

**นิพนธ์ปริทรรศน์**

## หลักการพื้นฐานในการประเมิน Pharmaceutical Biotechnology Products เพื่อใช้ในทางการแพทย์

ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา\*

เนื่องจากในปัจจุบันเทคโนโลยีในการผลิตยาได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างมาก มียาจำนวนมากที่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (recombinant DNA technology และ cell culture) เช่น tissue plasminogen activator, hepatitis B vaccine, monoclonal antibodies ซึ่งยาเหล่านี้มิได้เป็นผลผลิตโดยตรงจากธรรมชาติ และมีขั้นตอนต่างๆ มากมายในกระบวนการผลิต ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคหากไม่มีการควบคุมคุณภาพและประเมินประสิทธิภาพอย่างดีพอ ในประเทศสหรัฐอเมริกาหน่วยงานที่มีบทบาทโดยตรงในการควบคุมผลิตภัณฑ์เหล่านี้คือ Food and Drug Administration (FDA) ได้ตั้งคณะทำงาน International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Human Use (ICH) ขึ้นเพื่อศึกษาและจัดทำหนังสือร่างการควบคุมคุณภาพที่ชื่อว่า "Q6B Specifications" ขึ้นในปี 1998 โดยมีความร่วมมือกับสถาบันต่างๆ ในอีกสองภูมิภาคคือ สหภาพยุโรป และ ญี่ปุ่น เพื่อหาแนวทางปฏิบัติที่เป็นสากลสำหรับประเมินประสิทธิภาพของยาที่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม โดยเฉพาะผลผลิตที่เป็น recombinant protein แต่ข้อกำหนดมาตรฐานนี้ไม่ครอบคลุมถึงสารในกลุ่ม antibiotics, synthetic peptide/polypeptides,

heparins, vitamins, cells metabolites, DNA products, allergenic extracts, conventional vaccines, whole blood และ cellular blood components ในที่นี้จะขออ้างอิงหนังสือร่างแนวทางฉบับนี้เป็นหลักเนื่องจากมีความทันสมัยมากที่สุด

### คุณสมบัติเฉพาะตัว (Characteristic and Specification)

ชีววัตถุภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnological product) มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สำคัญที่ใช้ในการกำหนดถึงประสิทธิภาพ และความเป็นพิษ คือ physicochemical properties, biological activities, immunochemical properties, purity, และ impurities คุณสมบัติเฉพาะตัวเหล่านี้ต้องถูกนำมาพิจารณาเป็นข้อมูลในการตัดสินใจนำมาใช้กับมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (efficacy) และปลอดภัย (safety) ข้อกำหนดต่างๆ เหล่านี้จะถูกนำมาประเมินร่วมกับข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการรักษาผู้ป่วย (preclinical/clinical studies) และข้อมูลการผลิตจากโรงงานว่ามีความคงที่ (consistency) และความคงทน (stability) เพียงใด

\* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## 1. Physicochemical properties

เป็นคุณสมบัติทางกายภาพของสารเป็นลักษณะเฉพาะตัวที่ใช้แยกออกจากสารอื่นๆ ซึ่งจำเป็นต้องทราบองค์ประกอบ (composition), คุณสมบัติทางฟิสิกส์ (physical properties) และโครงสร้างพื้นฐาน (primary structure) แต่ในบางกรณีข้อมูลของโครงสร้างระดับสูง (conformational structure) ก็มีความจำเป็นต้องทราบเช่นกันหากมีความเกี่ยวข้องกับ ligand binding ซึ่งมีผลกับการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพ (biological activity)

นอกจากนี้ความหลากหลายในเชิงโครงสร้างของโมเลกุล (structural heterogeneity) ก็มีความสำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพของยา เช่นการเกิด glycosylation ของ polypeptide chain ชนิดเดียวกันแต่สร้างจาก host cells ชนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น t-PA ที่ express ใน insect cells จะมี carbohydrate moiety แตกต่างจาก t-PA ที่ express ใน CHO cells ความสำคัญในส่วนนี้คือ ในกรณีที่มีการผลิตยาแล้วเก็บรักษาไว้ในระยะเวลาหนึ่งยาอาจมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีเป็น product-related substances โดยเสีย carbohydrate chains ไป หรือไม่มีความคงที่ในการผลิตแต่ละครั้ง (lot-to-lot consistency) ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลงหรือมีความเป็นพิษสูงขึ้น เมื่อดูจากการทดสอบวัดผลทางคลินิก อย่างไรก็ตามในบางกรณีการเกิด glycosylation อาจไม่มีความสำคัญเลยก็ได้ เช่นในกรณีของ t-PA เป็นต้น

