

Generički peptidni lijekovi: metode karakterizacije i procjena istovjetnosti

Bernatović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:834646>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



Katarina Bernatović

**GENERIČKI PEPTIDNI LIJEKOVI: METODE
KARAKTERIZACIJE I PROCJENA
ISTOVJETNOSTI**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Industrijska farmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Pliva Hrvatska d.o.o. pod stručnim vodstvom dr.sc. Biserke Cetine-Čižmek.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr.sc. Biserki Cetini-Čižmek na stručnom vodstvu, uloženom vremenu i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se tvrtki Pliva Hrvatska d.o.o. na ustupljenome prostoru i prilici za rad na modernim instrumentima, te Jeleni, Andreji i Nikoli na pomoći i uputama pri rukovanju njima. Naposljetku se želim zahvaliti i svojim roditeljima i sestri te prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom svih godina studija.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Peptidi i proteini | 2 |
| 1.2. Peptidni lijekovi..... | 4 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME..... | 8 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 9 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 11 |
| 4.1. Regulatorni okvir | 11 |
| 4.1.1. Stavovi regulatornih agencija | 11 |
| 4.2. Metode proizvodnje peptida | 13 |
| 4.2.1. Rekombinantna tehnologija..... | 14 |
| 4.2.2. Kemijska sinteza..... | 15 |
| 4.2.3. Enzimska sinteza | 18 |
| 4.2.4. Izolacija iz prirodnih materijala..... | 19 |
| 4.3. Dokazivanje istovjetnosti peptida dobivenih različitim proizvodnim procesima | 21 |
| 4.3.1. Identifikacija..... | 22 |
| 4.3.2. Fizikalno-kemijska svojstva | 24 |
| 4.3.3. Karakterizacija strukture peptida | 29 |
| 4.3.3.1. Primarna struktura..... | 29 |
| 4.3.3.2. Sekundarna struktura | 32 |
| 4.3.3.3. Tercijarna struktura..... | 36 |
| 4.3.4. Imunogenost | 38 |
| 4.3.5. Čistoća i profil onečišćenja | 41 |
| 4.3.5.1. Pregled mogućih onečišćenja peptidnih lijekova | 43 |
| 4.3.5.2. Usporedba onečišćenja peptidnih lijekova dobivenih različitim proizvodnim procesima | 49 |
| 4.3.5.3. Karakterizacija onečišćenja peptida dobivenih rekombinantnom metodom..... | 52 |
| 4.3.5.4. Karakterizacija onečišćenja peptida dobivenih kemijskom sintezom | 53 |
| 4.3.6. Biološka aktivnost i potentnost | 55 |
| 4.4. Primjer karakterizacije peptida ikatibanta..... | 58 |
| 4.4.1. Termička svojstva | 58 |
| 4.4.1.1. Termogravimetrijska analiza | 59 |
| 4.4.1.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija | 59 |
| 4.4.2. Infracrvena spektroskopija..... | 60 |
| 4.4.2.1. FTIR | 60 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 4.4.2.2. Bio-FTIR | 61 |
| 4.4.3. Cirkularni dikroizam | 62 |
| 4.4.4. Fluorescencija | 64 |
| 4.4.5. Dinamička sorpcija vode | 65 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 68 |
| 6. LITERATURA..... | 69 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 73 |

1. UVOD

U posljednjih nekoliko desetljeća peptidi kao novi lijekovi su zauzeli značajno mjesto u farmaceutskoj industriji, budući da popunjavaju prostor između klasičnih malih molekula kao lijekova i velikih bioloških molekula. Od prvog odobrenog peptidnog lijeka (ljudski rekombinantni inzulin, 1982.) do danas, područje peptida je središte mnogih znanstvenih istraživanja. Pojačan interes za peptidne lijekove se odražava i na vrijednosti svjetskog tržišta, koje trenutno iznosi od 15 do 20 milijardi dolara uz pretpostavku daljnjeg rasta. Trenutno je u Sjedinjenim Američkim Državama, Europi i Japanu odobreno otprilike 100 peptidnih lijekova. U kliničkim istraživanjima je trenutno otprilike 140 peptida, a u pretkliničkim nekoliko stotina.

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) definira peptide kao polimere građene od 40 ili manje α -aminokiselina, dok su proteini polimeri sastavljeni od većeg broja aminokiselina te se ubrajaju u skupinu bioloških lijekova. Peptidi mogu biti prirodno prisutni u organizmu (npr. bradikinin), ali mogu se proizvesti i u laboratoriju kemijskom sintezom ili rekombinantnom DNA tehnologijom, koristeći druge žive organizme poput bakterija.

Peptidi se kao lijekovi koriste u brojnim indikacijama, od kojih su najznačajnije one za liječenje kardiovaskularnih, metaboličkih, respiratornih i infektivnih bolesti te za liječenje karcinoma. Peptidni lijekovi su učinkoviti, visoko specifični i imaju manje nuspojava od klasičnih lijekova. Međutim, ograničenja peptida, poput izrazito niske bioraspoloživosti prilikom peroralne primjene zbog razgradnje u probavnom traktu te s druge strane invazivnost parenteralne primjene čine razvoj formulacije peptidnog lijeka izazovnim za farmaceutsku industriju.

Lijekovi dostupni na tržištu mogu biti originalni (izvorni, inovativni) ili generički (istovjetni, zamjenski). Originalni lijek je lijek koji je na temelju potpune dokumentacije o sigurnosti, učinkovitosti i kakvoći prvi odobren za stavljanje na tržište u svijetu. On je najčešće zaštićen patentnim pravima. Patentno pravo traje 20 godina, a po njegovom isteku i drugi proizvođači smiju proizvoditi taj lijek kao generički. Generički lijek ima istu djelatnu farmaceutsku tvar, jednak kvalitativni i kvantitativni sastav te farmaceutski oblik kao i originalni lijek (uz neka dopuštena odstupanja). Također, generički lijek je bioekvivalentan originalnom, što treba biti dokazano studijama ispitivanja bioraspoloživosti. Oba tipa lijeka trebaju imati jednake standarde kvalitete koji se postižu primjenom dobre proizvođačke te dobre kliničke prakse. U slučaju proteina i bioloških lijekova općenito, izraz „generički“ nije primjenjiv te se tada govori o biosličnim lijekovima. Područje biosličnih lijekova je, za razliku od generičkih peptidnih

lijekova, zakonski dobro regulirano tako da je potrebno u bližoj budućnosti postaviti zakonski okvir i u području generičkih peptida.

Američka agencija za hranu i lijekove se suočila sa povećanim zahtjevima za odobrenje za stavljanje peptidnog lijeka u promet, te stoga postoji potreba za razvojem generičkih peptidnih lijekova kako bi takvi lijekovi postali dostupniji javnosti. Kao što je prethodno napomenuto, terapijski peptidi mogu biti sintetskog i rekombinantnog podrijetla. Tehnologija rekombinantne DNA dugo je bila metoda izbora u proizvodnji peptidnih lijekova, no to se u posljednje vrijeme mijenja zbog jednostavnosti i ekonomičnosti kemijske sinteze peptida. Originalni peptidni lijekovi trenutno dostupni na tržištu uglavnom su rekombinantnog podrijetla, no budući da se fokus farmaceutske industrije za vrijeme trajanja patentnih prava originalnih lijekova polako preusmjerio prema kemijskoj sintezi peptida, moguće je postojanje potencijalnih razlika u podrijetlu originalnog i mogućeg generičkog peptidnog lijeka.

1.1. Peptidi i proteini

Peptidi i proteini su polimeri sastavljeni od niza aminokiselinskih ostataka, povezanih amidnom (peptidnom) vezom koja nastaje reakcijom amino skupine jedne i karboksilne skupine druge aminokiseline. Linearni peptidi i proteini imaju svoje N- i C- krajeve, koji označavaju prisutnost slobodne (nevezane) amino skupine na jednom i karboksilne skupine na drugom kraju polimera. Dipeptidi su građeni od dviju, tripeptidi od triju aminokiselina, a polipeptidima se nazivaju polimeri sastavljeni od većeg broja aminokiselina (do 50 aminokiselina). Proteinske molekule su veće od peptida i često su građene od mnogo većeg broja aminokiselina, čak i od nekoliko stotina njih. Visoka varijabilnost proteinskih molekula uvjetovana je brojem aminokiselinskih ostataka u polimeru i njihovim sastavom. Svaka aminokiselina (osim glicina) se može pojaviti u dva stereoisomerna oblika (L- i D-), ovisno o položaju skupina oko središnjeg α -ugljikovog atoma. Peptide i proteine prisutne u ljudskom organizmu gradi dvadeset prirodno prisutnih L-aminokiselina, dok su kod proizvodnje peptida moguće i razne modifikacije aminokiselina, što dodatno povećava njihovu varijabilnost. Neki peptidi mogu sadržavati i D-aminokiseline, pa je tako i u živim organizmima dosad pronađeno više od 30 takvih peptida. D-aminokiselinski ostateci nastali posttranslacijskom izomerizacijom ključni su za biološku aktivnost peptida koji ih sadrže.

Biološka aktivnost peptida i proteina ovisi o njihovoj konformaciji. Konformacija označava prostorni raspored atoma u proteinu, a određena je njegovom strukturom. Postoje 4 razine strukturne uređenosti peptida, odnosno proteina.

Primarna struktura označava aminokiselinski slijed proteina te je određena genskim kodom zapisanim u molekuli DNA koja kodira za taj protein. Primarna struktura sadrži sve informacije potrebne za nastanak sekundarne strukture, koja je odgovorna za funkciju peptida.

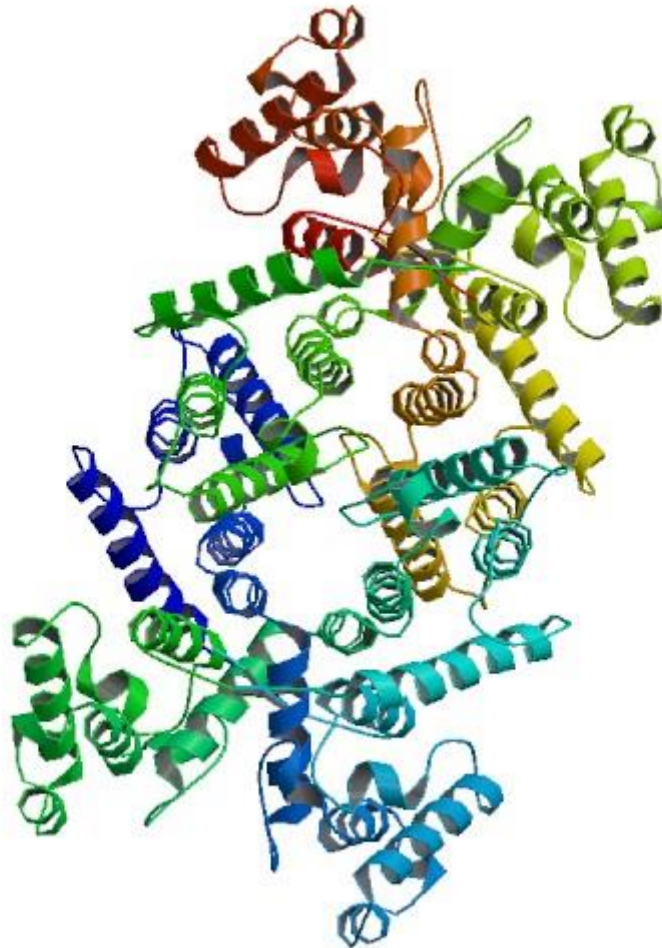
Sekundarna struktura se odnosi na prostorni raspored nekog dijela polipeptidnog lanca. Glavni oblici sekundarne strukture polipeptida su α -uzvojnica i β -nabrana ploča, sastavljena od β -lanaca. β -lanci mogu formirati i petlje koje se zovu β -zavoji. Takvi oblici nastaju zbog stvaranja vodikovih veza između skupina atoma prisutnih u amidnim vezama proteina. Ovakve sekundarne strukture imaju karakteristične dihedralne kutove (θ , ϕ) koji definiraju prostornu orijentaciju peptidne okosnice i prisutnost specifičnih vodikovih veza. U α -uzvojnici vodikovom vezom su povezane CO skupina jedne aminokiseline i NH skupina aminokiseline koja je od prve udaljena za 3 aminokiselinska ostatka. Ovakva povezanost aminokiselina rezultira čvrstim pakiranjem polipeptidnog lanca koji zavija u smjeru kazaljke na satu. β -lanac je izduženi polipeptidni lanac koji udruživanjem s drugim β -lancima preko stvaranja vodikovih veza stvara β -nabrane ploče. U njima smjer β -lanaca može biti paralelan i anti-paralelan, a moguća je i njihova kombinacija.

Složeniji peptidi i proteini također pokazuju tercijarnu i kvaternu strukturu. Na Slici 1. prikazana je prostorna struktura citoplazmatskog proteina distrofina. Prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su međusobno udaljeni u polipeptidnom slijedu opisuje se tercijarnom strukturom. To je trodimenzionalna struktura proteina koja nastaje smatanjem elemenata sekundarne strukture proteina u prostoru. Tercijarna struktura proteina nastaje spontano, te ju određuju hidrofobne interakcije, vodikove veze, ionske interakcije i disulfidne veze između udaljenih aminokiselinskih ostataka. Obzirom na svoju tercijarnu strukturu, proteini se obično mogu podijeliti na globularne i vlaknaste.

Proteini građeni od više peptidnih podjedinica posjeduju kvaternu strukturu kojom se opisuje njihov prostorni raspored. Kvaterna struktura proteina (oligo- ili multimera) nastaje povezivanjem više proteinskih podjedinica (protomera). Peptidne podjedinice najčešće su povezane nekovalentnim vezama, no mogu biti povezane i kovalentnim vezama, poput disulfidnih. Peptidne podjedinice koje grade protein međusobno mogu biti jednake ili različite.

Funkcionalni peptidi i proteini smataju se u svoju prirodnu (nativnu) konformaciju, no prilikom obavljanja određenih bioloških funkcija moguće su konformacijske promjene. Primjerice, enzim mijenja svoju konformaciju prilikom susreta supstrata reakcije koju katalizira. Također,

proteini mogu mijenjati svoju konformaciju u blizini ciljnog mjesta svog djelovanja kako bi interakcija bila jača a djelovanje potpunije.



Slika 1. Prikaz strukture proteina distrofina u prostoru (www.flipper.diff.org)

1.2. Peptidni lijekovi

Do sada je identificirano preko sedam tisuća prirodno prisutnih peptida koji aktivno sudjeluju u različitim fiziološkim procesima kao hormoni, neurotransmiteri, čimbenici rasta, antimikrobne tvari, imunomodulatori i dr. Peptidni kandidati za lijekove razvijaju se s ciljem utjecaja na interakcije peptida u organizmu te na unutarstanične molekule koje peptidni lijekovi mogu aktivirati ili inhibirati. Peptidi su izvrsne početne točke za dizajniranje novih lijekova zbog svojih intrinzičnih svojstava i farmakološkog profila. Selektivnost i specifičnost peptida

prema receptorima na staničnoj površini rezultira njihovom visokom potentnošću te sigurnošću primjene, učinkovitosti i podnošljivosti u primjeni kod ljudi.

Mnogo toga se promijenilo u području peptida u farmaceutskoj industriji od prve izolacije inzulina iz životinjskih tkiva i njegove komercijalizacije 1928. godine. Napretkom DNA rekombinantne tehnologije i metoda pročišćavanja peptida, humani rekombinantni inzulin zamijenio je inzulin dobiven izolacijom iz životinjskih tkiva koji je na tržištu bio gotovo 90 godina. U današnje vrijeme sve je popularnija proizvodnja peptida kemijskom sintezom koja polako zamjenjuje rekombinantnu tehnologiju. U posljednjih nekoliko godina, svjetsko tržište peptidnih lijekova povećalo se i u broju odobrenih peptidnih lijekova kao i u ekonomskom smislu. Glavni razlozi takvog razvoja su mogućnost široke primjene peptida u liječenju metaboličkih i autoimunih bolesti. Rast popularnosti peptida u farmaceutskoj industriji pokazuje i analiza svjetske industrije koja predviđa godišnju stopu rasta od 9.1% u razdoblju od 2016. do 2024. godine za ovu skupinu lijekova. Takva predviđanja u skladu su s onima o očekivanom povećanju incidencije metaboličkih, kardiovaskularnih i onkoloških bolesti u čijem liječenju bi se koristili peptidni lijekovi (Chi-Lung Lee i sur., 2019). Rast primjene peptida u liječenju metaboličkih bolesti uzrokovan je epidemijskim širenjem pretilosti i šećerne bolesti tipa II u svijetu, a u liječenju onkoloških bolesti peptidi se koriste zbog povećanog mortaliteta i potrebe za zamjenom kemoterapije, kao i suportivnom njegom. Sjeverna Amerika primjerice predstavlja najveći udio tržišta peptidnih lijekova zbog raširenosti pretilosti i šećerne bolesti u populaciji (Rastogi i sur., 2019; Fosgerau i Hoffmann, 2014).

Peptidi su ranije smatrani lošim kandidatima za lijekove zbog niske bioraspoloživosti nakon oralne primjene te sklonosti brzom metaboliziranju u organizmu, što je uzrokovalo stagnaciju u razvoju peptidnih lijekova. U novije vrijeme, uslijed razvoja tehnologije i drugih putova primjene, sve je više prihvaćena činjenica da lijek ne mora nužno biti oralno dostupan. U farmaceutskoj industriji zato je pokrenut novi val interesa za peptidne lijekove. Nove strategije sinteze i alternativni načini primjene ovih lijekova razvijenih od strane stručnjaka u industriji povećali su produktivnost i smanjili brzinu metaboliziranja peptida, čime je povećana bioraspoloživost te je posljedično time omogućen dolazak velikog broja peptidnih lijekova na tržište. Ovakva strategija dizajniranja lijekova učinila je peptidne lijekove vodećim trendom u farmaceutskoj industriji s dvadesetak kliničkih studija godišnje temeljenih na peptidima (Chi-Lung Lee i sur., 2019; Vlieghe i sur., 2010).

Oralna primjena peptidnih lijekova uvelike je otežana zbog fizičkih, bioloških te kemijskih barijera gastrointestinalnog trakta koje inače služe za zaštitu organizma od brojnih patogenih

mikroorganizama. Kemijsku barijeru u slučaju peptidnih lijekova predstavljaju niska pH vrijednost u želucu te prisutnost proteaza koje razgrađuju peptide i proteine. Na apsorpciju peptidnih lijekova negativno utječe njihova veća molekularna masa, niska lipofilnost te prisutnost nabijenih funkcionalnih skupina. To dovodi do niske biorasploživosti većine oralno primijenjenih peptida ($AUC < 2\%$) i kratkog poluvremena života ($t_{1/2} < 30$ min). Trenutno se većina peptidnih lijekova primjenjuje parenteralnim putem. Intravenskom, intramuskularnom ili supkutanom primjenom eliminira se utjecaj apsorpcije koji je prisutan kod oralne primjene, no u tom slučaju pojavljuju se problemi poput prisutnosti sistemskih proteaza, brzog metabolizma, opsonizacije, konformacijskih promjena, disocijacije podjedinica proteina i dr. Također, intravenski i supkutani način primjene lijeka invazivni su te smanjuju adherenciju pacijenta, pa se razvijaju sustavi oralne primjene lijeka koji bi omogućili adekvatnu biorasploživost i distribuciju lijeka te povećali adherenciju i uspješnost liječenja (Preet, 2018; Bak i sur., 2015).

U usporedbi s manjim molekulama lijekova te većim proteinima i protutijelima, peptidi predstavljaju jedinstvenu skupinu farmaceutskih tvari specifičnih biokemijskih i terapijskih svojstava. Manja veličina peptida u usporedbi s većim biološkim molekulama omogućuje im penetriranje u dublja tkiva. Peptidi su i manje imunogenični, relativno povoljnije cijene od rekombinantnih proteina i protutijela, učinkovitiji, minimalno su toksični, manje se nakupljaju u tkivima te su stabilniji prilikom skladištenja. U usporedbi s klasičnim manjim molekulama lijekova, peptidi su učinkovitiji, selektivniji i specifičniji. Također, raspadom peptida nastaju aminokiseline, što umanjuje rizik sistemske toksičnosti te potencijalnih interakcija između lijekova (Rastogi i sur., 2019; Vlieghe i sur., 2010).

Usprkos potencijalnim ograničenjima poput njihove visoke molekularne mase, niske sistemske apsorpcije, *in vivo* nestabilnosti zbog brze bubrežne i jetrene eliminacije i slabe permeabilnosti, mnogi peptidi zauzeli su svoje mjesto na tržištu lijekova i polučili uspjehe u borbi protiv teških bolesti. Procjena kvalitete novih peptidnih lijekova koji dolaze na tržište ključna je kako bi se osigurala njihova kontinuirana učinkovitost i sigurnost (Rastogi i sur., 2019).

Zanimljivo je da se terapijsko područje većine odobrenih peptida razlikuje od ciljanih indikacija peptida koji su u fazi istraživanja i razvoja. Primjerice, mnogo peptida je ušlo u fazu razvoja u onkološkim indikacijama, no samo njih nekoliko je i dobilo odobrenje za stavljanje na tržište, što pokazuje općenitu slabu uspješnost liječenja takvih bolesti (Preet, 2018). Interes farmaceutske industrije za liječenje rijetkih bolesti i razvoj „orphan“ lijekova također se reflektira i u polju peptidnih lijekova, što je uočljivo na primjeru pasireotida, peptida agonista

somatostatinskih receptora koji se koristi u liječenju Cushingovog sindroma. Također je više peptida trenutno u kliničkim istraživanjima za primjenu u liječenju infektivnih i upalnih bolesti (Fosgerau i Hoffmann, 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Originalni i generički lijek trebaju biti farmaceutski i terapijski ekvivalentni, stoga je u slučaju peptida potrebno dokazati istovjetnost („sameness“) dvaju ljekovitih proizvoda koji sadrže istu djelatnu farmaceutsku tvar dobivenu različitim proizvodnim procesima. Obzirom na to da trenutno ne postoje zakonske smjernice za njihovu proizvodnju, farmaceutska industrija orijentirana na proizvodnju generičkih lijekova pred velikim je izazovom u osiguravanju istovjetnosti peptidnih generičkih i originalnih lijekova. Patentna prava originalnih lijekova trenutno dostupnih na tržištu uskoro istječu, te je potrebno ustanoviti koje su najprikladnije metode i što je sve potrebno napraviti kako bi istovjetnost generičkih s originalnim peptidnim lijekovima bila osigurana. Također, trenutno je poželjno ovome problemu pristupiti iz šireg kuta kako ne bi došlo do mogućeg naknadnog povlačenja proizvoda s tržišta ukoliko on ne bude u skladu s jednom donesenim harmoniziranim zakonskim smjernicama.

Unatoč brojnim izazovima u istraživanju i razvoju, Američka agencija za hranu i lijekove je 2015. godine odobrila prvi generički peptidni lijek, Glatopa™ proizvođača Mylan. Njegova djelatna tvar, glatiramer acetat prije toga je na tržištu bio dostupan 20 godina samo pod originalnim imenom Copaxone® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.), a sada se Glatopa™ može koristiti u svim indikacijama za koje je odobren Copaxone®. Glatiramer acetat je složena mješavina polipeptida koja se koristi u liječenju pacijenata s relapsirajućim oblikom multiple skleroze, te je u potpunosti proizveden kemijskom sintezom i ne ubraja se u biološke lijekove. Nakon uspostavljanja procesa proizvodnje koji je rezultirao kvalitetom usporedivom s onom originalnog lijeka, niz metoda fizikalno-kemijske i biološke karakterizacije lijeka korišten je za dokazivanje ekvivalencije lijekova Copaxone® i Glatopa™.

U ovom diplomskom radu cilj je sistematizirano prikazati potrebne postupke za dokazivanje istovjetnosti originalnog i generičkog peptidnog lijeka dobivenih različitim proizvodnim procesima uz pregled dostupnih i mogućih analitičkih tehnika i metoda za njihovu karakterizaciju. Dostupnost osjetljivih i preciznih analitičkih tehnika omogućava karakterizaciju složenih lijekova, te olakšava razvoj i stavljanje generičkog peptidnog lijeka na tržište.

Također će se prikazati karakterizacija peptida, na primjeru dekapeptida ikatibanta, korištenjem novijih osjetljivih analitičkih tehnika.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog diplomskog rada literatura je pretražena elektroničkim putem preko umreženog računala koje ima pristup online bazama podataka. Znanstveni, stručni i pregledni radovi koji pokrivaju područje teme ovog rada su pretraženi prema ključnim riječima, temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisima u kojima su objavljeni. Pretražene su online znanstvene baze podataka kao što su bibliografska baza podataka PubMed, baza podataka s cjelovitim tekstem Science Direct, te je za pretraživanje dostupnih radova korištena i društvena mreža Research Gate. U svrhu usklađenosti s regulatornim smjernicama i zahtjevima pretražene su mrežne stranice nacionalne i svjetskih regulatornih agencija poput Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), Europske agencije za lijekove (EMA) i Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED). Također su pretražene stručne knjige sa srodnom tematikom.

Uzorak djelatne tvari ikatibant acetata, serijskog broja 90029-11-96 je korišten za karakterizaciju.

FTIR. Mjerenje FTIR spektra uzorka u čvrstom agregatnom stanju provedeno je na sobnoj temperaturi na FT-IR Frontier spektrometru proizvođača PerkinElmer. Mjerenje je provedeno na peletu dobivenim prešanjem smjese 1-2 g uzorka ikatibant acetata i kalijeva bromida. Spektar je snimljen u području valnih brojeva $4000-370\text{ cm}^{-1}$ s rezolucijom 4 cm^{-1} , te su snimljene 32 snimke. Prvo je snimljen spektar kalijeva bromida, a konačni spektar ikatibant acetata dobiven je oduzimanjem spektra kalijeva bromida od spektra smjese.

Termogravimetrijska analiza. Termogravimetrijska analiza provedena je na 6.4060 mg uzorka u čvrstom agregatnom stanju, koristeći TGA Q5000 termogravimetar proizvođača TA Instruments. Analiza je provedena metodom zagrijavanja uzorka brzinom $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do konačne temperature od 500°C .

Diferencijalna pretražna kalorimetrija. Diferencijalna pretražna kalorimetrija provedena je na triplikatu uzorka koristeći DSC Q2000 kalorimetar proizvođača TA Instruments. Aluminijske posudice s uzorcima i referentna aluminijska posudica zagrijavane su od 0°C do 300°C uz brzinu zagrijavanja od $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do konačne temperature od 300°C .

Dinamička sorpcija vode. Metoda je provedena na instrumentu DVS Intrinsic proizvođača Surface measurement Systems. 154.2778 mg uzorka izloženo je različitim uvjetima relativne vlažnosti pri 25°C . Relativna vlažnost skokovito je povećavana od 0% do 90% te zatim spuštana

do 0% u intervalima od 10%. Svakoj vrijednosti relativne vlažnosti uzorak je bio izložen 1h te je mjerena promjena mase uzorka.

