iz njih izlučuju djelatne tvari bioloških lijekova. Upravo zbog načina proizvodnje i porijekla, biološki lijekovi su puno složenije molekule od kemijskih lijekova (<https://www.halmed.hr>).

Sa sve većim saznanjima o patofiziologiji IBD-a, razvijeni su novi selektivni lijekovi za targetiranje specifičnih upalnih molekula i stanica koje su dio patogeneze upalne bolesti crijeva. Prva takva specifičnija skupina lijekova za liječenje ovih bolesti bili su anti-TNF- α inhibitori. Ovi lijekovi se dijele na topljive receptore kao što je etanercept i na monoklonska protutijela (engl. *Monoclonal Antibody*, mAb) poput infliksimaba i adalimumaba (Marušić i Mihaljević, 2013).

Biološki lijekovi koji se koriste za liječenje IBD-a se dijele na anti-TNF- α inhibitore, antiintegrinske lijekove i anti-IL-12/23 inhibitore (Milaković i Crnčević Urek, 2020). U Hrvatskoj su trenutno odobreni: infliksimab, adalimumab, vedolizumab, ustekinumab i golimumab (<https://hzzo.hr>).

Anti-TNF- α inhibitori pokazuju učinkovitost u redukciji indeksa aktivnosti CD, smanjuju razine C-reaktivnog proteina i pomažu u mukoznom cijeljenju. Predložena su dva mehanizma njihovog djelovanja, a to su indukcija apoptoze T stanica i Fc-receptorom-ovisna promocija makrofaga koji obnavljaju tkivo. Tako anti-TNF- α inhibitori inhibiraju upalu i pomažu mukoznom cijeljenju (Friedrich i sur., 2019). Različiti anti-TNF inhibitori imaju različite mehanizme djelovanja. Etanercept se veže za TNF- α i TNF- β visokim afinitetom. Može se vezati za dvije cirkulirajuće ili stanično vezane TNF molekule te ne dovodi do apoptoze stanica koje eksprimiraju TNF. Infliksimab, adalimumab i golimumab se vežu samo za TNF- α visokim afinitetom, mogu se vezati za topljivi i stanično vezani oblik TNF- α te dovode do apoptoze stanica koje eksprimiraju TNF. Certolizumab pegol se veže samo za TNF- α jakim afinitetom, može se vezati za topljivi ili stanično vezani oblik TNF-a. Ne dovodi do komplementom ili antitijelom posredovane stanične citotoksičnosti, ni do apoptoze stanica koje eksprimiraju TNF, ni do degranulacije neutrofila (Gerriets i sur., 2023).

Adalimumab je terapijsko humano IgG1 mAb koje se proizvodi u stanicama jajnika kineskog hrčka, a specifično se veže za TNF- α i neutralizira njegovu biološku funkciju blokirajući mu interakciju s površinskim staničnim TNF-receptorima. Osim toga, on i modulira biološke odgovore koje inducira ili regulira TNF, uključujući promjene u razinama adhezijskih molekula koje su odgovorne za migraciju leukocita (<https://mediately.co/hr>). Odobren je za liječenje mnogih bolesti, a prva odobrena indikacija od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) bila je reumatoidni artritis (Jang i sur., 2021). Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicinal Agency*, EMA) je ovaj lijek odobrila u sljedećim indikacijama: plak psorijaza, psorijatični artritis, reumatoidni artritis, aksijalni

spondiloartritis, ankilozni spondilitis, CD, UC, poliartrikularni juvenilni idiopatski artritis, artritis povezan s entezitisom, gnojni hidradentitis, neinfektivni uveitis (<https://www.ema.europa.eu>).

1.3. ANALITIČKE TEHNIKE ZA ISPITIVANJE BIOLOŠKIH LIJEKOVA

Biološki lijekovi su velike, kompleksne molekule čija se sinteza odvija u živim organizmima što zahtjeva puno koraka u proizvodnji. Važno je pratiti sve korake proizvodnje kako bi se osigurali kvaliteta, sigurnost i učinkovitost lijekova (<https://www.raps.org>).

Prema ICH smjernicama karakterizacija ovih lijekova uključuje: fizikalno-kemijska svojstva, ispitivanje biološke aktivnosti, imunokemijskih svojstava, određivanje čistoće, onečišćenja te sadržaja aktivne tvari.

Za te postupke se provodi validacija, a tipične karakteristike postupka koje se određuju validacijom su točnost, preciznost (ponovljivost, srednja preciznost), specifičnost, granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD), granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ), linearnost, radno područje i izdržljivost. Validacijom se treba pokazati da je određeni analitički postupak prikladan za određenu namjenu. Za identifikaciju je dovoljno odrediti specifičnost analitičkog postupka, za testiranje na onečišćenja je potrebno provesti sve postupke osim određivanja LOD dok je za određivanje sadržaja potrebno provesti sve osim određivanja LOD i LOQ (ICH, 1995).

Lijekovima koji su po strukturi protutijela važno je odrediti i imunološka svojstva, a to uključuje analize vezanja protutijela na pročišćene antigene i definirane regije antigena kako bi se utvrdili afinitet, aviditet i imunoreaktivnost. Isto tako, potrebno je biokemijski definirati molekulu koja nosi epitop kao i sam epitop. Za neke lijekove, potrebno je provesti i imunokemijske testove kao što su enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) i Western-blot (WB) test, koristeći protutijela koja prepoznaju različite epitope proteina. Imunokemijska svojstva mogu pomoći da se utvrdi identitet, homogenost, čistoća te da se odredi sadržaj (ICH, 1999).

1.3.1. IDENTIFIKACIJA

Kako bi se provele strukturna karakterizacija i potvrda određuju se slijed i sastav aminokiselina te slijed terminalnih aminokiselina. Ova ispitivanja uključuju i peptidno mapiranje odnosno selektivnu fragmentaciju lijeka na peptide primjenom enzima ili kemikalija. Dobiveni peptidni fragmenti analiziraju se najčešće tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Precision Liquid Chromatography*, HPLC). Određivanje sulfhidrilnih grupa i disulfidnih mostova također treba biti ispitan za pojedine biološke lijekove. Također se određuje i struktura ugljikohidrata kod glikoproteina (ICH, 1999).

Fizikalno-kemijska svojstva koja se određuju prilikom karakterizacije bioloških lijekova su molekularna masa, izoforme, molarna apsortivnost, elektroforetski obrasci, tekućinsko kromatografski obrasci i spektroskopski profili. Za određivanje molekulske mase kao tehnike koriste se kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC), natrij dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *Sodium Dodecyl-Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) i masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MS). Izoelektrično fokusiranje (engl. *Isoelectric Focusing*, IF) se koristi za određivanje izoformi. Molarna apsorptivnost određuje se primjenom UV/Vis spektrofotometrije pri određenoj valnoj duljini. Elektroforetski obrasci se utvrđuju s PAGE, IF, SDS-PAGE, WB-om i kapilarnom elektroforezom (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE). Tekućinsko kromatografski obrasci dobivaju se SEC-om, obrnuto faznom kromatografijom, kromatografijom ionske izmjene i afinitetnom kromatografijom. Spektroskopski profili se određuju UV/VIS spektroskopijom, cirkularnim dikroizmom (engl. *Circular Dichroism*, CD) i nuklearnom magnetskom rezonancom (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) (ICH, 1999).

SEC je referentna separacijska tehnika koja se koristi za kvalitativne i kvantitativne analize proteina. Prikladna je i za analizu fragmenata i agregata. Nedenaturirajuća je u prirodi jer se koriste blagi uvjeti koji su pogodni za biološke molekule. Princip ove tehnike je razdvajanje molekula s obzirom na vrijeme zadržavanja u unutarnjim porama smole koje je određeno unutarnjim promjerom pora i distribucijom veličine pora. S obzirom na to, najprije se eluiraju najveće čestice, dok se najduže u porama zadržavaju fragmentirani dijelovi molekula, odnosno molekule najmanjih veličina čestica. Murisier i sur. (2022) su pomoću SEC i MS uspješno okarakterizirali različitih produkte mAb-a od kojih su neki bili izloženi povišenoj temperaturi,

a neki ne (Murisier i sur., 2022). São Pedro i sur. (2023) koristili su metodu SEC-UPLC za određivanje razine agregacije mAb.

Schreiber i sur. (2020) ispitali su biosličnost adalimumaba i jednog njegovog biosimilara s obzirom na analizu fizikalno-kemijskih svojstava i biološku karakterizaciju. Analizirane su struktura i funkcija novoga biosimilara. Za analizu strukture su korišteni peptidno mapiranje s LC-om i MS-om, CE sa SDS, SEC-HPLC i kationsko izmjenjivačka HPLC. Funkcionalna aktivnost određena je uz pomoć ELISA-e, površinske plazmonske rezonancije i analizama na stanicama. Polipeptidni slijed adalimumaba i novog biosimilara bili su identični te su također sekundarna i tercijarna struktura pokazale visoku sličnost (Schreiber i sur., 2020).

1.3.2. ONEČIŠĆENJA

Onečišćenja bioloških lijekova mogu nastati ili porasti tijekom njihove proizvodnje ili skladištenja. Mogu se nalaziti u polaznim tvarima, nastati tijekom proizvodnje ili razgradnjom tijekom skladištenja. Budući da ova onečišćenja mogu biti raznovrsna za njihovo ispitivanje često se koristi više tehnika koje pružaju raznovrsne podatke o njima. Onečišćenja dobivena iz supstrata stanica najčešće su proteini dobivenih iz drugih izvora i nukleinske kiseline te se ona određuju imunoesejem s poliklonskim protutijelima. Kao onečišćenja u biološkim lijekovima mogu se naći enzimi, kemijski i biokemijski reagensi, anorganske soli, otapala, ligandi... Onečišćenja koja su srodna biološkom lijeku ili koja nastanu njegovom razgradnjom uključuju njegove različite forme (deamidirani, oksidirani, glikozilirani, fosfolirani i dr. forme). Za njihovu detekciju te karakterizaciju koriste se tehnike poput tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography*, LC), kapilarne elektroforeze, masene spektrometrije... U ovu skupinu onečišćenja ubrajaju se i agregati biološkog lijeka poput dimera i trimera za čiju identifikaciju i određivanje je prikladna SEC tehnika (ICH, 1999).