### 1. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physicochemical Characterization)

n. Structural characterization/confirmation

- Amino acid sequence ลำดับของ

กรดอะมิโนในสาย polypeptide มีความสำคัญมากในการระบุชนิดของ recombinant polypeptide ว่าเป็นตัวที่ต้องการหรือไม่หลังจากผ่านขบวนการ genetic engineering แล้ว ลำดับของกรดอะมิโนต้องสอดคล้องกับที่พบในธรรมชาติ

- Amino acid composition สัดส่วนของกรดอะมิโนในสารที่เตรียมได้สามารถทดสอบโดยใช้ hydrolytic และ analytical procedures สัดส่วนของกรดอะมิโนในองค์ประกอบยาที่เตรียมขึ้นต้องสอดคล้องกับที่พบในธรรมชาติ

- Terminal amino acid sequence การทดสอบเพื่อระบุชนิดของกรดอะมิโนปลาย N-terminal และ C-terminal ในสายของ recombinant polypeptide จะให้ข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ heterogeneity ขององค์ประกอบในยาที่เตรียมได้

- Peptide map เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนในสายของ polypeptide สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและให้ fragments ขนาดต่างๆ กัน ซึ่งสามารถแยกได้ด้วยเทคนิค HPLC และ mass spectrometry เป็นลักษณะเฉพาะตัว ทำให้สามารถระบุชนิดของ recombinant polypeptide เพื่อเทียบกับ polypeptide ที่พบในธรรมชาติได้

- Sulfhydryl group(s) และ disulfide bridges เนื่องจากตำแหน่งของ cysteine ภายในสายของ polypeptide เป็นตัวกำหนดพันธะ disulfide ภายในโครงสร้างโมเลกุล ดังนั้นการระบุตำแหน่งของ cysteine จึงเป็นอีกข้อมูลหนึ่งในการเปรียบเทียบ recombinant polypeptide กับ polypeptide ที่พบในธรรมชาติ

- Carbohydrate structure ในกรณีของ glycoproteins การระบุถึงปริมาณของ carbohydrates ภายในองค์ประกอบที่เตรียมได้ รวมทั้งโครงสร้าง (oligosaccharide pattern) และตำแหน่ง

ของ carbohydrate chains เป็นอีกคุณสมบัติเฉพาะตัวที่มีความสำคัญในการตรวจสอบองค์ประกอบที่เตรียมได้

ข. Physicochemical properties

- Molecular weight/size การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค size exclusion chromatography, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrophotometry

- Isoform pattern เนื่องจาก polypeptide chain ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ อาจมี isoform ซึ่งเกิดจาก carbohydrate chains ที่แตกต่างกันได้ ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ โดยใช้เทคนิค isoelectric focusing

- Extinction coefficient คุณสมบัติการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าคงที่ (extinction coefficient หรือ molar absorptivity) เป็นอีกคุณสมบัติเฉพาะตัวของ polypeptide แต่ละชนิด

- Electrophoretic patterns องค์ประกอบของ polypeptides ในยาที่เตรียมขึ้นสามารถแยกออกจากกันภายใต้สนามไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE หรือ capillary electrophoresis เกิดเป็นตำแหน่งที่จำเพาะตามน้ำหนักโมเลกุลของ polypeptide แต่ละเส้น patterns ที่เกิดขึ้นนี้เป็นลักษณะเฉพาะตัวขององค์ประกอบยาที่เตรียมขึ้นสามารถบอกถึงความคงที่ของการเตรียมแต่ละครั้งและความบริสุทธิ์ได้

- Liquid chromatographic patterns เป็นการระบุความจำเพาะขององค์ประกอบที่เตรียมขึ้นตามคุณสมบัติต่างๆ เช่น ประจุ (ion-exchange liquid chromatography), การละลาย (reverse-phase liquid chromatography) ทำให้ได้ข้อมูลความปนเปื้อนในองค์ประกอบที่เตรียมได้

- Spectroscopic profiles การหาโครงสร้างโมเลกุลระดับสูง secondary structure โดยวิธี circular dichroism และ tertiary structure โดยวิธี nuclear magnetic resonance (NMR) มีประโยชน์มากในการเปรียบเทียบโครงสร้าง 3 มิติ ระหว่าง polypeptide พบในธรรมชาติ กับ recombinant polypeptide ในกรณีที่ต้องได้ recombinant polypeptide ที่มีโครงสร้าง 3 มิติที่ถูกต้อง เพื่อ bind กับคู่ ligand

