

การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ด้วยวิธีแคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง

ธิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์¹, วิชชุดา จริยะพันธุ์¹, สายวรุฬ จตุรภักดีพันธ์¹ และ อีรณารถ จิระไพศาลพงศ์¹

Received: 30 June 2014

Accepted: 10 March 2015

บทคัดย่อ

บทนำ: ปัจจุบันมีการนำเข้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพสู่ประเทศไทยจำนวนมาก และเนื่องจากเป็นยาโปรตีนซึ่งมีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนหากการควบคุมคุณภาพไม่เพียงพอจะทำให้คุณภาพของยาไม่สม่ำเสมอเกิดเป็นไอโซฟอร์ม (isoforms) ที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัย ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีแคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง (capillary isoelectric focusing: cIEF) เพื่อการตรวจเอกลักษณ์ของยาโดยอาศัยความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point: pI) ของโมเลกุลโปรตีน

วิธีดำเนินการวิจัย: ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี cIEF โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสแบบแคปิลลารี PA 800 Beckman Coulter ตามสภาวะที่กำหนด และใช้ยาโปรตีนชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีและ granulocyte colony stimulating factor ในการศึกษา **ผลการวิจัย:** วิธี cIEF สามารถแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจาก peptide markers และโปรตีนอื่น ได้ค่า pI ที่จำเพาะมีความเที่ยงทั้งการวิเคราะห์ในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยมีร้อยละของค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ pI ของพีคหลักน้อยกว่า 0.3 มีความคงทนที่ดีแม้เปลี่ยนผู้วิเคราะห์ แคปิลลารีและเจลต่างรุ่นก็ไม่มีผลกระทบต่อความถูกต้องของวิธี ได้ค่า %RSD ของ pI ของทุกพีคหลักน้อยกว่า 0.9 ผลการตรวจเอกลักษณ์ของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เทียบได้กับสารมาตรฐานทั้งค่า pI และลักษณะของพีค **สรุปผลการวิจัย:** ดังนั้นวิธี cIEF นี้จึงเหมาะสมในการนำมาเป็นหนึ่งในวิธีตรวจเอกลักษณ์ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อการควบคุมยาก่อนและหลังจำหน่ายสู่ตลาด

คำสำคัญ: แคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง โมโนโคลนอลแอนติบอดี จุดไอโซอิเล็กทริก ไอโซฟอร์ม
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(1): 45-54

¹ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** วิชชุดา จริยะพันธุ์ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 โทรศัพท์/โทรสาร 02-5915448 อีเมลล์: wichuda.j@dmasc.mail.go.th

Development of Identity Testing for Monoclonal Antibodies using Capillary Isoelectric Focusing Method

Titaporn Pootipinyawat¹, Wichuda Jariyapan^{*}, Saiwarul Jadoonkittinan¹ and Teeranart Jivapaisarnpong¹

Abstract

Introduction: Currently, many monoclonal antibodies produced by biotechnology are imported to Thailand. As protein drugs, their manufacturing process are complex; if quality control is inadequately performed, the drugs' quality would be inconsistent. When isoforms occur, they may affect drug efficacy and safety. Therefore, capillary isoelectric focusing (cIEF) was developed as identity testing based on isoelectric point (pI) differences of protein molecules. **Methods:** Validation of cIEF using PA 800 Beckman Coulter was performed and protein drugs; monoclonal antibody including granulocyte colony stimulating factor were used. **Results:** The validated conditions offered good separation of monoclonal antibodies from peptide markers, their specific pIs were shown. The results of both repeatability and reproducibility were precise; percent relative standard deviation (%RSD) for pIs of the main peaks was less than 0.3. Besides, this cIEF method was also robust; changes of analysts, a new capillary as well as a new lot of ampholyte did not affect its accuracy, the %RSDs for pIs of all the main peaks were less than 0.9. The identity test of monoclonal antibodies using this validated method gave comparable results to their reference materials including their pIs and peak patterns. **Conclusion:** Therefore, this cIEF method is suitable to use as one of the identity testing methods for quality control of monoclonal antibodies before and after distribution to market.