1.3.3. SADRŽAJ

Sadržaj bioloških lijekova se najčešće određuje kao sadržaj proteina i treba se utvrditi prikladnom analizom koja je obično fizikalno-kemijske prirode. Za određivanje sadržaja proteina trebale bi se koristiti validirane metode prikladne osjetljivosti i specifičnosti. Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) prikladno je mjerenje apsorbancije na 280 nm te bi izmjerena koncentracija proteina trebala biti

unutar ± 10 % od deklarirane (<https://www.who.int>). S druge strane, biološka aktivnost je specifična sposobnost ili kapacitet proizvoda da postigne definirani biološki učinak, a kvantitativna mjera biološke aktivnosti je potentnost (engl. *potency*) (ICH, 1999; ICH, 1996).

1.3.4. ISPITIVANJE STABILNOSTI BIOLOŠKIH LIJEKOVA

Biološki lijekovi su osjetljivi na okolišne faktore te je zbog toga potrebno utvrditi uvjete za njihovo skladištenje kako bi se očuvala biološka aktivnost i izbjegla razgradnja. Njihove molekularne konformacije i biološka aktivnost ovise o kovalentnim i nekovalentnim vezama upravo zbog njihove polipeptidne strukture. Osjetljivi su na različite okolišne uvjete kao što su promjene temperature, oksidacija, svjetlost i pH (ICH, 1996).

Kako bi se utvrdila stabilnost bioloških lijekova potrebno je koristiti kompleksne analitičke tehnike, a određivanje biološke aktivnosti bi trebalo biti ključni element takvih ispitivanja kao i fizikalno-kemijske, biokemijske i imunokemijske metode. Prilikom razvoja novog biološkog lijeka važno je napraviti dugoročnu studiju stabilnosti kako bi se utvrdilo vrijeme skladištenja (ICH, 1996).

Ne postoji jedinstveni test ili parametar kojim se može odrediti stabilnost biološkog lijeka stoga proizvođači trebaju navesti parametre za ispitivanje stabilnosti kojima će se moći utvrditi promjene u identitetu, čistoći i potentnosti. Dakle, testovi stabilnosti su specifični za svaki lijek. Svaki lijek treba ostati unutar svoje specifikacije što se tiče limita kako bi se održali sigurnost, čistoća i potentnost tijekom roka trajanja (ICH, 1996).

Svrha ispitivanja stabilnosti aktivnih tvari i dozirnih oblika lijekova je utvrđivanje kako se mijenja njihova kvaliteta s vremenom pod utjecajem različitih čimbenika koji uključuju temperaturu, vlažnost i svjetlost te kako bi se prikupili podaci vrijedni za utvrđivanje *re-test* razdoblja za aktivnu tvar i u konačnici rok trajanja lijeka. Važno je ispitati svojstva koja utječu na kvalitetu, sigurnost i učinkovitost djelatne tvari. *Re-test* razdoblje je vrijeme tijekom kojega bi lijekovita tvar trebala ostati unutar svoje specifikacije. Prisilna razgradnja aktivne tvari se provodi kako bi se dobila informacija o intrinzičnoj stabilnosti aktivne tvari te je to vrlo važno testiranje prilikom razvoja lijekova. Prisilna razgradnja gotovog lijeka se provodi kako bi se ispitalo kako zahtjevni uvjeti djeluju na lijek. U to ispitivanje spadaju ispitivanje fotostabilnosti i specifična testiranja određenih proizvoda. Prisilnom razgradnjom se dobiva informacija o mogućim produktima razgradnje aktivne tvari te to pomaže u utvrđivanju mogućih puteva

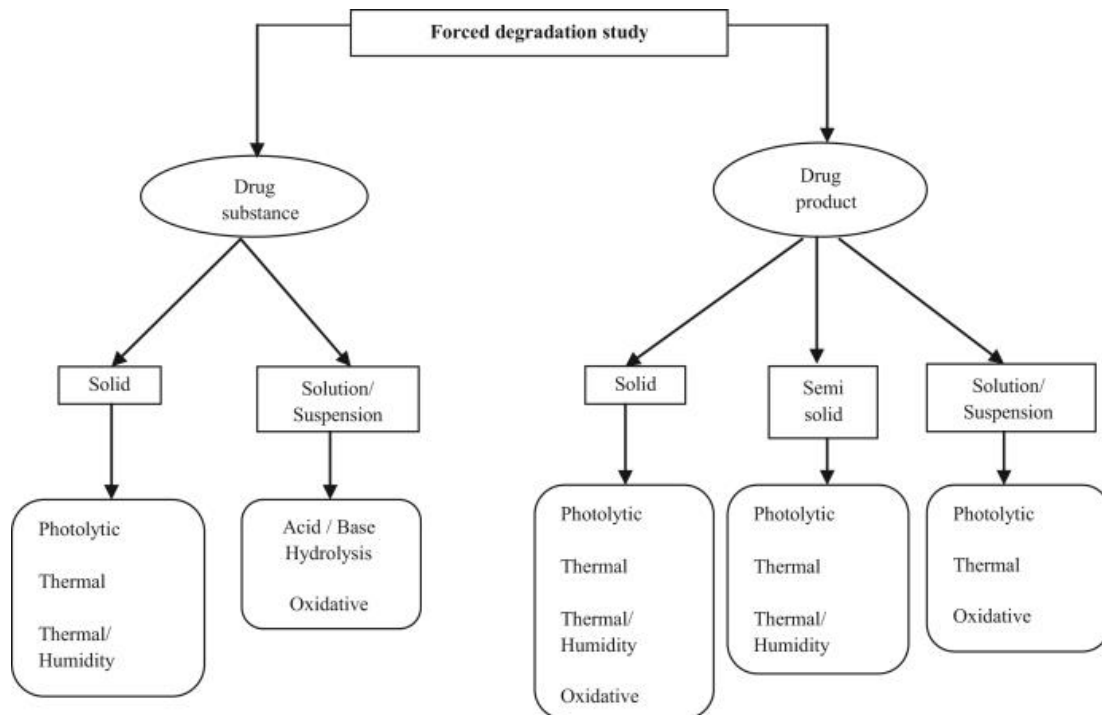
razgradnje te govori o intrinzičnoj stabilnosti molekule. Ovakva testiranja uključuju ispitivanje učinka temperature, vlažnosti, oksidacije, fotolize te hidrolize na aktivnu tvar kao i njezinu fotostabilnost (ICH, 2003).

Važno je provesti validirane stabilitetno-indikativne analitičke postupke (ICH, 2003). Stabilitetno-indikativna metoda je validirana analitička metoda kojom se precizno može mjeriti sadržaj aktivne tvari i produkta razgradnje jer se njome mogu otkriti specifične promjene u kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka. Najčešće se koristi prisilna razgradnja kako bi se dobili uzorci za razvoj i validaciju ovih metoda (Sonawane i sur., 2016).

Nadalje, u svrhu ispitivanja stabilnosti lijeka mogu se provesti još i dugoročne i ubrzane razgradnje (Blessy i sur., 2014). Dugoročna ispitivanja su ispitivanja stabilnosti pod normalnim uvjetima skladištenja za razdoblje ponovnog ispitivanja (*re-test*) ili roka trajanja. Ubrzano testiranje je dio studije stabilnosti kojim se ubrzava razgradnja ili pojava fizičkih promjena aktivne tvari ili gotovog lijeka. Podaci dobiveni takvim i dugoročnim studijama se koriste za procjenu dugoročnih kemijskih učinaka u normalnim uvjetima skladištenja te kratkoročnih odstupanja izvan uvjeta skladištenja koji se mogu pojaviti primjerice tijekom transporta (ICH, 2003). Studije prediktivne ubrzane razgradnje se provode kako bi se uštedilo vrijeme i smanjili troškovi prilikom razvoja lijekova. Ovakvim studijama se rezultati dobivaju unutar jednog mjeseca, za razliku od onih implementiranih ICH smjernicama za koje je potrebno minimalno šest mjeseci (González-González i sur., 2022). Prisilna razgradnja označava razgradnju aktivne tvari ili gotovog lijeka pod uvjetima koji su agresivniji od onih korištenih provođenjem ubrzane razgradnje. Takva ispitivanja su korisna za utvrđivanje specifičnosti metoda za ispitivanje stabilnosti te se dobiva uvid u puteve razgradnje i nastale produkte. Odabir stresnih uvjeta treba biti u skladu s razgradnjom proizvoda pod uobičajenim uvjetima proizvodnje, skladištenja ili uporabe (Blessy i sur., 2014). **Slika 3.** prikazuje dijagram na kojem su navedeni različiti stresni uvjeti koji se koriste za prisilnu razgradnju aktivnih tvari i gotovih lijekova.

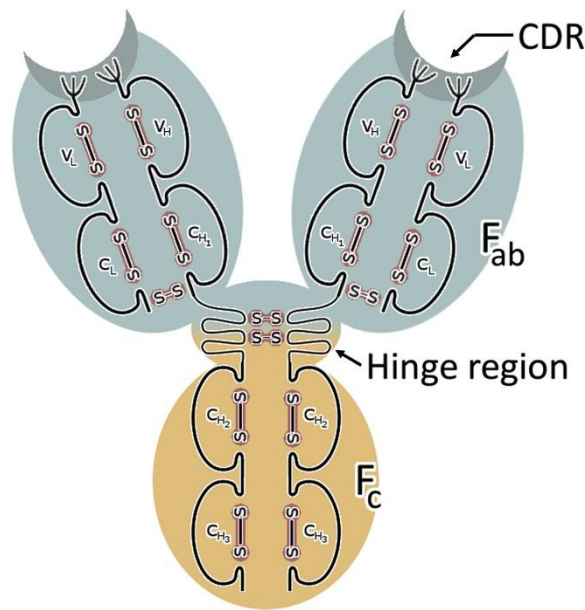
Shabestari i sur. (2018) koristili su prisilnu razgradnju za ispitivanje biosličnosti originalnog adalimumaba i njegovog biosimilara na temelju profila razgradnje tih lijekova. Biosimilari su biološki lijekovi koji pokazuju veliku sličnost u smislu strukture, biološke aktivnosti, učinkovitosti i profila imunogeničnosti s već odobrenim biološkim lijekovima (<https://www.ema.europa.eu/>). Zbog niže cijene, biosimilari su dostupniji pacijentima. Provedena su sljedeća stresna ispitivanja: oksidacija, kisela hidroliza, bazična hidroliza, termalna hidroliza, fotoliza i mehanička studija. Kako bi se odredili produkti razgradnje pod

različitim stresnim uvjetima, nakon provedene kisele hidrolize je korištena ionsko-izmjenjivačka kromatografija, nakon bazične SEC, a nakon termalne hidrolize je provedeno ispitivanje biološke aktivnosti (Shabestari i sur., 2018).