หมายเหตุ วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้น

## 2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ (Biological activity)

คุณสมบัติเฉพาะตัวในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้กับมนุษย์ วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติดังกล่าวมีหลายวิธีดังตัวอย่างที่จะกล่าวต่อไป

ก. Animal-based biological assays เป็นการใช้สัตว์ทดลองเพื่อดูผลการตอบสนองต่อยา

ข. Cell culture-based biological assays เป็นการศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ระดับเซลล์ต่อยา

ค. Biochemical assays เป็นการตรวจวัดผลจากการรับยาเช่น ระดับ enzyme หรือระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่เปลี่ยนไป

ง. Ligand/receptor binding assays สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณสมบัติทาง biological ได้ ผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดสอบยาในคลินิก อย่างไรก็ตามผลที่ได้รับจากการทดสอบยาในคลินิกอาจไม่ตรงกับ การทดสอบ biological activity เบื้องต้นก็ได้ การรายงานผลของการทดสอบควรรายงานเป็น units of activity ซึ่งปรับให้มีมาตรฐานเดียวกันทั่วโลก

### 3. การทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยา (Immunochemical properties)

ในกรณีที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นชีววัตถุที่ต้องการนำมาใช้ทางการแพทย์ คุณสมบัติต่างๆ ทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological properties) จะต้องถูกทดสอบ เช่น ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบริสุทธิ์ (purify antigens) และต้องเจาะลึกไปถึงบริเวณจำเพาะที่แอนติเจนถูกแอนติบอดีจับ (regions of antigens) โดยทำการศึกษาเพื่อระบุถึงลำดับของกรดอะมิโนบนโมเลกุลของแอนติเจนที่เกี่ยวข้อง ปฏิกริยาข้ามกลุ่ม (cross reactivity) โดยเฉพาะที่เกิดกับแอนติเจนซึ่งพบทั่วไปในมนุษย์เป็นสิ่งที่ต้องหลีกเลี่ยง นอกจากนี้ค่า avidity และ affinity ก็เป็นอีกสองปัจจัยหลักในการคัดเลือกแอนติบอดีมาใช้ในการแพทย์

การศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถทำได้โดยใช้ immunochemical procedures เช่น ELISA, Western blot ผลการทดลองที่ได้อาจนำมาใช้ประเมินความบริสุทธิ์ (purity) และความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ได้อีกด้วย

### 4. Purity, impurities และ contaminants

#### ก. Purity

การตรวจวัดค่าความบริสุทธิ์มักขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ (method-dependent) การประเมินความบริสุทธิ์ของชีววัตถุในเชิงเทียบเคียง (relative purity) ที่มักนิยมใช้ในระยะเวลาที่ผ่านมา คือการวัดระดับของ biological activity (units) ต่อ milligram ของ product ทำให้ค่าที่ได้มีความไม่แน่นอน ในปัจจุบันยาและผลิตภัณฑ์ยาจึงถูกประเมินความบริสุทธิ์โดยใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

เนื่องจากกรรมวิธีในการผลิต (biosynthetic production process) และคุณสมบัติระดับโมเลกุล (molecular characteristics) ของ biotechnological products มีความแตกต่างกัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันมีความหลากหลายในความบริสุทธิ์ ซึ่งอาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสารข้างเคียงที่เกิดขึ้นในขบวนการผลิต (product-related substances) อาจไม่มีผลกระทบต่อภาพรวมของประสิทธิภาพของยาก็ได้ ดังนั้นการระบุชนิดของ product-related substances ที่เกิดขึ้นมีความสำคัญในการควบคุมความบริสุทธิ์ของชีววัตถุ

#### ข. Impurities

นอกจากการประเมินความบริสุทธิ์ของ biotechnological products แล้ว บริษัทผู้ผลิตยังต้องทำการทดสอบเพื่อตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน (impurities) ที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการผลิต (process-related substance) เช่น ขั้นตอนการ culture (inducers, antibiotics, media components), chromatographic media ที่ใช้ในขั้นตอน purification, solvents/buffer component การตรวจสอบสารปนเปื้อนที่เป็น protein อาจทำได้โดย immunoassay นอกจากนี้ product-related substances บางชนิดอาจจัดเป็น impurities ด้วย เช่น host cell proteins and DNA, vector ในกรณีที่สารปนเปื้อนเป็น DNA อาจใช้ขบวนการตรวจสอบโดยวิธี hybridization อีกสาเหตุหนึ่งของการเกิด impurities คือการเปลี่ยนแปลงของสารภายหลังขบวนการเก็บรักษา (degradation products)