Keywords: capillary isoelectric focusing, monoclonal antibodies, isoelectric point, isoforms

IJPS 2015; 11(1):45-54

¹ Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanon Road, Muang District, Nonthaburi 11000

*** Corresponding author:** Wichuda Jariyapan, Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanon Road, Muang District, Nonthaburi, Thailand 11000 Tel/Fax 02-8915448 E-mail: wichuda.j@dmsc.mail.go.th

บทนำ

ผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ (biological products) ที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการรักษาโรค (biotechnological /biotherapeutic products) เป็นยากลุ่มโปรตีน ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: mAb) granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) erythropoietin interferon รวมทั้งโปรตีนและเปปไทด์สายสั้น (protein/peptide drugs) แตกต่างจากยาทั่วไป เนื่องจากผลิตมาจากสิ่งมีชีวิต มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนจึงต้องมีการออกแบบการผลิตและการควบคุมอย่างเข้มงวดเพื่อให้ได้ยาที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ออกแบบไว้ (Dubel, 2007; Roche, 2008; Shukla and Thommes 2010) อย่างไรก็ตามระหว่างขั้นตอนการผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการปรับแต่งโมเลกุลโปรตีนภายหลัง (post-translational modification: PTM) ทำให้ได้โมเลกุลของโปรตีนที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน (heterogeneity) ในแง่ของน้ำหนักประจุ และคุณสมบัติบางอย่าง ซึ่งจัดเป็นสารเจือปนจากตัวยา (product-related substances) โมเลกุลที่แตกต่างนี้อาจทำให้การทำหน้าที่และความคงทนของโมเลกุลยาต่างไปจากที่กำหนดไว้และอาจสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายผู้ที่ได้รับยาโปรตีนเหล่านี้ได้ (Jefferis, 2009; Kindt et al., 2006; WHO, 2013) ความหลากหลายของโมเลกุลโมโนโคลนอลแอนติบอดีแบบหนึ่งที่พบเสมอคือ ความแตกต่างของปริมาณประจุบนผิวโมเลกุลโปรตีน (charge variants/isoforms) ซึ่งมี 2 แบบ คือ acidic form และ basic form เมื่อเทียบกับโมเลกุลหลัก (main form) (Righetti, 2004; Zhou et al., 2004) ดังนั้นเพื่อการควบคุมคุณภาพและความสม่ำเสมอของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรุ่นสู่รุ่น ผู้ผลิตและภาครัฐจึงต้องตรวจสอบเอกลักษณ์เพื่อดูชนิดและปริมาณของ isoforms โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิค ion exchange chromatography และ gel isoelectric focusing (IEF) แต่มีข้อเสียคือวิธีไม่ค่อย

เสถียรทำให้ผลการทำซ้ำไม่เหมาะสม ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีแคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง (cIEF) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย ทนสมัย และวิเคราะห์ได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารจากความแตกต่างของประจุบนโมเลกุล