Slika 3. Dijagram provedbe prisilne razgradnje aktivne tvari ili gotovog lijeka. (Preuzeto iz Blessy i sur. (2014)).

Monoklonska protutijela su imunoglobulini (Ig) ili fragmenti Ig koji se dobivaju iz jednog klona stanica. Imaju svoje specifične mete. Njihova struktura se sastoji od četiriju lanaca, od kojih su dva laki lanci, a dva teški lanci. Lanci su međusobno povezani disulfidnim mostovima. Dije se na pet izotipova koji se razlikuju u strukturi i funkciji, a to su IgG, IgA, IgM, IgE i IgD. IgG izotip se dalje dijeli su subtipove, a IgG1 subtip se najčešće koristi u proizvodnji lijekova (Basle i sur. 2019). Na **Slici 4.** je prikazana generalna struktura protutijela. mAb tvore veliku skupinu bioloških lijekova koji pokrivaju širok spektar indikacija, a tijekom posljednjih godina dominiraju tržištem biofarmaceutika. Uspjeh ovih lijekova leži u njihovoj specifičnosti i tehnološkom napretku koji je pokrenuo njihov razvoj (<https://www.who.int>).



Slika 4. Generalna struktura protutijela (preuzeto iz Basle i sur., (2019)).

Monoklonska protutijela zbog svoje proteinske strukture imaju probleme sa stabilnosti tijekom proizvodnje uslijed različitih parametara koji mogu dovesti do modifikacija kao i zbog posttranslacijskih modifikacija koje im mogu izmijeniti biološke funkcije. Problem stabilnosti se nameće i kasnije u životu ovih bioloških lijekova jer su im različite situacije kao što su prepakiranje, zamrzavanje ili otapanje mogu biti rizici za stabilnost (Basle i sur. 2019).

Postoje različiti mehanizmi nestabilnosti mAb koji se mogu podijeliti na kemijske i fizikalne koji se međusobno isprepliću. Najčešće kemijske nestabilnosti su oksidacija, deamidacija te fragmentacija na disulfidnim mostovima ili peptidnim vezama. Fizikalne nestabilnosti se mogu dogoditi uslijed kemijskih nestabilnosti koje mogu dovesti i do denaturacije proteina. Do denaturacije također dovode i okolišni čimbenici, visoka temperatura ili neprikladni pH. Najvažnija fizikalna nestabilnost je agregacija koje je često u kasnijim fazama ireverzibilna. Ona je problem jer može dovesti do stvaranja netopljivih čestica što nije prihvatljivo za parenteralne lijekove. Agregacija uzrokuje i jaču imunogeničnost ovakvih lijekova. Postoje i različiti čimbenici koji utječu na stabilnost, a to su proteinska struktura, koncentracija proteina i potencijal samoasocijacije, temperatura, površine, svjetlost, pomoćne tvari i mehanički stres (Basle i sur. 2019). Bilo kakve promjene u proteinskoj strukturi protutijela mogu dovesti do razvoja teških imunskih reakcija kao što su anafilaksija i citokinske oluje te do stvaranja neutralizirajućih ili blokirajućih protutijela (Laptoš i Omeresel, 2018).

Metode koje se koriste za određivanje stabilnosti mAb trebaju utvrditi fizičku (agregacija, fragmentacija, struktura), kemijsku (kemijske razgradnje) i biološku stabilnost (očuvanje aktivnosti mAb). Za studije fizičkih nestabilnosti se koriste turbidimetrija, SEC i CD dok se za studije kemijskih nestabilnosti trebaju koristiti barem tri separacijske metode, kromatografija ionske izmjene, SEC i peptidno mapiranje. Biološka aktivnost se treba utvrditi imunološkim i citotoksičnim testovima. Očuvana biološka aktivnost ne znači da nije došlo do promjene u strukturi protutijela tako da treba stabilnost gledati kao cjelovitu (Basle i sur. 2019).

Demellenne i sur. (2021) proveli su studiju prisilne razgradnje na adalimumabu i etanerceptu te su oni uspoređeni sa svojim biosimilarima. Stresni uvjeti koji su korišteni su mućkanje i povišena temperatura te su ti uzorci korišteni za razvoj metode. Za analizu su korištene kapilarna gel elektroforeza (CGE), reverzno fazna tekućinska kromatografija i SEC koje su bile spregnute s UV detektorom. Hidrofilni i hidrofobni produkti razgradnje odvojeni su reverzno faznom tekućinskom kromatografijom, CGE je imala dobru selektivnost za fragmente adalimumaba, a SEC je bio koristan za analizu agregata i nekih fragmenata (Demellenne i sur., 2021).

Tokhadze i sur. (2018) proveli su potpunu karakterizaciju infliksimaba koristeći vizualnu provjeru, brojanje subvidljivih čestica, dinamičko raspršenje svjetlosti, SEC, kromatografiju kationske izmjene te analizu primarne, sekundarne i tercijarne strukture. SEC je u ovoj studiji korištena za evaluaciju agregacije i fragmentacije infliksimaba (Tokhadze i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

MAB postaju povezana sa sve više indikacija te na tržište dolaze biosimilari koji su zbog svoje niže cijene sve dostupniji pacijentima. Stabilnost ovih lijekova je problematična upravo zbog njihove proteinske strukture. Kako ne postoje jedinstveni testovi za analizu stabilnosti ovih lijekova, potrebno je razviti napredne analitičke metode.

Mogućnost primjene SEC-a za analizu mAb pokazana je različitim dosad provedenim istraživanjima, a provedena su istraživanja i na anti-TNF- α inhibitoru adalimumabu koji se koristi za liječenje upalne bolesti crijeva. Ova analitička tehnika je korisna za razdvajanje molekula s obzirom na njihovu veličinu te je zbog toga prikladna za razdvajanje ishodnih proteina od njihovih fragmenata i agregata. Upravo ta osobina ove metode može biti iskorištena za analizu uzoraka na kojima je provedena prisilna razgradnja u svrhu analize dobivenih produkata razgradnje. Dodatno, SEC je korisna metoda za identifikaciju, analizu onečišćenja, određivanje sadržaja te za studije stabilnosti.

Cilj ovoga diplomskog rada bio je razviti pouzdanu analitičku metodu za određivanja sadržaja bioloških lijekova koja bi mogla biti primjenjiva i za studiju prisilne razgradnje kao stabilitetno-indikativna metoda u svrhu određivanja produkata razgradnje. Za ovu studiju je odabran adalimumab u terapijskoj dozi 40 mg / 0,4 mL u obliku injekcijske otopine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Kemikalije

- fosfatni pufer (10 mM, pH = 7,4) za pripremu pokretne faze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- metanol čistoće ua HPLC (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- adalimumab 10 mg/mL u 12,5 mM puferu (*certified reference material*) korišten za razvoj i validaciju metode (Cerilliant Analytical Standard, Round Rock, TX, SAD)
- ultra-čista voda dobivena je korištenjem sustava MilliQ UF-Plus (otpornost $M\Omega\text{cm}^{-1}$ >18 na 25 °C i TOC <5 ppb) (Millipore, Darmstadt, Njemačka)

Instrumenti

- tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti, UHPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- analitička vaga AG245 s mogućnošću očitavanja 0,01 mg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- sustav za filtraciju pokretnih faza (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- inkubator ES-20/60 (Biosan, Latvija)

Specifični pribor

- PTFE membranski filteri 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- magnetski mješač (IKA, Staufen, Njemačka)
- vorteks (IKA, Staufen, Njemačka)
- automatske pipete varijabilnog volumena (Rainin, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)
- pH metar (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA I UZORKA

Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem komercijalno dostupne standardne otopine s ultra-čistom vodom do prikladnih koncentracijskih razina. Uzorci lijekova su pohranjeni prema uputi proizvođača te su analizirani unutar navedenog roka trajanja. Otopine uzorka pripremljene su njihovim razrjeđivanjem s ultra-čistom vodom u omjeru 1:200 (V/V). Sve otopine pripremljene su neposredno prije analize te su pohranjene u hladnjaku ili LC *autosampler*-u na 4 °C do injektiranja.

3.2.2. PRIPREMA UZORAKA ZA STUDIJU PRISILINE RAZGRADNJE

Prisilna razgradnja provedena je primjenom standardne otopine adalimumaba konačne koncentracije od 500 µg/mL dobivene razrjeđivanjem s ultra-čistom vodom. U standardne otopine dodano je 10 µL 0,1 M HCl za provedbu kisele razgradnje odnosno 10 µL 0,1 M NaOH za provedbu bazične razgradnje. Za provedbu razgradnje pri povišenoj temperaturi priređena je otopina koncentracije 500 µg/mL koja je pohranjena u inkubator na temperaturi od 60 °C. Sve navedene otopine priređene su u tamne LC bočice za uzorkovanje kako bi se uklonio utjecaj svjetlosti. Za provedbu razgradnje pod utjecajem svjetla priređena je otopina koncentracije 500 µg/mL u prozirnoj LC bočici za uzorkovanje koja je potom izložena dnevnom svjetlu.

Uzorci su uzorkovani u sljedećim točkama: 1 sat, 2 sata, 4 sata, 12 sati, 24 sata te 48 sati. Pojedina točka razgradnje obustavljena je nakon postizanja od 10 % do 20 % razgradnje lijeka.