การตรวจสอบปริมาณและคุณลักษณะของสารปนเปื้อนเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ทดสอบความเป็นพิษเมื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย เพื่อหาระดับความปนเปื้อนที่ยอมรับได้ต่อไป

### จ. Contaminants

สารแปลกปลอม (contaminants) เป็นสิ่งที่อาจเกิดขึ้นได้ในขบวนการผลิต และเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้น เช่น chemical/biochemical materials (microbial protease) หรือ ตัวเชื้อเอง (microbial species) โดยเฉพาะในกรณีที่มี virus เจือปนอยู่ใน drug products ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อในระหว่าง culture cells เช่น mycoplasma จะไม่สามารถยอมรับได้เลยหากมีการตรวจพบการปนเปื้อนในการใช้กับมนุษย์

### ฉ. Quantity

การตรวจวัดปริมาณขององค์ประกอบยาที่เตรียมขึ้น จำเป็นต้องใช้ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทำการทดสอบคุณสมบัติเฉพาะตัวทาง physicochemical ดังได้กล่าวไว้ข้างต้นเป็นสำคัญ ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปใช้ในขั้นตอนของการบรรจุขวดเพื่อจำหน่าย

### Clinical Trial

นอกเหนือจากการทดสอบคุณสมบัติของ pharmaceutical biotechnology products ทางห้องปฏิบัติการแล้ว การทดสอบทางคลินิกก่อนที่จะผลิตในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อใช้กับผู้ป่วยจริงก็มีความสำคัญมากเช่นกัน และต้องทำการทดสอบถึงสามขั้นตอน (Phase) ที่มีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน

1. Phase I มีวัตถุประสงค์หลักในการทดสอบความปลอดภัยของตัวยาที่พัฒนาขึ้น โดยทำการทดสอบ pharmacokinetics ซึ่งประกอบด้วย absorption, distribution, metabolism และ excretion ของยา รวมทั้ง pharmacodynamics ซึ่งเป็นการศึกษา physiologic และ toxicologic changes ที่เป็นผลจากยา การทดลองยาทุกชนิดจะต้องมีข้อมูลที่ยืนยันถึงความปลอดภัยในการ

ทดสอบขั้นตอนนี้มีฉะนั้นจะไม่สามารถทำการทดลองยากับผู้ป่วยในขั้นตอนอื่นๆได้ อาสาสมัครที่เข้าร่วมการทดสอบจะมีจำนวนไม่มากในขั้นตอนนี้ และเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงจากอันตราย และรักษาศักยภาพของแพทย์ที่เข้าร่วมโครงการในการดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด

2. Phase II เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันความปลอดภัยและให้ข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณยา (dosage) ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมีจำนวนตัวอย่างมากขึ้นกว่า Phase I แต่ยังเป็น การทดสอบยาในระยะเวลาสั้น โดยปกติการออกแบบการทดลองในระดับนี้เป็น placebo-controlled and double-blinded คือทั้งผู้ป่วยและแพทย์ไม่ทราบว่าผู้ป่วยรายใดที่ได้รับยาเทียม (dummy placebo) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความลำเอียงในการประเมินผลสัมฤทธิ์จากการรักษา

3. Phase III เป็นการพิสูจน์เพื่อพิสูจน์ทั้งประสิทธิภาพ (efficacy) ของยาในระยะเวลาที่ยาวขึ้น และมีจำนวนตัวอย่างมากขึ้นอาจถึง 1000 ราย การทดลองในระดับนี้ยังคงเป็น placebo-controlled and double-blinded เช่นกัน ผลการทดสอบจะรวมถึงความปลอดภัยและผลข้างเคียงจากการรับยา เช่น allergic reactions, autoantibodies production ด้วย

### เอกสารอ้างอิง

1. Biotechnology Inspection Guide Reference Materials and Training Aids, [http://www.fda.gov/ora/inspect\\_ref/igs/biotech.html](http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/biotech.html).
2. Gelehrter TD, Collins FS, and Ginsburg D, Principles of Medical Genetics. Williams & Wilkins, Maryland, USA, 1998.