cIEF เป็นวิธีการแยกสารจากค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพสูงประกอบด้วย 3 ขั้นตอนสำคัญ (Ph. Eur., 2011; USP36/NF21) คือ loading step เป็นการเติมสารผสม ampholytes ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นประจุหรือพีเอชอยู่ในช่วง 3-10 ลงในท่อแคปิลลารี ขั้นตอนที่ 2 เป็น focusing step โดยให้ศักย์ไฟฟ้าสูง 25 kV เพื่อแยกโปรตีนแต่ละชนิดให้เคลื่อนในท่อที่ ampholytes มีค่าพีเอชเป็น gradient โปรตีนที่มีค่า pI สูงกว่าพีเอชจะมีประจุบวก โปรตีนที่มีค่า pI ต่ำกว่าจะมีประจุลบ เมื่อเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งใดที่ประจุมบนโมเลกุลเป็นศูนย์ โปรตีนจะหยุดการเคลื่อน ณ จุดนี้คือค่า pI ของโปรตีนนั้นๆ และขั้นตอนที่สาม mobilization step เป็นขั้นตอนที่โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดไปตามลำดับ (chemical mobilization) โดยเพิ่มศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นเป็น 30 kV และแสดงผล electropherogram เป็นพีคซึ่งมีความหมายทั้งตำแหน่งซึ่งบอกเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (migration time: MT) ความสูง (peak height) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ที่บอกถึงปริมาณพีคที่ขนาดใหญ่หรือสูงที่สุดจะเป็นพีคหลัก (major peak/main peak) ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดและมักจะมีพีคอื่นประกอบตามชนิดขององค์ประกอบในตัวอย่างทีวิเคราะห์โดยพีคที่อยู่ด้านขวาของพีคหลักจะมีค่าพีเอชต่ำกว่าพีคหลักเรียกเป็น acidic peak และในด้านตรงกันข้ามซึ่งค่าพีเอชสูงกว่าพีคหลักคือ basic peak ในการตรวจเอกลักษณ์ของโปรตีนจะคำนวณหาค่า pI ของตัวอย่างจาก MT ซึ่งค่า pI และ electropherogram ของตัวอย่างต้องตรงกับสารมาตรฐานชนิดนั้นๆ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนด

ของยา (product specification) หากค่า pI หรือ MT รวมทั้งรูปแบบ electropherogram เปลี่ยนแปลงจากเดิมหรือแตกต่างจากสารมาตรฐานจะทำให้ทราบว่ามีความผิดปกติหรือการปนเปื้อนของยาโปรตีนนั้น (Little et al., 2006; Zhou et al., 2004) ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น จากลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมเลกุลหลังการผลิต (PTM) หรือในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน เนื่องจากความไม่คงตัวของยาโดยที่ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์อาจเป็นไปตามเกณฑ์และการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของยาอาจไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ สถาบันชีววัตถุในฐานะห้องปฏิบัติการควบคุมกำกับยาชีววัตถุของรัฐจึงได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี cIEF เพื่อนำมาเป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานของประเทศนอกเหนือจากวิธีอื่นๆ ในการตรวจสอบเอกลักษณ์และประเมินคุณภาพยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับและเฝ้าระวังความปลอดภัยหลังจำหน่าย

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมืออุปกรณ์และสภาวะการทำงานของเครื่องมือ

เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี (capillary electrophoresis: CE) PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch, มีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด UV 280 nm และแคปิลลารีแบบ neutral-coated ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 50 μ m ความยาวทั้งหมด (L) 30.2 cm, เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบความเร็วสูง (Micro-Centrifuge II, Lab tech), เครื่องเขย่าสาร (Vortex Genie II, Scientific Industries)

สารละลาย และสารมาตรฐาน

สารละลาย: cIEF gel (Beckman Coulter # 477479), Anolyte (200 mM Phosphoric Acid), Catholyte (300 mM Sodium Hydroxide), Chemical Mobilizer (350 mM Acetic Acid), Cathodic Stabilizer (500 mM Arginine), Anodic Stabilizer (200 mM Iminodiacetic Acid), Urea Solution (4.3 M Urea), 3 M Urea- cIEF Gel, Pharmalyte 3-10 carrier ampholytes (GE Healthcare # 17-0456-01)

โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน cIEF Peptide Markers: pI 10.0, 9.5, 7.0, 5.5, 4.1 (Beckman Coulter # A58481)

สารมาตรฐาน: สารมาตรฐานโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ชนิด คือ mAb A, B และ C และ G-CSF จากบริษัทผู้ผลิต คือ Amgen, Centocor B.V. Leiden, Bristol-Myers Squibb, และ F. Hoffmann-La Roche ตามลำดับ

ตัวอย่าง

ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 ชนิด (mAb A, B และ C) และ G-CSF จำนวน 1 ชนิด จากบริษัทผู้ผลิตเดียวกับสารมาตรฐาน

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน (Mack et al., 2008)