Bio-FTIR. Ispitivana otopina uzorka ikatibant acetata koncentracije 10 mg/mL pripravljena je otapanjem 50 mg ikatibant-acetata u 5 mL pufera pH vrijednosti 5.41. Otopina je pripravljena po uzoru na odobrenu formulaciju ikatibant acetata. Pufer je pripravljen otapanjem natrijeva hidroksida, natrijeva klorida i ledene octene kiseline u miliQ vodi te mu je pH vrijednost prilagođena na interval 5.4-5.6. Za analizu uzorka korišten je Prota-3S™ spektrometar proizvođača BioTools. Korišten je ATR modul za analizu 12 µL uzorka, uz snimanje 400 snimki u području valnih brojeva od 1800 do 400 cm⁻¹ s rezolucijom 4 cm⁻¹. Snimljeni su spektri pozadinskog šuma, prisutne vlage, placebo otopine pufera te otopine ikatibant acetata. Mjerenje je rađeno u triplicatu. Spektar otopine ikatibant acetata dobiven je obradom u programu FT-IR Protein Structure Analyzer.

Cirkularni dikroizam. Ispitivana otopina uzorka pripravljena je razrjeđivanjem početne otopine koncentracije 10 mg/mL na 1.2 mg/mL uz pufer. Mjerenje je provedeno na sobnoj temperaturi na J-1500 spektropolarimetru proizvođača Jasco koristeći kivetu duljine puta 1 cm za mjerenje područja valnih duljina 250-340 nm te 0.02 cm za područje 198-260 nm. Snimljen je spektar miliQ vode, placebo otopine pufera i otopine uzorka pet puta. Nakon oduzimanja spektra placeba, CD spektar uzorka preveden je u molarni elipticitet (CD intenzitet po aminokiselini) koristeći koncentraciju peptida, prosječnu masu po aminokiselini i duljinu puta svjetlosti kivete (0.02 ili 1 cm). Sekundarna struktura peptida izračunata je algoritmom preko Yangove i Reedove reference.

Fluorescencija. Otopina uzorka ikatibant acetata koncentracije 10 mg/mL dobivena je otapanjem 50 mg ikatibant acetata u 5 mL miliQ vode. Mjerena je fluorescencija otopine ikatibant acetata i miliQ vode. Fluorescencijski spektar ikatibant acetata dobiven je oduzimanjem fluorescencije vode od fluorescencije otopine. Mjerenje je provedeno na sobnoj temperaturi, na spektrometru SpectraMax M3 proizvođača Molecular Devices, koristeći kvarnu kivetu duljine puta svjetlosti 1 cm. Nakon određivanja ekscitacijske valne duljine pri 266 nm, intenzitet emisije mjereno je u području valnih duljina od 280 do 500 nm, na svakih 1 nm uz srednje pojačanje fotomultiplikatora i uz 10 pobuđenih ekscitacijskih bljeskova po očitavanju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Regulatorni okvir

Peptidni terapeutici zanimljivi su u regulatornom smislu jer se, ovisno o duljini peptida, kliničkoj indikaciji i tehnologiji proizvodnje, mogu smatrati konvencionalnim kemijskim molekulama ili pak biološkim lijekovima, budući da ispunjavaju prostor između njih (Wu i sur., 2017). Zahtjeve za lijekove s malim molekulama djelatnih tvari i njihova onečišćenja propisuju ICH smjernice, a također su dostupne i regulatorne smjernice za biološke i bioslične lijekove. Budući da trenutno ne postoji regulativni okvir za peptidne lijekove, proizvodnja peptidnih lijekova te njihovih generičkih verzija vrlo je izazovna. Trenutno različite farmakopeje definiraju zahtjeve kvalitete u obliku monografija koje peptidne djelatne tvari i završni ljekoviti oblici moraju ispunjavati. To je osnova za osiguravanje kvalitete pojedinačnih ljekovitih oblika koja je nužna za pravilno funkcioniranje i regulatornu kontrolu peptidnih lijekova (Rastogi i sur., 2019).

4.1.1. Stavovi regulatornih agencija

Prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA), peptidni lijekovi građeni od manje od 100 aminokiselina i proizvedeni kemijskom sintezom, odobravaju se NDA putem (New Drug Approval), dok peptidni lijekovi proizvedeni rekombinantnom DNA tehnologijom prolaze proces prijave za licencu bioloških lijekova (BLA; Biologics License Application). Generički peptidni lijekovi odobravaju se skraćanim NDA postupkom (ANDA; Abbreviated New Drug Approval) te su međusobno zamjenjivi. Za svaki lijek kao biosličan koji je odobren putem prijave za biološke lijekove, mora se dokazati međusobna zamjenjivost s referentnim lijekom zbog razlika u proizvodnoj tehnologiji. To je izazovno jer proizvođač treba priložiti podatke o farmakokinetičkim i farmakodinamičkim profilima, te učinkovitosti i sigurnosti u jednakoj dozi u usporedbi s referentnim lijekom (Rastogi i sur., 2019). Američka agencija za hranu i lijekove procjenjuje terapijsku istovjetnost generičkih lijekova temeljem znanstvene procjene. Lijekovi su terapijski istovjetni ukoliko su i farmaceutski i bioekvivalentni originalnom odobrenom lijeku. Tražitelj odobrenja za generički lijek mora dokazati da je generički lijek bioekvivalentan originalnom, a nekim slučajevima moguće je i oslobađanje od studija bioekvivalencije.

Europska agencija za lijekove (EMA) ne razlikuje peptide prema veličini, nego temeljem tehnologije proizvodnje, odnosno ovisno o tome je li peptid proizveden rekombinantnom tehnologijom ili kemijskom sintezom. Svi peptidni lijekovi koji se smatraju inovativnima te oni proizvedeni biotehnoški moraju pratiti proceduru za centralizirani postupak davanja

odobrenja za stavljanje lijeka na tržište, dok to nije obavezno za nebiološke lijekove koji odobrenje mogu dobiti nacionalnim postupkom. Centraliziranim postupkom odobreni lijek na tržištu postaje dostupan svim pacijentima unutar Europske unije. U svrhu odobrenja takvih biosličnih lijekova, Europska unija je za područje bioloških terapeutika donijela okvir za opsežne usporedne studije s referentnim proizvodom (Rastogi i sur., 2019; Oner i sur., 2017). Prema Direktivi 2001/83/EC, članak 10(1), u slučaju generičkih medicinskih proizvoda, nužno je dokazati bioekvivalenciju s referentnim medicinskim proizvodom. Također je moguće oslobađanje od studija bioekvivalencije ukoliko je to primjenjivo (Oner i sur., 2017).

Američka agencija za hranu i lijekove 2017. godine objavila je specifičnu skicu vodiča za industriju u kojoj na primjeru pet sintetskih generičkih peptida opisuje razvoj generičkih lijekova terapijski ekvivalentnih originalnim lijekovima rekombinantnog podrijetla.

Razlike između stavova i zahtjeva ovih dviju agencija mogu se uočiti na primjeru generičkog peptidnog lijeka s glatiramer acetatom (GA). FDA nije zahtijevala klinička istraživanja prilikom odobrenja lijeka Glatopa, prve generičke verzije lijeka Copaxone. Američka agencija za hranu i lijekove u tom slučaju je zaključila da je bioekvivalencija dvaju lijekova očita jer generički i originalni lijek sadrže kvalitativno i kvantitativno jednake aktivne i pomoćne tvari. U Europi jest Remurel prva generička verzija lijeka Copaxone, a lijek je odobren decentraliziranim putem temeljem kvalitete i podataka nekliničkih te kliničkih istraživanja (Oner i sur., 2017).

Prioritet regulatornih agencija je osigurati kvalitetu, sigurnost i učinkovitost lijekovitih proizvoda te kontinuiranu dostupnost lijekova populaciji. Obzirom na trenutnu situaciju, postoji potreba za razvojem usklađenog seta smjernica od strane regulatornih agencija kako bi se regulirala kontrola kvalitete peptidnih lijekova, a naročito razine onečišćenja koja u njima može biti prisutna.

4.2. Metode proizvodnje peptida

Peptide i proteine moguće je proizvesti tehnologijom rekombinantne DNA, kemijskom i enzimskom sintezom ili izolacijom iz prirodnog materijala. Veličina željenog peptida određuje izbor najprikladnije metode proizvodnje, međutim na to može utjecati i ukupan trošak te mogućnost postizanja određenih modifikacija peptida koje su potrebne za biološku aktivnost, poput fosforilacije, glikozilacije i dr. Proizvodnja peptida i proteina uključuje više koraka ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja, što naposljetku može utjecati na njihovu strukturu. Budući da su određeni postupci proizvodnje većinom zaštićeni patentom, mogu se pojaviti razlike u procesu proizvodnje između različitih proizvođača istog terapijskog peptida. Male promjene u procesu proizvodnje mogu rezultirati kemijskom i/ili fizikalnom nestabilnošću, što može imati značajan učinak na aktivnost peptida i proteina (Awotwee-Otoo i sur., 2012).

Kemijska sinteza trenutno se smatra najrazvijenijom dostupnom tehnologijom proizvodnje peptida. Industrijska proizvodnja sintetskih terapijskih peptida postala je moguća zbog razvoja sinteze na čvrstom nosaču (solid-phase peptide synthesis; SPPS). Kemijska sinteza glavna je metoda proizvodnje malih i peptida srednje veličine, odnosno peptida koji su građeni od 5 do 50 aminokiselinskih ostataka (D'Hondt i sur., 2014; Vlieghe i sur., 2010). Peptidi srednje veličine čine većinu farmaceutski važnih molekula (Vlieghe i sur., 2010). Kemijskom sintezom moguće je postići puno širu kemijsku raznolikost proizvedenih peptida nego rekombinantnom DNA tehnologijom, budući da je takvom sintezom moguće proizvesti peptide koji sadrže netipične aminokiseline i pseudo-peptidne veze. Primjenom kemijske sinteze na čvrstoj fazi moguće je jednostavnije odvojiti željeni peptid od onečišćenja i nusprodukata sinteze, pa je stoga proizvodnja terapijskih peptida sintetskim putem postala povoljnija od proizvodnje rekombinantnim ili enzimskim putem.

Rekombinantna DNA tehnologija općenito se koristi u proizvodnji velikih peptida, poput inzulina, kalcitonina i glukagona (D'Hondt i sur., 2014). Rekombinantnom tehnologijom nije moguće proizvesti peptide koji u sastavu sadrže netipične aminokiseline, kao ni postići amidaciju C-kraja peptida. Također, u usporedbi s kemijski sintetiziranim peptidima, kvaliteta i čistoća peptida proizvedenih rekombinantnom tehnologijom nije uvijek optimalna, a faza istraživanja i razvoja korištenjem ove tehnologije je skupa i zahtijeva puno vremena.

Enzimska metoda proizvodnje ograničena je na sintezu peptida koji sadrže do 10 aminokiselinskih ostataka u svojoj strukturi, poput glutationa (D'Hondt i sur., 2014). Usprkos tehnološkom napretku, enzimska metoda proizvodnje peptida najčešće nije metoda izbora zbog

niskog prinosa, niske produktivnosti i visoke cijene enzima potrebnih u procesu (Vlieghe i sur., 2010).

Odabrana metoda proizvodnje treba zadovoljavati zahtjeve regulatornih agencija u pogledu standarda kvalitete proizvoda i validacije procesa. Potrebno je uspostaviti sustav dobre proizvođačke prakse kako bi bila osigurana reproducibilnost procesa i kvaliteta proizvoda. Karakterizacija peptidnog lijeka nužna je u svakom koraku proizvodnje kako bi se razlike u kvaliteti između proizvedenih serija svele na minimalnu mjeru. Svaka varijabilnost u kvaliteti završnog proizvoda ovisi o promjenama u svakom proizvodnom koraku, ali i o kvaliteti početnog materijala korištenog za sintezu (Rastogi i sur., 2019).

4.2.1. Rekombinantna tehnologija

Rekombinantna DNA tehnologija je tehnologija kojom se jedan ili više gena nekog genoma mogu identificirati, izdvojiti i umetnuti u genom drugog organizma. Prvi proizvedeni peptidni lijek, humani inzulin, proizveden je upravo ovom tehnologijom.

Za uspješnu primjenu rekombinantne DNA tehnologije potrebno je postojanje enzima, vektora i organizma domaćina. Enzimi koji su potrebni su restrikcijski enzimi, polimeraze i ligaze. Restrikcijski enzimi koriste se za kidanje molekule DNA na točno određenom mjestu, nazvanom restrikcijsko mjesto. Restrikcijski enzimi proizvode ljepljive krajeve na molekuli DNA koji pomažu u vezanju sa željenim genom. Pomoću polimeraza se DNA molekula sintetizira, a uz ligaze dolazi do spajanja molekule DNA. Vektori su važan dio rekombinantne tehnologije. Vektor predstavlja završni nosač pomoću kojeg se gen od interesa unosi u organizam domaćina. Najkorišteniji vektori su plazmidi i bakteriofazi. Vektor treba sadržavati jednaka restrikcijska mjesta kao što postoje na krajevima željenog gena kako bi se gen mogao integrirati u vektor. Također, vektor može sadržavati i sljedove za selekciju, identifikaciju, klonirajuće sljedove, te dodatne sljedove koji omogućavaju domaćinu dodatna svojstva, primjerice rezistenciju na određene antibiotike. Organizam domaćina jest stanica u koju se unosi rekombinantna DNA molekula, a to mogu biti bakterije, gljivice i životinjske stanice. Metode koje se koriste za unos vektora u organizam domaćina su primjerice mikroinjektiranje, biolistika, korištenje genskog pištolja, izmjenično hlađenje i grijanje te primjena kalcijevog fosfata.

Rekombinantna DNA tehnologija uglavnom podrazumijeva pet koraka: (1) izrezivanje željenog gena iz DNA molekule i kidanje vektora na restrikcijskim mjestima; (2) umnožavanje kopija

gena pomoću lančane reakcije polimeraze; (3) umetanje gena u vektore; (4) unošenje vektora u organizam domaćina; (5) dobivanje produkata rekombinantnih gena.

Trenutno se rekombinantna DNA tehnologija, osim u proizvodnji peptida, koristi još i u genskoj terapiji, kliničkoj dijagnostici te kod proizvodnje transgeničnih biljaka i životinja (Azevedo i sur., ured., 2017).

4.2.2. Kemijska sinteza

Kemijska sinteza jest ustaljena metoda za istraživanje i proizvodnju novih terapijskih i dijagnostičkih peptida te razumijevanje odnosa njihove strukture i funkcije. Prvotno se kemijska sinteza peptida provodila u otopini, no važnost joj je porasla tek nakon uvođenja sinteze peptida na čvrstoj fazi i dodatnih usavršavanja pojedinih koraka u sintezi (D'Hondt i sur., 2014; Guzmán i sur., 2007).

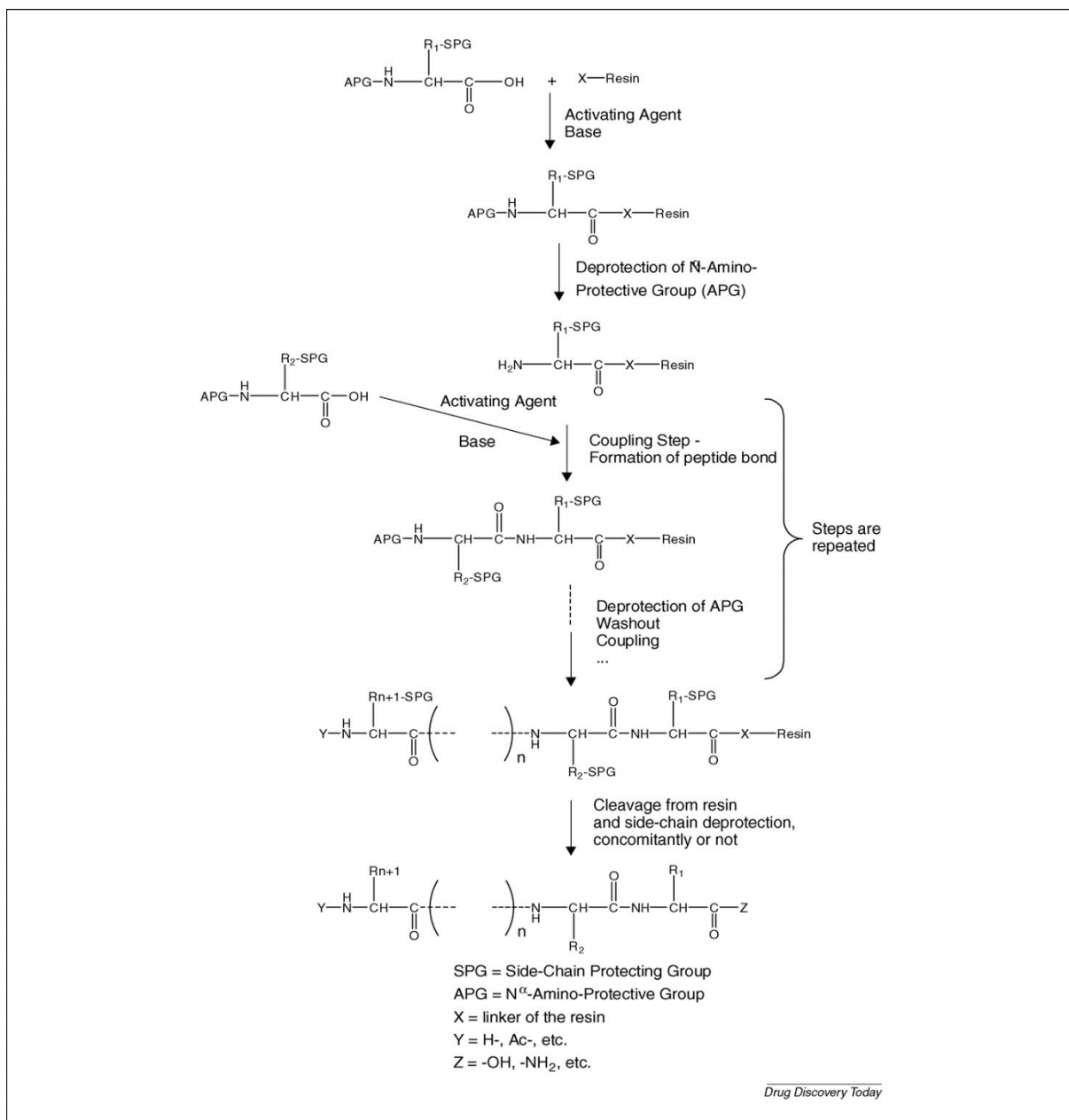
Kemijska sinteza u otopini (liquid-phase peptide synthesis; LPPS) može se koristiti za proizvodnju manjih peptida građenih od tek nekoliko aminokiselinskih ostataka. Glavna razlika kemijske sinteze u otopini i na čvrstom nosaču je u početnom koraku. Početni korak sinteze peptida u otopini jest zaštita C-kraja prve aminokiseline u nizu vezanjem zaštitne skupine. Prednost kemijske reakcije sinteze provedene u otopini jest mogućnost izolacije i pročišćavanja međuprodukata nakon svakog koraka reakcije te mogućnost njihovog kombiniranja u svrhu dobivanja većih peptida željene sekvence (Guzmán i sur., 2007).

Sinteza peptida na čvrstoj fazi (solid-phase peptide synthesis; SPPS) je metoda u kojoj se produljuje peptidni lanac koji je usidren na čvrstom nosaču. Produljivanje peptidnog lanca postiže se stvaranjem peptidne veze između amino skupine posljednje aminokiseline koja je posredno ili neposredno vezana za nosač i karboksilne skupine aminokiseline koja se dodaje dotad nastalom peptidnom lancu. Postupak dodavanja novih aminokiselina ponavlja se do postizanja željene veličine i sekvence peptida (D'Hondt i sur., 2014; Vlieghe i sur., 2010; Guzmán i sur., 2007). *In vivo* sinteza proteina u biološkim sustavima odvija se od N- prema C-kraju, dok se *in vitro* sinteza peptida odvija u suprotnome smjeru.

Najvažnije varijable u procesu sinteze na čvrstoj fazi su priroda čvrstog nosača, odabir strategije sinteze, reagens za povezivanje i način odstranjivanja peptidnog lanca s čvrstog nosača. Čvrsti nosač treba biti kemijski inertan i stabilan pod uvjetima sinteze peptida, a njegove čestice trebaju biti uniformne i robusne. Za aktivaciju karboksilnih skupina aminokiselina koje stupaju u reakciju stvaranja peptidne veze potrebno je koristiti reagens za povezivanje. Zaštita α -amino

skupina i skupina u bočnim ograncima aminokiselina potrebna je kako bi se osigurala selektivnost reakcije stvaranja peptidne veze. Dvije raširene strategije sinteze, t-Boc i Fmoc strategija razlikuju se u načinima zaštite određenih funkcionalnih skupina i njihovom skidanju, odabiru čvrstog nosača te načinu odstranjivanja peptida s čvrstog nosača.

Prvi korak sinteze na čvrstom nosaču jest spajanje C-kraja prve aminokiseline peptidnog lanca na nosač. Slijedi uklanjanje zaštitne skupine prethodno vezane na njezinu α -amino skupinu kako bi se mogla vezati karboksilna skupina sljedeće aminokiseline u nizu. U t-Boc strategiji zaštitna skupina s α -amino skupine uklanja se tretiranjem tri-fluorocetnom kiselinom, dok se u Fmoc strategiji u tu svrhu koristi piperidin. Nakon vezanja sljedeće aminokiseline u nizu, ponovno se hidrolizira zaštitna skupina vezana na α -amino skupini. Daljnji postupak vezanja narednih aminokiselina i skidanja zaštite s α -amino skupina ponavlja se dok se ne sintetizira željeni peptid. Veze između bočnih ogranaka aminokiselina i njihovih zaštitnih skupina trebaju biti stabilne pod uvjetima hidrolize zaštitnih skupina na α -amino skupinama. Naposljetku se cijepa kompleks nosača i peptida te se miču zaštitne skupine s bočnih ogranaka aminokiselinskih ostataka u peptidu (D'Hondt i sur., 2014; Guzmán i sur., 2007).



Slika 2. Prikaz sinteze peptida na čvrstome nosaču (Vlieghe i sur., 2010).

Moguće metodologije sinteze peptida na čvrstoj fazi su sekvencijalna sinteza, konvergentna sinteza i kemijska ligacija. Sekvencijalna sinteza podrazumijeva postupno dodavanje aminokiselina u niz do potpune sinteze peptida. U konvergentnoj strategiji peptidni se fragmenti sekvencijalno sintetiziraju neovisno jedan o drugom te se zatim spajaju kondenzacijom u tekućoj fazi ili na čvrstom nosaču (Vlieghe i sur., 2010; Guzmán i sur., 2007). Kod kemijske ligacije peptidni fragmenti se spajaju kemoselktivnim reakcijama uz tioeterske, oksimske, hidrazonske i tiazolidinske poveznice (Guzmán i sur., 2007).

Postupak sinteze na čvrstoj fazi može se provesti ručno ili automatski, što omogućava industrijsku proizvodnju jednog ili čak više peptida istovremeno. Potrebne su velike količine

reagensa kako bi se reakcija provela brže i kvantitativno. Svi koraci sinteze na čvrstoj fazi provode se u istom mediju pa je potrebno više koraka ispiranja. Tijekom procesa sinteze nužno je provoditi različita ispitivanja poput analize i pročišćavanja peptida, određivanja slobodnih amino skupina, molekularne mase peptida u svrhu njegove identifikacije, kao i određivanje sintetizirane količine peptida (Guzmán i sur., 2007).

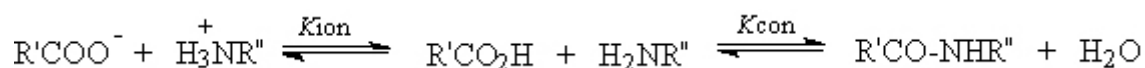
4.2.3. Enzimska sinteza

Enzimi su biološki katalizatori odgovorni za stanični metabolizam koji u organizmu djeluju u blagim uvjetima. Kako bi bili učinkoviti u industrijskim procesima, enzimi trebaju biti dovoljno robusni kako bi mogli podnijeti uvjete različite od onih u organizmu, što često zahtjeva njihovu modifikaciju (Guzmán i sur., 2007).

Proteolitički enzimi ili proteaze pripadaju skupini hidrolaza, a aktivne su pri blagim uvjetima, s optimalnim pH djelovanja od 6 do 8. To su stereo- i regio-selektivni enzimi, stabilni i robusni, što ih čini pogodnim za primjenu u sintezi. Proteaze kataliziraju proces hidrolize peptidnih veza, ali i njihov nastanak pa se mogu primjenjivati u svrhu sinteze peptida. Odabir proteaza temelji se na njihovoj specifičnosti za aminokiselinske ostatke koji stupaju u reakciju. Proteaze se razvrstavaju u porodice na temelju aminokiseline ili metalnog iona koji ima primarnu katalitičku ulogu, pa tako postoje serinske, cisteinske, aspartatne i metaloproteinaze. Osim stvaranja i hidrolize peptidne veze, proteaze mogu katalizirati i druge tipove reakcija, poput esterifikacije, transesterifikacije, sinteze glikokonjugata i dr. (Guzmán i sur., 2007).

Primjenom nevodnih medija, područje primjene proteaza prošireno je i na reakcije koje se ne mogu provoditi u vodenom mediju, poput sinteze peptidnih veza umjesto suprotne reakcije hidrolize. Jedna od prednosti enzimske sinteze u odnosu na kemijsku sintezu jest specifičnost enzimski katalizirane reakcije, što smanjuje potrebu za zaštitom funkcionalnih skupina bočnih lanaca aminokiselina. Međutim, specifičnost proteaza također i ograničava njihovu primjenu, budući da je peptid koji nastaje tijekom reakcije sinteze istovremeno podložan i hidrolizi djelovanjem proteaza (Guzmán i sur., 2007).

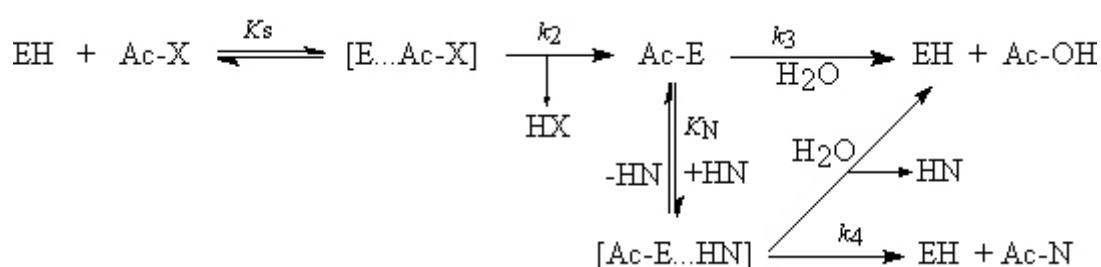
Sinteza peptida primjenom proteaza može biti termodinamički ili kinetički kontrolirana. Termodinamički kontrolirana reakcija sinteze jest zapravo povratna reakcija hidrolitičkog kidanja peptidne veze:



gdje je K_{ion} ravnotežna konstanta reakcije ionizacije, a K_{con} ravnotežna konstanta konverzije, odnosno reakcije nastanka peptidne veze.