3.2.3. KROMATOGRAFSKA ANALIZA

Za analizu bioloških lijekova korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti. Kao nepokretna faza korištena je kolona AdvanceBio SEC 130Å (dimenzije 7,8 x 150 mm, veličina čestica 2,7 µm) od Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD). Kao pokretna faza korišten je fosfatni pufer (0,01 M, pH = 7,4) priređen s ultra-čistom vodom. Prije upotrebe pokretna faza je profiltrirana kroz membranski filter veličine čestica 0,45 µm. Protok pokretne faze iznosio je 0,5 mL/min. Volumen injektiranja postavljen je na 10,0 µL, a temperatura kolone držana je 25,0 ± 0,1 °C. Vrijeme trajanja analize bilo je 30 minuta kako bi se postigla elucija većih produkata razgradnje, a provedena je izokratna elucija. Tijekom analize uzorci su se čuvani u tamnim bočicama za LC na 4 °C. Snimanje se provodilo spektrofotometrijski na

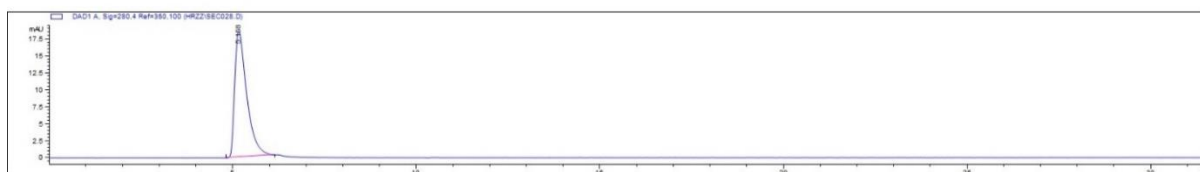
valnim duljinama maksimuma adalimumaba 280 nm. Tijekom analize snimani su spektri kromatografskih pikova u području od 190 do 600 nm. Kromatogrami su praćeni pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD).

Validacija analitičkog postupka provedena je prema ICH smjernicama.

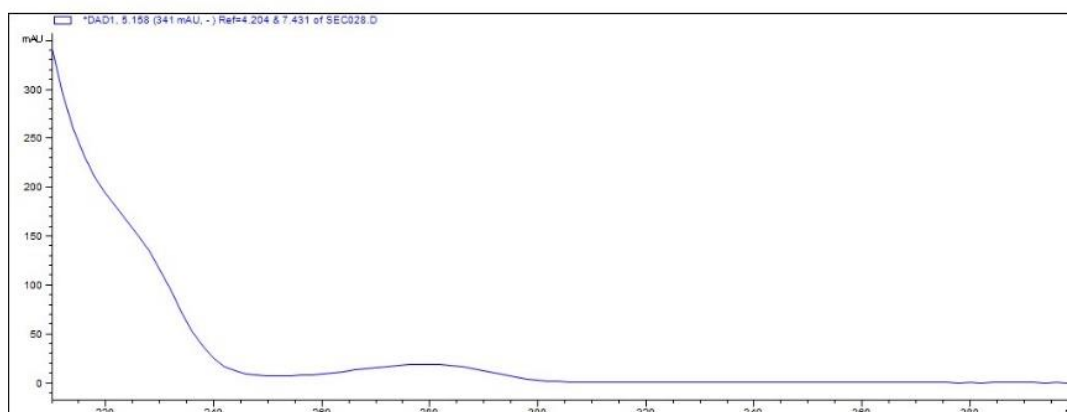
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA METODE

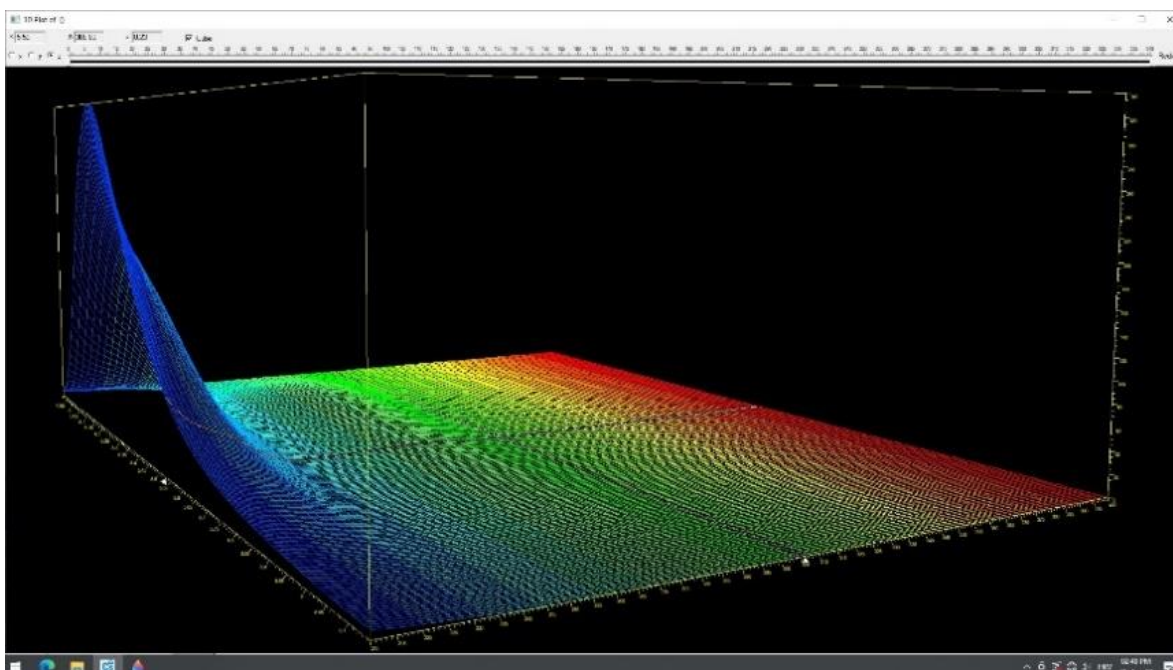
Primjenom gore opisanog analitičkog postupka razvijena je metoda za određivanje biološkog lijeka i produkata njegove prisilne razgradnje. Na **Slici 5.** prikazan je kromatogram standardne otopine (koncentracijska razina 500 µg/mL) snimljen pri 280 nm na kojem je vidljiv pik adalimumaba pri vremenu zadržavanja od 5,16 minuta, dok je na **Slici 6.** i **Slici 7.** prikazan spektar adalimumaba. Na **Slici 8.** prikazana je visoka čistoća pika dobivena opisanom metodom, čistoća je iznosila preko 999,99 (**Slika 9.**). Kako bi se procijenila pouzdanost analitičke metode ispitana je prikladnost kromatografskog sustava. U **Tablici 2.** prikazani su sljedeći parametri: vrijeme zadržavanja, površina pika, broj teorijskih tavana, faktor zadržavanja, čistoća pika i simetrija pika. Ispitivanje je provedeno primjenom standardne otopine koncentracije 500 µg/mL analizirane u šesteroplikatu. Odstupanja od mjerenja prikazana su relativnim standardnim devijacijama (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD). Dobivene RSD vrijednosti bile su manje od 5 % što upućuje na visoku ponovljivost analitičkog postupka.



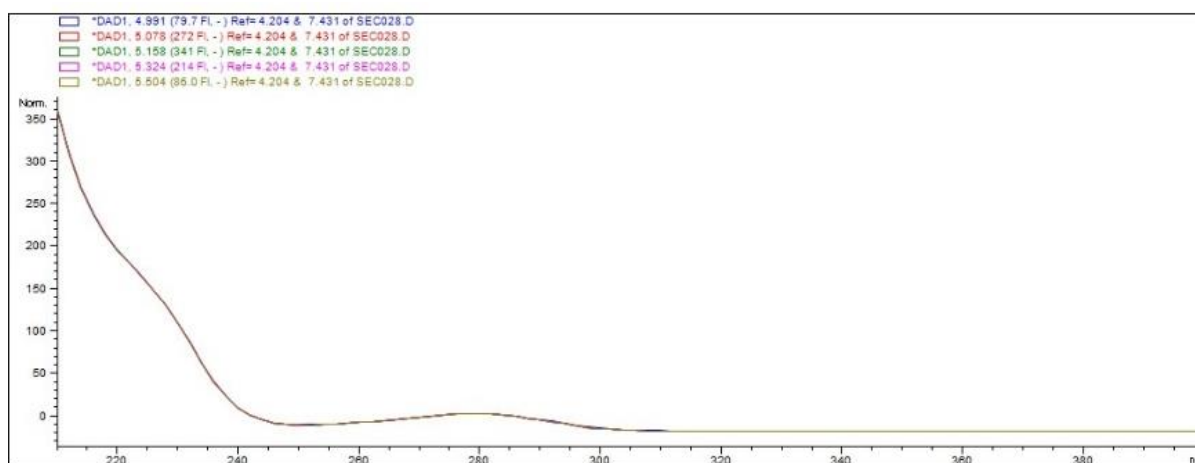
Slika 5. Kromatogram adalimumaba (500 µg/mL) snimljen pri 280 nm.



Slika 6. Spektar adalimumaba.



Slika 7. 3D spektar adalimumaba.



Slika 8. Spektar adalimumaba – prikaz čistoće kromatografskog pika (koncentracijska razina 500 µg/mL).



Slika 9. Čistoća pika u standardnoj otopini (koncentracijska razina 500 µg/mL).

Tablica 2. Rezultati ispitivanja prikladnosti sustava
(koncentracijska razina 500 µg/mL; $n = 6$).

Vrijeme zadržavanja		Površina pika		Faktor zadržavanja		Broj teorijskih tavana		Simetrija pika		Čistoća pika	
t_R (min)	RSD ¹ (%)	A (mAU/s)	RSD (%)	k	RSD (%)	N	RSD (%)	A_s	RSD (%)	P	RSD (%)
5,17	0,01	930,2	0,38	9,33	0,01	3699	0,03	0,78	4,33	999,99	0,01

¹ RSD – relativna standardna devijacija (engl. *relative standard deviation*)

4.2. VALIDACIJA METODE

4.2.1. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA ZA PROVEDBU VALIDACIJSKOG POSTUPKA

Linearnost metode je ispitana na pet koncentracijskih razina (5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL i 1000 µg/mL) korištenjem tri zasebno pripremljene standardne otopine iz kojih je izrađena jedinstvena linearna jednadžba. Rezultat je prikazan kao jednadžba pravca i pripadajući koeficijent korelacije.

LOD je dobivena razrjeđivanjem standardne otopine ultra-čistom vodom na temelju omjera signala i šuma 3:1, a LOQ je dobivena na temelju omjera signala i šuma 10:1.

Ponovljivost metode je procijenjena analizom šest radnih otopina (koncentracijska razina: 50 µg/mL) unutar istog dana, dok je srednja preciznost metode ispitivana analizom tri radne otopine (koncentracijska razina: 50 µg/mL) priređene i analizirane tijekom tri uzastopna dana. Podaci su prikazani kao RSD vrijednosti.