เตรียม micro tube 2 หลอด สำหรับตัวอย่างและสารมาตรฐาน แล้วเติมสารเหล่านี้ลงในหลอดทั้ง 2 คือ 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 μ L carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 μ L cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 μ L anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 μ L และ pI มาตรฐาน 2 ชนิด ที่มีค่า pI ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่สุดชนิดละ 2.0 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 15 วินาที จากนั้นเติมสารมาตรฐานและตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 10 μ L ลงในหลอดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 6,600 rpm ประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนทำการทดสอบ

เตรียมโปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (cIEF peptide markers)

เปิด 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 uL ใส่ใน micro tube แล้วเติม pharmalyte 3-10 carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 uL cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 uL anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 uL จากนั้นเติม pl markers 10.0, 9.5, 7.0, 5.5 และ 4.1 ชนิดละ 2.0 uL ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 6,600 rpm

ประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนทำการทดสอบ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้โปรแกรม Excel version 2007 ในการคำนวณค่า SD

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามสภาวะที่กำหนดนี้ โดยพิจารณาความเที่ยงและทดสอบความคงทนของวิธีจากการเปลี่ยนแปลงรุ่นของเจล และท่อแคปิลลารี รวมทั้งนักวิเคราะห์ว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยนิตสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง CE (รายละเอียดดังตารางที่ 1) (Mack et al., 2008)

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้สำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธี cIEF ในขั้นตอนต่างๆ

step#	Time(min)	event	value	duration	comments
		rinse-pressure	50.0 psi	3.00 min	urea solution (4.3 M Urea) rinse
		rinse-pressure	50.0 psi	2.00 min	water rinse
		inject-pressure	25.0 psi	99.0 sec	sample injection
		wait		0.00 min	water dip
	0.00	separate-voltage	25.0 kV	15.00 min	focusing step
	15.00	separate-voltage	30.0 kV	30.00 min	chemical mobilization step
	45.00	stop data			stop cIEF separation
	45.10	rinse-pressure	50.0 psi	2.00 min	water rinse
	47.20	wait	15.0 kV	0.00 min	water dip
	47.30	end			method end

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบความเที่ยง เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกันได้ค่า pi และ MT ตรงกันทั้ง 6 ซ้ำ และ

วิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำ 3 วันในสภาวะเดียวกัน ได้ค่า pi ของพีคหลักมี %RSD น้อยกว่า 0.3 (รายละเอียดดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด A

Parameters		pI value			
		peak 1 (basic)	peak 2 (basic)	Main peak	peak 3 (acidic)
repeatability (day 1) N = 6	Average	8.85	8.65	8.37	8.22
	%RSD	0.06	0.06	0.10	0.06
repeatability (day 2) N = 6	Average	8.84	8.61	8.39	8.23
	%RSD	0.00	0.06	0.05	0.05
repeatability (day 3) N = 6	Average	8.84	8.63	8.38	8.23
	%RSD	0.07	0.26	0.05	0.09
intermediate precision, between-days 3 days N = 18	Average	8.84	8.63	8.38	8.23
	%RSD	0.06	0.02	0.11	0.10

ผลการทดสอบความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ ใช้เจลต่างรุ่นและเปลี่ยนท่อแคปิลลารี ค่า pI ของพีคหลักมี %RSD น้อยกว่า 0.9 (รายละเอียดดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงทนเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ เจลต่างรุ่นและท่อแคปิลลารี

Parameters		pI value			
		peak 1 (basic)	peak 2 (basic)	Main peak	peak 3 (acidic)
robustness ต่างนักวิเคราะห์ N = 6	Average	8.75	8.52	8.31	8.11
	%RSD	0.18	0.18	0.15	0.30
robustness เจลต่างรุ่น N = 6	Average	8.81	8.61	8.35	8.20
	%RSD	0.36	0.36	0.43	0.38
robustness ต่างท่อแคปิลลารี N = 6	Average	8.79	8.57	8.34	8.16
	%RSD	0.62	0.76	0.48	0.83