Poput ostalih katalizatora, proteaze povećavaju brzinu postizanja ravnoteže kemijske reakcije, no ne mijenjaju kemijsku ravnotežu. Hidroliza i nastajanje peptidne veze događaju se jednakim mehanizmom uz stvaranje jednakih međuprodukata. Korak koji određuje brzinu reakcije je nastajanje acilnog međuprodukta iz karboksilne kiseline. Izbor medija, reagensa i ostalih procesnih parametara ovise o karakteristikama reakcije, robustnosti enzima i svojstvima supstrata i produkata.

Kinetički kontrolirana sinteza peptida uz proteaze odvija se prema sljedećem mehanizmu:



Aktivirani acilni donor koji je u obliku estera, amida ili nitrila veže se za enzim i nastaje tetrahedralni kompleks enzima i supstrata, $[\text{E}\dots\text{Ac-X}]$. Tetrahedralni kompleks se razgrađuje i nastaje kovalentni acil-enzim međuprodukt, $[\text{Ac-E}]$. Molekula vode ili nukleofil poput amina, alkohola ili tiola mogu napasti ovaj međuprodukt i deacilirati ga. Uspjeh reakcije sinteze ovisi o kinetici ovih kompetitivnih reakcija. Parametri koji utječu na reakciju kinetički kontrolirane sinteze peptida su: temperatura, pH, koncentracija supstrata i omjer enzima i supstrata. Učinkovitost reakcije i potencijal primjene u sintezi peptida znatno se razlikuju među različitim proteazama, budući da je specifičnost za acilni donor i za nukleofilnu vezu individualan parametar za svaki pojedini enzim (Guzmán i sur., 2007).

4.2.4. Izolacija iz prirodnih materijala

Peptidi i proteini mogu se dobiti i iz prirodnih materijala, poput biljaka, životinja i mikroorganizama postupcima izolacije koji se temelje na fizikalno-kemijskim svojstvima proteina.

Izolacija i pročišćavanje pojedinog proteina iz stanice koja sadrži mješavinu različitih proteina moguća je zbog njegovih karakterističnih svojstava, poput sastava aminokiselina, aminokiselinskog slijeda, strukture pod-jedinica, veličine, oblika, ukupnog neto naboja, pH izoelektrične točke, topljivosti, otpornosti na toplinu i higroskopnosti. Ovisno o navedenim

svojstvima postoje različite metode izolacije proteina, poput isoljavanja i izoiionske precipitacije. Pročišćavanje izoliranih peptida i proteina je izazovno, te se u tu svrhu koriste metoda gel elektroforeze uz natrijev dodecil sulfat i kromatografija (Nehete i sur., 2013).

Proteini dobiveni izolacijom mogu se koristiti u sustavima dostave lijeka i gena kao nosači, te kod ljekovitih oblika s kontroliranim otpuštanjem u sastavu filma za oblaganje, hidrogelova, kao nanočestice, mikročestice ili kuglice (Nehete i sur., 2013).

4.3. Dokazivanje istovjetnosti peptida dobivenih različitim proizvodnim procesima

Generički lijekovi u Sjedinjenim Američkim Državama mogu biti odobreni skraćenim postupkom davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet (Abbreviated New Drug Application Assessment Process; ANDA). Takav postupak moguć je budući da se tražitelj odobrenja oslanja na podatke iz prekliničkih i kliničkih istraživanja odobrenog originalnog lijeka. Generički lijekovi trebaju biti terapijski ekvivalentni originalnom lijeku, što se uspostavlja kombiniranim kriterijima za farmaceutsku ekvivalenciju i bioekvivalenciju. Generički lijek također treba biti prikladno označen i proizveden u skladu s načelima dobre proizvođačke prakse.

Pod farmaceutskom ekvivalencijom podrazumijeva se da generički i originalni lijek imaju jednaku djelatnu farmaceutsku tvar koja je u jednakoj dozi, jednakom farmaceutskom obliku, primjenjuje se jednakim putem, ima jednaku kvalitetu, učinkovitost i sigurnost, te namjenu primjene. Nužna je istovjetnost djelatne farmaceutske tvari generičkog i originalnog lijeka. Pojam bioekvivalencije označava da se primjenom generičkog lijeka pacijent izlaže jednakoj količini djelatne farmaceutske tvari u jednakom vremenskom periodu kao pri primjeni originalnog lijeka. U većini slučajeva, peptidni generički lijekovi formulirani za parenteralnu primjenu koji sadrže jednake aktivne i neaktivne sastojke kao i originalni lijek mogu dobiti oslobađanje od kliničke studije bioekvivalencije ili biowaiver.

Moguća je situacija u kojoj je peptidna djelatna tvar u originalnom i generičkom peptidnom lijeku proizvedena različitim procesima, te je zato potrebno dokazati istovjetnost djelatne tvari dobivene na različit način u svrhu dobivanja odobrenja za stavljanje generičkog peptidnog lijeka na tržište. Generički peptid potrebno je detaljno karakterizirati, s naglaskom na primarnu i sekundarnu strukturu, fizikalno-kemijska svojstva, prisustvo oligomera, profil onečišćenja, pojavu agregata i biološku aktivnost. Ukoliko je primjenjivo, preporučuje se provesti usporednu karakterizaciju originalnog i generičkog sintetskog peptida.

Primjerice, procjena ekvivalencije generičkog (GlatopaTM) i originalnog (Copaxone®) lijeka koji sadrže glatiramer acetat kao djelatnu tvar provedena je na četiri razine:

- (1) ekvivalencija početnih karakteristika materijala i osnovnih kemijskih principa;
- (2) ekvivalencija strukturnih značajki vezanih za polimerizaciju, depolimerizaciju i pročišćavanje;

(3) ekvivalencija fizikalno-kemijskih svojstava;

(4) ekvivalencija bioloških i imunoloških svojstava.

Takav „ukupni pristup dokaza“ može se analogno primijeniti u demonstriranju istovjetnosti i drugih kompleksnih djelatnih farmaceutskih tvari. Svaka složena djelatna farmaceutska tvar ima različite izazove, a nositelji zahtjeva za odobrenje za stavljanje lijeka u promet trebaju procijeniti svaku individualnu situaciju i prema tome primijeniti potrebnu strategiju karakterizacije.

4.3.1. Identifikacija

Identifikacijskim testovima trebalo bi se odrediti prisutnost aktivne tvari te isključiti prisutnost procesnih i razgradnih onečišćenja koja mogu biti strukturno slična peptidnoj djelatnoj tvari. Takvi testovi trebaju razlikovati tvari slične strukture koje bi mogle biti prisutne, a identifikacija treba biti specifična i nedvosmislena. Prikladna specifičnost postiže se primjenom kombinacije različitih, uglavnom dviju metoda. Prema ICH Q6A smjernicama, potrebno je napraviti više od jednog identifikacijskog testa koji može biti fizikalno-kemijski, biološki i/ili imunokemijski. Test treba biti temeljen na aspektima strukture ili drugih svojstava specifičnih za tvar. Metode korištene u određivanju potentnosti i čistoće također se kao takve i/ili modificirane mogu koristiti i u identifikacijskim postupcima. U slučaju da je peptid u obliku soli, potvrda identiteta također treba uključivati i ione suprotnog naboja (Rastogi i sur., 2019.; Vergote i sur., 2009). Metode koje se primjenjuju za identifikaciju peptidnih djelatnih tvari trebaju razlikovati osnovni peptid od peptida s promijenjenim sekvencama ili funkcionalnim skupinama koje se mogu pojaviti uslijed problema nastalih tijekom sinteze peptida (primjerice delecija aminokiseline, zaostala zaštitna skupina i dr.), kao i od drugih peptida iz iste terapijske skupine te ostalih peptida prisutnih na mjestu proizvodnje (Vergote i sur., 2009).

Monografije peptida propisuju metode identifikacije koje provjeravaju veličinu molekule, njezinu primarnu strukturu, izoelektrični profil, kromatografska svojstva molekule te provjeravaju ima li molekula ispravnu funkcionalnu konfiguraciju. To su obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (RP-HPLC), peptidno mapiranje, izoelektrično fokusiranje, kapilarna elektroforeza, biološka određivanja, te u nekim slučajevima nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija i masena spektrometrija (Rastogi i sur., 2019). Kriteriji prihvatljivosti za fizikalno-kemijske testove identifikacije temelje se na usporednoj analizi rezultata uz primjenu prikladnog kemijskog referentnog standarda.

Primarna identifikacijska metoda u ovakvim testovima jest obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (RP-HPLC), koja se koristi u odvajanju cijelih ili razgrađenih peptida iz različitih sintetskih ili bioloških izvora. Za sekundarnu identifikaciju farmakopeje predlažu metode poput peptidnog mapiranja (za peptide dobivene metodom rekombinantne DNA tehnologije), aminokiselinske analize kojom se postiže visoka specifičnost, te metode ultraljubičaste ili infracrvene spektrometrije, kolorimetrijskih reakcija i bioloških određivanja (Rastogi i sur., 2019).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) primarna je metoda korištena u identifikaciji, odjeljivanju i kvantifikaciji peptida i peptidima srodnih onečišćenja nastalih raspadom peptida. Ovom tehnikom peptidi se odjeljuju na temelju razlika u svojoj hidrofobnosti/hidrofilnosti (normalno-fazna ili obrnuto-fazna kromatografija), ukupnom naboju (kromatografija ionske izmjene) ili veličini (kromatografija isključenjem veličinom). Obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (RP-HPLC) uključuje adsorpciju peptida na hidrofobnu nepokretnu fazu ovisnu o aminokiselinskom slijedu i molekularnoj konformaciji peptida te primjenu gradijentne elucije i mjerenja vremena zadržavanja. Za detekciju peptida u ultraljubičastom području valnih duljina 210-220 nm i za detekciju aromatskih bočnih ogranaka fenilalanina, tirozina i triptofana (250-290 nm) široko se koriste ultraljubičasti detektori (Rastogi i sur., 2019).

Peptidno mapiranje je metoda kojom se direktno analizira peptidni slijed, naročito u slučaju peptida dobivenih rekombinantnom DNA tehnologijom. Ova metoda obično se smatra nužnom. Monografije Europske farmakopeje za inzulin i njegove analoge predlažu kombinaciju tekućinske kromatografije i peptidnog mapiranja, koje se također često koristi i u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Rastogi i sur., 2019). Potvrda identifikacije dobiva se usporedbom dobivene peptidne mape s referentnim standardom.

Elektroforeza (SDS-PAGE i kapilarna elektroforeza) je metoda koja se koristi za identifikaciju i odvajanje peptida na temelju veličine te daje relativno pouzdanu informaciju o molekularnoj masi peptida. U posljednje vrijeme kapilarna elektroforeza pokazala se kao vjerodostojna i robusna tehnika za analitičku karakterizaciju, razvoj i kontrolu kvalitete peptida (Rastogi i sur., 2019).

Aminokiselinskom analizom određuje se aminokiselinski sastav ili sadržaj peptida. Njome se mogu kvantificirati slobodne aminokiseline, kao i aminokiseline otpuštene iz peptida. To je alternativna metoda korištena kao dopuna sofisticiranim spektrometrijskim tehnikama.

Identifikacija metodom nuklearne magnetske rezonantne spektrometrije može se primijeniti na peptidima građenim od najviše 15 aminokiselina. Također, njome se mogu identificirati peptidi koji u svojoj strukturi sadrže aminokiseline koje nisu prirodno prisutne u organizmima. U slučaju složenijih struktura, ^1H i ^{13}C NMR spektri mogu imati više preklapajućih signala, koji mogu biti jednostavnije asignirani primjenom dvodimenzionalnih NMR metoda.

Trenutno se masena spektrometrija i vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije najviše koriste u analizama kontrole kvalitete, budući da ove metode daju detaljnije informacije o peptidima i njima srodnim onečišćenjima, a pritom ne zahtijevaju kompliciranu pripremu uzorka. Zbog brzog tehnološkog napretka, USP je zamijenila konvencionalne metode identifikacije određenih sintetskih peptida, poput dezmozopresin-acetata, gonadorelin-acetata i dr. metodom masene spektrometrije (Rastogi i sur., 2019).

Za proteine dobivene rekombinantnom DNA tehnologijom, važan kriterij identifikacije je usklađenost sa zahtjevima navedenim u dijelu monografije Određivanja/potentnost. Biološka određivanja se mogu u potpunosti zamijeniti fizikalno-kemijskim testovima jedino u slučajevima kad se takvim testovima može doći do dovoljnih informacija o svojstvima proteina čija je povezanost s biološkom aktivnošću poznata, kad je poznata biološka aktivnost srodnih tvari koje se nalaze u ljekovitom proizvodu te kad je dobro dokumentirana povijest proizvodnje.

Pojedini peptidi mogu kao aktivne farmaceutske tvari postojati u jednom ili više oblika soli. Gonadorelin je primjerice dostupan kao djelatna tvar u obliku acetatne soli, ali također i u obliku hidroklorida. Prema ICH Q6A smjernicama, potrebna je identifikacija suprotnog iona u slučaju peptida koji su u obliku soli. Također, uvođenje ovog dodatnog testa u monografije peptida opravdano je i zbog moguće prisutnosti soli peptida i trifloroacetne kiseline (peptidni trifloroacetati) koje su međuprodukti u kemijskoj sintezi peptida. Acetatni ioni mogu se identificirati kromatografskim metodama, kolorimetrijskim reakcijama te NMR analizom kojom se mogu razlučiti mono- i diacetati (Vergote i sur, 2009).

Dodatne metode koje se mogu primijeniti u peptidnim identifikacijskim testovima uključuju metode vezanja protutijela, bilo same ili vezane s elektroforetskim metodama (Western blot), N-terminalno sekvenciranje i tehnike analize glikana za glikozilirane proteine.

4.3.2. Fizikalno-kemijska svojstva

Širok spektar analitičkih tehnika koristi se za karakterizaciju peptidnih lijekova, poput kapilarne elektroforeze, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, MALS (multi angle light

scattering), poliakrilamidne gel-elektroforeze, nuklearne magnetske rezonantne spektrometrije (NMR), cirkularni dikroizam (CD), IR spektroskopije, fluorescencije (FI), masene spektrometrije (MS) te DSC i TGA za određivanje termičkih svojstava i DVS za određivanje higroskopnosti. Budući da peptidne djelatne farmaceutske tvari te njihove formulacije imaju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva, potrebno je koristiti različite analitičke protokole za svaki lijek. Primjerice, specifična svojstva glatiramer acetata nužna su za njegovu funkciju te promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima, poput molekulske mase, mogu utjecati na njegov mehanizam djelovanja, učinkovitost i sigurnost primjene. Razvoj visoko osjetljivih diferencijalnih metoda nužan je za što bolju analizu ovakvih složenih ljekovitih proizvoda (Rogstad i sur., 2015). Karakterizacija tijekom razvoja uključuje i informacije dobivene iz relevantnih stres-testova, odnosno izlaganjem svjetlosti, toplini, vlazi, kiseloj ili baznoj hidrolizi te oksidaciji (Vergote i sur., 2009).

Djelatna tvar lijeka Copaxone jest glatiramer acetat, ne-biološka složena heterogena smjesa polipeptida dobivenih ko-polimerizacijom četiri sintetskih aminokiselina (L-glutaminske kiseline, L-alanina, L-tirozina i L-lizina). Američka agencija za hranu i lijekove 2015. godine odobrila je generičku verziju glatiramer acetata proizvođača Mylan. Budući da prema smjernicama Američke agencije za hranu i lijekove nisu potrebni klinički podaci o istovjetnosti generičkih verzija glatiramer acetata, odobrenje je temeljeno na fizikalno-kemijskoj karakterizaciji te biološkim podacima o istovjetnosti aktivne tvari s onom u lijeku Copaxone. Kako bi se dokazala istovjetnost aktivnih tvari u Europskoj uniji, potrebno je priložiti uz biološke i fizikalno-kemijske podatke i kliničke podatke (Komlosh i sur., 2019.).

Komlosh i suradnici usporedili su serije djelatne tvari glatiramer acetata proizvođača Mylan s onom prisutnom u lijeku Copaxone koristeći fizikalno-kemijske metode i biološka ispitivanja. Primjenom fizikalno-kemijskih metoda niske rezolucije, poput aminokiselinske analize, određivanja raspodjele molekularne mase i interakcije s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 nisu uočene razlike u djelatnoj tvari između ova dva proizvođača. Međutim, koristeći metode visoke rezolucije, poput size-exclusion kromatografije i metodu naziva Viscotek TDMax otkrivene su razlike u polidispersnosti i homogenosti uzoraka. Koristeći RPLC-2D MALLS metodu, u 5/8 uzoraka proizvođača Mylan/Natco pronađena je skupina polipeptida visoke molekularne mase i visoke hidrofobnosti koja nije prisutna u lijeku Copaxone. Također, kromatografija kationske izmjene (CEX) koja mjeri površinski naboj polipeptida pokazala je razlike u raspodjeli površinskog naboja peptida u ova dva uzorka. Ovi rezultati pokazali su teškoće povezane s proizvodnjom složenih smjesa polipeptida te razlike između takvih lijekova

proizvedenih od strane različitih proizvođača. Različiti proizvodni procesi mogu dovesti do promjena primarne strukture aktivne tvari, što često nije moguće uvidjeti upotrebom konvencionalnih metoda pa je potrebno koristiti fizikalno-kemijske metode visoke rezolucije i biološke testove. Primjerice, meksičko Ministarstvo zdravlja od 2016. godine zahtijeva upotrebu takvih metoda i biološkog testiranja pri ishođenju odobrenja za stavljanje na tržište generičkih lijekova s glatiramer acetatom. Utjecaji ovakvih razlika među različitim uzorcima glatiramer acetata na terapiju pacijenata s multiplom sklerozom nisu još istraženi (Komlosh i sur., 2019.).

Rogstad i suradnici (Rogstad i sur., 2015) također su razvili analitičke tehnike za fizikalno-kemijske analize u svrhu usporedbe različitih glatiramoidnih lijekovitih proizvoda. Kod tih proizvoda primijenjene su nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija, frakcioniranje asimetričnog polja strujanjem (AFFF spregnuta s MALS; AFFF-MALS) i vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS). AFFF-MALS, NMR i LC-MS izabrane su jer te analitičke metode određuju važne komponente vezane za kvalitetu i sastav peptidnih smjesa poput glatiramer acetata, a pregled korištenih metoda prikazan je u Tablici 1. Usporedna NMR i AFFF-MALS, kao i diferencijalna masena spektrometrija pokazane su prikladnima za određivanje razlika glatiramoidnih lijekova. Također, ovi znanstvenici odredili su okvir za analizu podataka u svrhu kvantifikacije istovjetnosti, odnosno razlike između uzoraka. Taj okvir pokazao se prikladnim za višedimenzionalne podatke, što je tipično za složene djelatne farmaceutske tvari kao što je glatiramer acetat.

Tablica 1. Pregled korištenih tehnika za usporedbu glatiramoidnih lijekovitih proizvoda

| Analitička tehnika | Svrha korištene tehnike |
|--------------------|---|
| AFFF-MALS | Izračunavanje prosječne molekulske mase glatiramoida i polidisperznosti |
| NMR | Usporedba sekundarne strukture, relativnog aminokiselinskog sastava i sadržaja pomoćnih tvari |
| LC-MS | Uspoređivanje prisutnosti i zastupljenosti različitih peptidnih sekvenci |

AFFF-MALS korištena je za izračunavanje prosječne molekulske mase glatiramoida i polidisperznosti. AFFF koristi četiri različita protoka za razdvajanje komponenti uzorka. Kad

se primijene okomiti protoci, bilo konstantnom ili gradijentnom brzinom, komponente se razdvajaju prema brzini eluiranja (primjerice, manji peptidi eluiraju se brže od većih peptida). Integracija s MALS, UV- i RI (refrakcijski indeks) detektorima omogućava određivanje prosječne molekulske mase i polidisperznosti, mase i kvadratne srednje vrijednosti polumjera (RMS) izračunavanjem bez potrebe za primjenom referentnih standarda (Rogstad i sur., 2015).

Nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija može se koristiti za usporedbu sekundarne strukture, relativnog aminokiselinskog sastava intaktnih peptidnih lanaca te sadržaja pomoćnih tvari u ovakvim kompleksnim formulacijama. NMR podaci mogu se koristiti za određivanje relativnih omjera prisutnih aminokiselina ukoliko su pokusi provedeni u kvantitativnom smislu te je u spektru prisutan barem jedan poznat signal za svaku aminokiselinu (Rogstad i sur., 2015).

Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije može se koristiti za razdvajanje ko-polimera i uspoređivanje prisutnosti i zastupljenosti različitih peptidnih sekvenci. LC-MS podaci pokazali su da iako dva različita glatiramoida sadrže puno identičnih pikova, oni se mogu razlikovati vizualno kromatografskom usporedbom i statistički diferencijalnom analizom. Značajne razlike među njima mogu se uočiti primjenom klasifikacijskih metoda kao što je SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy). Ta metoda pokazala se dovoljno osjetljivom za detekciju razlika između različitih serija lijeka Copaxone (Rogstad i sur., 2015).

Za određivanje koncentracije i enzimске aktivnosti peptida uobičajeno se koristi ultraljubičasta apsorpcijska spektroskopija. Ovi testovi trebaju se izvesti tamo gdje je to prikladno prilikom karakterizacije peptida. Primjerice, monografije sintetskih peptida koji sadrže triptofan, specificiraju prisutnost apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 278 nm. Međutim, dva međusobno slična sintetska peptida, goserelin i leuprorelin, u monografiji nemaju propisan UV test, što govori da on nije uvijek nužan za kontrolu kvalitete ukoliko su dostupne druge moderne spektroskopske metode (Rastogi i sur., 2019; Vergote i sur., 2009). Zbog prisutnosti kiralnih asimetričnih ugljikovih atoma u strukturi, peptidi su optički aktivni, tj. zakreću ravninu polarizirane svjetlosti koja kroz njih prolazi. Optička rotacija peptida može se ispitati polarimetrijom, odnosno mjerenjem specifičnog kuta rotacije primjenom polarimetra. Takva metoda postupno se zamjenjuje primjenom kiralne kromatografije.

Dinamička sorpcija vode jest gravimetrijska metoda kojom se utvrđuje promjena mase uzorka obzirom na različite uvjete relativne vlažnosti u njegovoj okolini. Peptidni spojevi su higroskopi, pa se mogu istraživati i njihova higroskopsnost međusobno uspoređivati upotrebom

ove metode. Također, ovom metodom može se promatrati nastajanje hidrata, formiranje kristala, te promjena brzine reakcije u ovisnosti o količini prisutne vode. Ova metoda uključuje izlaganje uzorka različitim vrijednostima relativne vlažnosti i mjerenje promjene mase u vremenu. Uzorak treba postići gravimetrijsku ravnotežu pri svakoj vrijednosti relativne vlažnosti prije njezine promjene. Izoterma sorpcije prikazuje odnos između ravnotežnog sadržaja vode i vlažnosti uzorka, odnosno prikazuje sadržaj vode u uzorku pri određenoj vrijednosti relativne vlažnosti. Sorpcijska izoterma dobiva se izlaganjem uzorka rastućim vrijednostima relativne vlažnosti, a naknadnim snižavanjem vrijednosti relativne vlažnosti dobiva se desorpcijska izoterma. Razlika tih dviju izoterma jest histereza, a iz nje se dobiva dojam o poroznosti uzorka i mehanizmu sorpcije.

Većina lijekova na tržištu dostupna je u obliku soli, budući da takav oblik omogućuje jednostavnije postizanje ciljanih fizikalno-kemijskih svojstava lijeka, poput topljivosti, stabilnosti te bioraspoloživosti. U tu svrhu koristi se širok spektar organskih i anorganskih aniona i kationa, ovisno o djelatnoj tvari i obliku u kojemu se nalazi pri određenoj pH vrijednosti. U slučaju peptidnih lijekova, također je moguća prisutnost nekih soli kao onečišćenja zaostalih tijekom proizvodnje, poput soli trifloroctene kiseline koja se koristi u sintezi. Posljedično, određivanje suprotnih iona općeniti je farmakopejski zahtjev za peptide. Ono se najčešće provodi ionskom kromatografijom koja detektira vodljivost te metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) s CAD (Charged Aerosol Detection) i/ili UV detekcijom.

Analizom termičkih svojstava te sadržaja vode dobiva se uvid u fizikalno ponašanje i stabilnost proteina i peptida, što je važno prilikom formuliranja takvih lijekova. Primjerice, prisutnost ostatne vlage u peptidnim lijekovima može dovesti do interakcija vode i peptida te utjecati na potentnost i stabilnost lijeka, kao i na temperaturu staklastog prijelaza. Viši sadržaj vlage rezultira u nižim temperaturama staklastog prijelaza i denaturacije. Pojam ostatne vlage odnosi se na vodu zaostalu u niskom udjelu (1-5%) na površini liofiliziranog peptida nakon uklanjanja otapala. Awotwe-Otoo i suradnici usporedili su svojstva peptidnog lijeka protamin sulfata iz različitih izvora koristeći termičke i spektroskopske analitičke metode. Termička analiza uzoraka provedena je termogravimetrijskom analizom, moduliranom diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom te mjerenjem gubitka sušenjem. Metode primijenjene u ovom istraživanju uspješno su detektirale razlike u termičkim svojstvima poput sadržaja vlage, temperature staklastog prijelaza i temperature denaturacije između uzoraka protamin sulfata

dobivenih iz različitih izvora te bi se analogno mogle koristiti i prilikom pristupa sličnim peptidnim lijekovima (Awotwe-Otoo i sur., 2012.).

4.3.3. Karakterizacija strukture peptida

Široki niz analitičkih metoda potreban je za određivanje strukture peptida i njezine kompleksnosti. Karakterizacija strukture peptida osnova je za njegovu identifikaciju.

4.3.3.1. Primarna struktura

Primarna struktura peptida može biti kritični čimbenik koji određuje njegovu imunogenost, pa se zato analiza aminokiselinskog slijeda koristi u predviđanju imunogenosti peptida. Zahvaljujući tome, tijekom razvoja lijeka moguće je odabrati peptid koji ima minimalan potencijal za izazivanje imunološkog odgovora organizma (Wu, 2019). Primarna struktura i položaj disulfidnih veza u peptidu kritične su determinante istovjetnosti generičkog i originalnog peptidnog lijeka. Peptidi proizvedeni metodama kemijske sinteze uglavnom imaju već točno definiran sastav i poredak aminokiselina u peptidnom lancu, pa se tehnike karakterizacije primarne strukture uglavnom koriste za njihovo potvrđivanje (Wu i sur., 2017).

Analiza slijeda aminokiselina može se provesti kromatografskim metodama koje su spregnute sa metodama sekvencioniranja, poput Edmanove degradacije ili peptidnog mapiranja spregnutog s masenom spektrometrijom. Jednostavne metode analize aminokiselinskog slijeda i sekvencioniranja nisu u mogućnosti u potpunosti rasvijetliti strukturu peptida i proteina koji sadrže disulfidne veze (npr. kalcitonin iz lososa) jer ih ne mogu identificirati, pa se u tu svrhu može koristiti kombinacija Edmanove degradacije i tandemске masene spektrometrije (Wu, 2019; Wu i sur., 2017). Do cjelokupne informacije o aminokiselinskom slijedu cikličkih peptida nastalih formiranjem disulfidne veze također nije moguće doći korištenjem konvencionalnih metoda, pa je potrebna primjena metoda poput masene spektrometrije (Johnson i sur., 2015).

