

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา

ปีที่ 32 ฉบับที่ 2 (2568): พฤษภาคม – สิงหาคม

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL

Vol. 32 No. 2 (2025): May – August

<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาอะดาลิอูแมบ โดยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

สุดาทิพย์ สุนสิน¹ จิรเดช ปังฉิม¹ สายวรุฬ จตุกิตตินันท์¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธินที่อยู่ติดต่อ: สุดาทิพย์ สุนสิน สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
sudatip.r@dmsc.mail.go.th

Method Development for Identity and Purity Testing of Adalimumab Using the Capillary Electrophoresis-sodium Dodecyl Sulphate

Sudatip Sunsinn¹, Jiradej Patchim¹, Saiwarul Jadoonkittinan¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Sudatip Sunsinn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, sudatip.r@dmsc.mail.go.th**Received:** 7 October 2024, **Revised:** 23 April 2025, **Accepted:** 20 May 2025

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis can be treated with adalimumab, a human recombinant immunoglobulin G1, that helps reduce inflammation by targeting the immune system. Adalimumab specifically binds to tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and neutralizes its biological activity by blocking its interaction with cell surface TNF receptors. It is available as both original and biosimilar drugs. Thus, identity and purity testing using capillary electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) is a critical quality attribute for quality control of these drugs, ensuring that patients receive high-quality medications that meet international standards.

Objectives: This study aimed to develop a method for determining the identity and purity of adalimumab using CE-SDS according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. The ultimate goal is to establish this as a standard method for laboratory quality control of marketed adalimumab in Thailand.

Methods: The method validation for determining the identity and purity of adalimumab includes various parameters including specificity, precision, accuracy, linearity, and robustness, following the ICH Q2 guidelines.

Results: The results demonstrated that the method was specific under both reduced and non-reduced conditions, showing linearity over the concentration range of 0.50-1.50 mg/mL. The relative standard deviation (RSD) for precision, both within-day and between-day, was within 5%. The recovery percentage ranged from 90% to 110%. Additionally, the method was robust when changes in equipment were made.

Conclusions: The developed method for testing the identity and purity of adalimumab using capillary electrophoresis with sodium dodecyl sulfate is specific, precise, accurate, reliable, and suitable for quality control of adalimumab products in Thailand.

Keywords: monoclonal antibody, adalimumab, capillary electrophoresis, method validation

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์สามารถรักษาได้โดยใช้อะดาลิแมบโดยยาผลิตโดยเทคนิครีคอมบิแนนต์ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินจี 1 ซึ่งช่วยลดการอักเสบจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยยาจับอย่างจำเพาะกับ human Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) และขัดขวางการทำงานของปฏิกิริยาภายในเซลล์ยาอะดาลิแมบที่ใช้ในปัจจุบันมีทั้งยาต้นแบบ และยาชีววัตถุคล้ายคลึง ดังนั้นการควบคุมคุณภาพด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาโดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (CE-SDS) เป็นหนึ่งในวิธีการทดสอบ Critical Quality Attribute (CQA) ที่สำคัญจึงมีความสำคัญยิ่งเพื่อให้ผู้ป่วยมั่นใจได้ว่าได้รับยาที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากล

วัตถุประสงค์: เพื่อทดสอบความเหมาะสมและความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิแมบโดยใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต สำหรับห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อควบคุมคุณภาพยาอะดาลิแมบที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย

วิธีการวิจัย: วิจัยเชิงทดลอง (experimental research) โดยใช้ตัวอย่างยาชีววัตถุคล้ายคลึงชนิดอะดาลิแมบที่ผู้ผลิตส่งตรวจวิเคราะห์เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยาในประเทศไทย โดยสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานของบริษัผู้ผลิตแต่ละแห่ง จำนวน 2 ยี่ห้อ ที่ความเข้มข้น 40 mg/0.8 mL อย่างละ 2 ตัวอย่าง และสารมาตรฐาน monoclonal IgG system suitability ดำเนินการทดสอบในพารามิเตอร์ตาม ICH Q2 ประกอบด้วย ความจำเพาะ ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ และความคงทนของวิธีวิเคราะห์

โดยเปรียบเทียบลักษณะ electropherogram และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ one-way ANOVA, linear regression และ Independent t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยศึกษาระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2563 – 30 กันยายน 2564