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ cIEF ระหว่าง พบว่าให้ค่าความเป็นเส้นตรงและความเที่ยงอยู่ในวิธีนี้กับวิธีที่ตีพิมพ์แล้ว (รายละเอียดดังตารางที่ 4) เกณฑ์ที่สอดคล้องกัน

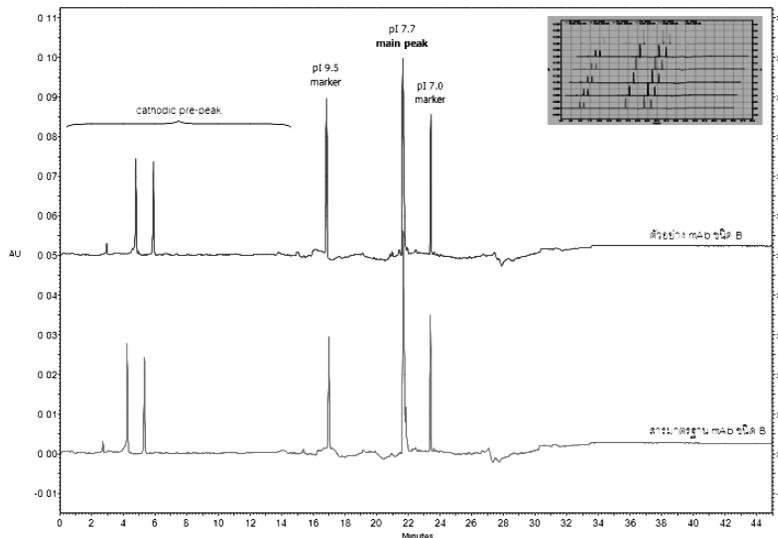
ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบสภาวะการวิเคราะห์ของวิธีนี้กับวิธีที่ตีพิมพ์

Column	Detector nm	Focusing step	Mobilization step	Samples	Linearity (r ²)	Reproducibility (%RSDs of pI value)	Ref.
Neutral coated, 50 µm i.d. x 30.2 cm	280	25.0 KV 15 min	30.0 KV 30 min	mAb	> 0.999	>1%	วิธีนี้
Dimethyl siloxane coated, 50 µm i.d. x 47 cm	280	30 KV 8-20 min	30 KV 20 min	rlgGs*	0.991	>3%	Tang S.
bioCAP LPA capillary, 50 µm i.d. x 24 cm	280	10,15,20 KV 6 min	10,15,20 KV 20 min	mAb	> 0.99	≥2%	Hunt G. (1998)
bioCAP LPA capillary, 50 µm i.d. x 24 cm	UV	625 V/cm 5 min	625 V/cm 17 min	mAb	> 0.99	>1%	Hunt G. (1996)
Neutral coated, 50 µm i.d. x 30.2 cm	280	25.0 KV 15 min	25.0 KV 30 min	mAb	> 0.999	>1%	Maeda E.
Neutral coated, 50 µm i.d. x 31 cm	280	580 V/cm 8 min	645 V/cm 28 min	mAb	> 0.99	>1%	Santora L.C.

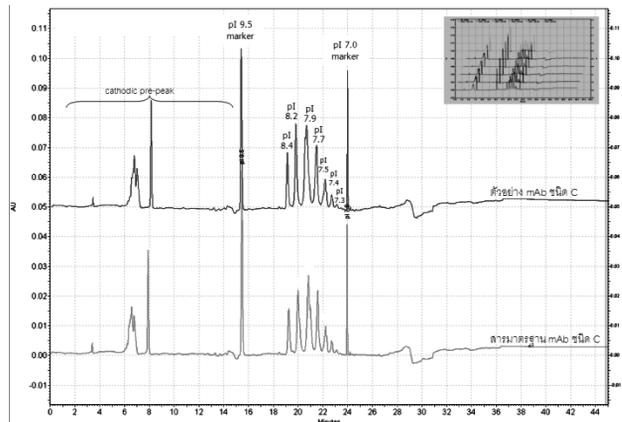
*rlgGs = recombinant immunoglobulin G

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และ G-CSF เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ตามสภาวะของวิธี cIEF ที่ได้ตรวจสอบความใช้ได้แล้ว