Tablica 2. Pregled analitičkih tehnika korištenih u analizi primarne strukture peptida

| Analitička tehnika | Primjena tehnike |
|-------------------------|---|
| Peptidno mapiranje | Potvrda primarne strukture i identifikacija; sekvencioniranje peptida; identifikacija onečišćenja |
| Aminokiselinska analiza | Identifikacija i određivanje peptida i proteina |

| | |
|----------------------|---|
| Edmanova degradacija | Sekvencioniranje peptida veličine do 30 aminokiselina |
| MS, tandemaska MS | Identifikacija te karakterizacija peptida i onečišćenja |

Peptidno mapiranje je tehnika otiska prsta kojom se potvrđuje primarna struktura peptida, a koristi se i za sekvencioniranje nepoznatih proteina i identifikaciju onečišćenja u proteinu. To je metoda identifikacije peptida i proteina propisana Europskom farmakopejom. Budući da je peptidno mapiranje vrlo osjetljiva tehnika kojom se može detektirati zamjena samo jedne aminokiseline u peptidu, koristi se i u analizi stabilnosti ekspresije u proizvodima dobivenim rekombinantnom DNA tehnologijom. Peptidno mapiranje započinje izolacijom i čišćenjem peptida, što je postupak propisan u monografiji. Pročišćeni peptid zatim se podvrgava selektivnom cijepanju peptidnih veza koje može biti kemijsko ili enzimsko. Dobiveni peptidni fragmenti kromatografski se odjeljuju iz smjese te podliježu analizi i identifikaciji, najčešće vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektroskopije. Moguće je također identificirati proteinsko odstupanje usporedbom peptidne mape s poredbenim peptidom.

Aminokiselinska analiza podrazumijeva određivanje aminokiselinskog sastava peptida i proteina. Aminokiselinskom analizom mogu se identificirati i kvantificirati peptidi i proteini te detektirati atipične aminokiseline u njihovom sastavu. Također, ova metoda doprinosi strukturnoj analizi peptida i proteina. Peptid se najprije hidrolizira jednom od metoda propisanih u Europskoj farmakopeji te se zatim uzorak analizira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Kako bi bila moguća detekcija, uzorak je potrebno derivatizirati prije ili poslije ulaska uzorka u kromatografsku kolonu. Uobičajeno korišteni detektori za detekciju aminokiselinskog sastava su UV i fluorescencijski detektor. Usporedbom kromatograma uzorka s kromatogramom aminokiselinskog standarda zaključuje se o aminokiselinskom sastavu proteina. Aminokiselinskom analizom može se dobiti informacija o molnom aminokiselinskom udjelu te je moguće procijeniti koncentraciju nepoznatog proteinskog uzorka.

Edmanova degradacija je metoda sekvenciranja aminokiselina u peptidu. To je N-terminalna metoda sekvenciranja koja započinje označavanjem aminokiselinskog ostatka na N-kraju peptida te zatim dolazi do pucanja peptidne veze između tog i susjednog aminokiselinskog ostatka u peptidnom lancu. Pritom ne dolazi do kidanja ostalih peptidnih veza unutar peptida.

Odcijepljeni aminokiselinski ostatak s N-kraja peptida zatim se najčešće kromatografskim metodama odjeljuje iz smjese, identificira te se ponavljanjem postupka dolazi do informacije o cjelokupnom aminokiselinskom slijedu peptida. Ova metoda prikladna je za određivanje aminokiselinskog slijeda peptida koji sadrže do 30 aminokiselinskih ostataka. Također, metoda nije prikladna za peptide koji imaju modificirani N-kraj niti za sekvenciranje cikličkih peptida.

Masena spektrometrija vrlo je korisna metoda u istraživanju terapijskih peptida i proteina te protutijela. U kombinaciji s kromatografskim odjeljivanjem (LC-MS, GC-MS), najbolja je metoda za identifikaciju i karakterizaciju strukture tragova onečišćenja, te određivanje lijeka i njegovih metabolita u različitim uzorcima. Masena spektrometrija koristi se za potvrdu identiteta ljekovitih tvari te određivanje strukture analizom njihovih fragmenata. Njome se određuje molekulska masa ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule dobivenog njezinim cijepanjem. Maseni spektrometar daje spektar masa koji pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih entiteta u odnosu na omjer njihove mase i naboja. Maseni spektar karakterističan je za ispitivanu tvar. Ionizacija molekule uzorka može se postići različitim metodama, primjerice djelovanjem snopa elektrona (electron impact; EI), kemijski (chemical ionization; CI), kemijskom ionizacijom kod atmosferskog tlaka (atmospheric-pressure chemical ionization; APCI), elektrosprej ionizacijom (electrospray ionization; ESI), te matriksom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (matrix-assisted laser desorption ionization; MALDI). Nastali ioni razdvajaju se prema masi primjenom električnog ili magnetskog polja u različitim vrstama analizatora, poput magnetskog analizatora, kvadropolnog analizatora masa, ion-trap analizatora te analizatora vremena leta (time of flight; TOF).

Tandemska masena spektrometrija (MS/MS) izrazito je moćna metoda masene spektrometrije u kojoj se za razdvajanje nastalih iona koristi više serijski spojenih analizatora. Zeng i sur. uspješno su potvrdili aminokiselinski slijed kalcitonina iz lososa koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemske masene spektrometrije visoke rezolucije (LC-MS/MS). MS/MS analiza u kombinaciji s točnim određivanjem molekulske mase omogućava određivanje aminokiselinskog sastava i potvrdu aminokiselinskog slijeda. Ukoliko bi došlo do određene promjene u slijedu, poput deaminacije, promjene mjesta modifikacije ili nedostatka disulfidne veze, ovakav pristup takvu bi promjenu uspješno identificirao (Zeng i sur., 2015). LC-MS/MS metoda također može uspješno detektirati prisutnost atipičnih aminokiselina u peptidu (Boutin i sur., 2019).

Struktura cikličkih peptida koji sadrže disulfidne veze može se rasvijetliti korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS) kojem prethodi redukcija disulfidne veze uz reducens poput ditionitola. Ova metoda također se može koristiti za dokazivanje prisutnosti ili odsutnosti linearnog peptidnog prekursora u uzorku. Za karakterizaciju strukture cikličkih peptida mogu poslužiti i NMR metode poput $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ i $^1\text{H-NOESY}$ (Johnson i sur., 2016).

4.3.3.2. Sekundarna struktura

Karakterizacija sekundarne strukture peptida izrazito je važna jer strukturna uređenost peptida utječe na njegovu biološku aktivnost. Peptidi koji u svojem sastavu sadrže manje od 40 aminokiselina imaju vrlo fleksibilnu konformaciju zbog prisutnosti mnogo nasumičnih zavoja te α -uzvojnica i/ili β -nabranih ploča (Wu, 2019; Wu i sur., 2017).

Uobičajeno korištene metode za karakterizaciju peptidne sekundarne strukture su metoda cirkularnog dikroizma (CD), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), Raman spektroskopija, fluorescencijska spektroskopija, nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija (NMR) i rendgenska kristalografija (Wu, 2019).

Tablica 3. Pregled analitičkih tehnika korištenih u analizi sekundarne strukture peptida

| Analitička tehnika | Primjena tehnike |
|---|---|
| Cirkularni dikroizam | Detekcija i kvantifikacija sekundarne strukture |
| Infracrvena spektroskopija (FTIR) | Predviđanje i određivanje sekundarne strukture peptida i razlučivanje tipa strukture |
| Vibracijski cirkularni dikroizam | Kvalitativna i kvantitativna analiza peptida i proteina |
| Raman spektroskopija | Razjašnjenje peptidne strukture, proučavanje lokalnih interakcija u peptidu |
| Fluorescencijska spektroskopija | Ispitivanje struktura peptida koji sadrže Tyr, Trp, Phe ostatke; ispitivanje pravilnog smatanja peptida |
| Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija | Određivanje peptidnih struktura i razlika među strukturama, metoda „otiska prsta“ |

| | |
|----------------------------|--|
| Rendgenska kristalografija | Određivanje vrste i prostornog rasporeda atoma i kemijskih veza u molekuli |
|----------------------------|--|

Cirkularni dikroizam (CD) optička je tehnika kojom se mogu detektirati i kvantificirati kiralni spojevi, a temelji se na mjerenju razlike u apsorpciji lijevo i desno kružno polarizirane svjetlosti optički aktivnih tvari. Smatra se jednom od najvrjednijih tehnika korištenih za proučavanje strukture peptida i proteina u otopini (D'Hondt i sur., 2014). Negativan signal ili vrpca u CD spektru označavaju veću apsorpciju lijevo polarizirane kružne svjetlosti, dok se prilikom veće apsorpcije desno polarizirane kružne svjetlosti u spektru javlja pozitivan signal. Budući da su peptidi i proteini optički aktivni, iz CD spektra dobivenog korištenjem CD spektrometra može se dobiti informacija o konformaciji polipeptidnih lanaca. Kromofori u slučaju peptida su peptidna veza koja pokazuje apsorpcijsku vrpcu ispod 240 nm i služi za određivanje sekundarne strukture, bočni ogranci aromatskih aminokiselina koji pokazuju apsorpciju u rasponu 260-320 nm i disulfidna veza koja pokazuje široku i slabu apsorpcijsku vrpcu oko 260 nm (D'Hondt i sur., 2014). Cirkularni dikroizam u kojem se koristi zračenje valnih duljina 170-250 nm može se koristiti za analizu strukture α -uzvojnice, dok je zračenje valnih duljina 250-320 nm pogodno za analizu utjecaja vanjskih utjecaja na okolinu aromatskih aminokiselina (Wu i sur., 2017). Proteini sa značajnim udjelom α -uzvojnice u strukturi pokazuju negativne vrpce na 222 i 208 nm, dok proteini sa značajnim udjelom β -nabranih ploča pokazuju negativnu vrpcu blizu 216 nm i pozitivnu vrpcu između 195 i 200 nm. Prisutnost strukture nasumičnog klupka uzrokuje prisutnost snažne negativne vrpce na 200 nm (Awotwe-Otoo i sur., 2012). Tehnika cirkularnog dikroizma je ne-destruktivna, brza i jednostavna analitička tehnika koja zahtijeva male količine uzorka (D'Hondt i sur., 2014).

Infracrvena spektroskopija (IR) analitička je metoda u kojoj se uzorak izlaže djelovanju infracrvenog zračenja (valne duljine 2.5-50 μ m) koje uzrokuje promjenu vibracijske energije molekule uzorka. Vibracije molekula ovise o masi i broju atoma u molekuli, jačini veze između atoma te prostornom rasporedu atoma. IR spektrofotometar analizom uzorka daje IR spektar koji prikazuje apsorpcijske vrpce. Apsorpcijske vrpce se pojavljuju kad vibracija uzrokuje promjenu u raspodjeli naboja molekule. IR spektar se interpretira obzirom na položaj i intenzitet apsorpcijske vrpce, te usporedbom karakterističnih područja IR spektra, poput područja otiska prsta, područja aromatske strukture i područja karakterističnih funkcionalnih skupina s bazom podataka. Kod infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) monokromator obično prisutan u IR spektrofotometru zamijenjen je interferometrom te se

snimanjem apsorpcije zračenja u širem spektralnom području dobije interferogram. Interferogram daje prikaz ovisnosti intenziteta apsorpcije zračenja o valnom broju te je dobiven primjenom matematičke formule Fourierove transformacije za pretvaranje analognih podataka u digitalni oblik. Opaženo je devet karakterističnih IR apsorpcijskih vrpca amidne veze, koje su nazvane amidna vrpca A, B i I-VII, u nizu prema padajućoj frekvenciji apsorpcije. Za istraživanje peptidne strukture pogodne su amidna vrpca I (80% CO rastezanje, oko 1650 cm^{-1}), amidna vrpca II (60% NH savijanje i 40% CN istezanje, oko 1550 cm^{-1}) i amidna vrpca III (40% CN istezanje, 30% NH savijanje, oko 1300 cm^{-1}) (D'Hondt i sur., 2014). Svi amidi imaju jednu ili više apsorpcijskih vrpca srednjeg do jakog intenziteta, koje mogu biti široke, u području od 695 do 550 cm^{-1} koje se vjerojatno pojavljuju zbog savijanja skupine NCO. U proučavanju sekundarne strukture peptida i proteina infracrvenom spektroskopijom najviše se koristi amidna vrpca I, koja se nalazi u području od 1700 do 1600 cm^{-1} i koja se pojavljuje većinom zbog vibracijskog rastezanja CO veze povezanog sa savijanjem NH veze. To područje vrlo je osjetljivo na male promjene u geometriji molekule i profilu vodikovih veza, pa shodno tome svaki tip sekundarne strukture peptida daje drukčiji oblik vrpce (Awotwe-Otoo i sur., 2012). Različiti profili vodikovih veza daju različite pomake u frekvenciji vibracijskog rastezanja CO veze (D'Hondt i sur., 2014). FTIR metoda može se koristiti za predviđanje nastanka β -nabranih ploča te razlučivanje njihovih paralelnih i antiparalelnih oblika, kao i agregata (Wu, 2019). Ponekad u spektru može doći do preklapanja dijelova vrpca koji predstavljaju određene strukturne komponente, što dovodi do otežanog povezivanja signala sa strukturom. U takvom slučaju moguće je derivirati spektar kako bi se povećala rezolucija vrpca (Awotwe-Otoo i sur., 2012).

U vibracijskom cirkularnom dikroizmu (VCD) koristi se kombinacija pristupa cirkularnog dikroizma i infracrvene spektroskopije. Ova tehnika može se koristiti u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi peptida i proteina, budući da uzima u obzir varijabilnost oblika vrpca u cirkularnom dikroizmu i razlučivost frekvencija u infracrvenoj spektroskopiji (D'Hondt i sur., 2014).

Raman spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije koja se između ostalog koristi i u analizi peptidnih farmaceutika. U Raman spektrometru uzorak se ekscitira laserskom zrakom valne duljine zračenja 450 - 800 nm . Uslijed vibracija mijenja se polarnost elektronskog oblaka koji obavija molekulu uzorka. Prolaskom kroz monokromator i rasipanjem raspršenih zraka na prizmi mjeri se Ramanovo (neelastično) raspršenje na detektoru koji daje Raman spektar uzorka. Vibracijske frekvencije ovise o jačini veze, masi vezanih atoma i intermolekulskim

interakcijama, pa se analizom Raman pomaka funkcionalnih skupina uzorka može razjasniti njegova struktura. Peptidi su vrlo higroskopni, a budući da apsorpcija vode slabo utječe na metodu Raman spektroskopije, ona se može koristiti i za proučavanje lokalnih interakcija u koje su uključeni cisteinski i tirozinski aminokiselinski ostatci (Wu, 2019).

Fluorescencijska spektroskopija je molekulska emisijska spektroskopija u kojoj se molekule pobuđuju ultraljubičastim ili vidljivim zračenjem te se mjeri intenzitet emitiranog zračenja prilikom povratka u osnovno stanje. Fluorescencija je jedan od mehanizama povratka molekule u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja, tijekom kojeg se apsorbirano zračenje emitira na većim valnim duljinama. U fluorescencijskom spektrofotometru detektira se fluorescirajuće zračenje te se dobije fluorescentni spektar uzorka. Fluorescentne vrste su molekule s više kromofora i krute strukture, poput spojeva s visoko konjugiranim dvostrukim vezama, spojeva s aromatskim prstenovima i cikličkih karbonilnih spojeva. Peptidi pokazuju jaku fluorescenciju zbog tirozinskih, triptofanskih te fenilalaninskih ostataka prisutnih u sastavu. Fluorescencijska spektroskopija se također uz primjenu određenih fluorofora, poput boje Tioflavin T može koristiti za istraživanje prisutnosti nepravilno smotanih peptida i peptidnih agregata.

Nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (NMR) analitička je metoda koja se koristi za analizu strukture organskih spojeva, određivanje onečišćenja, lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama te za kvantitativnu analizu ljekovitih tvari. Uz rendgensku strukturnu analizu, NMR je najbolja tehnika za pouzdano određivanje molekulske strukture. Temelji se na postojanju stalnog magnetskog momenta jezgri (spin) izotopa ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N koje se u prisutnosti vanjskog magnetskog polja usmjeravaju paralelno ili antiparalelno u odnosu na njegov smjer. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja radiofrekvencije koje je rezonantno s frekvencijom jezgre, jezgre prelaze na višu energetska razinu te povratkom u osnovno stanje emitiraju zračenje koje daje signal u NMR spektru. Položaj pri kojemu nastupa rezonancija pojedine jezgre jest kemijski pomak (Hz), a na njega utječu elektroni u okolini jezgre koji svojim magnetskim poljem zaklanjaju jezgru od polja vanjskog magneta. Apsorpcija i emisija energije vezane su uz zakretanje spina jezgre. Magnetsko međudjelovanje jezgara susjednih atoma uzrokuje cijepanje signala spregom spinova. Rezonantna frekvencija jezgre i složeno cijepanje signala karakteristični su za strukturu molekule, pa se interpretacijom NMR spektra dolazi do informacije o strukturi tvari. NMR spektar daje odnos između intenziteta signala i kemijskog pomaka. NMR spektrometrom mogu se snimati ^1H spektri, ^{13}C spektri te također i dvodimenzionalni NMR spektri, poput ^1H - ^1H (NOESY, TOCSY), ^{13}C - ^{13}C , ^1H - ^{13}C spektara.

Zbog strukturne kompleksnosti većine peptida, naročito onih većih od 15 aminokiselina, dolazi do djelomičnog preklapanja signala u ^1H i ^{13}C NMR spektru. Takvi signali mogu se asignirati korištenjem dvodimenzionalnih NMR metoda (D'Hondt i sur., 2014). Dvodimenzionalne NMR metode poput NOESY i TOCSY obično se koriste kao metode otiska prsta („fingerprint“ metode) u određivanju peptidne strukture i potencijalnih razlika u peptidnoj strukturi uzrokovanih određenim vanjskim čimbenicima, poput promjene u pomoćnim tvarima formulacije (Wu i sur., 2017). Raspon u kojemu se nalaze kemijski pomaci atoma amidne skupine ili ugljikovodične okosnice peptida vrlo je osjetljiv na promjene u aminokiselinskom slijedu peptida, sekundarnoj i tercijarnoj strukturi te na promjene u uvjetima okoline (Awotwe-Otoo i sur., 2012). Obzirom na takvu osjetljivost, ove metode prikladne su za dokazivanje istovjetnosti strukture višeg reda generičkog i originalnog peptida.

Rendgenska kristalografija je metoda određivanja trodimenzionalne strukture molekula difrakcijom rendgenskih zraka na monokristalu. Ovom metodom mogu se odrediti vrsta i prostorni raspored atoma te duljine i vrste kemijskih veza u molekuli. Monokromatske X-zrake padaju na kristal, na njemu se lome i dolaze na detektor te se kao rezultat dobije 3D mapa elektronske gustoće iz koje se može projicirati struktura molekule te njena konformacija i konfiguracija.

Prilikom karakterizacije peptida potrebno je koristiti ortogonalne metode kako bi se osiguralo točno određivanje sekundarne strukture, budući da pojedinačna metoda karakterizacije može dati informaciju samo s određenog aspekta strukture višeg reda (Wu i sur., 2017). Nuklearna magnetska rezonancija i rendgenska kristalografija trenutno su jedine metode kojima se može karakterizirati cjelokupna molekularna struktura peptida jer daju informaciju o relativnom položaju svih atoma u peptidnom lancu.

Većina peptidnih lijekova ima visoku termodinamički uvjetovanu konformacijsku fleksibilnost, pa se može zaključiti da generički peptidi koji imaju jednak aminokiselinski slijed te su kvalitativno i kvantitativno jednako formulirani kao i originalni peptidi imaju i njima jednaku strukturu višeg reda (Wu i sur., 2017).

4.3.3.3. Tercijarna struktura

Kao što je ranije navedeno, proteini i neki peptidi složenije građe pokazuju i tercijarnu strukturu za koju je karakteristično postojanje hidrofobnih interakcija, vodikovih veza, ionskih interakcija i disulfidnih veza kojima se postiže smatanje proteina u prostoru. Smatanje i trodimenzionalna struktura peptida često nisu uzeti u obzir prilikom karakterizacije sintetskih

peptida srednje veličine, što može dovesti do propusta u procjeni biološke aktivnosti peptida. Modernim metodama analize, poput ion-mobilnog MS-a (IM-MS) moguće je razlučiti pravilno smotane od nepravilno smotanih peptida (Boutin i sur., 2019).

Tablica 4. Pregled analitičkih tehnika korištenih u analizi peptidne strukture višeg reda

| Analitička tehnika | Primjena tehnike |
|--------------------------------|--|
| Elektrokemijska redukcija s MS | Karakterizacija disulfidnih veza u peptidima |
| Ion-mobilna MS | Ispitivanje pravilnog smatanja i konformacije peptida u prostoru |

Disulfidne veze u peptidima i proteinima nastaju međusobnom reakcijom aminokiselinskih ostataka koji u svojim bočnim ograncima sadrže sumpor u obliku tiolnih funkcionalnih skupina, poput cisteinskih i metioninskih ostataka. Time reducirani oblici sumpora u tiolnim skupina prelaze u oksidirani oblik u disulfidnoj vezi, obično djelovanjem enzima proteinske disulfidne izomeraze. To je važna posttranslacijska modifikacija proteina koja se često može previdjeti primjenom klasičnih metoda analize poput masene spektrometrije (Switzar i sur., 2016). Potvrda pravilnog stvaranja disulfidnih veza kritična je u slučaju proteinskih lijekova. Kod primjene klasične masene spektrometrije za analizu proteina, disulfidne veze se cijepaju u koraku kemijske redukcije, te se zatim cisteinski ostaci alkiliraju kako bi se preveniralo njihovo ponovno nastajanje. Takva metoda rezultira gubitkom informacija o lokaciji i broju disulfidnih veza u proteinu (Switzar i sur., 2016). Starija istraživanja disulfidnih veza u proteinima bila su temeljena uglavnom na MALDI-MS metodi u kombinaciji s označavanjem stabilnih izotopa. Nešto kasnije pojavile su se i metode koje uključuju tekućinsku kromatografiju povezanu s masenom spektrometrijom (LC-MS) ili samo masenu spektrometriju visoke rezolucije. Ovakve metode često su rezultirale prisutnošću reagensa korištenog u redukciji disulfidnih veza koji bi kasnije interferirao s rezultatima dobivenim kromatografskim metodama ili masenom spektrometrijom.

Primjena elektrokemijske redukcije pokazala se uspješnom u karakterizaciji disulfidnih veza, budući da nema potrebe za primjenom reducensa te se lako može kombinirati s masenom spektrometrijom i kompatibilna je s različitim tehnikama ionizacije uzorka. Koristeći kombinaciju elektrokemijske redukcije s ESI-MS visoke rezolucije, Switzar i suradnici uspješno su okarakterizirali disulfidne veze u oksitocinu i hepcidinu. Također, razvijena je i online LC-EC-MS platforma za karakterizaciju disulfidnih veza u proteinu u kojoj su

kombinirane tekućinska kromatografija (LC) za odjeljivanje s elektrokemijskom redukcijom te analizom mase disulfidno vezanih peptida s FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) ESI-MS. Njome su navedeni znanstvenici uspješno karakterizirali sve prisutne inter- i intra-disulfidne veze u β -laktoglobulinu i ribonukleazi B te dokazali da je online LC-EC-MS metoda primjenjiva u njihovoj karakterizaciji (Switzar i sur., 2016).

Ion-mobilna masena spektrometrija (IM-MS) moderna je metoda razvijena u području native spektrometrije koja daje informaciju o konformaciji i smatanju peptida. Ovom metodom se molekularni ioni u plinovitoj fazi razdvajaju na temelju njihove mase i interakcije s kolizijskim plinom. Način interakcije s kolizijskim plinom povezan je s veličinom i oblikom molekularnih iona u plinovitoj fazi. Dosadašnjom primjenom IM-MS metode, karakterizirani su konjugati peptida i sintetskih polimera, proučavane su preferencije konformera hidrofobnih antimikrobnih peptida, identificirana je topologija novootkrivenih prirodnih antibakterijskih produkata s potencijalom primjene u medicinske svrhe (lasso peptidi), te su uspješno razdvojeni peptidi s D-aminokiselinama (Boutin i sur., 2019).

4.3.4. Imunogenost

Imunogenost peptidnih proizvoda vrlo je važna budući da može imati kliničke posljedice, uključujući proizvodnju protutijela u odgovoru na terapijski peptid, gubitak učinkovitosti terapijskog peptida, neutralizaciju sličnog peptida prisutnog u organizmu i opće učinke na imunološki sustav, uključujući alergijske i anafilaktičke reakcije. Primarna struktura peptida odlučujući je čimbenik njegove imunogenosti. Analizom sekvence moguće je tijekom razvoja peptidnog lijeka odabrati onaj s minimalnim potencijalom uzrokovanja imunoloških reakcija (Wu, 2019).

Čimbenici koji utječu na sigurnost primjene, odnosno imunogenost peptidnog ili proteinskog lijeka mogu biti povezani s lijekom i procesom proizvodnje. To mogu biti onečišćenja slična peptidima, agregati, formulacijski čimbenici poput pomoćnih tvari te tvari koje mogu potjecati iz ambalaže lijeka. Kontrola i usporedivost ovih čimbenika kritična je za osiguravanje sigurnosti primjene i istovjetnosti generičkog i originalnog lijeka, što su Lee i suradnici 2010. godine pokazali na primjeru generičkog sintetskog kalcitonina iz lososa u formulaciji nazalnog spreja (Lee i sur., 2010.). Najveći problem pri terapijskoj primjeni kalcitonina iz lososa jest njegov potencijal izazivanja neželjenih imunogenih reakcija, budući da se one javljaju kod čak 40-70% pacijenata koji ga primjenjuju (Grauer i sur., 1995.).

Istraživanja su pokazala da je imunogeni odgovor na primjenu kalcitonina iz lososa uvjetovan slijedom aminokiselina u epitopu kalcitonina koji nije prisutan u sekvenci humanog kalcitonina te je stran ljudskom imunološkom sustavu. U skladu s time, potrebno je odrediti aminokiselinsku sekvencu, odnosno primarnu strukturu peptida kako bi se mogla isključiti imunogenost (Lee i sur., 2010.). Svi nepoznati peptidi aktiviraju imunološki sustav, a što je niža razina homologije terapijskog peptida i peptida prisutnih u organizmu, to je jača njegova imunogenost. Imunološki sustav čovjeka sposoban je detektirati male razlike među strukturama sintetskog peptida i onog prisutnog u organizmu (Wu i sur., 2017.).