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีความเหมาะสมของเครื่องมือและระบบที่ใช้ในการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ โดยสารมาตรฐาน monoclonal IgG system suitability ที่วิเคราะห์ได้มีลักษณะ electropherogram คล้ายคลึงกับเอกสารรับรองคุณภาพและค่าที่ได้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดใน USP-NF การทดสอบความจำเพาะระหว่างยาและสารมาตรฐานอะดาลิอูแมบ พบว่าปรากฏพีกของตัวอย่างและสารมาตรฐานตรงกัน และ formulation buffer ของยาไม่มีผลรบกวนพีกหลักของตัวอย่าง นอกจากนี้การทดสอบความเที่ยง โดยการทำซ้ำภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่าค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 5 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ระหว่างวันโดยใช้สถิติ One-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 การทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยใช้สถิติ linear regression พบว่าค่า correlation coefficient มีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งบ่งชี้ว่าความเข้มข้นของสารที่ระดับต่าง ๆ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยตรงกับค่า corrected area ทั้งในสถานะ reduced protein และ non-reduced protein การทดสอบความแม่นยำ พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 90-110 และการทดสอบความคงทน ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ยังคงให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกัน แม้มีการเปลี่ยนแปลงชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ต่างกันโดยใช้สถิติ Independent t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุป: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาอะดาลิอูแมบโดยเทคนิค แคปิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต มีความจำเพาะ เที่ยงตรง แม่นยำ น่าเชื่อถือและเหมาะสม สำหรับนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อควบคุมคุณภาพยาอะดาลิอูแมบประกอบการขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทย

คำสำคัญ: โมโนโคลนอลแอนติบอดี อะดาลิอูแมบ แคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

บทนำ

ยาอะดาลิุมแมบช่วยลดการอักเสบจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยยาจะจับอย่างจำเพาะกับ human Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) และขัดขวางการทำงานของปฏิกิริยาในเซลล์ ใช้รักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคสะเก็ดเงิน โรคข้อกระดูกสันหลังอักเสบยึดติด และโรคลำไส้ใหญ่อักเสบ¹ เป็นหนึ่งในยาในกลุ่มชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceutical) มีการคาดการณ์อัตราการเจริญเติบโตในตลาดยาโลก ปี ค.ศ. 2024-2029 ว่าเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ (CAGR) 5.10 ต่อปี อันเนื่องมาจากการเจ็บป่วยที่เพิ่มขึ้นจากโรคติดต่อและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของประชากรผู้สูงอายุและความต้องการใช้ยาในการรักษาโรคที่จำเพาะเจาะจงเพื่อลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการรักษาด้วยยาเคมี ส่งผลให้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนายาชีวเภสัชภัณฑ์ออกสู่ตลาดเพิ่มมากขึ้น² ยาอะดาลิุมแมบเป็น fully human recombinant Immunoglobulin G1: IgG1 โดยยาชนิดแรกที่ได้รับอนุมัติสำหรับใช้งานในทางการแพทย์คือ Humira® เมื่อปี ค.ศ. 2002 ในประเทศสหรัฐอเมริกาในรูปแบบยาต้นแบบ (originator/ innovator) และเมื่อยาหมดสิทธิบัตรจึงเริ่มมีการผลิตเพื่อจำหน่ายมากขึ้น ทั้งยาในรูปแบบยาต้นแบบและยาคัดลอกถึงปัจจุบันมีการผลิตและขึ้นทะเบียนยาในรูปแบบยาคัดลอกหลายยี่ห้อ เช่น Amgevita®, Exemptia®, Abrilada® และ Hyrimoz® เป็นต้น³⁻⁴

โครงสร้างทางเคมีของยาอะดาลิุมแมบประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,330 โมเลกุล มีน้ำหนักประมาณ 148 kDa โดยโมเลกุลเดี่ยวที่สมบูรณ์ (monomer) ต้องประกอบด้วยสาย Light Chain: LC 2 สาย และ Heavy Chain: HC 2 สาย เชื่อมต่อ

เป็นรูปตัววาย (Y shape) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่บนสาย (glycosylated) จะส่งผลให้การออกฤทธิ์ของยามีประสิทธิภาพ แต่หากโครงสร้างของยาเกิดการเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกาะกลุ่มหรือการแตกตัวของโมเลกุลยา (aggregation and fragmentation) จะส่งผลต่อโครงสร้างโมเลกุลเดี่ยวของยาไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้การออกฤทธิ์ของยามีประสิทธิภาพลดลงได้⁵

ตามมาตรฐานการทดสอบตำรายาสากลสหรัฐอเมริกา (United States Pharmacopeia: USP) และตำรายาสากลแห่งสหภาพยุโรป (European Pharmacopoeia: ph.Eur) ได้กำหนดแนวทางและวิธีการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพทางด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อาศัยการแยกตามขนาดโมเลกุลประกอบด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Size Exclusion Chromatography (SEC-HPLC) และ Capillary Sodium Dodecyl Sulfate Electrophoresis (CE-SDS) ซึ่งเทคนิค CE-SDS สามารถแยกและตรวจสอบโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดเล็กได้ดีกว่าเทคนิค SEC ดังนั้นจึงนิยมใช้สองวิธีนี้ควบคู่กันในการทดสอบหาความบริสุทธิ์ของโมเลกุลโปรตีน นอกจากนี้เทคนิค CE-SDS สามารถแยกโปรตีนโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้า เช่นเดียวกับวิธี SDS-PAGE แต่มีความละเอียดและแม่นยำ วิเคราะห์ได้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว และสามารถทำซ้ำได้โดยมีความผิดพลาดได้น้อยกว่าวิธี SDS-PAGE⁶ โดย SDS จะช่วยทำให้โปรตีนมีประจุลบและทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียสภาพคลายตัวเป็นสายตรง ซึ่งสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ทั้งสองสถานะคือ non reduce protein และ