Točnost metode ispitana je analizom standardnih otopina u triplicatu na tri koncentracijske razine (niska koncentracijska razina: 25 µg/mL; srednja koncentracijska razina: 250 µg/mL; visoka koncentracijska razina: 500 µg/mL). Rezultati su prikazani kao prinos (engl. *recovery*, %) i RSD vrijednosti.

Rezultati provedene validacije prikazani su u **Tablici 3**. Metoda se pokazala linearna u rasponu od 5 do 1000 µg/mL uz iznimno visoki koeficijent korelacije od 0,9994. Nadalje, postignuta je zadovoljavajuća osjetljivost metode uz LOQ vrijednost od 5 µg/mL. Metoda se pokazala preciznom unutar 3 uzastopna radna dana budući da su RSD vrijednosti bile manje od 0,48 %. Točnost metode bila je zadovoljavajuća na sve tri koncentracijske razine. Prinosi su bili u rasponu od 94,6 % do 105,2 % uz pripadajuće RSD vrijednosti manje od 0,99 %. Na temelju dobivenih rezultata moguće je utvrditi kako je metoda visoko pouzdana. Nadalje, analit se pokazao stabilnim 48 sati čuvan u tamnoj bočici u hladnjaku na 4 °C (prinos je iznosio 99,8 %).

Tablica 3. Validacijski podaci.

Vrijeme zadržavanja (t_R , min/ RSD ¹ , %)	Linearnost (µg/mL)	Jednadžba	r^2	LOD (µg/mL) ³	LOQ (µg/mL) ⁴
5,169 / 0,02	5 - 1000	$y = 1,8771x - 12,378$	0,9994	3	5
Preciznost (RSD, %)⁶		Točnost (Prinos i RSD, %)⁷			
Ponovljivost ($n = 6$)	Srednja preciznost ($n = 9$)	Niska koncentracija ($n = 3$)	Srednja koncentracija ($n = 3$)	Visoka koncentracija ($n = 3$)	
0,37	0,48	104,3 / 0,91	105,2 / 0,99	94,6 / 0,18	

¹RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

² r – koeficijent korelacije

³LOD – granica identifikacije (engl. *Limit of Detection*) dobivena na temelju omjera signala i šuma 3:1

⁴LOQ – granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation*) dobivena na temelju omjera signala i šuma 10:1

4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA

U **Tablici 4.** prikazani su rezultati određivanja sadržaja u dozirnom obliku prikazan kao mg/mL. Mjerenje je provedeno u triplikatu te su dobiveni zadovoljavajući prinosi (od 100,2 % do 101,0 %) uz visoku ponovljivost analitičkog postupka. Rezultati su prikazani i kao utvrđeni sadržaj u odnosu na deklarirani (**Tablica 4**). Rezultati pokazuju iznimno nisko odstupanje u odnosu na deklarirani sadržaj.

Tablica 4. Rezultati određivanja sadržaja adalimumaba.

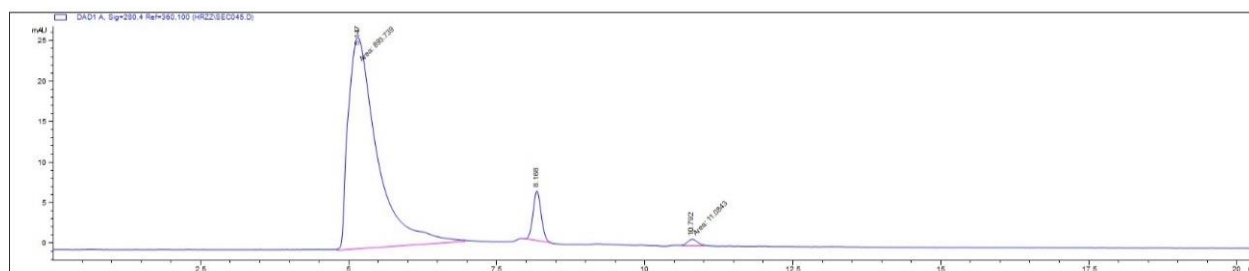
Oznaka uzorka	Deklarirani sadržaj	Eksperimentalno utvrđeni sadržaj	Odstupanje od deklariranog sadržaja
originator	40 mg / 0,4 mL	40,2 mg / 0,4 mL	0,5 %

4.4. STUDIJA PRISILNE RAZGRADNJE

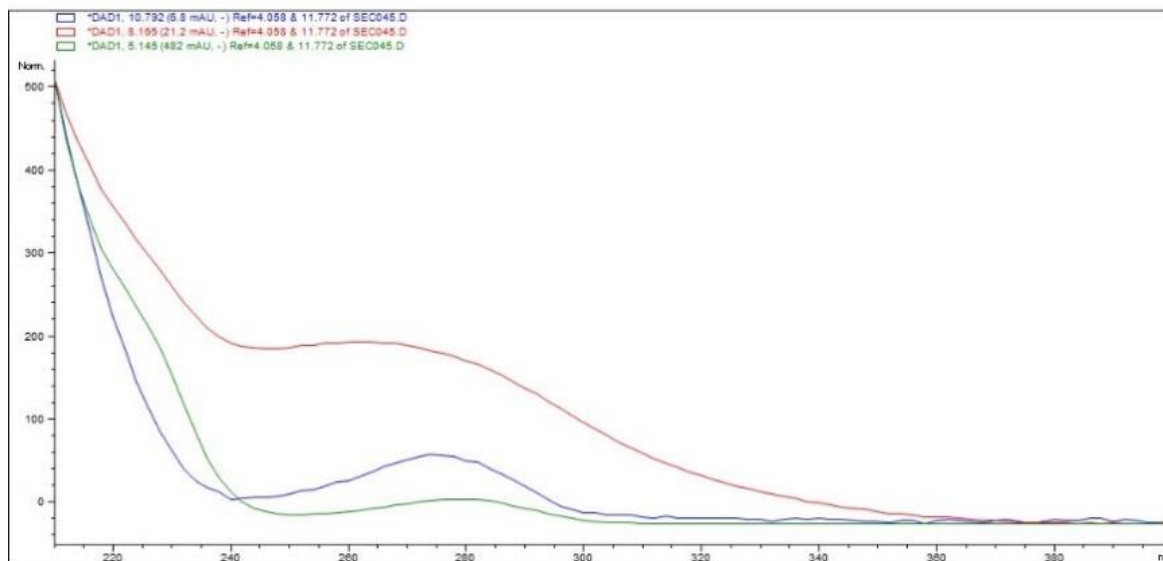
Studija prisilne razgradnje provedena je pri kiselim uvjetima (**Tablica 5., Slike 10.-12.**), bazičnim uvjetima (**Tablica 5., Slike 13.-15.**), povišenoj temperaturi (**Tablica 5., Slike 16.-18.**) te izloženosti dnevnom svjetlu (**Tablica 5., Slike 19.-20.**). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kiseli i bazični uvjeti najintenzivnije utječu na razgradnju lijeka. Naime, razgradnje su zaustavljene nakon svega 1 sat kada je došlo da razgradnje 9,88 % (kisela razgradnja), odnosno 17,02 % (bazična razgradnja) lijeka. U oba slučaja vidljiv je nastanak produkata razgradnje s vremenima zadržavanja većim u odnosu na lijek. Zanimljivo je da **Slika 11.** i **Slika 14.** pokazuju kako nastali produkti razgradnje imaju različite spektre u odnosu na lijek. Kako bi se utvrdilo da nema drugih produkata razgradnje koji ne apsorbiraju pri 280 nm pregledani su i 3D kromatogrami (**Slika 12.** i **Slika 15.**). Na temelju dobivenih rezultata moguće je utvrditi da nema drugih produkata razgradnje detektabilnih DAD detektorom. Izloženost povišenoj temperaturi i dnevnom svjetlu slabije je utjecala na razgradnju lijeka. Povišena temperatura tijekom 48 sati dovela je do razgradnje od 10,12 % lijeka pri čemu je vidljiv nastanak jednog produkta razgradnje s dvostruko dužim vremenom zadržavanja u odnosu na lijek. Dnevno svjetlo tijekom 48 sati intenzivnije je razgradilo lijek, čak do 14,94 %. Zanimljivo je da nisu vidljivi produkti razgradnje. Kako bi se utvrdilo da nema drugih produkata razgradnje koji ne apsorbiraju pri 280 nm također su pregledani i 3D kromatogrami (**Slika 18.** i **Slika 20.**). Na temelju dobivenih rezultata moguće je utvrditi da nema drugih produkata razgradnje detektabilnih DAD detektorom. Dakle predložena metoda je prikladna stabilitetno-indikativna metoda za praćenje nastanka produkata razgradnje.

Tablica 5. Rezultati prisilne razgradnje.