Agregati peptidnog lijeka također mogu pobuditi imunološki odgovor organizma te imati kliničke učinke, poput proizvodnje protutijela te reakcija preosjetljivosti. Oni mogu nastati prilikom proizvodnje ljekovite tvari, ljekovitog oblika i tijekom skladištenja, na što utječe i način formulacije lijeka koji treba biti takav da održava peptid u stabilnoj aktivnoj konformaciji kako bi se smanjila vjerojatnost kemijskog raspada, odmotavanja peptida te nastanka agregata (Lee i sur., 2010.). Agregati terapijskih peptida i proteina koji imaju najmanje 10-20 epitopa koji se ponavljaju svakih 100 Å te su veći od 100 kDa mogu uzrokovati imunološki odgovor aktivirajući T-limfocite koji potiču proizvodnju protutijela (Wu, 2019.). Pokazano je da su veći agregati imunogeničniji od manjih dimera i trimera. Tome također pridonosi njihova niža topljivost, budući da su netopljivi agregati imunogeničniji od topljivih te stimuliraju imunološki odgovor alternativnim mehanizmima (Xiang, 2006.). Agregati velike molekulske mase mogu uzrokovati imunološki odgovor koji dovodi do smanjenja terapijske aktivnosti peptida. Također, formiranjem nekih agregata mogu nastati novi epitopi koji ne smanjuju aktivnost peptida, ali dovode do reakcija preosjetljivosti. Molekule kalcitonina iz lososa pokazuju sklonost spajanju u dimere te daljnjoj agregaciji, te je pri određivanju istovjetnosti sintetskog generičkog kalcitonina i originalnog lijeka potrebno napraviti usporednu analizu njihovih agregacijskih profila. Analizom se uspoređuju veličine peptidnih agregata i razine uzrokovanih imunoloških odgovora te se osigurava da ne postoji bitna razlika među njihovim agregatima koja bi utjecala na imunogenost, naročito pri primjeni različitih pomoćnih tvari u tim formulacijama. Analizu agregata moguće je provesti kombinacijama metodama poput size-exclusion kromatografije (SEC), analitičkog ultracentrifugiranja (AUC), nuklearne magnetske rezonantne spektroskopije (NMR), field flow frakcioniranja (FFF) i dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) kako bi se omogućila analiza agregata širokog spektra veličina. Također je poželjno provesti i analizu subvidljivih čestica u rangu veličine 2-10 μm (Wu, 2019.; Lee i sur., 2010.).

Modifikacijama peptidnih lijekova poput oksidacije, deamidacije, hidrolize, epimerizacije i dr. nastaju peptidima srodna onečišćenja koja također mogu utjecati na imunogenost peptidnih lijekova te njihovu terapijsku aktivnost. Ukoliko je način proizvodnje peptidnih lijekova različit (primjerice kemijska sinteza u odnosu na rekombinantnu DNA tehnologiju ili izolaciju iz prirodnih izvora), može se očekivati i različit profil onečišćenja tih lijekova (Wu i sur., 2017.). Deamidacija je češće opažena kod peptida nego kod većih proteina te znatno povećava njihovu agregaciju te tako utječe na imunogenost. Epimerizacijom i racemizacijom peptidnih lijekova mogu nastati D-enantiomeri koji mogu pojačati ili umanjiti ukupnu imunogenost ovisno o tipu i broju tih promjena. Ove modifikacije također mogu nastati prilikom proizvodnje i skladištenja peptidnih lijekova te je potrebno usporediti profile onečišćenja generičkog i originalnog peptidnog lijeka pri različitim uvjetima (Lee i sur., 2010.). Smanjenje rizika od imunogenosti generičkih peptida moguće je postići dokazom da onečišćenja prisutna u generičkom lijeku ne uzrokuju stimulaciju imunološkog sustava jaču od onečišćenja prisutnih u originalnom lijeku. To se može ispitati provođenjem *in silico* i *in vitro* studija kojima se određuje afinitet vezanja peptida na glavni kompleks tkivne histokompatibilnosti (MHC). Na taj način mogu se identificirati peptidna onečišćenja odgovorna za uzrokovanje imunološkog odgovora i odrediti rizik imunogenosti u slučaju onečišćenja različitih od onih prisutnih u originalnom lijeku (Wu, 2019., Wu i sur., 2017.). Dodatnu pažnju potrebno je posvetiti pegiliranim peptidima. Kemijska modifikacija peptida uzrokovana dodavanjem polietilenglikolnih lanaca dovodi do smanjenja njegove imunogenosti zbog mehaničkog zasjenjenja antigenskih epitopa većim lancima polietilenglikola, ali istovremeno se dodavanjem lanaca povećava ukupna veličina peptida, što dovodi do smanjenja bubrežne filtracije peptida i promjene biološke raspodjele. Utjecaj pegilacije ovisi o broju, molekulskoj masi, strukturi i položaju polietilenglikolnih lanaca na peptidu. Potrebno je pažljivo pristupiti ispitivanju imunogenosti takvih peptida jer određene studije pokazuju da pegilacija izaziva proizvodnju anti-PEG protutijela (Garay, 2012.; Wang i sur., 2007.; Sroda, 2005.).

Ukoliko se formulacije generičkog i originalnog peptidnog lijeka razlikuju, potrebno je proučiti utjecaj razlika na stabilnost peptida kako ne bi došlo do pojačane imunogene reakcije. To je moguće učiniti provođenjem usporednih stabilitetnih studija u stvarnom vremenu te ubrzanih studija degradacije. Važno je proučiti interakcije pomoćnih tvari s peptidom jer pomoćne tvari mogu pojačati imunogenost vezanjem na peptid i promjenom njegove konformacije te aktivnosti. Takve interakcije mogu dovesti do alergijskih reakcija i anafilaktičkog šoka. Rijetko kada i same pomoćne tvari mogu pokazati imunogenost. Interakcije peptida s pomoćnim

tvarima mogu se istražiti primjenom površinske plazma rezonancije, NMR-a, diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), imunološkim testovima poput ELISA-e te biološkim testovima, npr. testom bioidentiteta propisanim u USP. Ukoliko su u formulacijama generičkog i originalnog peptidnog lijeka prisutne jednake pomoćne tvari, očekivano je da su interakcije između pomoćnih tvari i peptida u generičkom lijeku jednake onima u originalnom. Međutim, postoji mogućnost razlike u kakvoći korištenih pomoćnih tvari što ovisi o proizvođaču te je potrebno procijeniti njihovu kvalitetu (Wu i sur., 2017.; Lee i sur., 2010.).

Prema ICH smjernicama te uputama Američke agencije za hranu i lijekove, u svrhu procjenjivanja istovjetnosti peptidnih lijekova potrebno je ispitati i izlazak tvari iz spremnika („leachables“) koji mogu potjecati iz primarne ambalaže ljekovitog pripravka. U slučaju lijeka Eprex (eritropoetin) uočeno je da određene tvari mogu prijeći iz ambalaže, naročito iz gumenih dijelova, u formulaciju i djelovati kao adjuvansi ili uzrokovati agregaciju i tako dovesti do povećanja imunogenosti. Na difuziju tvari iz ambalaže u lijek može utjecati i sama formulacija. Potrebno je kvalitativno i kvantitativno analizirati i usporediti „leachables profile“ originalnog i generičkog lijeka tijekom vremena skladištenja i ubrzanim stres testovima. Takvo ispitivanje moguće je primjenom plinske ili tekućinske kromatografije vezanih s masenom spektrometrijom kako bi se utvrdila odsutnost „leachables“ ili usporedivost dvaju „leachables profila“. Korištenjem prikladne ambalaže i pažljivim formuliranjem može se smanjiti utjecaj na imunogenost i sigurnost primjene lijeka (Lee i sur., 2010.).

Potencijal imunogenosti generičkih peptidnih lijekova moguće je svesti na najmanju moguću mjeru kontroliranjem njihove kvalitete kroz optimiranje procesa proizvodnje, formuliranja i osiguranjem prikladnih uvjeta čuvanja (Wu, 2019.).

4.3.5. Čistoća i profil onečišćenja

Kvaliteta peptidnog lijeka uvelike ovisi o njegovom profilu onečišćenja s naglaskom na srodna onečišćenja. Takva onečišćenja mogu biti biološki aktivna, mijenjati željeni učinak lijeka ili inducirati neželjenu toksičnost lijeka. Zato su regulatorna tijela uspostavila smjernice i specifikacije kako bi se osigurala konzistentna čistoća peptidnih lijekova. Onečišćenja se klasificiraju na specifična i nespecifična, ovisno o njihovoj pojavnosti i koncentraciji. Specifična onečišćenja je potrebno analizirati i dokumentirati prilikom kontrole kvalitete, a njihovi kriteriji prihvatljivosti su povezani s pragovima detekcije i kvantifikacije.

Farmakopejske monografije zakonski su temelj za aktivne farmaceutske tvari, dok regionalna i internacionalna tijela objavljuju i dodatne smjernice. Za gotove peptidne farmaceutske

proizvode dostupne su samo opće smjernice, budući da je u ICH Q3A i Q3B smjernicama navedeno da se one ne odnose na peptidne lijekove. Izrada profila onečišćenja peptidnih lijekova vrlo je izazovna zbog dostupnog širokog spektra različitih reagensa koje je moguće koristiti u njihovoj proizvodnji (Van Dorpe i sur., 2011). Općenito, preporuke za prijavljivanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja peptida razlikuju se od onih prisutnih u smjernicama za manje molekule lijekova jer peptidne djelatne tvari mogu imati mnogo srodnih peptidnih onečišćenja. Prijedlozi dopuštenih pragova za srodna peptidna onečišćenja koja se pojavljuju uslijed sinteze ili degradacije peptida uglavnom se donose za svaki slučaj posebno, uzimajući u obzir rizik imunogenosti i kliničku namjenu peptida (npr. terapijska primjena, cjepiva, *in vivo* ili *in vitro* dijagnostika). Kao takve, dostupne ICH smjernice za onečišćenja mogu biti prikladne za primjenu samo u slučaju peptida s manje od deset aminokiselina u strukturi. Takvi peptidi mogu se tretirati kao male molekule jer su visoke čistoće i manje vjerojatno izazivaju imunološke reakcije. Za sve ostale peptide, dopuštene razine onečišćenja trebaju biti opravdane, i to kliničkim i toksikološkim podacima u slučaju novih peptida, ili u usporedbi s dostupnim USP, Eu. Pharm, BP i JP monografijama, znanstvenom literaturom, podacima o razvoju i stabilnosti, toksikološkim podacima, značajnim metabolitima aktivne tvari ili s referentnim originalnim lijekom u slučaju generičkih lijekova (Wu, 2019).

Onečišćenja mogu biti povezana s procesom proizvodnje ili s krajnjim proizvodom, mogu se pojaviti prilikom sinteze, proizvodnje ili čuvanja i nužno ih je karakterizirati u potrebnoj mjeri, pa se strogo kontroliraju tijekom razvoja i proizvodnje peptidnih lijekova. U ranoj fazi istraživanja lijeka potrebno je i procijeniti biološku aktivnost onečišćenja kako bi se u kasnijoj fazi mogli izbjeći lažno pozitivni i lažno negativni rezultati uslijed njihove prisutnosti, a to je iznimno važno jer biološki aktivna onečišćenja mogu imati veću aktivnost ili mijenjati biološku aktivnost peptidne djelatne tvari (Van Dorpe i sur., 2011).

Samo selektivne, osjetljive i reproducibilne tehnike potrebno je koristiti kako bi se kvantificirala čistoća peptida. U monografijama peptidnih djelatnih tvari najčešće su prisutne tradicionalne metode poput HPLC-UV uz korištenje C18 stacionarne faze te kromatografija isključenjem veličinom za analizu oligomernih produkata tamo gdje je to potrebno (D'Hondt i sur., 2014). Tradicionalno se koristi vezana metoda RP-HPLC-UV zbog svoje selektivnosti, niskog praga detekcije i kvantifikacije, robustnosti i visoke osjetljivosti, dok HPLC-MS metoda omogućava identifikaciju mogućih prisutnih onečišćenja (Rastogi i sur., 2019; Van Dorpe i sur., 2011; Vergote i sur., 2009). Zeng i suradnici analizirali su peptidna onečišćenja prisutna u petnaest serija lijeka kalcitonina iz lososa od pet različitih proizvođača metodama LC-HRMS i

HPLC-UV. HPLC-UV metodom propisanom u USP opaženo je šest onečišćenja ukupnog sadržaja 2.0%, dok je LC-HRMS metodom uspješno identificirano dvanaest onečišćenja ukupnog sadržaja 2.6%, od kojih su za dva entiteta pragovi detekcije bili ispod 0.1% (Zeng i sur., 2015). Tekućinska kromatografija vezana s tandemskom masenom spektrometrijom je ključna tehnika za detekciju, identifikaciju i određivanje onečišćenja strukturno sličnih peptidima u peptidnom uzorku (Stoppacher i sur., 2013).

Metode odjeljivanja onečišćenja mogu uključivati normalno-faznu HPLC, tankoslojnu kromatografiju (TLC) te kapilarnu zonsku elektroforezu (CZE), dok je detekcija moguća primjenom NMR, fluorescencije, mjerenja refraktivnog indeksa (RI) i ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) (Van Dorpe i sur., 2011). Neke od metoda korištenih u istraživanju i razvoju su također i fused-core UHPLC, kromatografija primjenom superkritičnog fluida, te spektroskopske tehnike poput cirkularnog dikroizma (CD), vibracijskog cirkularnog dikroizma (VCD), Raman te NMR spektroskopije (D'Hondt i sur., 2014).

Stoppacher i suradnici identificirali su i odredili srodna onečišćenja nastala zbog degradacije peptida angiotenzina I koji se koristi kao referentni materijal upotrebom LC-HRMS/MS metode. Optimizirana metoda rezultirala je dobrim razlučivanjem pikova u kromatogramu, što je omogućilo identifikaciju i određivanje onečišćenja. Angiotenzin I eluirao je posljednji, budući da su fragmenti nastali raspadom kraći te su eluirali ranije. Ova metoda može se modificirati te koristiti za identifikaciju i određivanje onečišćenja i drugih peptida te proteina (Stoppacher i sur., 2013).

4.3.5.1. Pregled mogućih onečišćenja peptidnih lijekova

Neovisno o tome je li peptid proizveden kemijskom sintezom ili rekombinantnom DNA tehnologijom, on može sadržavati onečišćenja koja potječu od raspada lijeka koje nastupa tijekom skladištenja ili od samog postupka proizvodnje. Veći izazov jest određivanje procesnih onečišćenja, jer su onečišćenja koja su rezultat raspada tijekom skladištenja očekivano ista kod generičkog i kod originalnog peptidnog lijeka ako te formulacije imaju jednaku djelatnu tvar, uglavnom iste ostale neaktivne pomoćne tvari i iste uvjete čuvanja. Prilikom procjene zahtjeva za odobrenje za stavljanje generičkog peptidnog lijeka na tržište, FDA procjenjuje istovjetnost aktivne tvari, ostalih sastojaka, uvjeta čuvanja i onečišćenja nastalih ovim putem na isti način kako to radi i za ostale nepeptidne lijekove.

Tablica 5. Pregled najčešćih onečišćenja peptidnih lijekova i mehanizma njihovog nastanka

| Onečišćenje | Mehanizam nastanka |
|---------------------------------------|--|
| Denaturacija | Promjena peptidne strukture u prisutnosti denaturirajućeg agensa koja mijenja fizikalno-kemijska i biološka svojstva peptida |
| Proteoliza | Nastupa pri izlaganju uvjetima poput ekstremnog pH, visoke temperature ili enzimima |
| Agregacija i precipitacija | Asocijacija hidrofobnih aminokiselina. Precipitacija nastaje pri većim veličinama agregata |
| Deaminacija | Hidroliza bočne amino skupine aminokiseline pri čemu nastaje slobodna karboksilna skupina |
| Oksidacija i redukcija | Inducirane temperaturom, pH, metalnim ionima i puferima tijekom sinteze i/ili skladištenja |
| Disulfidna izmjena | Promjena konformacije zbog reakcije između disulfidnih skupina unutar peptidnog lanca |
| Diastereoizomerizacija (racemizacija) | Promjena L-aminokiselina u D,L-smjese uz nastanak peptidnih veza osjetljivih na proteolitičke enzime |
| β-eliminacija | Nastaje preko karbanionskog intermedijera, najčešće na Cys, Lys, Phe, Ser i Tyr ostacima uz alkalne uvjete |
| Delecija (nepotpuni coupling) | Nepotpun coupling zbog nepotpunog uklanjanja zaštitne skupine zadnje dodane aminokiseline ili nedovoljna aktivacija aminokiseline koja se dodaje |

| | |
|---|--|
| Fragmentacija | Nedostatak jednog ili više aminokiselinskog ostatka na N- ili C-kraju zbog taloženja kuglica smole tijekom sinteze |
| Insercija aminokiselina | Umetanje dodatne aminokiseline u peptidni slijed zbog viška Fmoc-zaštićenih aminokiselina i nepravilnog ispiranja |
| Nastajanje dimera | Samoasocijacija hidrofobnih aminokiselina u peptidu uz nastajanje agregata |
| Ostali nusprodukti tijekom kemijske sinteze | Nastaju zbog nepotpune hidrolize zaštitnih skupina koje ostaju kovalentno vezane za peptid |
| Peptidi stanice domaćina | Zaostaju kao onečišćenje nakon proizvodnje rekombinantnom DNA tehnologijom |

U delecijaska onečišćenja ubrajaju se onečišćenja nastala tijekom kemijske sinteze uslijed nepotpunog uklanjanja zaštitne skupine zadnje dodane aminokiseline ili nedovoljne aktivacije aminokiseline koja se dodaje te onečišćenja koja su rezultat skraćivanja peptida zbog taloženja smole tijekom sinteze (delecija jedne ili više aminokiselina). Identifikacija ovih onečišćenja provodi se pripisivanjem razlike mase između opaženog onečišćenja i kompletnog peptida određenom aminokiselinskom ostatku, odnosno molekulskoj masi aminokiseline umanjenoj za molekulsku masu vode. Neke od metoda koje se mogu primijeniti za detekciju i identifikaciju delecijaskih onečišćenja su RP-C18 kromatografija i kapilarna elektroforeza spregnuta s MS i zatim MALDI-FT-MS, HPLC-MS, SCX-HPLC (Strong Cation Exchange-HPLC) i dr. (D'Hondt i sur., 2014).

Tijekom kemijske sinteze dodaje se višak Fmoc-zaštićenih aminokiselina kako bi se povećalo iskorištenje reakcije. Ukoliko se višak reagensa ne ispere potpuno, može doći do nastanka onečišćenja uslijed insercije dodatnih aminokiselina u peptid. U takvim onečišćenjima može doći i do acilacije amino skupine tijekom daljnjeg postupka sinteze. Insercijska onečišćenja mogu također nastati i zbog prisutnosti srodnih onečišćenja u početnim materijalima za sintezu peptida, koji se tijekom sinteze prenose u peptid. Opažena su onečišćenja tipa Fmoc- β -Ala i Fmoc- β -Ala-X koja su nastala tijekom pripreme Fmoc-zaštićenih aminokiselina za sintezu. Stoga je potrebno prije sinteze uzeti u obzir i profil čistoće početnih materijala. Identifikacija

inercijskih onečišćenja provodi se analogno identifikaciji delecijских onečišćenja (D'Hondt i sur., 2014).

Određeni aminokiselinski ostatci podložniji su reakcijama oksidacije od drugih. To su primjerice cistein, metionin, histidin, lizin, tirozin te triptofan u kiselim uvjetima. Oksidacijom njihovih funkcionalnih skupina te daljnjim reakcijama kovalentnog povezivanja, ciklizacije i sl. nastaju nova onečišćenja. Primjerice, metionin i cistein sadrže sumpor koji može oksidirati u sulfoksid, sulfon i/ili sudjelovati u nastanku disulfidne veze. U slučaju cisteina, mogu ireverzibilno nastati i disulfidni mostovi. Histidin, tirozin i triptofan su podložni oksidaciji zbog prisutnosti aromatskog prstena u strukturi. Oksidacijski produkti polarniji su od početnog peptida, što može dovesti do drugih promjena u peptidnoj konformaciji te dovesti i do agregacije. Oksidacija se može dogoditi tijekom proizvodnje i skladištenja peptidnog lijeka. Kako bi se mogućnost nastanka oksidacijskih onečišćenja smanjila, potrebno je poznavati čimbenike koji utječu na oksidaciju peptida, uključujući izlaganje svjetlosti, različite uvjete pH te prisutnost metalnih kationa koji su katalizatori reakcija oksidacije. Ne može se isključiti niti oksidativni stres u peptidima i proteinima uzrokovan reaktivnim kisikovim spojevima. Kako bi se isključila prisutnost metalnih iona, dodaju se kompleksirajući agensi poput EDTA te antioksidansi (Wu i sur., 2017; D'Hondt i sur., 2014).

Dijastereoizomerizacijom dolazi do konverzije L- u D-aminokiselinski ostatak pri čemu nastaje racemična D,L-smjesa. Racemizacijski mehanizmi mogu biti preko direktne enolizacije ili preko nastajanja oksazolonskog međuprodukta, a oba mehanizma su bazno katalizirana. Kako bi se izbjegla racemizacija, peptidi se obično sintetiziraju od C- prema N- kraju uz aktivaciju karboksilne skupine slobodne aminokiseline. Poznato je da histidin ima malu ali važnu sklonost racemizaciji tijekom sinteze peptida. Finder i suradnici opazili su pojavu brže agregacije rekombinantnog amiloidnog β -peptida od onog sintetskog podrijetla te su primjenom RP-HPLC metode tu pojavu povezali s niskom prisutnošću dijastereoizomernih onečišćenja u sintetskom amiloidnom β -peptidu, odnosno histidinskih, argininskih, metioninskih ostataka prisutnih u D-konfiguraciji. Budući da je pokazano da je rekombinantni peptid sklon bržoj agregaciji te je neurotoksičniji od sintetskog, zaključeno je da čak i male količine stereoizomernih onečišćenja mogu uvelike utjecati na biološku funkciju peptida. Konvencionalna RP-HPLC metoda nije uvijek sposobna odvojiti ova onečišćenja iz peptidne smjese, što otežava detekciju racemizacijskih onečišćenja (D'Hondt i sur., 2014; Finder i sur., 2010).

Krajevi i bočni ogranci peptida mogu biti reaktivni te stupati u različite reakcije pri čemu nastaju nova onečišćenja. Primjerice, često su opažene aminacije bočnog lanca arginina pri čemu

nastaje primarni amin, kao i nastanak ornitina iz arginina hidrolizom gvanidino skupine, koji također svojom amino skupinom može reagirati dalje. Također, moguća je pojava i onečišćenja nastalih acetilacijom aminokiselinskih ostataka, primjerice serina. Litowski i suradnici primjenom RP-HPLC i kromatografijom kationske izmjene uspješno su detektirali i locirali mjesta acetilacije sintetskog peptida građenog od 21 aminokiseline (D'Hondt i sur., 2014; Litowski i sur., 1999).

Do pojave peptidnih onečišćenja visoke molekularne mase mogu dovesti različiti agregacijski mehanizmi. Peptidni agregati mogu biti kovalentni i nekovalentni. Kovalentni agregati obično nastaju vezanjem dva ili više monomera disulfidnom vezom ili oksidacijom tirozina u ditirozin. Takvi agregati ubrajaju se u oksidacijska onečišćenja. Nevalentni agregati obično su rezultat slabih hidrofobnih i elektrostatskih interakcija. Molekulske mase kovalentnih i nekovalentnih dimera zato se razlikuju. Nevalentni agregati kao onečišćenja u ravnoteži su s monomernim peptidom u nativnom obliku, a na tu ravnotežu utječu promjene u koncentraciji peptida ili promjene u otapalu (npr. pH vrijednost), temeljem čega se može zaključiti je li riječ o stvarnom onečišćenju ili je pojava agregata rezultat pripreme uzorka za analizu. De Spiegeleer i suradnici su prilikom izrade profila čistoće humanog obestatina identificirali onečišćenje koje ima dvostruku veću molekulsku masu te 1.8 puta dulje vrijeme zadržavanja od obestatina primjenom metode RP-HPLC-MS. Kromatografijom isključenjem veličinom vezanom s MS znanstvenici su pokazali da je riječ o dimeru humanog obestatina (D'Hondt i sur., 2014; De Spiegeleer i sur., 2008). Agregati također mogu nastati i kao posljedica denaturacije peptida ili njegove modifikacije. Denaturacija peptida je konformacijska promjena strukture peptida koja se pojavljuje kao odgovor na uvjete okoline uključujući temperaturu, pH, ionsku jakost, pomoćne tvari i dr. Pojava agregacije može dovesti do precipitacije. Budući da je poznat rizik od imunogenosti uzrokovane agregatima, potrebno je pratiti i uspoređivati agregacijske profile peptidnih djelatnih tvari koristeći metode poput kromatografije isključenjem veličinom (SEC), analitičkog ultracentrifugiranja (AUC), dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS), te FFF (Field Flow Fractionation) (Wu i sur., 2017).

Prisutnost suprotnih iona poput iona trifluoroctene kiseline također se smatra onečišćenjem, budući da ovi ioni stupaju u interakciju s pozitivno nabijenim bočnim lancima aminokiselina u peptidu. Surewicz i suradnici uočili su prisutnost snažne apsorpcijske vrpce s maksimumom na 1673 cm^{-1} u IR spektru peptida dinorfina A-(1-13). Nakon pročišćavanja kromatografijom, vrpca je nestala, a IR analiza natrijevog trifluoroacetata pokazala je snažnu apsorpcijsku vrpcu pri 1673 cm^{-1} . Ova apsorpcijska vrpca interferira s amidnom vrpcom I, a također može i narušiti

peptidnu konformaciju. De Spiegeleer i suradnici također su detektirali suprotne ione trifluoroctene kiseline tijekom izrade profila čistoće obestatina primjenom RP-HPLC-DAD metode. Kako bi se uklonila onečišćenja trifluoroctene kiseline, Andrushcenko i suradnici predložili su korištenje klorovodične kiseline u koncentraciji 2-10 mM kako se ne bi narušila peptidna sekundarna struktura, za čime slijedi liofilizacija. Peptidne djelatne tvari uglavnom se proizvode u obliku acetatnih soli, što se postiže dodatnim korakom ionske izmjene tijekom proizvodnje (D'Hondt i sur., 2014; Surewicz i sur., 1989; Andrushcenko i sur., 2007; De Spiegeleer i sur., 2008).

Do β -eliminacije dolazi kad je peptid izložen alkalnom pH i povišenoj temperaturi, a ona uključuje izlazak -SH ili -OH skupine cisteina, serina ili treonina uz nastajanje dvostruke veze između α - i β -ugljikovih atoma i slobodnih tiola. Ti slobodni tioli također kataliziraju nastanak disulfidne izmjene i reducibilnih agregata. Dvostruka veza nastala β -eliminacijom elektrofilnija je i podložnija nukleofilnom napadu amino-skupine lizina ili tiolne skupine cisteina uz nastanak nereducibilnih agregata. Kako bi se kontrolirala onečišćenja koja nastaju β -eliminacijom, potrebno je tijekom proizvodnje i skladištenja kontrolirati pH i temperaturu (Wu i sur., 2017).