พบว่าตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด B และ G-CSF ได้ electropherogram และ ค่า pI ตรงกับสารมาตรฐานชนิดนั้นๆ (รายละเอียดจัดรูปที่ 1-2)



รูปที่ 1 Electropherogram ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด B และผลการฉีดทั้ง 6 ครั้ง (ในกรอบ)



รูปที่ 2 Electropherogram ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด C และผลการฉีดทั้ง 6 ครั้ง (ในกรอบ)

อภิปรายและสรุปผลวิจัย

วิธี cIEF นี้เป็นวิธีวิเคราะห์หนึ่งที่ใช้ในตำรายาสากล (Ph. Eur., 2011; USP, 2013) สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ ความบริสุทธิ์และความคงตัวของ biotechnological products ซึ่งตำรายาจะระบุเพียงหลักการของวิธี ส่วนรายละเอียดนั้นขึ้นกับชนิดของเครื่องมือและการประยุกต์ใช้กับชนิดของตัวอย่าง ในการประเมินความใช้ได้ของวิธี cIEF ของการศึกษานี้ อาศัยหลักการที่ระบุในตำรายาเพื่อทดสอบความเที่ยง ความเป็นเส้นตรงและความคงทนของวิธี ซึ่งพบว่ามีความเที่ยงดีจาก %RSD ของ pI ของพีคหลักจากการฉีดซ้ำน้อยกว่า 0.3 วิธี cIEF นี้มีความคงทนที่ดีการเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ แคปิลลารีและเจล ไม่มีผลกระทบ ต่อผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ baseline ของ electropherogram ที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นเรียบมี noise ต่ำแสดงถึงความเสถียร และมีการแยกที่ดี พีคหลักของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (รูปที่ 1-2) ที่ปรากฏมีลักษณะสมมาตรและไม่เป็น tailing ผลการตรวจสอบความใช้ได้ในภาพรวมจากค่าทางสถิติของยืนยันว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ และจากข้อมูลการวิเคราะห์ pI ของ mAb ด้วย cIEF ของงานที่ตีพิมพ์แล้ว (ตารางที่ 4) ซึ่งแตกต่างในแง่ของ

เครื่องมือเช่น ชนิดและความยาวของคอลัมน์และ รายละเอียดของสภาวะวิธีพบว่าวิธีนี้ให้ค่าความน่าเชื่อถือทางสถิติเหมาะสมสอดคล้องกัน

เมื่อทดสอบตัวอย่างยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเป็นยาสำเร็จรูปที่ยื่นขอขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศ เมื่อนำมาศึกษาตัวยังอยู่ในอายุของยาโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งชนิด B และ C มีขนาดน้ำหนักประมาณ 150 kDa ใช้รักษาโรคต่างชนิดกัน ผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างด้วยวิธีที่ตรวจสอบความใช้ได้แล้วนี้ พบว่าสามารถแยกไอโซฟอร์มของโปรตีนได้ดี โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด B ปรากฏพีคหลักเพียงพีคเดียวมี pI ที่ 7.7 (รูปที่ 1) ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด C (รูปที่ 2) มี 7 ไอโซฟอร์ม ซึ่งมีค่า pI ต่างกันเพียงเล็กน้อย คือ 7.3, 7.4, 7.5, 7.7, 7.9, 8.2 และ 8.4 โดยมี electropherogram และค่า pI ตรงกับสารมาตรฐาน และจาก pI ของตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดมีค่าน้อยกว่า 9.0 ดังนั้น ampholytes ที่เลือกใช้ซึ่งมีค่า pH 3 - 10 นี้จึงเหมาะสมสามารถให้การแยกไอโซฟอร์มของตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ รวมทั้งโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้มีพีเอช 4.1 - 10.0 ครอบคลุมค่า pI ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ศึกษา