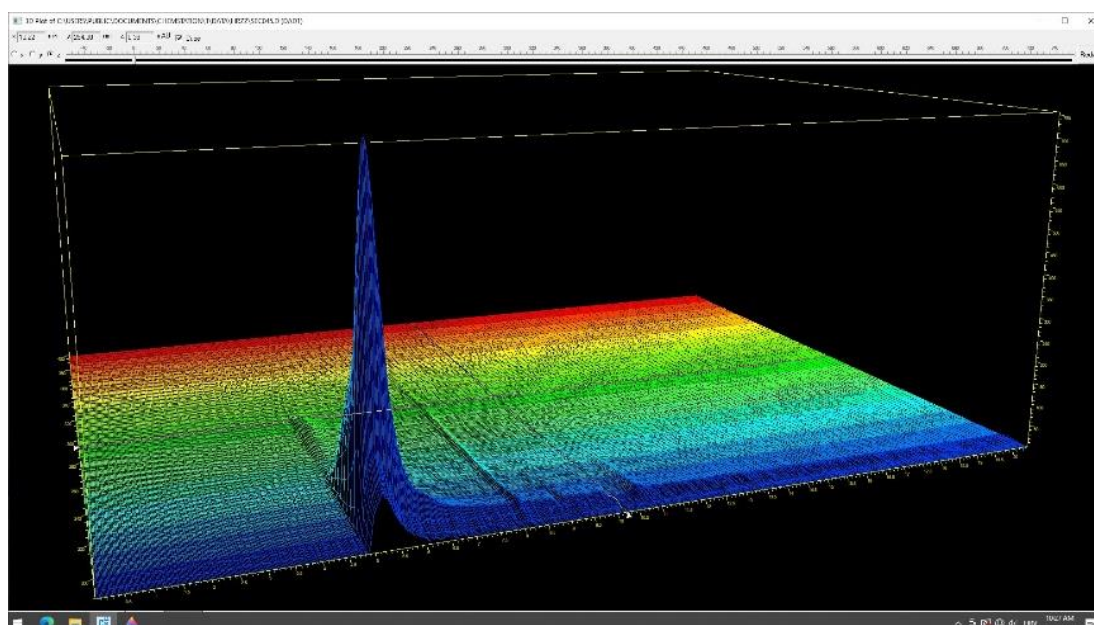
Vrsta razgradnje	Reagens / uvjet	Vrijeme razgradnje (sati)	Udio razgradnje (%)	Popis nastalih produkata razgradnje (vrijeme zadržavanja – min, površina pika – mAU/s)
Kisela razgradnja	0,1 M HCl	1 h	9,88	1. $t_R = 8,19$ min, $A = 59,3$ mAU/s 2. $t_R = 10,79$ min, $A = 11,1$ mAU/s
Bazična razgradnja	0,1 M NaOH	1 h	17,02	1. $t_R = 10,79$ min, $A = 900$ mAU/s 2. $t_R = 13,30$ min, $A = 17,7$ mAU/s
Razgradnja pri povišenoj temperaturi	60 °C	48 h	10,12	1. $t_R = 10,79$ min, $A = 16,8$ mAU/s
Razgradnja na svjetlu	dnevno svjetlo	48 h	14,94	Nema vidljivih produkata razgradnje.



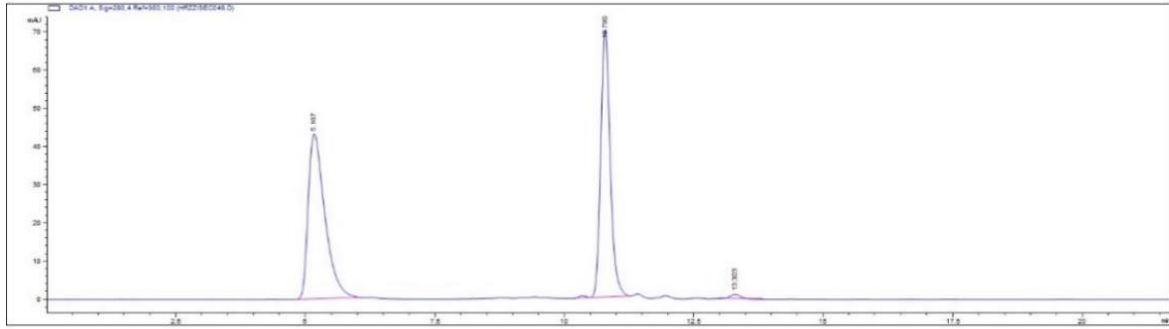
Slika 10. Kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 µg/mL) nakon provedbe kisele razgradnje primjenom 0,1 M HCl 1 sat.



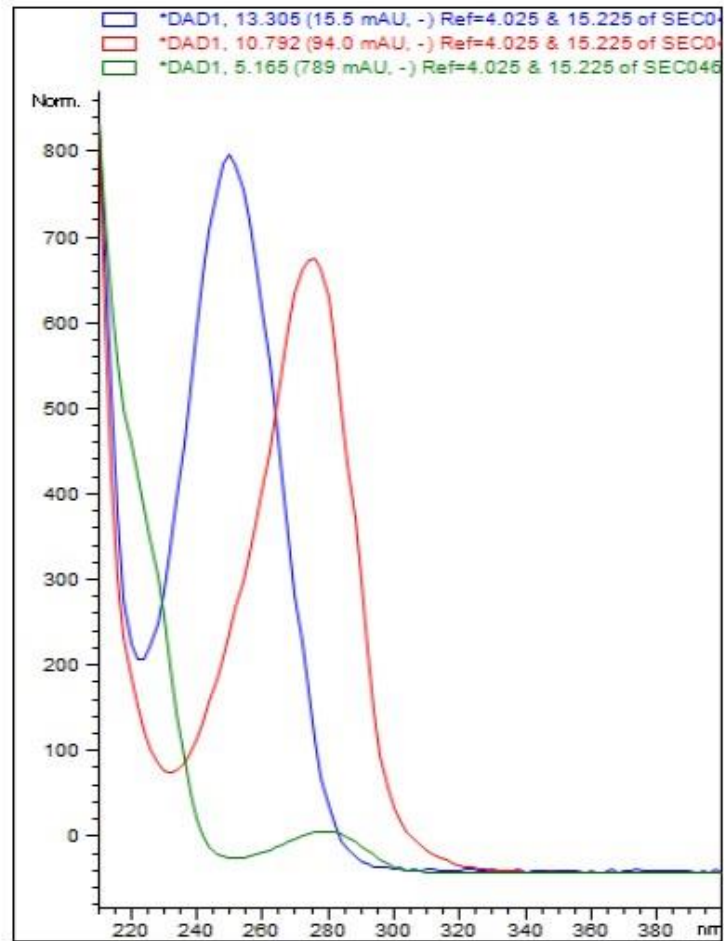
Slika 11. Spektar adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (zeleno) i produkata razgradnje (crveno i plavo) nastalih nakon provedbe kisele razgradnje primjenom 0,1 M HCl 1 sat.



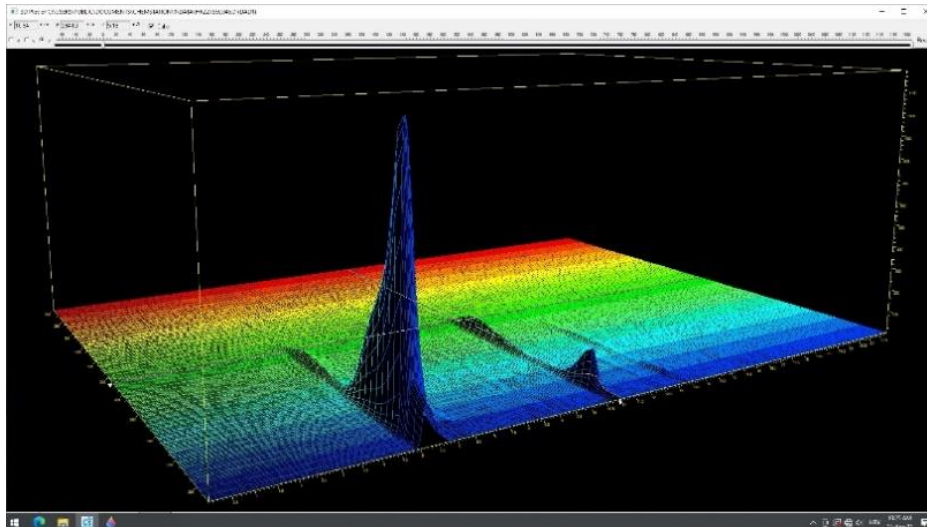
Slika 12. 3D kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nakon provedbe kisele razgradnje primjenom 0,1 M HCl 1 sat.



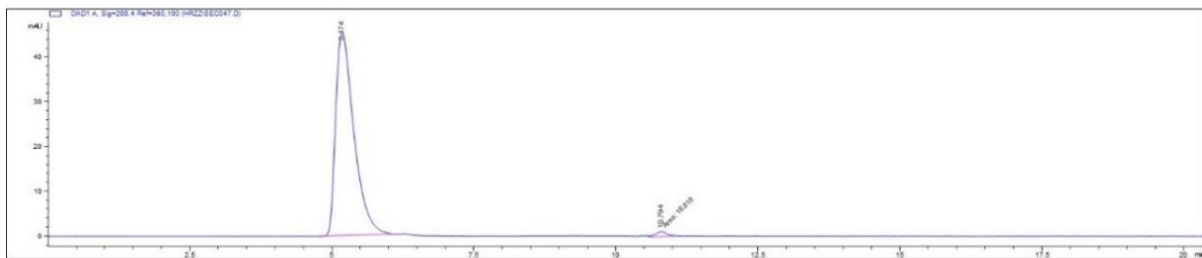
Slika 13. Kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g/mL}$) nakon provedbe bazične razgradnje primjenom 0,1 M NaOH 1 sat.



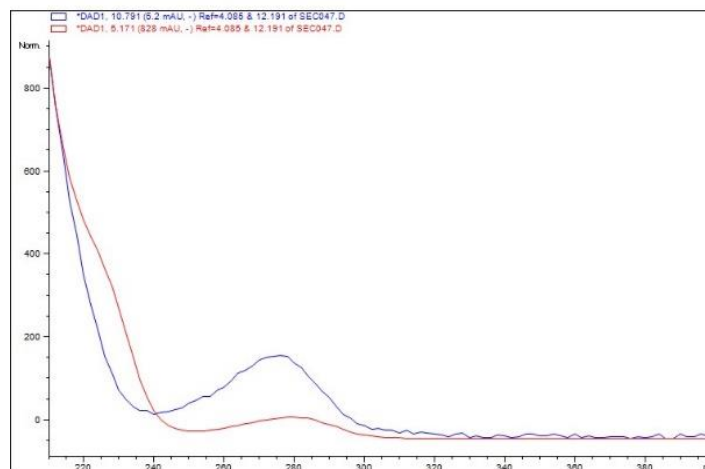
Slika 14. Spektar adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g/mL}$) (zeleno) i produkata razgradnje (crveno i plavo) nastalih nakon provedbe bazične razgradnje primjenom 0,1 M NaOH 1 sat.