Do nastanka diketopiperazina može doći tijekom sinteze peptida na čvrstoj fazi ili tijekom skladištenja. Ova reakcija je ovisna o sekvenci i do nje dolazi ukoliko su prolin ili glicin na prvom ili drugom mjestu u aminokiselinskom slijedu. Reakcija se sastoji od nukleofilnog napada N-terminalnog dušikovog atoma na amidni karbonil između druge i treće aminokiseline u nizu, što dovodi do kidanja prvih dviju aminokiselina u obliku diketopiperazina. Dobra dostupnost amidnog karbonila, odnosno nedostatak veće bočne skupine (npr. u slučaju glicina) pospješuje reakciju. Nastanak piroglutaminske kiseline događa se gotovo uvijek ako je glicin na N-terminalnom kraju peptida. To je analogna reakcija koja se događa napadom N-terminalnog dušikovog atoma na karbonilni ugljikov atom bočnog lanca Gln pri čemu nastaje peptidni analog piroglutaminske kiseline, a također se može dogoditi i kad je Asn N-terminalni ostatak. Unutarnji asparaginski i aspartatni ostatci skloni su i nastanku aspartimida, odnosno sukcinimida, naročito kad u blizini nemaju veliki bočni lanac koji bi sterički onemogućio reakciju. Obje reakcije su analogne, a rezultiraju nastankom peteročlanog sukcinimidnog prstena nukleofilnim napadom C-terminalnog dušika iz peptidne veze na γ -karbonil asparaginskog, odnosno aspartatnog ostatka. Ova reakcija je preferirana pri blago kiselim uvjetima i prsten je nestabilan pri fiziološkim i alkalnim uvjetima te je podložan racemizaciji i hidrolizi. Prisutnost Asn ostataka također može inducirati kidanje peptidne veze između tog Asn ostatka i aminokiseline s C-terminalne strane, napadom amidnog dušika u bočnom lancu

Asn ostatka na karbonilnu skupinu peptidne veze. Pri tome nastaju C-terminalni sukcinimid s originalnim N-krajem peptida i peptid s novim C-krajem. (D'Hondt i sur., 2014).

Kemijski raspad peptida tijekom skladištenja specifičan je za njegov aminokiselinski slijed. Glavne reakcije kemijskog raspada peptida uključuju deamidaciju, hidrolizu, pucanje peptidne veze, oksidaciju, Maillardovu reakciju, β -eliminaciju, enantiomerizaciju, izomerizaciju i dimerizaciju. Poznato je da su aspartatni i asparaginski ostaci najnestabilniji. Osim raspada same peptidne djelatne tvari, moguća je degradacija i cijelog ljekovitog oblika. Općenito su suhi farmaceutski oblici stabilniji od vodenih formulacija, a velik utjecaj na degradaciju ima odabir pomoćnih tvari kao i sadržaj njihovih onečišćenja (Van Dorpe i sur., 2011).

Najčešća reakcija kemijskog raspada peptidne djelatne tvari je deamidacija. Deamidacijom peptida koji sadrže Asn i Glu nastaju Asp i Gln, a reakcija je pH ovisna i kiselo katalizirana. Drugi najčešći mehanizam raspada je pucanje peptidne veze, što se često opaža kod Asp ostataka te nastaje peptid s Asp na C-kraju. Met, Cys, Trp i Tyr ostatci su podložni oksidaciji, što dovodi do stvaranja aldehidnih derivata. Ukoliko su u formulaciji prisutni reducirajući šećeri, oni mogu s amino-skupinom peptida dati Maillardovu reakciju koja rezultira nastajanjem Schiffove baze koja je podložna izomerizaciji, što je opaženo naročito za Lys, Arg, Asn i Gln ostatke. β -eliminacija disulfidnih veza dovodi do slobodnih tiolnih skupina, koje su podložne daljnim reakcijama poput kidanja CS veze i daljnoj degradaciji. Prilikom izlaganja toplini i lužinama, može doći do racemizacije nekih aminokiselina. U gotovoj formulaciji proizvoda moguće su i neke dodatne reakcije raspada, uslijed dodavanja različitih pomoćnih tvari koje se dodaju radi povećanja stabilnosti djelatne tvari ali i same mogu utjecati na promoviranje raspada (Van Dorpe i sur., 2011).

4.3.5.2. Usporedba onečišćenja peptidnih lijekova dobivenih različitim proizvodnim procesima

Razlike u rekombinantnoj DNA tehnologiji proizvodnje i kemijskoj sintezi rezultiraju pojavom drukčijih i novih, neispitanih onečišćenja. Primjerice, ovisno o procesu proizvodnje može se razlikovati sadržaj ostatnih otapala, soli i metalnih iona prisutnih u lijeku. Razlike u čistoći originalnog peptidnog lijeka proizvedenog rekombinantno i generičkog peptida proizvedenog kemijskom sintezom mogu dati profil onečišćenja koji utječe na sigurnost ili učinkovitost primjene lijeka te ih je potrebno strogo kontrolirati. Skica smjernica za industriju Američke agencije za hranu i lijekove odnosi se na pet peptidnih lijekova: glukagon, liraglutid, nesiritid, teriparatid i teguglutid. Njihovi profili onečišćenja dobro su okarakterizirani te ih je moguće

usporediti s onim generičkog peptida sintetskog porijekla, uzevši u obzir trenutne napretke u proizvodnji, analitici i kontroli peptidnih lijekova.

Uobičajena onečišćenja u rekombinantnim i sintetskim peptidnim lijekovima prikazana su u Tablici 4. Poznati su rizici od pojave proteina stanice domaćina u rekombinantnim proteinima, rezidualnih tBu skupina u sintetskim lijekovima, te pojave D-enantiomera aminokiselina i peptidnih onečišćenja koja potječu od drugih sinteza (Zeng i sur., 2015; D'Hondt i sur., 2014; Eon-Duval i sur., 2012).

Tablica 6. Najčešća onečišćenja u rekombinantnim i sintetskim peptidnim lijekovima

| Rekombinantno dobiven lijek | Sintetski peptidni lijek |
|--|--|
| Modifikacije aminokiselina C, M, H, K, W: oksidacija, redukcija, deamidacija, pyro-Glu | Modifikacije aminokiselina C, M, H, K, W: oksidacija, redukcija, deamidacija |
| Fragmentacija | Nepotpuno odstranjenje zaštitnih skupina: tBu, Fmoc, tBoc i dr. |
| Agregacija | Racemizacija aminokiselina: D- umjesto L- |
| Promjene sekvence | Delecije aminokiselina |
| Proteini i DNA stanice domaćina | Insercije aminokiselina |

Prema FDA, potrebno je primijeniti osjetljive analitičke metode visoke rezolucije poput UHPLC-HRMS kako bi se otkrila i karakterizirala peptidima srodna onečišćenja u generičkom sintetskom peptidu u usporedbi s originalnim rekombinantnim peptidom. Metoda HPLC-UV je najčešće primjenjivana prilikom kontrole kvalitete, no ona često nije prikladna za analizu peptidima srodnih onečišćenja. Metode ispitivanja trebaju biti validirane i ortogonalne. Ispitivanja je potrebno provesti na statističkom broju serija originalnog i generičkog lijeka te na početku i kraju njihovog „shelf life-a“ koje je bilo u skladu s njihovim uvjetima čuvanja (www.fda.gov).

Općenito, prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA), potrebno je provesti usporedbu profila onečišćenja kako bi se identificiralo svako peptidu srodno onečišćenje prisutno i u originalnom i generičkom lijeku koje je u količini od 0.10% i više sadržaja peptida. Ovisno o riziku imunogenosti, moguće je i sniženje tog praga kako bi se identificirala i druga prisutna onečišćenja. Potrebno je osigurati da niti jedno peptidu srodno onečišćenje nije prisutno u generičkom peptidu u količini većoj od one prisutne u originalnom peptidu, što je moguće optimiziranjem puta sinteze i načina pročišćavanja. Ukoliko se u generičkom peptidnom lijeku

pronađu onečišćenja koja nisu prisutna u originalnom lijeku, potrebno je osigurati da takvo onečišćenje nije u količini većoj od 0.5% sadržaja djelatne tvari kako bi se snizio potencijalan rizik od imunogenosti i izbjegla inače potrebna dodatna klinička istraživanja. Također, takva onečišćenja potrebno je karakterizirati te opravdati njihovu dopuštenu razinu i opisati zašto ne utječu na sigurnost i učinkovitost primjene peptida. To je potrebno potkrijepiti podacima o utjecaju onečišćenja na fizikalno-kemijska i biološka svojstva peptida te potencijal izazivanja imunoloških reakcija. Za svako novo peptidu srodno onečišćenje ili ono koje se pojavljuje u povećanoj količini, tj. u razinama $\geq 0.10\%$ i $\leq 0.5\%$ potrebno je procijeniti rizik imunogenosti. Potrebno je *in vitro* i *in silico* metodama pokazati da nova onečišćenja ne sadrže sekvence s povećanim afinitetom za molekule glavnog kompleksa tkivne histokompatibilnosti (MHC), odnosno ne sadrže nove epitope koji bi potencijalno aktivirali T-limfocite. Također je potrebno pokazati da ne povećavaju sklonost agregaciji i ne utječu na postojeće agregate, naročito pri stresnim uvjetima te da ne stimuliraju urođenu imunološku aktivnost jače od originalnog lijeka. Ovisno od slučaja do slučaja, FDA zadržava pravo zahtijevati dodatne i strože dokaze istovjetnosti, odnosno niže pragove za detekciju i identifikaciju onečišćenja.

U monografijama sintetskih peptida u Europskoj farmakopeji, pragovi ispod kojih se onečišćenja mogu zanemariti variraju od 0.03% do 0.1%, odnosno od 1.5% do 12% (Vergote i sur., 2009). U općoj monografiji „Tvari za farmaceutsku primjenu“, Europska farmakopeja navodi pragove za prijavu, identifikaciju i kvalifikaciju organskih onečišćenja u sintetskim peptidima redom kao $>0.1\%$, $>0.5\%$ i $>1.0\%$. Za onečišćenja za koja je poznato da su potentna te imaju neočekivane ili toksične farmakološke učinke, mogući su drukčiji specifični pragovi. Uzevši u obzir različite kriterije farmakopeja, najviši dozvoljeni prag ukupnih onečišćenja varira od 1% do 17%. Najviši dozvoljeni prag ukupnih onečišćenja opažen je u monografijama bacitracina i kolistin sulfata u Europskoj farmakopeji. Uočene su brojne razlike u kriterijima Europske farmakopeje i USP. Primjerice, monografija gonadorelin acetata prisutna je u objema farmakopejama, no kriteriji su različiti. U Eu.Pharm. pojedina onečišćenja u slučaju gonadorelin acetata ne smiju biti u količini većoj od 2%, a ukupna onečišćenja ne više od 5%, dok USP ima strože kriterije pa isti pragovi iznose 1% i 2% (Rastogi i sur., 2019).

Kao što je ranije spomenuto, agregati peptida mogu varirati od dimera do polimera i imati ozbiljne toksikološke, imunološke i farmakološke posljedice uslijed njihovog nastanka tijekom skladištenja peptida, te je potrebno kontrolirati njihovu prisutnost. Trenutno je kvantifikacija ovih onečišćenja rijetko zastupljena u Eu.Pharm. i USP monografijama. No, u monografijama inzulina propisan je poseban test na agregate primjenom size-exclusion kromatografije (SEC).

U nekim slučajevima, kovalentni agregati mogu se odrediti koristeći RP-LC metodu za srodne tvari (Rastogi i sur., 2019; Vergote i sur., 2009).

U Europskoj i Indijskoj farmakopeji (IP) spominje se i test na anorganska onečišćenja peptidnih tvari, poput sulfatnog pepela te teških metala. U USP je rijetko spomenuto određivanje sulfatnog pepela, a test na teške metale u pojedinačnim monografijama zamijenjen je testom na elementarna onečišćenja (Rastogi i sur., 2019). Teški metali mogu potjecati iz početnih materijala i reagensa korištenih u proizvodnji, industrijskih strojeva i dr. Budući da anorganska onečišćenja poput metalnih soli mogu biti toksična te utjecati na stabilnost peptidne djelatne tvari, preporučljivo je provesti i prikladan test na teške metale, primjerice na paladij koji se često spominje u ovakvim testovima. Preporučuje se korištenje metode induktivno spregnute plazme (ICP; inductively coupled plasma) s AES i MS detekcijom umjesto kolorimetrijskih testova (Rastogi i sur., 2019; Vergote i sur., 2009).

Kemijski testovi koji otkrivaju razine pojedinih onečišćenja mogu biti prošireni i provođenjem fizikalnih testova, poput mjerenja specifične optičke rotacije, apsorpcije svjetlosnog zračenja, indeksa refraktivnosti i dr. (Rastogi i sur., 2019).

Yang i suradnici analizirali su onečišćenja u proizvodima za nazalnu primjenu u spreju koji sadrže kalcitonin iz lososa. Kalcitonin iz lososa je peptid građen od 32 aminokiseline odobren za liječenje postmenopauzalne osteoporoze, a na tržištu se nalaze lijekovi s kalcitoninom i rekombinantnog i sintetskog podrijetla. Ovi znanstvenici su primijenili metode LC-MS-MS i LC-MS koristeći UHPLC-MS spektrometar te identificirali peptidna onečišćenja prisutna u tri skupine: (1) onečišćenja opažena u kromatogramu ukupnih iona (TIC; total ion chromatogram); (2) onečišćenja koja eluiraju skupa s djelatnom tvari ili pri kraju pika elucije djelatne tvari; (3) onečišćenja prisutna ispod bazne linije u kromatogramu ukupnih iona. Na ovaj način primjenom LC-MS metode detektirano je više od sto peptidnih onečišćenja, od kojih je četiri bilo u količini većoj od 0.5%, a šesnaest u količini većoj od 0.10% (Yang, 2017).

4.3.5.3. Karakterizacija onečišćenja peptida dobivenih rekombinantnom metodom

Onečišćenja koja potječu od proizvodnje peptida rekombinantnom DNA tehnologijom mogu se podijeliti u tri kategorije: (1) onečišćenja povezana s peptidom; (2) onečišćenja povezana sa stanicom domaćina; (3) druga nepeptidna onečišćenja. Onečišćenja srodna peptidu uključuju ona koja imaju primarnu strukturu sličnu, ali ne jednaku aktivnoj tvari i javljaju se kao rezultat insercije, delecije ili drugih promjena primarne strukture poput oksidacije, glikozilacije i dr. Onečišćenja povezana sa stanicom domaćina uključuju DNA i proteine stanice domaćina te se

javljaju samo kod peptida proizvedenih rekombinantnom tehnologijom. Ostala onečišćenja mogu se pojaviti kod peptida proizvedenih i rekombinantno i kemijskom sintezom.

Analitičke metode za analizu proteina dobivenih rekombinantnom tehnologijom obično se temelje na njihovoj veličini, naboju i hidrofobnosti, poput kromatografije isključenja veličinom (SEC), tekućinske kromatografije ionske izmjene, RP-LC, SDS-PAGE, izoelektričnog fokusiranja i kapilarne elektroforeze (CE). Gel filtracijom mogu se identificirati i kvantificirati onečišćenja proteinima stanice domaćina prisutnih u rekombinantnim peptidima u ppm količinama (Boutin i sur., 2019).

4.3.5.4. Karakterizacija onečišćenja peptida dobivenih kemijskom sintezom

Monografije sintetskih peptida u Europskoj farmakopeji za test na peptidima srodna onečišćenja propisuju obrnuto-faznu tekućinsku kromatografiju (RP-LC). Takvi testovi su validirani na specifična onečišćenja za koje se zna da su potencijalno prisutna. Monografije sintetskih peptida trebaju sadržavati kriterije prihvatljivosti za svako specificirano onečišćenje, za nespecificirana onečišćenja (što je obično u skladu s pragom identifikacije), te za ukupna onečišćenja. Moguća je potreba za dodatnom kvantifikacijom specificiranih onečišćenja. Svi sintetski peptidi također moraju odgovarati zahtjevima navedenima u poglavlju „Tvari za farmaceutsku primjenu“ (Europsko ravnateljstvo za kakvoću lijekova, 2018).

Kao što je ranije navedeno, tijekom kemijske sinteze peptida moguća je upotreba različitih zaštitnih i aktivirajućih funkcionalnih skupina te reagensa kako bi se prevenirale neželjene reakcije. Budući da se reakcije sinteze ne odvijaju u potpunosti kvantitativno, ove kemijske skupine mogu ostati vezane na konačnom peptidu te prisutne u krajnjem produktu reakcije kao peptidu srodna onečišćenja unatoč naknadnom pročišćavanju. Uz nepotpuno odstranjivanje zaštitnih skupina (tBoc ili Fmoc), ponavljajuće tretiranje trifluoroctenom kiselinom ostavlja prostor za reakcije oksidacije i alkilacije u slučaju osjetljivijih aminokiselina poput Cys, Met i Trp (Van Dorpe i sur., 2011).

Ostatna otapala prisutna zbog procesa proizvodnje obično se određuju plinskom kromatografijom sa statičkim „headspace“ uzorkovanjem, dok se trifluoroctena kiselina određuje ionskom kromatografijom (Vergote i sur., 2009).

Prilikom proizvodnje peptida kemijskom sintezom može doći do križne kontaminacije nekim drugim peptidima prethodno prisutnima u proizvodnom pogonu, što se nekad ne može otkriti konvencionalnim metodama analize budući da su prisutni u vrlo niskim koncentracijama.

Currier i suradnici pokazali su da visoka osjetljivost T-limfocita može dovesti do detekcije takvih onečišćenja prepoznavanjem njihovih epitopa, što je opaženo ELISPOT (enzyme-linked immunospot) i CFC (cytokine-based flow cytometry) testovima. Ta peptidna onečišćenja mogla bi inače dovesti do lažno pozitivnih rezultata tijekom ispitivanja imunoloških svojstava ciljnog peptida te utjecati na razvoj ciljnog lijeka. T-limfociti sposobni su prepoznati i subnanomolarne koncentracije kontaminirajućih peptida u velikoj koncentraciji drugog peptida, što nije moguće rutinskim metodama analize. Potrebno je osvijestiti mogućnost križne kontaminacije sintetskih peptida te poticati proizvođače na poboljšanje kontrole kvalitete i proizvodnje (Currier i sur., 2008).

Čistoća sintetskog peptida računa se temeljem količine samog peptida u odnosu na ukupnu količinu analita u uzorku mjerenjem apsorbancije pri 214 nm. Čistoća sintetskog peptida jest postotak određene peptidne sekvence u peptidnom okruženju uzorka. Određuje se određivanjem omjera površine ispod pika ciljnog peptida i ukupne površine svih pikova u MS analizi.

Zeng i suradnici razvili su i validirali LC-HRMS metodu za praćenje kvalitete peptidnih lijekova koji sadrže kalcitonin iz lososa, bivalirudin i eksenatid s ciljem identifikacije, karakterizacije, odjeljivanja i kvantifikacije peptida i njima srodnih onečišćenja prisutnih u lijekovima. LC-HRMS ima nekoliko prednosti u usporedbi s konvencionalnom HPLC-UV metodom, uključujući mogućnost dobivanja i kvalitativnih i kvantitativnih podataka u jednom eksperimentu. LC-HRMS metodom mogu se visokom osjetljivošću detektirati peptidi u širokom dinamičkom spektru i bez prisutnosti UV kromofora. Podaci dobiveni masenom spektrometrijom visoke rezolucije mogu se koristiti za izračun točne molekularne mase te u kombinaciji s tandemskom MS/MS za određivanje aminokiselinskog sastava i potvrdu sekvence peptida. Također, mogu se karakterizirati i ostala detektirana onečišćenja. Ova analitička metoda može poslužiti kao primjer za osiguravanje kvalitete peptidnih lijekova.

Grosse i suradnici izradili su profil onečišćenja sintetskog peptida LL-37 uz pomoć HPLC s kombiniranom UV i detekcijom masenim spektrometrom, budući da je analiza samo HPLC-UV metodom često izazovna u vidu odjeljivanja i detektiranja srodnih i procesnih onečišćenja koja su često prisutna u puno nižim koncentracijama i vrlo strukturno slični glavnom peptidu. Količina onečišćenja kontinuirano je praćena UV detekcijom, te istovremeno je identifikacija provedena upotrebom kvadrupolnog masenog spektrometra, što je omogućilo detekciju peptida manjeg naboja te povisilo pouzdanost točne identifikacije. Pravilno asigniranje pikova u kromatogramu ne bi bilo moguće uz primjenu samo UV detekcije. Ova metoda također se može

primjenjivati i za provjeru prisutnosti nepoznatih onečišćenja. Kombinacija UV i MS detekcije izrazito je korisna pri ispitivanju čistoće peptida budući da se njome dobivaju komplementarne informacije o analitima, poput čistoće pika i potvrde identifikacije temeljem mase (Grosse i sur., 2018).

4.3.6. Biološka aktivnost i potentnost

Uz usporedne studije strukture višeg reda, profila onečišćenja te agregata, u svrhu dokazivanja istovjetnosti peptidnih lijekova potrebno je napraviti i usporednu studiju njihove biološke aktivnosti. Takve studije potrebne su kako bi se osiguralo da je biološka aktivnost peptida u generičkom peptidnom lijeku odgovarajuća i usporediva s onom u originalnom lijeku.

Studije biološke aktivnosti peptida sastavni su dio procjene rizika imunogenosti lijeka te mogu biti provedene u *in vitro* i/ili *in vivo* uvjetima. Rizik od imunogenosti peptidnog lijeka može se odrediti praćenjem aktivacije T-limfocita uzrokovane vezanjem peptidima srodnih onečišćenja na glavni kompleks tkivne histokompatibilnosti (MHC) i to *in silico* studijama vezanjem na MHC te *in vitro* vezanjem i određivanjima specifičnih onečišćenja. Usporedba aktivacije urođene imunosti generičkog i one originalnog peptidnog lijeka može se provesti *in vitro* staničnim ispitivanjima te *in vivo* na životinjskim modelima.

Biološka aktivnost peptida može se pratiti *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima. *In vitro* testovima dobivaju se informacije o povezanosti strukture s biološkom aktivnosti peptida, čime se može potvrditi provedena karakterizacija primarne i sekundarne strukture, te strukture višeg reda peptida i biološka aktivnost složenih peptida, dok se u *in vivo* uvjetima prati farmakodinamički profil peptida. *In vitro* test je u prošlosti korišten za mjerenje potentnosti sintetskih peptida. Određivanje biološke aktivnosti naročito je važno u slučajevima gdje se sintetski peptid koristi u formuliranju generičkog lijeka, te je potreban kao dodatan potvrdni test u dokazivanju istovjetnosti generičkog i originalnog lijeka. Procjena biološke aktivnosti može se izvršiti na kulturi stanica, životinjskim modelima te biokemijskim testovima i testovima imunološkog odgovora (Wu i sur., 2017).

Više skupina znanstvenika provelo je opsežna usporedna istraživanja bioloških i imunoloških svojstava peptida glatiramer acetata (GA) prilikom ispitivanja istovjetnosti lijekova Copaxone i Glatopa. Anderson i suradnici proveli su u tu svrhu mnoga opširna i ortogonalna biološka i imunološka ispitivanja, poput ispitivanja vezanja za MHC-II molekule, funkcije antigenprezentirajućih stanica, proliferacije i polarizacije T-limfocita, biologije B-limfocita, ispitivanja odgovora protutijela, imunološkog prepoznavanja, utjecaj genske ekspresije, protuupalnog

učinka i neuroprotektivnosti. Sposobnost moduliranja imunološkog sustava glatiramer acetata (GA) mjerena je preko jačine sekrecije interleukina-4 koju GA izaziva. Izlučivanje interleukina-4 kvantificirano je korištenjem ELISA metode (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Relativna potentnost lijekova Glatopa i Copaxone poslužila je kao mjera njihove bioekvivalencije, budući da je iznosila od 93 do 107%. Za usporedbu biološkog učinka lijekova Glatopa i Copaxone korišteni su životinjski modeli. Model eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE) na miševima najkorišteniji je životinjski model za oponašanje stanja multiple skleroze i testiranje učinkovitosti terapije lijekovima. Test blokiranja EAE koristi se za procjenu učinkovitosti glatiramer acetata. Testiranja na tri EAE modela pokazala su ekvivalentnu učinkovitost lijekova Glatopa i Copaxone te istovjetan učinak na parametre bolesti (Anderson i sur., 2015). Budući da je ranije dokazana strukturna sličnost ovih dvaju lijekova, nisu bile očekivane razlike u njihovoj imunogenosti. Kako bi se to potvrdilo, upotrijebljene su dvije imunološke metode. U metodi imunološkog prepoznavanja korišten je panel monoklonskih protutijela specifičnih za GA kako bi se mapirali epitopi na GA. Korištenjem „sandwich-ELISA“ metode na ovaj način nisu opažene značajne razlike među lijekovima, no uočen je sličan imunološki „otisak prsta“ te je pokazano da ova dva lijeka imaju ekvivalentan sastav te aminokiselinsku sekvencu. Druga korištena metoda bila je usporedba imunogenih potencijala dvaju lijekova mjerenjem titra i izotipa protutijela na GA u miševima te križne reaktivnosti protutijela u pojedinom mišu. Oba lijeka pokazala su statistički slične učinke te je na ovaj način dokazano da rizik imunogenosti lijeka Glatopa nije veći od onog lijeka Copaxone (Anderson i sur., 2015).

Komlosch i suradnici također su usporedili lijekove Glatopa i Copaxone te su također pokazali da lijekovi imaju usporedive učinke korištenjem EAE modela, ispitivanjem vezanja monoklonskih i poliklonskih protutijela te ispitivanjem njihove *in vitro* citotoksičnosti. *Ex vivo* mjerenje potentnosti temeljeno je na mjerenju razine interleukina-2 kojeg izlučuju T-limfociti u odgovoru na antigen koristeći ELISA metodu, te je relativna potentnost izračunata prema referentnom standardu. Ispitivanjem potentnosti pokazano je da tri od osam ispitanih serija lijeka Glatopa pokazuju veću indukciju sekrecije interleukina-2 od serija lijeka Copaxone. *In vitro* citotoksičnost ovisna o dozi ovih lijekova testirana je na ljudskim B-staničnim linijama transformiranim Epstein-Barr virusom. Kao marker citotoksičnosti mjerena je razina laktatne dehidrogenaze, enzima koji se otpušta uslijed stanične lize. Relativna citotoksičnost izračunata je prema referentnom standardu, te nisu pokazana odstupanja citotoksičnosti serija lijeka Glatopa u odnosu na Copaxone, no pokazana je varijabilnost u citotoksičnosti između samih

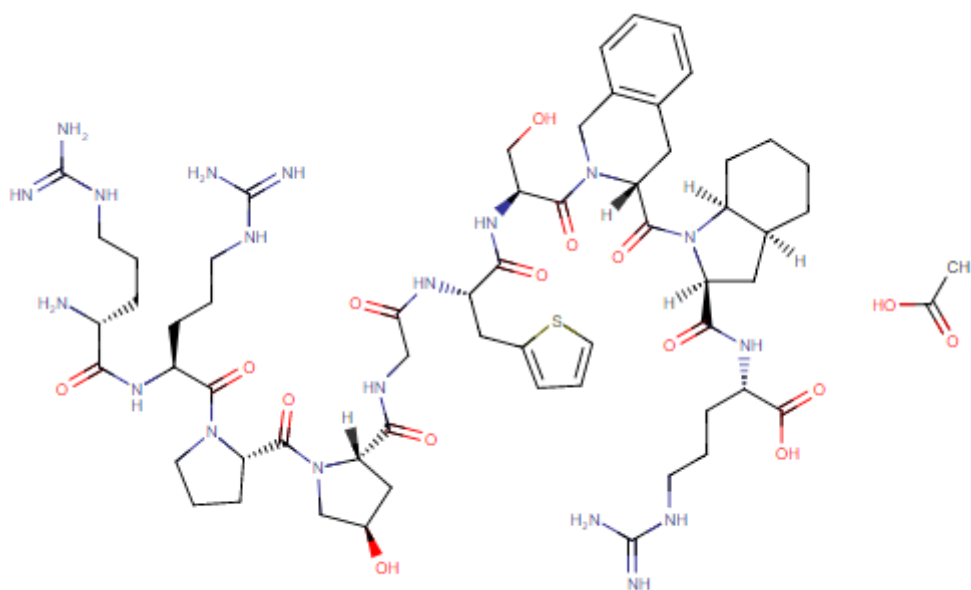
serija lijeka Glatopa. Test blokiranja EAE pokazao je usporedive učinke dvaju lijekova. Ispitivanje vezanja monoklonskih te poliklonskog protutijela na GA u lijekovima Glatopa i Copaxone provedeno je koristeći ELISA metodu, a postotak vezanja specifičnih protutijela na GA dobiven je mjerenjem optičke gustoće. Rezultati vezanja protutijela u slučaju Glatope bili su usporedivi te unutar specifikacije za Copaxone (Komlosh i sur., 2019). D' Alessandro i suradnici opisali su također i utjecaj ovih lijekova na izlučivanje interferona- γ te na otpuštanje histamina *in vitro*, a pritom nisu opažene značajne razlike među serijama lijekova Glatopa i Copaxone (D' Alessandro i sur., 2017).