reduce protein เพื่อตรวจสอบการแตกตัวและความคงตัวของโปรตีน โดยสภาวะ non reduce protein เป็นการตรวจสอบปริมาณโมเลกุลของ monomer โดยใช้สารกลุ่ม alkaline เช่น iodoacetamide ทำให้โปรตีนยังคงสภาพของโครงสร้างโดยไม่มีการสลายพันธะไดซัลไฟด์แล้วทำการแยกตามขนาดโมเลกุล และสภาวะ reduce protein เป็นการตรวจสอบปริมาณ LC และ HC โดยใช้สารกลุ่ม reducing เช่น 2-mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล ทำให้โมเลกุลของโปรตีนแยกออกเป็นพีคของ HC และ LC จากนั้นจึงผ่านตัวอย่างเข้าไปในท่อแคปิลลารี (capillary tube) และเกิดการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงผ่านหลอดขนาดเล็ก (capillary tube) ซึ่งภายในบรรจุสารละลายอิเล็กโตรไลต์ที่นำไฟฟ้าได้ โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกแยกออกมาก่อน ตามด้วยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (Migration Time: MT) ของแต่ละโมเลกุลจะเป็นค่าเฉพาะ ปรากฏพีคที่มีความสูงแปรตามจำนวนโมเลกุลที่แยกได้ โดยปริมาณของสารที่แยกได้นี้จะถูกคำนวณเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (Corrected percentage Area: %Corr A) และเปรียบเทียบผลที่ได้กับสารมาตรฐานของตัวอย่างนั้น ๆ เพื่อตรวจสอบความเป็นเอกลักษณ์ของตัวอย่าง⁷⁻⁸

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการควบคุมคุณภาพด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาอะดาลิมุแมบ จำเป็นต้องใช้วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมและทันสมัยที่สามารถเปรียบเทียบทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ⁹ โดยเทคนิค CE-SDS เป็นหนึ่งในวิธีการทดสอบตามมาตรฐานตำรายา USP-NF เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบปริมาณของสิ่งปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากการแตกตัว

ของผลิตภัณฑ์ได้ดี แม่นยำ และใช้เวลารวดเร็วในการทดสอบสิ่งปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์ (related impurity)¹⁰ แต่เนื่องจากในตำรายาสากล USP-NF มีข้อกำหนดเฉพาะยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี¹¹ แต่ยังไม่มีการกำหนดเฉพาะสำหรับยาอะดาลิมุแมบ ส่งผลให้ต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เนื่องจากในกระบวนการผลิตยาและสูตรตำรับ (formulation buffer) ของยาที่มีความแตกต่างกันในแต่ละยี่ห้ออาจส่งผลต่อผลการทดสอบ⁷⁻⁸ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ CE-SDS ตามแนวทางของ International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – Validation of Analytical Procedures (ICH Q2)¹² เพื่อให้สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับวิเคราะห์คุณภาพเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาอะดาลิมุแมบในประเทศไทย เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ทั้งสำหรับบุคลากรทางการแพทย์และประชาชนที่ต้องใช้ยาอะดาลิมุแมบในการรักษาโรค ซึ่งเป็นก้าวสำคัญในการยกระดับมาตรฐานของยาชีววัตถุในประเทศให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความเหมาะสมของวิธีการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิมุแมบโดยใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีลซัลเฟต โดยวิเคราะห์สารมาตรฐาน USP monoclonal IgG system suitability ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein

2. เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิอูแมบ โดยใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานอะดาลิอูแมบเปรียบเทียบกับยาอะดาลิอูแมบ ตามแนวทางและเกณฑ์การยอมรับของ ICH Q2 เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐาน รองรับการตรวจวิเคราะห์สำหรับการขึ้นทะเบียนยาอะดาลิอูแมบทั้งชนิดยาต้นแบบและยาชีววัตถุคล้ายคลึง สำหรับห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีวิจัย

วิธีวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) โดยทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิอูแมบด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส-โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ตามแนวทางของ ICH Q2 โดยดำเนินการศึกษาในระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2563 - 30 กันยายน 2564