นอกจากนี้สภาวะที่กำหนดยังมีความจำเพาะสามารถแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากยา G-CSF ที่เติมลงไปซึ่งมีน้ำหนักใกล้เคียงกันคือ 18.8 kDa ได้ (ไม่แสดงข้อมูล)

เทคนิค cIEF ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพในการแยกโมเลกุลที่มี pI ใกล้เคียงกันได้ และยังสามารถรวดเร็วจากชุดเครื่องมืออัตโนมัติ เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งที่จะใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาโปรตีนร่วมกับเทคนิคอื่นซึ่งเป็นเรื่องสำคัญและจำเป็น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

References

Dubel S. Recombinant therapeutic antibodies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 74: 723-29.

European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia 2011 volume I. Nördlingen: Druckerei C.H. Beck; 2010; 77-82.

European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia, 2011 volume I. Nördlingen: Druckerei C.H. Beck; 2010: 692-3.

FDA. Food and Drug Administration. http://drug.fda.moph.go.th/zone_service/ser020.asp.

Hunt G, Hotaling T, Chen AB. Validation of a capillary isoelectric focusing method for the recombinant monoclonal antibody C2B8. *J Chromatogr A*. 1998; 800:355-67.

Hunt G., Moorhouse KG, Chen AB. Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2. *J Chromatogr A* 1996; 744 (1-2): 295-301.

Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(7): 356-62.

Jenkins MA, Ratnaik S. Capillary isoelectric focusing of haemoglobin variants in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 1999; 289: 121-132.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. editors. Kuby IMMUNOLOGY. 6th edition. New York: W.H. Freeman and Company. 2006; 85-9.

Little MJ, Paquette DM, Roos PK. Electrophoresis of pharmaceutical proteins: Status quo. *Electrophoresis* 2006; 27(12): 2477-2485.

Mack S, Cruzado-Park, ID, Ratnayake CK, Application Information Bulletin A-12026 A: High Resolution cIEF of Therapeutic Monoclonal Antibodies: A Platform Method Covering pH 4-10, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, 2008. [cited 2013 December 16]. Available from: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=A-12026A.pdf>.

Maeda E., Urakami K., Shimura K., et al. Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 7164-7171.

- Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia, the National Formulary: USP 36, NF 31 2013. United States Pharmacopoeia Convention. Rockville (MD): The United States Pharmaceutical Convention; 2013. 629-632.
- Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia, the National Formulary: USP 36, NF 31 2013. United States Pharmacopoeia Convention. Rockville (MD): The United States Pharmaceutical Convention; 2013. 551.
- Righetti PG. Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. *J Chromatogr A* 2004; 1037: 491–99.
- Roche. Biotechnology - New Directions in Medicine. 3rd edition. Basel: F. Hoffmann-La Roche Ltd. 2008.
- Santora LC, Krull IS, Gran KT. Characterization of Recombinant Human Monoclonal Tissue Necrosis Factor- α Antibody Using Cation-Exchange HPLC and Capillary Isoelectric Focusing. *Analytical Biochemistry* 1999; 275: 98–08.
- Shukla AA, Thommes J. Recent Advances in Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies and Related Proteins. *Trends Biotechnol* 2010; 28(5): 253-61.
- Sosic XZ, Krull IS. Capillary isoelectric focusing as a tool in the examination of antibodies, peptides and proteins of pharmaceutical interest. *J Chromatogr* 1996; 735:165-90.
- Tang S, Nesta DP, Maneri LR, Anumula KR. A method for routine analysis of recombinant immunoglobulins (rIgGs) by capillary isoelectric focusing (cIEF). *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19(3-4) 569–83.
- World Health Organization. WHO Technical Report Series No. 977. World Health Organization. Geneva. 2013; 51-89.
- Zhao SS, Chen DY. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics *Electrophoresis* 2014; 35(1): 96–108.
- Zhou GH, Luo GA, Sun GQ, Cao YC, Zhang XD, Zhang X. Characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rHuG-CSF) by capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35(3):425-32.