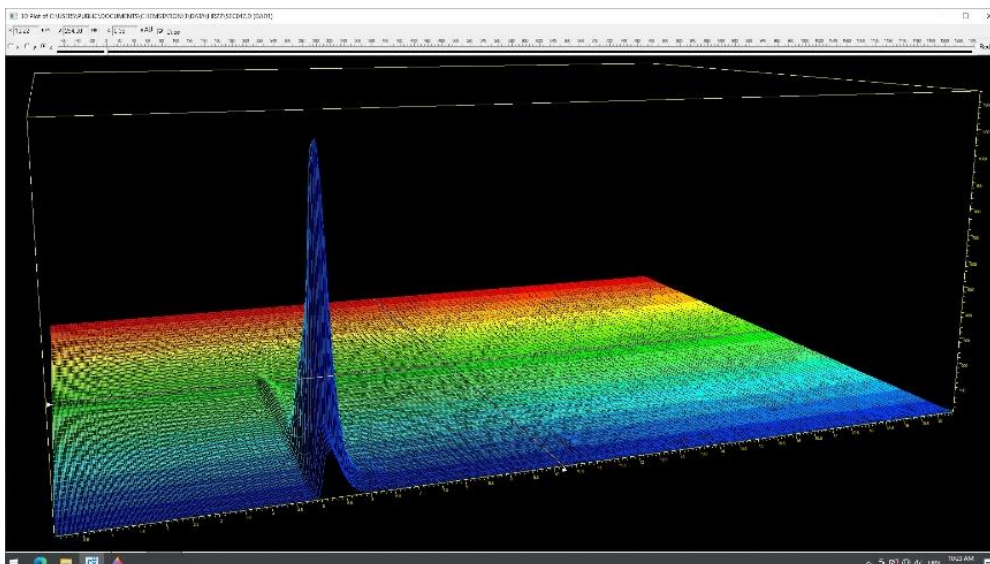
Slika 15. 3D kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g/mL}$) nakon provedbe bazične razgradnje primjenom 0,1 M NaOH 1 sat.



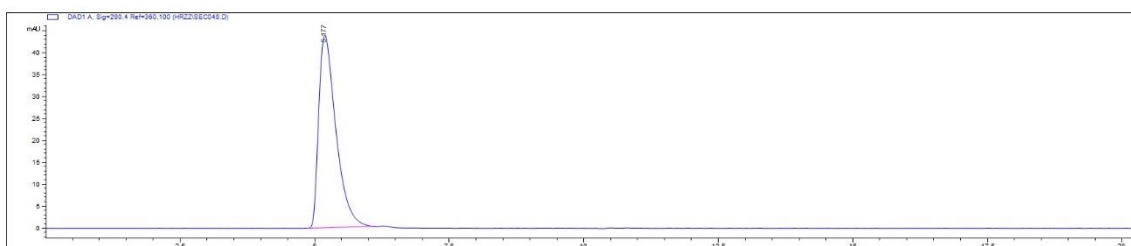
Slika 16. Kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g/mL}$) nakon provedbe razgradnje na povišenoj temperaturi 48 sati.



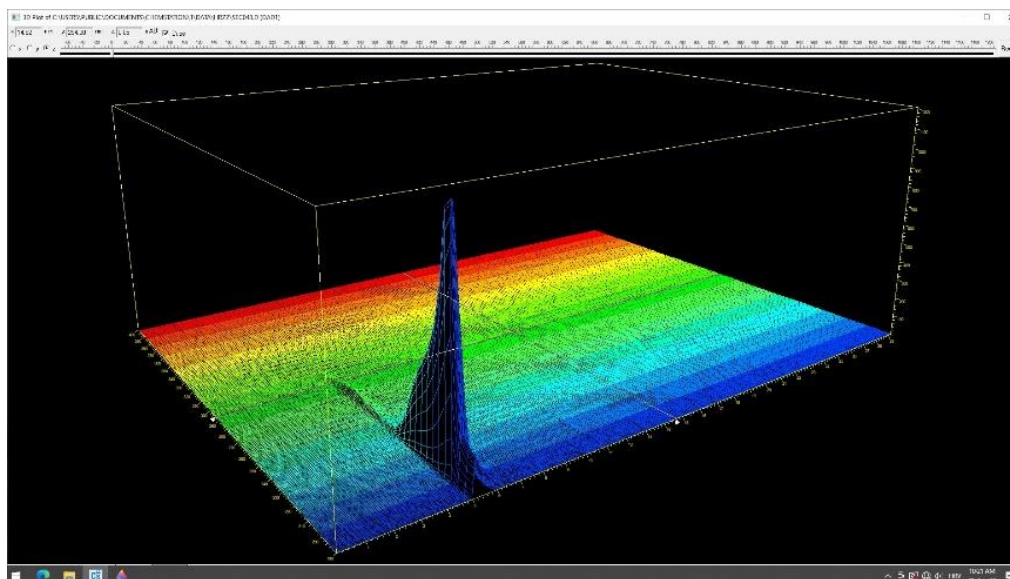
Slika 17. Spektar adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 $\mu\text{g/mL}$) (crveno) i produkta razgradnje (plavo) nastalih nakon provedbe razgradnje na povišenoj temperaturi 48 sati.



Slika 18. 3D kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 µg/mL) nakon provedbe razgradnje na povišenoj temperaturi tijekom 48 sati.



Slika 19. Kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 µg/mL) nakon provedbe razgradnje na dnevnom svjetlu tijekom 48 sati.



Slika 20. 3D kromatogram adalimumaba (koncentracija standardne otopine 500 µg/mL) nakon provedbe razgradnje na dnevnom svjetlu tijekom 48 sati.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu razvijena je SE-HPLC metoda za određivanje sadržaja biološkog lijeka adalimumaba te je provedena studija prisilne razgradnje za taj lijek. Razvijena metoda je pokazala linearnost u širokom rasponu koncentracija i visoki koeficijent korelacije, zadovoljavajuću osjetljivost, dobru preciznost i točnost te zadovoljavajući prinos. Zaključeno je da je metoda visoko pouzdana.

Adalimumab je podvrgnut različitim stresnim uvjetima, a postupci su uključivali kiselu razgradnju, bazičnu razgradnju, razgradnju pri povišenoj temperaturi i razgradnju na dnevnom svjetlu. Kiseli i bazični uvjeti doveli su do najvećeg stupnja razgradnje lijeka te su nastali produkti razgradnje imali duža vremena zadržavanja u odnosu na ishodnu tvar, dakle dobiveni su entiteti manje veličine čestica – fragmenti adalimumaba. Ispitivanje pri povišenoj temperaturi također je pokazalo značajnu razgradnju lijeka s jednim produktom razgradnje, također dužeg vremena zadržavanja. Izlaganjem adalimumaba dnevnom svjetlu došlo je do razgradnje, ali nisu uočeni razgradni produkti na 280 nm, a niti drugi razgradni produkti nisu bili vidljivi prilikom analize 3D kromatograma. Produkti razgradnje koji su uočeni nakon analize nisu identificirani u sklopu ovog istraživanja.

Metoda se pokazala prikladnom i za kvantitativnu analizu, tj. određivanje sadržaja analita na što ukazuje dobivena vrijednost koja se minimalno razlikuje od deklariranog sadržaja.

Razvijena SE-HPLC se može koristiti za analizu adalimumaba u prisutnosti njegovih razgradnih produkata te je stoga ova metoda prikladna stabilitetno-indikativna metoda za ispitivanje adalimumaba.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CD – Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*)

CD – cirkularni dikroizam (engl. *Circular Dichroism*)

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*)

ELISA – enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

IBD – upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*)

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

GIT – gastrointestinalni trakt

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Precision Liquid Chromatography*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LOD – granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*)

LOQ – granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*)

mAb – monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

MS – masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*)

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

SDS – natrij dodecil-sulfat (engl. *Sodium Dodecyl-Sulphate*)

SEC – kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*)

TLR – Toll-like receptor

TNF – faktor tumorske nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

UC – ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative Colitis*)

WB – Western-blot

7. LITERATURA

Amidžić Klarić D, Kovačić J, Jeličić ML, Zubčić S, Stankov V, Gulan Čičak M, Bučar B, Klarić I, Mornar A. Assessment of Physicochemical Parameters and Contaminants in Herbal Dietary Supplements Used in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(6), 893.

Analytical Methods for Biologics – An Overview, 2023, <https://raps.org>, pristupljeno 15.8.2023.

Basle Y, Chennel P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci*, 2020, 109(1), 169-190.

Berg DR, Colombel JF, Ungaro R. The Role of Early Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(12), 1896–1905.

Bioški i bioslični lijekovi - Informacije o lijekovima, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 6.8.2023.

Biosimilar Medicines: Overview, 2018, <https://www.ema.europa.eu/>, pristupljeno 14.8.2023.

Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs—A Review. *J Pharm Anal*, 2014, 4(3), 159–65.

Demelenne A, Ben Yahia A, Lempereur D, Crommen J, Servais AC, Fradi I, Fillet M. Comparison of Three Complementary Analytical Techniques for the Evaluation of the Biosimilar Comparability of a Monoclonal Antibody and an Fc-Fusion Protein. *Front Chem*, 2021, 9, 782099.

Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*, 2019, 50(4), 992–1006.

Gerriets V, Goyal A, Khaddour K. Tumor Necrosis Factor Inhibitors. In *StatPearls*, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2023.

González-González O, Ramirez IO, Ramirez BI, O'Connell P, Ballesteros MP, Torrado JJ, Serrano DR. Drug Stability: ICH versus Accelerated Predictive Stability Studies. *Pharmaceutics*, 2022, 14(11), 2324.

Guidelines for the production and quality control of monoclonal antibodies and related products intended for medicinal use, <https://www.who.int>, pristupljeno 16.8.2023.

Humira 20 mg otopina za injekciju u napunjenoj štrcaljki. Sažetak opisa svojstava lijeka, <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 16.8.2023.

Humira, <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 17.8.2023.

ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products, 2003, <https://www.ich.org>, pristupljeno 15.8.2023.

ICH Topic Q 2 (R1) Validation. of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995, <https://www.ich.org>, pristupljeno 15.8.2023.

ICH Topic Q 5 C Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products, 1996, <https://www.ich.org>, pristupljeno 15.8.2023.

ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 1999, <https://www.ich.org>, pristupljeno 15.8.2023.

Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5), 2719.

Laptoš T, Omersel J. The Importance of Handling High-Value Biologicals: Physico-Chemical Instability and Immunogenicity of Monoclonal Antibodies. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4), 3161–3168.

Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (NY)*, 2011, 7(4), 235–241.

Marušić M, Mihaljević S. Farmakologija bioloških lijekova. *Acta Med Croat*, 2013, 67(2), 125–130.

Milaković D, Crnčević Urek M. Biološka terapija u liječenju kroničnih upalnih bolesti crijeva. *Medicina Fluminensis*, 2020, 56(2), 137–146.

Monoclonal Antibodies, <https://www.who.int>, pristupljeno 16.8.2023.