U nekoliko monografija peptida u USP opisan je test bioidentiteta, dok se on primjerice ne nalazi u monografijama Europske farmakopeje. Svrha ovog testa prema ICH Q6B smjernicama jest procijeniti mogućnost biotehnoški proizvedenog ili biološkog lijeka da postigne određeni biološki učinak. Kako se peptidi ne smatraju složenim molekulama poput proteina, ovaj test se smatra suvišnim ukoliko je provedena opširna fizikalno-kemijska karakterizacija te postoji dobro uhodan i dokumentiran proces proizvodnje. Unatoč tome, USP i dalje zahtijeva ovakav test, primjerice za calcitonin iz lososa u slučaju kojeg je potrebna kvantifikacija proizvedenog cAMP-a, te za inzulin čija monografija uključuje kvalitativan test na glukozu u krvi kunića (Vergote i sur., 2009). Test bioidentiteta u slučaju protamin sulfata uključuje titracijsku metodu s kvantifikacijom broja USP heparinskih jedinica u potrebnom volumenu titranta (Rastogi i sur., 2019).

Ovakva saznanja na primjeru glatiramer acetata i drugih peptida potvrđuju da je potreban rigorozan znanstveni pristup kako bi se ustanovila biološka i imunološka ekvivalencija složenih djelatnih tvari i njihovih generičkih verzija.

4.4. Primjer karakterizacije peptida ikatibanta

Ikatibant je sintetski dekapeptid koji je u Europskoj uniji i Sjedinjenim Američkim Državama odobren za liječenje akutnih napada nasljednog angioedema pod trgovačkim nazivom Firazyr u obliku acetatne soli topljive u vodi. U Sjedinjenim Američkim Državama Firazyr ima status „orphan“ lijeka. U razvoju kliničkih simptoma nasljednog angioedema ključan je bradikinin te su napadaji angioedema uzrokovani njegovim povećanim oslobađanjem. Ikatibant je potentan, specifičan, i kompetitivan peptidomimetik s modificiranom peptidnom strukturom koji se potpuno antagonistički veže za bradikinininske receptore tipa 2. Struktura ikatibanta slična je strukturi bradikininina, ali ikatibant sadrži pet neproteinogenih aminokiselina. Ikatibant se također istražuje za mogućnost u primjeni kod liječenja brojnih drugih stanja u kojima bradikinin ima važnu ulogu (www.ema.europa.eu).



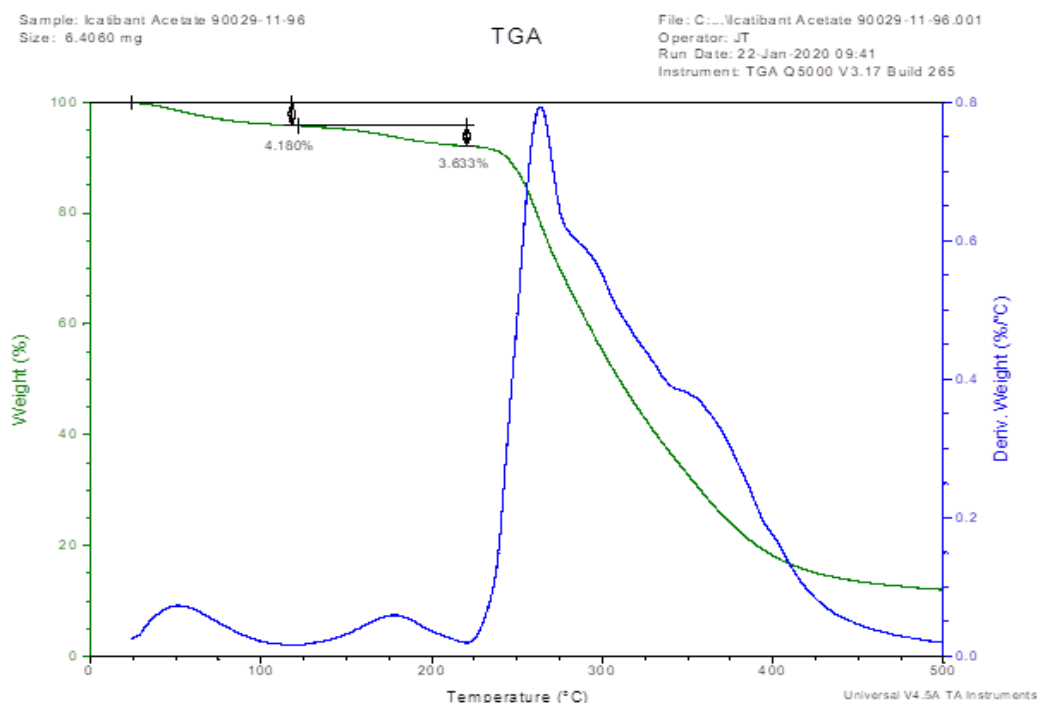
Slika 3. Kemijska struktura ikatibant acetata (www.drugbank.ca)

4.4.1. Termička svojstva

Termička svojstva ikatibant acetata proučena su metodama termogravimetrijske analize i diferencijalne pretražne kalorimetrije na uzorku čvrstog agregatnog stanja. Termogravimetrijskom analizom moguće je točno kvantitativno odrediti promjene u masi uzorka uzrokovane zagrijavanjem, dok se diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom te promjene mogu kvalitativno potvrditi.

4.4.1.1. Termogravimetrijska analiza

Termogramom je prikazana masa uzorka u ovisnosti o temperaturi kojoj je uzorak izložen. Na termogramu uzorka ikatibant acetata uočava se smanjenje mase uzorka uzrokovano povišenjem temperature te su vidljiva tri događaja: (1) gubitak vode; (2) izlazak acetata i (3) raspad čvrstog uzorka. Deriviranjem krivulje termograma ti se događaji mogu bolje razlučiti. Uočava se gubitak mase čvrstog ikatibant acetata od 4.180% u rasponu temperatura od 20°C do 120°C, što odgovara isparavanju vode iz uzorka. Daljnjim zagrijavanjem uzorka u rasponu temperatura od 120°C do 220°C dolazi do gubitka 3.633% početne mase uzorka, što je uzrokovano gubitkom acetata. Na temperaturi višoj od 220°C dolazi do termičkog raspada uzorka.



Slika 4. Termogram čvrstog uzorka ikatibant acetata

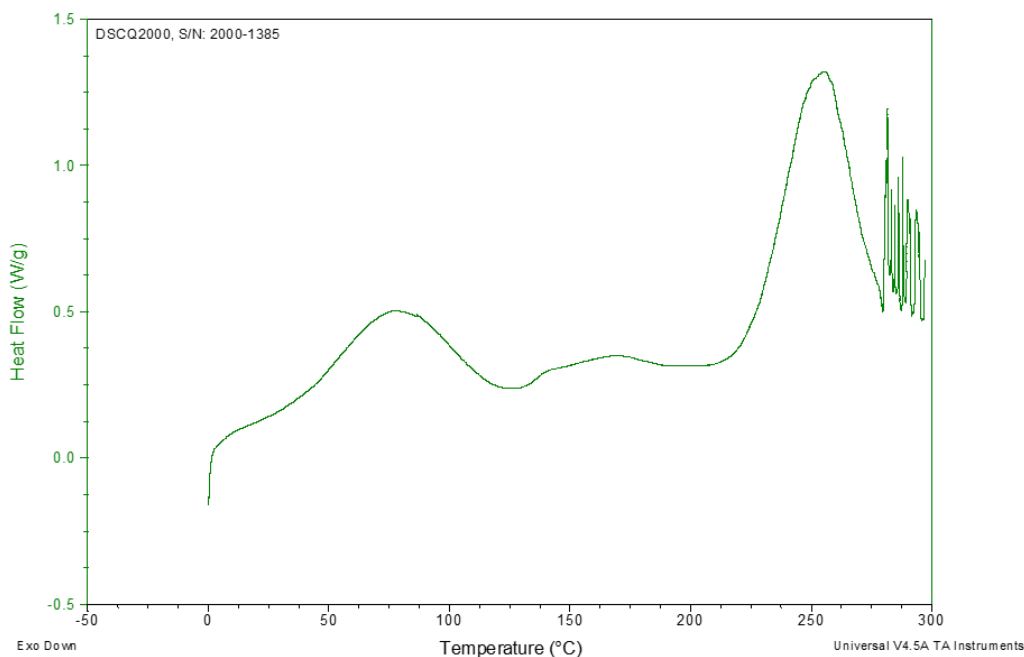
4.4.1.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom prati se protok topline u uzorku uzrokovan promjenom temperature te se mogu uočiti toplinski procesi koji se odvijaju unutar uzorka. Izlaganjem čvrstog uzorka ikatibant acetata povišenoj temperaturi uočavaju se tri pika koja predstavljaju tri endotermna procesa: (1) isparavanje vode; (2) izlazak acetata i (3) termički raspad uzorka. Temperature pri kojima nastupaju ovi toplinski procesi odgovaraju onima određenima termogravimetrijskom analizom.

Sample: Icatibant acetat 90029-11-96_2
Size: 1.4900 mg

DSC

File: C:\...Icatibant acetat 90029-11-96_2.001
Operator: JT
Run Date: 22-Jan-2020 10:49
Instrument: DSC Q2000 V24.11 Build 124



Slika 5. DSC spektar čvrstog uzorka ikatibant acetata

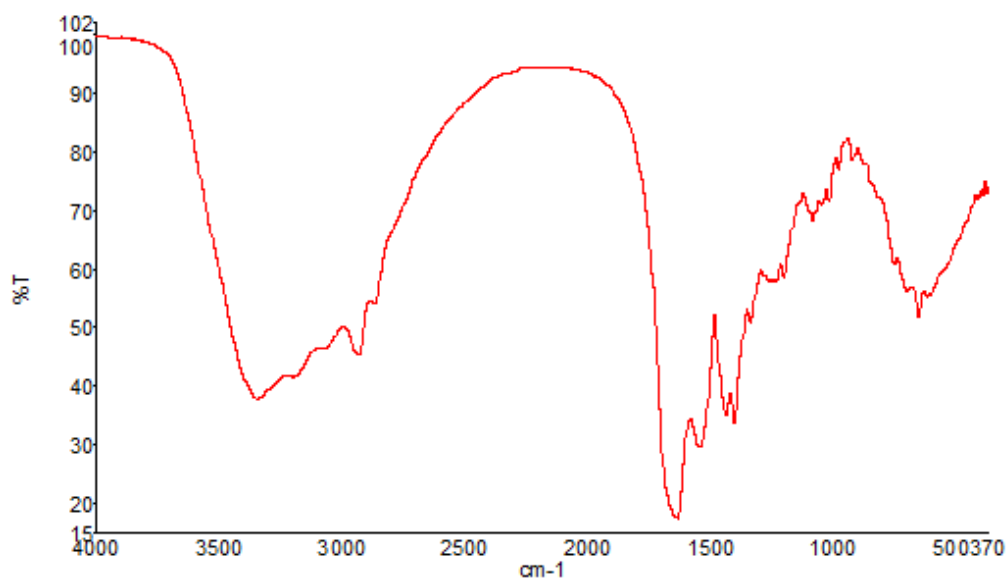
4.4.2. Infracrvena spektroskopija

Uzorak ikatibant acetata analiziran je metodom infracrvene spektroskopije u čvrstom stanju te u otopini koncentracije 10 mg/mL.

4.4.2.1. FTIR

Sekundarni amidi u čvrstom agregatnom stanju pokazuju jaku apsorpciju na području valnih brojeva od 1680 do 1630 cm^{-1} , što odgovara amidnoj vrpici I. Amidna vrpca I javlja se većinski zbog istežanja dvostruke veze u karbonilnoj CO skupini. Na FTIR spektru čvrstog uzorka ikatibant acetata vidljive su tri specifične amidne vrpce. Najizraženiji pik u FTIR spektru ikatibant acetata predstavlja amidnu vrpcu I, koja se pojavljuje u području oko 1630 cm^{-1} (1634.24 cm^{-1}). Zbog brojnih vodikovih veza prisutnih u molekuli ikatibant acetata koje smanjuju karakter dvostruke CO veze, valni brojevi na kojima se pojavljuju amidne vrpce i drugi karakteristični pikovi pomaknuti su prema nešto nižim vrijednostima. Sekundarni amidi u čvrstom agregatnom stanju također pokazuju karakterističnu apsorpciju u području od 1570 do 1515 cm^{-1} , što odgovara amidnoj vrpici II. Pojava amidne vrpce II uzrokovana je

deformacijom NH veze i istezanjem CN veze. U FTIR spektru ikatibant acetata, amidna vrpca II pojavljuje se u blizini amidne vrpce I, odnosno u području oko 1540 cm^{-1} (1540.75 cm^{-1}).

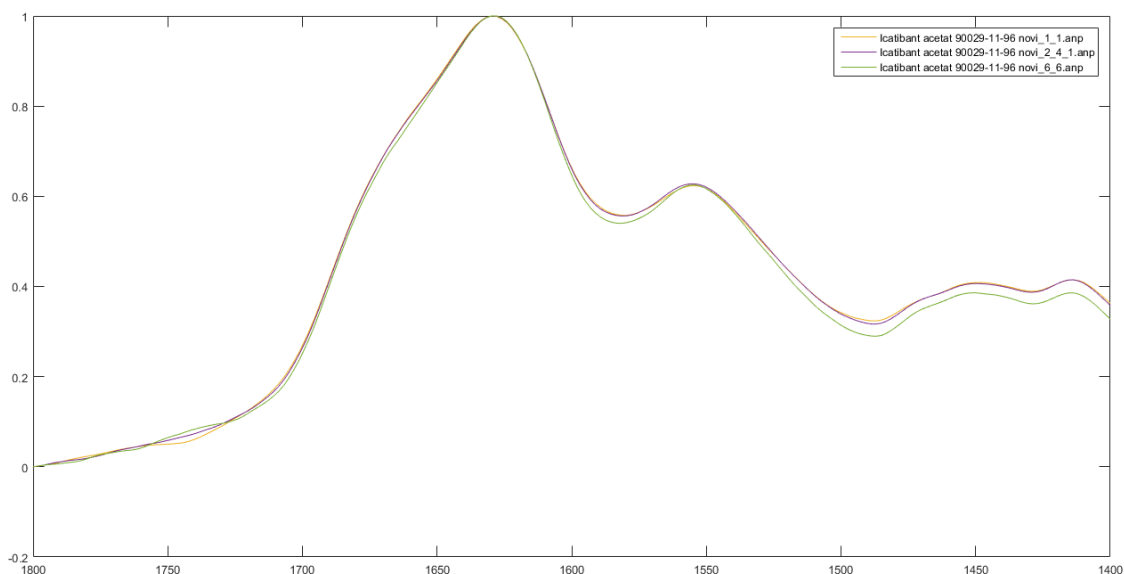


Slika 6. FTIR spektrar čvrstog uzorka ikatibant acetata

4.4.2.2. Bio-FTIR

Programskom obradom rezultata mjerenja Bio-FTIR spektra dobivaju se informacije o zastupljenosti pojedinog oblika sekundarne strukture peptida. Bio-FTIR spektrar uzorka peptida treba sadržavati dva pika koja odgovaraju amidnim vrpcoma I i II te čiji omjer intenziteta odgovara intervalu 1.2-1.7. Osim toga, u spektru treba biti vidljiva prisutnost amidnih vrpce III, te vrpce koje odgovaraju istezanju CH kemijske veze. U području spektra ispod 1800 cm^{-1} ($1800\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$) treba biti prisutna ravna osnovna linija. U spektru ne smiju biti vidljive vrpce uzrokovane prisutnošću vlage.

Analizom uzorka otopine ikatibant acetata te placebo otopine i pozadinskog šuma, dobiven je Bio-FTIR spektrar pojedinačnih uzoraka ikatibant acetata. Na spektru se uočavaju dva pika koja odgovaraju amidnoj vrpce I u području oko 1630 cm^{-1} te amidnoj vrpce II u području oko 1550 cm^{-1} . Vidljive su amidne vrpce III u području $1490\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$. Ovi rezultati u skladu su s onima dobivenim analizom FTIR spektra čvrstog uzorka ikatibant acetata.



Slika 7. Presjek Bio-FTIR spektra tri otopine uzorka iKatibant acetata

Analizom Bio-FTIR spektara uzoraka otopine iKatibant acetata dobiveni su podaci o zastupljenosti pojedinih oblika sekundarne strukture u peptidu koji su prikazani u Tablici 7. Rezultati ukazuju da je najzastupljeniji oblik sekundarne strukture u iKatibant acetatu β -ploča (42.90%), zatim slijede β -okreti te struktura nasumičnog klupka.

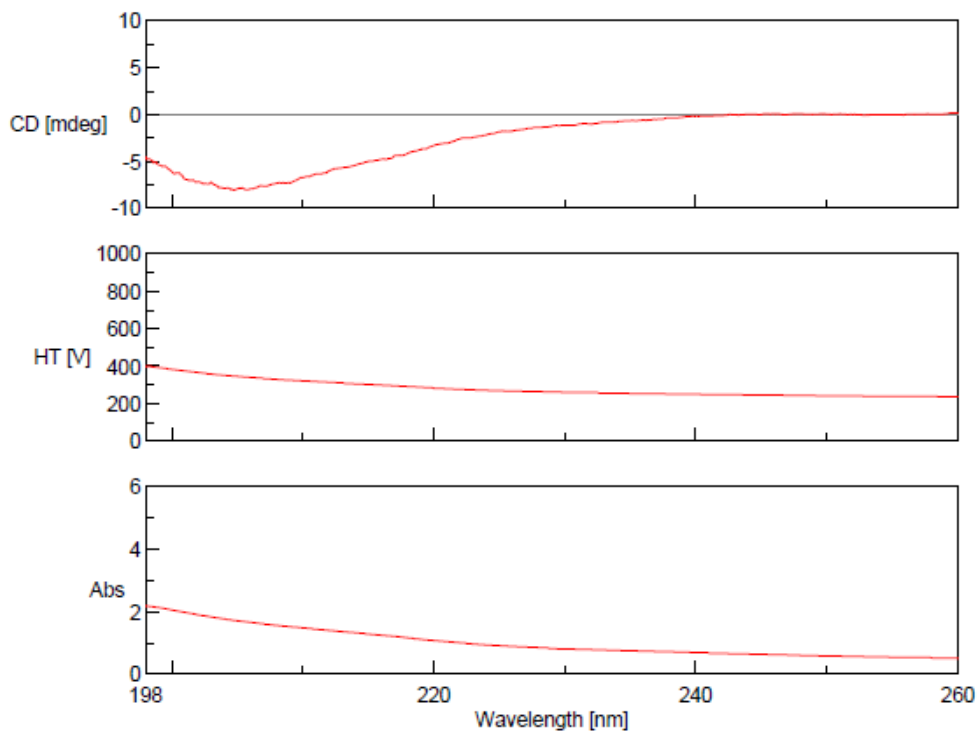
Tablica 7. Raspodjela oblika sekundarne strukture u uzorcima otopine iKatibant acetata

| | Uzorak 1/% | Uzorak 2/% | Uzorak 3/% | Prosječno/% |
|---------------------|------------|------------|------------|-------------|
| α -uzvojnica | 12.48 | 12.43 | 12.67 | 12.53 |
| β -ploča | 42.75 | 42.96 | 43.00 | 42.90 |
| β -okret | 15.19 | 15.32 | 15.10 | 15.20 |
| zavoj | 12.53 | 12.51 | 12.51 | 12.52 |
| nasumično klupko | 15.26 | 15.19 | 14.98 | 15.14 |
| ukupno | 98.21 | 98.41 | 98.26 | 98.29 |

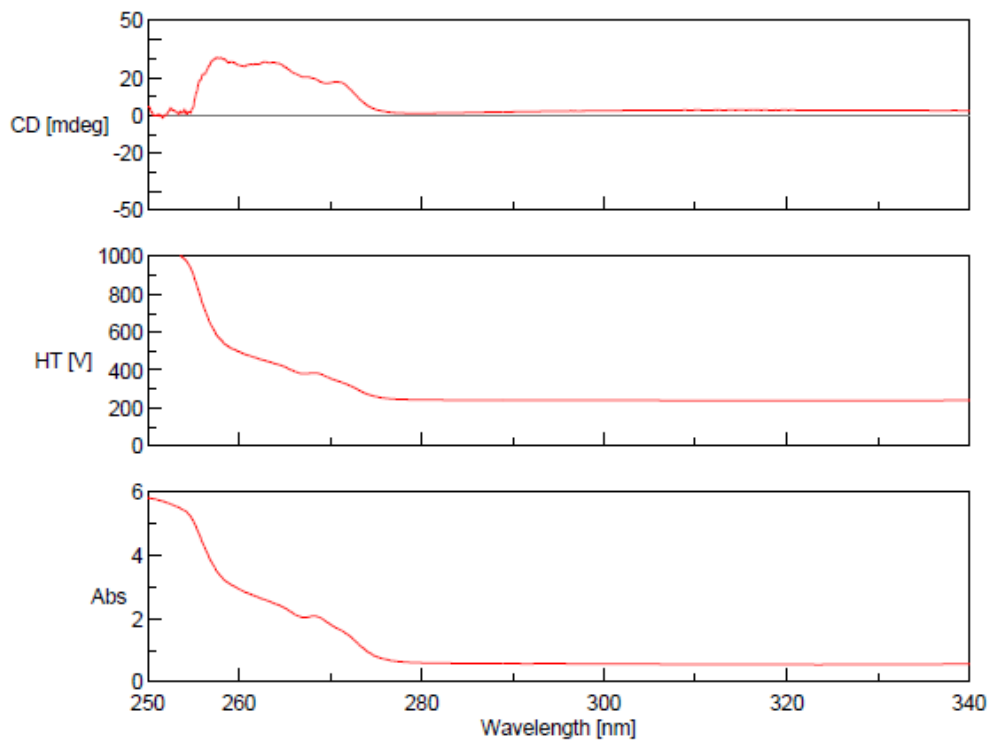
4.4.3. Cirkularni dikroizam

Analizom otopine uzorka iKatibant acetata koncentracije 1.2 mg/mL metodom cirkularnog dikroizma dobiveni su „far“ i „near“ -UV CD spektri prikazani na slikama 8 i 9. CD spektri korišteni su za određivanje sekundarne strukture uzorka.

U „far“-UV području mjerenja (198-260 nm) otopina uzorka ikatibant acetata više apsorbira lijevo polariziranu kružnu svjetlost, na što ukazuje negativna vrpca u CD spektru. U „near“-UV području mjerenja (250-340 nm) otopina više apsorbira desno polariziranu kružnu svjetlost.



Slika 8. Prikaz CD spektra u području 198-260 nm



Slika 9. Prikaz CD spektra u području 250-340 nm

Zastupljenost pojedinih oblika sekundarne strukture uzorka ikatibant acetata dobivena je obradom CD spektra (mjenenog u području 198-260 nm) po Yangovoj i Reedovoj referenci te je prikazana u Tablici 8.

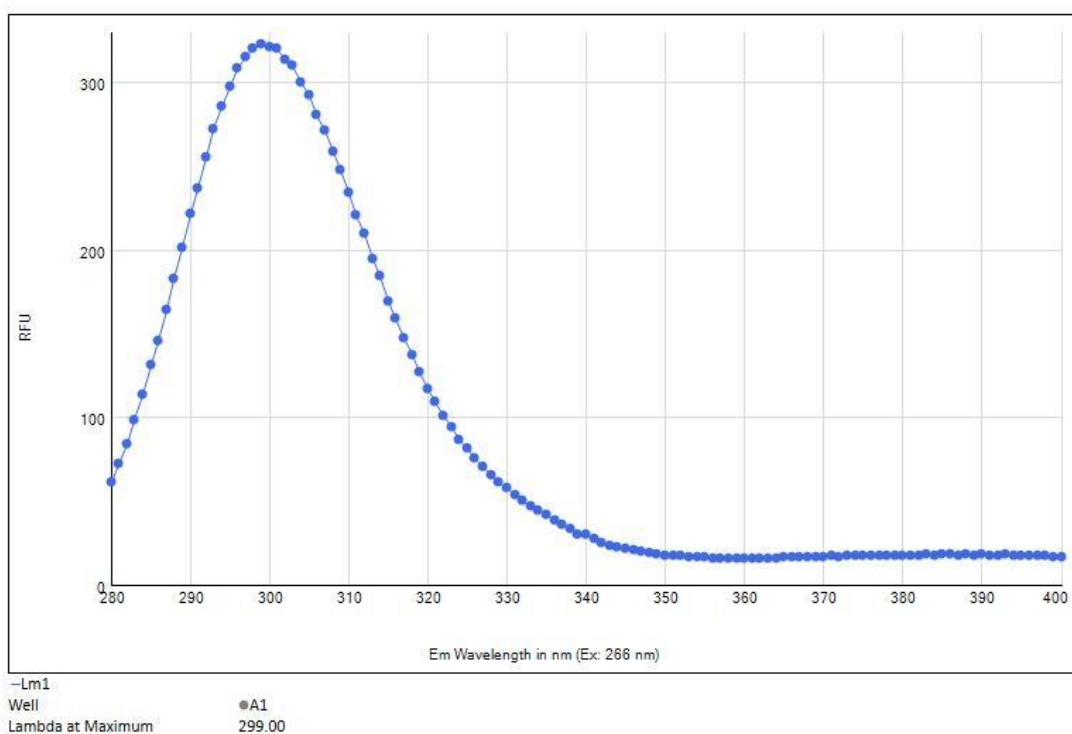
Tablica 8. Zastupljenost oblika sekundarne strukture uzorka otopine ikatibant acetata

| | Zastupljenost po Yangu/% | Zastupljenost po Reedu/% |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| α -uzvojnica | 0.8 | 1.0 |
| β -nabrana ploča | 57.4 | 33.3 |
| β -zavoj | 11.6 | 14.8 |
| nasumično klupko | 30.2 | 50.9 |
| ukupno | 100 | 100 |

4.4.4. Fluorescencija

Mjerenjem fluorescencijskog spektra otopine ikatibant acetata utvrđeno je da je ekscitacijski prag ikatibant acetata na valnoj duljini 266 nm te da je emisijski maksimum, odnosno maksimum fluorescencije na valnoj duljini od 299 nm.