Murisier A, Andrie M, Fekete S, Lauber M, D'Atri V, Iwan K, Guillarme D. Direct Coupling of Size Exclusion Chromatography and Mass Spectrometry for the muCharacterization of Complex Monoclonal Antibody Products. *J Sep Sci*, 2022, 45(12), 1997–2007.

Okobi OE, Udoete IO, Fasehun OO, Okobi T, Evbayekha EO, Ekabua JJ, Elukeme H, Ebong IL, Ajayi OO, Olateju IV, Taiwo A, Anaya IC, Omole JA, Nkongho MB, Ojinnaka U, Ajibowo AO, Ogbeifun OE, Ugbo OO, Okorare O, Akinsola Z, Olusoji RA, Amanze IO, Nwafor JN, Ukoha JN, Elimihele TA. A Review of Four Practice Guidelines of Inflammatory Bowel Disease. *Cureus*, 2021, 13(8), e16859.

Objavljene liste lijekova, 2023, <https://hzzo.hr>, pristupljeno 7.8.2023.

São Pedro MN, Isaksson M, Gomis-Fons J, Eppink MHM, Nilsson B, Ottens M. Real-Time Detection of MAb Aggregates in an Integrated Downstream Process. *Biotechnol Bioeng*, 2023, 1-12

Schreiber S, Yamamoto K, Muniz R, Iwura T. Physicochemical Analysis and Biological Characterization of FKB327 as a Biosimilar to Adalimumab. *Pharmacol Res Perspect*, 2020, 8(3), e00604.

Schreiner P, Neurath MF, Ng SC, El-Omar EM, Sharara AI, Kobayashi T, Hisamatsu T, Hibi T, Rogler G. Mechanism-Based Treatment Strategies for IBD: Cytokines, Cell Adhesion Molecules, JAK Inhibitors, Gut Flora, and More. *Inflamm Intest Dis*, 2019, 4(3), 79–96.

Shabestari Badamchi A, Mojtaba Mostafavi S, Malekzadeh H. Force Degradation Comparative Study on Biosimilar Adalimumab and Humira. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 2018, 13(6), 496–508.

Sonawane S, Jadhav S, Rahade P, Chhajed S, Kshirsagar S. Development and Validation of Stability-Indicating Method for Estimation of Chlorthalidone in Bulk and Tablets with the Use of Experimental Design in Forced Degradation Experiments. *Scientifica*, 2016, 4286482.

Tokhadze N, Chennell P, Basle Y, Sautou V. Stability of Infliximab Solutions in Different Temperature and Dilution Conditions. *J Pharm and Biomed Anal*, 2018, 150, 386–95.

Tsui JJ, Huynh HQ. Is Top-down Therapy a More Effective Alternative to Conventional Step-up Therapy for Crohn's Disease? *Ann Gastroenterol*, 2018, 31(4), 413–24.

Venkateswaran N, Weismiller S, Clarke K. Indeterminate Colitis - Update on Treatment Options. *J Inflamm Res*, 2021, 14, 6383–6395.

Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus*, 2006, 15(1), 53–62.

Zhang YZ, Li YY. Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1), 91–99.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) je kronična upalna bolest gastrointestinalnog trakta, a dijeli se na Crohnovu bolest, ulcerozni kolitis i nedeterminirani kolitis. IBD je najviše zastupljena u visoko razvijenom dijelu svijeta, a incidencija joj raste. Patofiziologija IBD-a je složena te uključuje različite citokine od kojih je za terapijsku primjenu najviše iskorištena signalizacija faktora tumorske nekroze α (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF). Razvijeni su biološki lijekovi koji su po svojoj strukturi monoklonska protutijela, a djeluju kao anti-TNF- α inhibitori. Ti lijekovi se koriste za liječenje različitih bolesti uključujući i IBD. Biološki lijekovi su velike, složene molekule osjetljive na različite uvjete. Važno je osigurati im kvalitetu, sigurnost i učinkovitost, a za to je potrebno koristiti složene analitičke tehnike.

Za određivanje sadržaja anti-TNF- α inhibitora adalimumaba i njegovih razgradnih produkata korištena je kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) koja se temelji na razdvajanju molekula s obzirom na veličinu čestica. Uzorci korišteni za razvoj metode dobiveni su prisilnom razgradnjom uz korištenje stresnih uvjeta koji su uključivali kisele, bazične uvjete, povišenu temperaturu i dnevno svjetlo. Razgradnja lijeka dogodila se pri svim uvjetima, najintenzivnije pri kiselim i bazičnim uvjetima, a produkti razgradnje na 280 nm utvrđeni su nakon provedene kisele, bazične i razgradnje pri povišenoj temperaturi. Svi produkti razgradnje pokazali su duža vremena zadržavanja u odnosu na adalimumab. Ovom metodom uspješno su odvojeni ishodni analit i njegova onečišćenja te je eksperimentalno utvrđeni sadržaj bio gotovo identičan onom deklariranom. Stoga je SE-HPLC prikladna metoda za određivanje sadržaja bioloških lijekova u prisutnosti njihovih produkata razgradnje.

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disease of gastrointestinal tract, and it is divided into Crohn's disease, ulcerative colitis, and indeterminate colitis. IBD is mostly prevalent in the highly developed part of the world, and its incidence is rising. The pathophysiology of IBD is complex, and it includes various cytokines, of which tumor necrosis factor α (TNF- α) signalling is the most used for therapeutic application. Biological drugs have been developed that are monoclonal antibodies by their structures, and act as TNF- α inhibitors. These drugs are used for treatment of various diseases, including IBD. Biological drugs are big, complex molecules that are sensitive to different conditions. It is important to ensure their quality, safety, and efficiency, and for this it is necessary to use complex analytical techniques.

For determining the content of the anti-TNF- α inhibitor adalimumab and its degradation products, size exclusion chromatography (SEC) was used, which is based on the separation of molecules regarding particle size. The samples used for the development of the method were obtained by forced degradation using stress-conditions that included acidic, basic conditions, elevated temperature, and daylight. Degradation of the drug occurred under all conditions, the most intensely under acidic and basic conditions, and degradation products at 280 nm were determined after acid, basic degradation, and degradation under elevated temperature. All degradation products had longer retention times compared to adalimumab. Using this method, the initial analyte and its impurities were successfully separated, and the experimentally determined content was almost identical to the declared one. Therefore, SE-HPLC is a suitable method for determining the content of biological drugs in the presence of their degradation products.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Studija prisilne razgradnje adalimumaba primjenom SE-HPLC tehnike

Ivana Babić

SAŽETAK

Upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) je kronična upalna bolest gastrointestinalnog trakta, a dijeli se na Crohnovu bolest, ulcerozni kolitis i nedeterminirani kolitis. IBD je najviše zastupljena u visoko razvijenom dijelu svijeta, a incidencija joj raste. Patofiziologija IBD-a je složena te uključuje različite citokine od kojih je za terapijsku primjenu najviše iskorištena signalizacija faktora tumorske nekroze α (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF). Razvijeni su biološki lijekovi koji su po svojoj strukturi monoklonska protutijela, a djeluju kao anti-TNF- α inhibitori. Ti lijekovi se koriste za liječenje različitih bolesti uključujući i IBD. Biološki lijekovi su velike, složene molekule osjetljive na različite uvjete. Važno je osigurati im kvalitetu, sigurnost i učinkovitost, a za to je potrebno koristiti složene analitičke tehnike.

Za određivanje sadržaja anti-TNF- α inhibitora adalimumaba i njegovih razgradnih produkata korištena je kromatografija isključenjem po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) koja se temelji na razdvajanju molekula s obzirom na veličinu čestica. Uzorci korišteni za razvoj metode dobiveni su prisilnom razgradnjom uz korištenje stresnih uvjeta koji su uključivali kisele, bazične uvjete, povišenu temperaturu i dnevno svjetlo. Razgradnja lijeka dogodila se pri svim uvjetima, najintenzivnije pri kiselim i bazičnim uvjetima, a produkti razgradnje na 280 nm utvrđeni su nakon provedene kisele, bazične i razgradnje pri povišenoj temperaturi. Svi produkti razgradnje pokazali su duža vremena zadržavanja u odnosu na adalimumab. Ovom metodom uspješno su odvojeni ishodni analit i njegova onečišćenja te je eksperimentalno utvrđeni sadržaj bio gotovo identičan onom deklariranom. Stoga je SE-HPLC prikladna metoda za određivanje sadržaja bioloških lijekova u prisutnosti njihovih produkata razgradnje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 20 grafičkih prikaza, 5 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Upalna bolest crijeva, adalimumab, TNF, SE-HPLC, prisilna razgradnja

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Domagoj Kifer, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz, 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of analytics and drug control
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Forced degradation study of adalimumab using SE-HPLC technique

Ivana Babić

SUMMARY

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disease of gastrointestinal tract, and it is divided into Crohn's disease, ulcerative colitis, and indeterminate colitis. IBD is mostly prevalent in the highly developed part of the world, and its incidence is rising. The pathophysiology of IBD is complex, and it includes various cytokines, of which tumor necrosis factor α (TNF- α) signalling is the most used for therapeutic application. Biological drugs have been developed that are monoclonal antibodies by their structures, and act as TNF- α inhibitors. These drugs are used for treatment of various diseases, including IBD. Biological drugs are big, complex molecules that are sensitive to different conditions. It is important to ensure their quality, safety, and efficiency, and for this it is necessary to use complex analytical techniques.

For determining the content of the anti-TNF- α inhibitor adalimumab and its degradation products, size exclusion chromatography (SEC) was used, which is based on the separation of molecules regarding particle size. The samples used for the development of the method were obtained by forced degradation using stress-conditions that included acidic, basic conditions, elevated temperature, and daylight. Degradation of the drug occurred under all conditions, the most intensely under acidic and basic conditions, and degradation products at 280 nm were determined after acid, basic degradation, and degradation under elevated temperature. All degradation products had longer retention times compared to adalimumab. Using this method, the initial analyte and its impurities were successfully separated, and the experimentally determined content was almost identical to the declared one. Therefore, SE-HPLC is a suitable method for determining the content of biological drugs in the presence of their degradation products.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 20 figures, 5 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Inflammatory bowel disease, adalimumab, TNF, SE-HPLC, forced degradation

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domagoj Kifer, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2023.