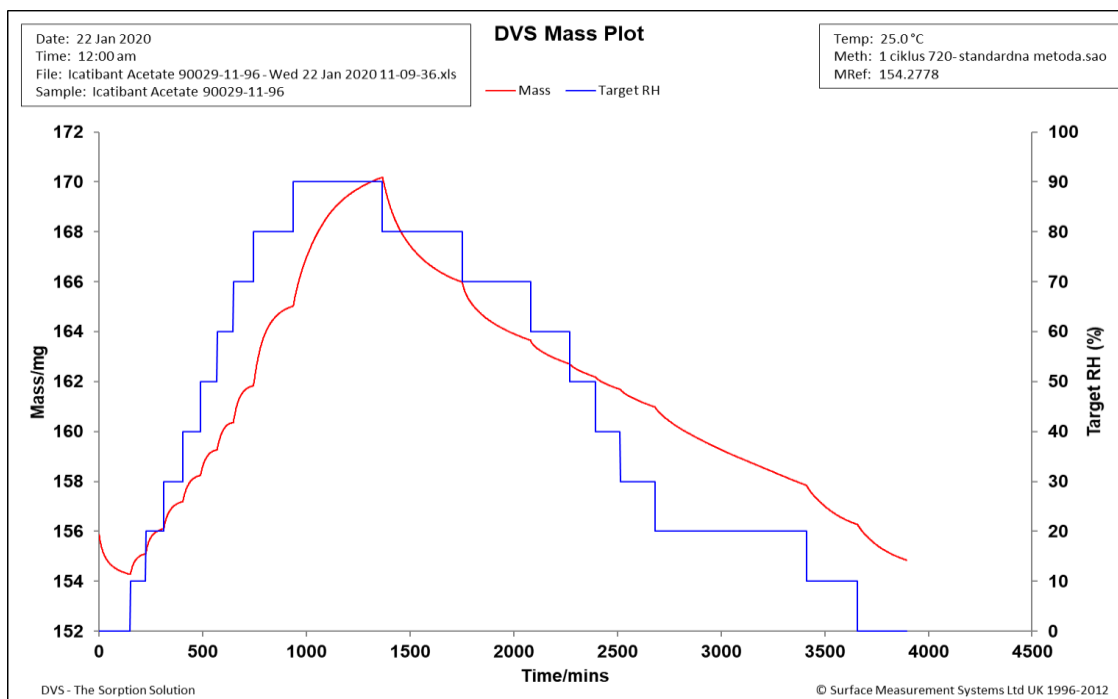
Intenzitet fluorescencije na emisijskom maksimumu jest relativno nizak, što je uvjetovano strukturom molekule ikatibant acetata. Molekule koje fluoresciraju imaju više kromofora, krutu strukturu, a sadrže i visoko konjugirane dvostruke veze, aromatske prstenove i cikličke karbonilne skupine. Peptidi općenito pokazuju jaku fluorescenciju zbog aromatskih aminokiselina poput triptofana, tirozina i fenilalanina u svojoj strukturi. Intenzitet fluorescencije ikatibant acetata slab je jer on u strukturi ne sadrži aromatske aminokiseline, cikličke karbonilne skupine ni konjugirane dvostruke veze. Fluorescencija ikatibant acetata može biti uzrokovana prisutnošću aromatskih prstena tiofena i tetrahidroizokinolina.



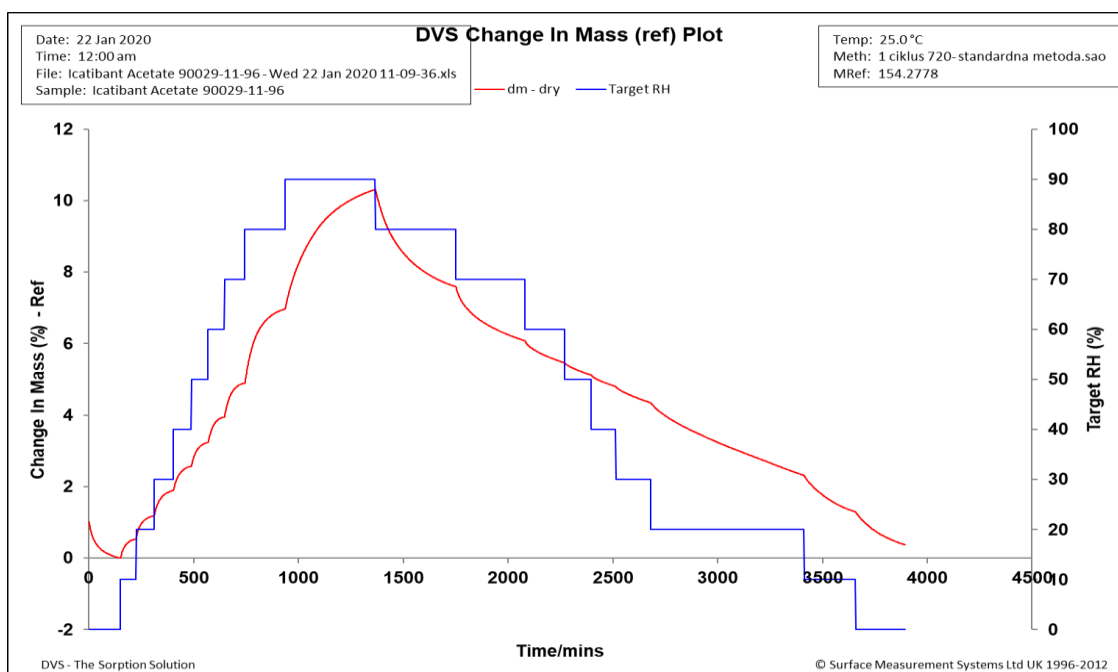
Slika 10. Fluorescencijski spektar uzorka ikatibant acetata

4.4.5. Dinamička sorpcija vode

Dinamička sorpcija vode prati se mjerenjem promjene mase uzorka pri izlaganju različitim vrijednostima relativne vlažnosti. Relativna vlažnost okoline uzorka izotermno se povećava uslijed čega raste masa uzorka zbog sorpcije (adsorpcije i apsorpcije) vode i postizanja ravnoteže. Zatim se relativna vlažnost smanjuje, što uzrokuje smanjenje mase uzorka zbog desorpcije vodene pare s uzorka. Opisani procesi u slučaju čvrstog uzorka ikatibant acetata vidljivi su na slikama 11 i 12.

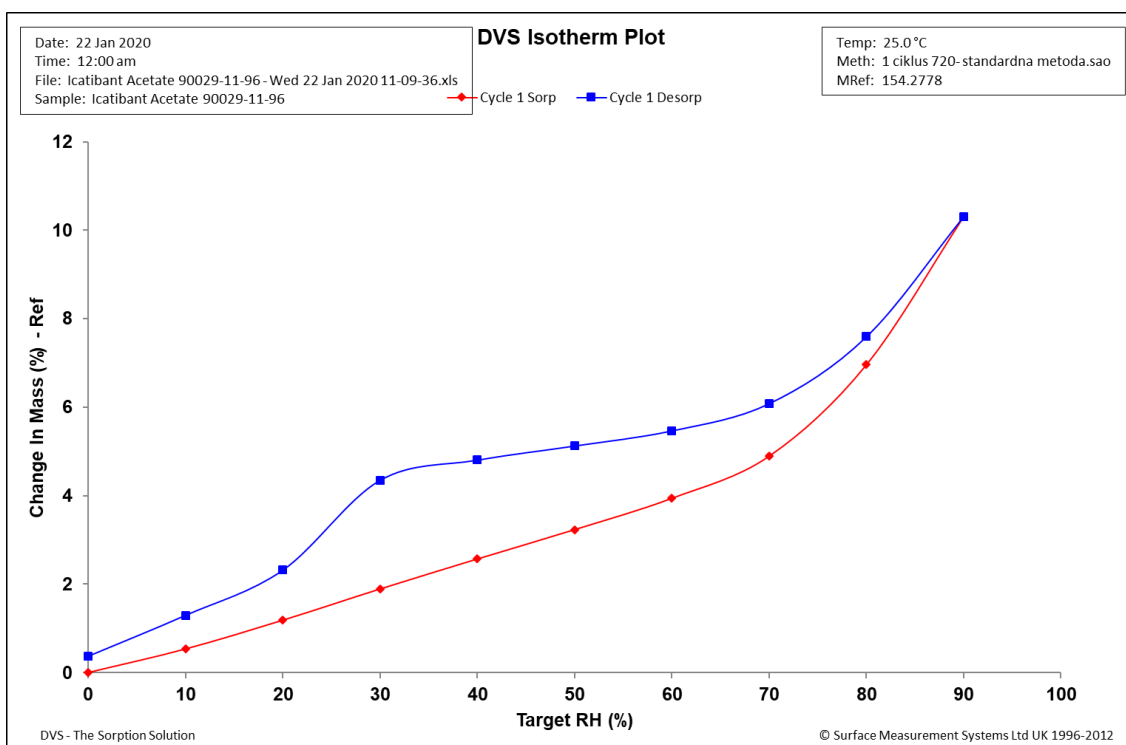


Slika 11. Ovisnost mase uzorka ikatibant acetata i relativne vlažnosti o vremenu



Slika 12. Ovisnost promjene mase i relativne vlažnosti o vremenu

Razlika u promjeni mase uzorka na početku i kraju mjerenja odgovara razlici između izotermi sorpcije i desorpcije koja je uočljiva na slici 13. Ta promjena mase poznata je kao histereza uz pomoć koje se može doznati o poroznosti uzorka i mehanizmu sorpcije.



Slika 13. Prikaz izotermi sorpcije i desorpcije vlage ikatibant acetata

Tablica 9. Promjena mase uzorka ikatibant acetata u ovisnosti o relativnoj vlažnosti okoline

| Relativna vlažnost | Promjena mase uzorka (%) | | |
|--------------------|--------------------------|------------|-----------|
| | sorpcija | desorpcija | histereza |
| 0.0 | 0.00 | 0.37 | |
| 10.0 | 0.53 | 1.30 | 0.76 |
| 20.0 | 1.18 | 2.32 | 1.13 |
| 30.0 | 1.89 | 4.35 | 2.46 |
| 40.0 | 2.57 | 4.80 | 2.24 |
| 50.0 | 3.23 | 5.12 | 1.89 |
| 60.0 | 3.94 | 5.47 | 1.53 |
| 70.0 | 4.89 | 6.08 | 1.19 |
| 80.0 | 6.96 | 7.59 | 0.63 |
| 90.0 | 10.31 | 10.31 | |

Primjenom ove metode doznaje se o ponašanju čvrstog uzorka ikatibant acetata pri izlaganju različitim uvjetima relativne vlažnosti okoline, što je važno pri formuliranju ljekovitog oblika, određivanju sadržaja uzorka, rukovanja pri proizvodnji, te uvjeta pri skladištenju.

5. ZAKLJUČCI

Generički peptidni lijekovi u posljednje vrijeme sve se češće proizvode kemijskom sintezom, dok je većina originalnih peptidnih lijekova na tržištu trenutno rekombinantnog podrijetla. Kako bi generički peptidni lijek dobio odobrenje za stavljanje na tržište, potrebno je dokazati istovjetnost peptidne djelatne tvari u generičkom sintetskom i originalnom rekombinantnom lijeku. Za dokazivanje istovjetnosti peptidnih lijekova proizvedenih različitim proizvodnim procesima potrebno je koristiti širok spektar analitičkih tehnika. Potrebno je identificirati djelatnu tvar, provesti strukturnu karakterizaciju, ispitati čistoću te imunogenost i biološku aktivnost peptidnog lijeka. Korištene tehnike trebaju biti validirane i ortogonalne. Identifikacija se može provesti primjenom RP-HPLC kao metode primarne identifikacije, a za sekundarnu identifikaciju mogu se provesti peptidno mapiranje, aminokiselinska analiza, a moguća je i primjena masene spektrometrije, kapilarne elektroforeze i drugih analitičkih tehnika. Primarna struktura peptida ključni je čimbenik njegove imunogenosti, a sekundarna struktura povezana je s biološkom aktivnosti peptida. Peptidno mapiranje i aminokiselinska analiza se uz Edmanovu degradaciju i MS koriste za karakterizaciju primarne strukture. Za karakterizaciju sekundarne strukture koriste se NMR, infracrvena spektroskopija (IR, FTIR), Raman i fluorescencijska spektroskopija, cirkularni dikroizam te rendgenska kristalografija. Korištenjem tehnika poput ion-mobilne masene spektrometrije moguće je karakterizirati i strukture višeg reda. Posebnu pažnju potrebno je posvetiti profilu čistoće lijeka, jer prisutna onečišćenja mogu biti biološki aktivna i utjecati na imunogenost lijeka. Onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenja lijeka. Potrebno je kontrolirati onečišćenja, prijaviti njihovu prisutnost, identificirati ih i odrediti u skladu s razinom prisutnom u lijeku. Najčešće korištene metode za analizu onečišćenja su RP-HPLC-UV i HPLC-MS. Potrebno je ispitati imunogenost i biološku aktivnost peptidnog lijeka koristeći *in vitro* i *in vivo* studije poput ispitivanja vezanja na MHC molekule. Kako bi se ispitala istovjetnost generičkog i originalnog peptidnog lijeka dobivenih različitim metodama proizvodnje, navedena ispitivanja potrebno je provesti usporedno. Trenutno ne postoji zakonski okvir u području peptida, što farmaceutskoj industriji otežava stavljanje novih peptidnih lijekova na tržište. Zbog novog vala popularnosti peptida i rastuće potrebe za liječenjem metaboličkih te drugih infektivnih i upalnih bolesti, očekuje se da svjetske regulatorne agencije u bližoj budućnosti uspostave harmonizirani set smjernica kako bi se olakšala proizvodnja i kontrola kvalitete peptidnih lijekova, te lijekovi postali dostupniji populaciji.

6. LITERATURA

1. Anderson J., Bell C., Bishop J., Capila I., Ganguly T., Glajch J., Iyer M., Kaundinya G., Lansing J., Pradines J., Prescott J., Cohen B.A., Kantor D., Sachleben R. Demonstration of equivalence of a generic glatiramer acetate (GlatopaTM). *J Neurol Sci*, 2015, 359, 24-34.
2. Andrushchenko V.V., Vogel H.J., Prenner E.J. Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides. *J Pept Sci*, 2007, 13, 37-43.
3. Awotwe-Otoo D., Agarabi C., Keire D., Lee S., Raw A., Yu L., Habib M.J., Khan M.A., Shah R.B. Physicochemical Characterization of Complex Drug Substances: Evaluation of Structural Similarities and Differences of Protamine Sulfate from Various Sources. *AAPS J*, 2012, Vol.14 No.3, 619-626.
4. Bak A., Leung D., Barret S.E., Forster S., Minnihan E.C., Leithead A.W., Cunningham J., Toussaint N., Crocker L.S. Physicochemical and Formulation Developability Assessment for Therapeutic Peptide Delivery – A Primer. *AAPS J*, 2015, Vol.17., No.1, 144-155.
5. Boutin J.A., Tartar A.L., van Dorsselaer A., Vaudry H. General lack of structural characterization of chemically synthesized long peptides. *Protein Sci*, 2019, Vol.28, 857-867.
6. Chi-Lung Lee A., Harris J.L., Khanna K.K., Hong J-H. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 2383.
7. Currier J.R., Galley L.M., Wenschuh H., Morafo V., Ratto-Kim S., Gray C.M., Maboko L., Hoelscher M., Marovich M.A., Cox J.H. Peptide Impurities in Commercial Synthetic Peptides and Their Implications for Vaccine Trial Assessment. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 267-276.
8. D' Alessandro J., Garofalo K., Zhao G., Honan C., Duffner J., Capila I., Fier I., Kaundinya G., Kantor D., Ganguly T. Demonstration of Biological and Immunological Equivalence of a Generic Glatiramer Acetate. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16, 714-723.
9. De Spiegeleer B., Vergote V., Pezeshki A., Peremans K., Burvenich C. Impurity profiling quality control testing of synthetic peptides using liquid chromatography-photodiode array-fluorescence and liquid chromatography-electrospray ionization mass-spectrometry the obestatin case. *Anal Biochem*, 2008, 376, 229-234.
10. D'Hondt M., Bracke N., Taevernier L., Gevaert B., Verbeke F., Wynendaele E., De Spiegeleer B. Related impurities in peptide medicines. *J Pharm Biomed Anal*, 2014.
11. Dystrophine, <http://flipper.diff.org/>, zadnje pristupljeno 8.7.2020.

12. Eon-Duval A., Broly H., Gleixner R. Quality Attributes of Recombinant Therapeutic Proteins: An Assessment of Impact on Safety and Efficacy as Part of a Quality by Design Development Approach. *Biotechnol Prog*, 2012, Vol. 28, No. 3, 608-622.
13. Finder V.H., Vodopivec I., Nitsch R.M., Glockshuber R. The recombinant amyloid- β peptide A β 1-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic A β 1-42. *J Mol Biol*, 2010, 396, 9-18.
14. Firazyr, 2019., <https://www.ema.europa.eu>, zadnje pristupljeno 25. 5. 2020.
15. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*, 2014, Vol. 00, No. 00.
16. Garay R.P., E-Gewely R., Armstrong J.K., Garray G., Richette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, Vol. 9 No.11, 1319-1323.
17. Grauer A., Ziegler R., Raue F. Clinical significance of antibody against calcitonin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995, 103, 345-51.
18. Grosse S., Samonig M., De Pra M., Steiner F. Impurity profiling of the synthetic peptide LL-37 using high-performance liquid chromatography with combined UV and single quadrupole mass spectrometric detection. *Brochure-Termo Fisher Scientific*, Germany, 2018.
19. Gucinski A.C., Boyne II M.T., Keire D.A. Modern analytics for naturally derived complex drug substances: NMR and MS tests for protamine sulfate from chum salmon. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407, 749-759.
20. Guzmán F., Barberis S., Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron J Biotechnol*, 2007, Vol.10 No.2, 279-314.
21. Icatibant acetate, <https://drugbank.ca>, zadnje pristupljeno 25. 5. 2020.
22. Johnson M., Liu M., Struble E., Hettiarachchi K. Characterization of cyclic peptides containing disulfide bonds. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109, 112-120.
23. Litowski J.R., Semchuk P.D., Mant C.T., Hodges R.S. Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for the purification of synthetic peptides from closely related impurities: serine side-chain acetylated peptides. *J Pept Res*, 1999, 54, 1-11.
24. Nehete J.Y., Bhambar R.S., Gawali S.R. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacogn Rev*, 2013, Vol.7 No.14, 107-116.
25. Pang X., Jia C., Chen Z., Li L. Structural characterization of monomers and oligomers of D-amino acid-containing peptides using T-wave ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 2017, Vol.28 No.1, 110-118.

26. Preet P. Peptides: A new therapeutic approach. *Int J Curr Pharm Res*, 2018, Vol 10, No.2, 29-34.
27. Rastogi S., Shukla S., Kalaivani M., Singh G.N. Peptide-based therapeutics: quality specifications, regulatory considerations, and prospects. *Drug Discov Today*, 2019, Vol.24 No.1, 148-162.
28. Rogstad S., Pang E., Sommers C., Hu M., Jiang X., Keire D.A., Boyne II M.T. Modern analytics for synthetically derived complex drug substances: NMR, AFFF-MALS, and MS tests for glatiramer acetate. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407, 8647-8659.
29. Sroda K., Rydlewski J., Langner M., Kozubek A., Gryzbek M., Sikorski A.F. Repeated injections of PEG-PE liposomes generate anti-PEG antibodies. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, Vol. 10 No.1, 37-47.
30. Stoppacher N., Josephs R.D., Daireaux A., Choteau T., Westwood S.W., Wielgosz R.I. Impurity identification and determination for the peptide hormone angiotensin I by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry and the metrological impact on value assignments by amino acid analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405, 8039-8051.
31. Surewicz W.K., Mantsch H.H. The conformation of dynorphin A(1-13) in aqueous solution as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Mol Struct*, 1989, 214, 143-147.
32. Switzar L., Nicolardi S., Rutten J.W., Lesnik Oberstein S.A.J., Aartsma-Rus A., van der Burgt Y.E.M. In-Depth Characterization of Protein Disulfide Bonds by Online Liquid Chromatography-Electrochemistry-Mass Spectrometry. *J Am Mass Spectrom*, 2016, 27, 50-58.
33. Van Dorpe S., Verbeken M., Wynendaele E., De Spiegeleer B. Purity Profiling of Peptide Drugs. *J Bioanal Biomed*, 2011, S6: 003.
34. Vergote V., Burvenich C., Van de Wiele C., De Spiegeleer B. Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach. *J Pept Sci*, 2009, 15, 697-710.
35. Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*, 2010, Vol.15 No.1/2, 40-56.
36. Wang X.Y., Ishida T., Kiwada H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J Control Release*, 2007, Vol. 119 No.2, 236-244.
37. Wu L. Regulatory Considerations for Peptide Therapeutics. U: Peptide Therapeutics: Strategy and Tactics for Chemistry, Manufacturing and Controls. Srivastava V., urednik, The Royal Society of Chemistry, 2019, str. 1-30.

38. Wu L.C., Chen F., Lee S.L., Raw A., Yu L.X. Building parity between brand and generic peptide products: Regulatory and scientific considerations for quality of synthetic peptides. *Int J Pharm*, 2017, 518, 320-334.
39. Xiang S.D., Scholzen A., Minigo G., David C., Apostolopoulos V., Mottram P.L., Plebanski M. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*, 2006, Vol. 40, No.1, 1-9.
40. Yang J. Rapid Screening of Peptide Impurities in Calcitonin-Salmon Nasal Spray Using Data-Dependent LC-MS-MS And Data-Independent LC-MS. ASMS Poster, 2017.
41. Zeng K., Geerlof-Vidavisky I., Gucinski A., Jiang X., Boyne II M.T. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry for Peptide Drug Quality Control. *AAPS J*, 2015, Vol.17 No.3, 643-651.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Peptidni lijekovi i njihov široki terapijski potencijal postali su dostupniji općoj populaciji dolaskom generičkih peptidnih lijekova na tržište. Usprkos tome što ne postoje opće harmonizirane zakonske smjernice za proizvodnju i kontrolu kvalitete peptida, farmaceutska industrija pod pritiskom je plasiranja generičkih peptidnih lijekova na tržište kako bi se zadovoljile potrebe liječenja populacije. Kako bi generički lijek dobio odobrenje za stavljanje na tržište, potrebno je dokazati njegovu istovjetnost s originalnim lijekom, često proizvedenim različitim proizvodnim procesom. U svrhu ispitivanja istovjetnosti generičkih i originalnih peptidnih lijekova provode se brojne usporedne analize korištenjem širokog spektra analitičkih tehnika. Potrebno je provesti identifikaciju tvari, analizirati različite razine strukturnog uređenja peptidnih molekula, ispitati njihova fizikalno-kemijska i biološka svojstva te utjecaj na organizam u smislu imunogenosti te biološke aktivnosti i potentnosti. Posebnu pažnju treba posvetiti ispitivanju prisutnih i mogućih onečišćenja u djelatnoj tvari te u završnoj formulaciji. U ovom diplomskom radu je prikazana karakterizacija decapeptida ikatibanta upotrebom novijih osjetljivih analitičkih tehnika.

Peptide drugs and their wide therapeutic potential have become more available for patients around the world when generic peptide drugs entered to drug market. Although there are still no general guidelines for manufacturing and quality control of peptide drugs, pharmaceutical industry is working under pressure in order to place generic peptides to the market so they could accomplish their purpose in medical treatment. Pharmaceutical companies that are seeking approval for putting generic peptide drug on the market need to demonstrate sameness between original and generic peptide drug. This is often challenging, given that manufacturing process of original and generic drug may vary. Wide range of analytical techniques are used in order to establish sameness and justify equivalence between original and generic peptide drugs. Some of many comparative tests that have to be done are identification of active pharmaceutical substance, molecule structure characterization, examination of physicochemical and biological properties such as biological activity and immunogenicity. Particular attention should be given to impurities that could be present in the active substance or final drug product. In this Bachelor's thesis, characterization of decapeptide icatibant using novel sensitive analytical techniques has also been presented.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Samostalni kolegij Industrijska farmacija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GENERIČKI PEPTIDNI LIJEKOVI: METODE KARAKTERIZACIJE I PROCJENA ISTOVJETNOSTI

Katarina Bernatović

SAŽETAK

Peptidni lijekovi i njihov široki terapijski potencijal postali su dostupniji općoj populaciji dolaskom generičkih peptidnih lijekova na tržište. Usprkos tome što ne postoje opće harmonizirane zakonske smjernice za proizvodnju i kontrolu kvalitete peptida, farmaceutska industrija pod pritiskom je plasiranja generičkih peptidnih lijekova na tržište kako bi se zadovoljile potrebe liječenja populacije. Kako bi generički lijek dobio odobrenje za stavljanje na tržište, potrebno je dokazati njegovu istovjetnost s originalnim lijekom, često proizvedenim različitim proizvodnim procesom. U svrhu ispitivanja istovjetnosti generičkih i originalnih peptidnih lijekova provode se brojne usporedne analize korištenjem širokog spektra analitičkih tehnika. Potrebno je provesti identifikaciju tvari, analizirati različite razine strukturnog uređenja peptidnih molekula, ispitati njihova fizikalno-kemijska i biološka svojstva te utjecaj na organizam u smislu imunogenosti te biološke aktivnosti i potentnosti. Posebnu pažnju treba posvetiti ispitivanju prisutnih i mogućih onečišćenja u djelatnoj tvari te u završnoj formulaciji. U radu je prikazana karakterizacija dekaeptida ikatibanta upotrebom novijih osjetljivih analitičkih tehnika.

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

Rad sadrži: 73 stranice, 13 grafičkih prikaza, 9 tablica i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: peptidni lijekovi, generički peptidi, istovjetnost, ekvivalencija, karakterizacija

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Independent course Industrial pharmacy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

GENERIC PEPTIDE DRUGS: CHARACTERIZATION METHODS AND SAMENESS EVALUATION

Katarina Bernatović

SUMMARY

Peptide drugs and their wide therapeutic potential have become more available for patients around the world when generic peptide drugs entered to drug market. Although there are still no general guidelines for manufacturing and quality control of peptide drugs, pharmaceutical industry is working under pressure in order to place generic peptides to the market so they could accomplish their purpose in medical treatment. Pharmaceutical companies that are seeking approval for putting generic peptide drugs on the market need to demonstrate sameness between original and generic peptide drug. This is often challenging due to the fact that manufacturing processes of original and generic drug could be different. Wide range of analytical techniques are used in order to establish sameness and justify equivalence between original and generic peptide drugs. Some of many comparative tests that have to be done are identification of active pharmaceutical substance, molecule structure characterization, examination of physicochemical and biological properties such as biological activity and immunogenicity. Particular attention should be given to impurities that could be present in the active substance material or final formulation of the drug. In this Bachelor's Thesis, characterization of decapeptide icatibant using novel sensitive analytical techniques has also been presented.

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

Thesis includes: 73 pages, 13 figures, 9 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: peptide drugs, generic peptides, sameness, equivalence, characterization

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jelena Filipović-Grčić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