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างยาชีววัตถุคล้ายคลึงชนิดอะดาลิอูแมบ ที่ผู้ผลิตส่งตรวจวิเคราะห์เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยาในประเทศไทย โดยการสุ่มตัวอย่างการทดสอบดำเนินการสุ่มโดยบริษัทผู้ผลิต จำนวน 2 ยี่ห้อ กำหนดเป็นชื่อ mAb A และ mAb B ที่ความเข้มข้น 40 mg/0.8 ml จำนวนอย่างละ 2 ตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. สารมาตรฐาน monoclonal IgG system suitability (USP, USA) และสารมาตรฐานอะดาลิอูแมบ (In-house reference standard)

2. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป: SDS-MW analysis kit (SCIEX, USA) ประกอบด้วยโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 10-225 kDa และ Internal Standard (IS) ขนาด 10 kDa, gel buffer (proprietary formulation, pH 8.0, 0.2% SDS), sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% SDS), acidic wash solution (0.1 N HCl), basic wash solution (0.1 N NaOH), 2-mercaptoethanol (Sigma, USA), Iodoacetamide: IAA (Sigma, USA) และ water HPLC grade

3. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี (CE) รุ่น PA 800 plus pharmaceutical analysis system (Beckman Coulter, USA) พร้อมด้วยชุดคอมพิวเตอร์และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat software, เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด Photodiode Array (PDA), fused-silica capillary แบบ uncoated ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μ m ยาว 30.2 cm (SCIEX, USA), cartridge assembly kit (SCIEX, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius ED 822, Germany) และ Heating box (Eppendorf, USA)

ขั้นตอนการศึกษา^{11,13}

1. การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ non-reducing โดยเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 1.0 mg/ml ด้วย sample buffer เติม IS ปริมาตร 4 μ l, เติม 250mM IAA ปริมาตร 5 μ l ลงในตัวอย่างปริมาตร 95 μ l นำไปต้มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 3 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 นาที ก่อนนำไปทดสอบ

2. การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ reducing โดยเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 1.0 mg/ml

ด้วย sample buffer เดิม IS ปริมาตร 4 ul, 2-Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ul ลงในตัวอย่าง ปริมาตร 95 ul นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 3 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 นาที ก่อนนำไปทดสอบ

3. นำสารมาตรฐานและตัวอย่างที่เตรียมไว้ ฉีดเข้าเครื่อง CE ขั้นตอนการแยกสารของ CE-SDS โดยมีสภาวะของเครื่อง (ดังตารางที่ 1) การสลาย พันธะในโมเลกุลโปรตีนด้วยความร้อนในสภาวะที่มี SDS จากนั้นสารจะผ่านแคปิลลารีโดยใช้ IS ขนาด โมเลกุล 10 kDa ที่เติมในตัวอย่างเป็น mobility

marker ซึ่งเคลื่อนที่ผ่านเครื่องวัดค่าการดูดกลืน คลื่นแสง จากนั้นโปรตีนจะเคลื่อนที่แยกออกตาม ขนาดของโมเลกุล โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ ออกมาก่อนโมเลกุลขนาดใหญ่ แล้วใช้โปรแกรม ประมวลผล 32 Karattm software แปลงค่าสัญญาณ เป็น electropherogram พร้อมวิเคราะห์ค่าร้อยละ ของพื้นที่ใต้กราฟ และค่าเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ โดยมีชุดน้ำยาโปรตีนที่มีน้ำหนักมาตรฐานในช่วง 10-225 kDa เพื่อใช้เทียบขนาดโมเลกุล ของตัวอย่าง และสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE สำหรับใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนการทำงาน

Step	Event	Value	Duration	Comment
#1	rinse-pressure	70.0 psi	3.00 min	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface
#2	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface
#3	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	water rinse to remove the acid residue
#4	rinse-pressure	70.0 psi	10.00 min	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel
#5	wait	-	0.00 min	H2O dipping to clean capillary tip
#6	wait	-	0.00 min	H2O dipping to clean capillary tip
#7	inject-voltage	5.0 kV	20.0 sec	sample injection
#8	wait	-	0.00 min	H2O dipping to avoid sample carryover
#9	separation-voltage	15.0 kV	40.0 min	separation

4. การทดสอบความพร้อมของระบบ ก่อนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ทำการตรวจสอบความพร้อมก่อนการทดสอบ กับตัวอย่างและสารมาตรฐานยาอะดาลิบูแมบ โดยใช้สารมาตรฐาน USP monoclonal IgG system suitability ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.5 mg/ml ในสภาวะ non-reducing และ reducing ในการฉีดเข้าเครื่อง CE เพื่อตรวจสอบ ความพร้อมของระบบ ซึ่งต้องผ่านตามเกณฑ์ ตามตำรายาสากล USP-NF^{11,14-15} ก่อนทำการ ทดสอบความถูกต้องตามพารามิเตอร์

5. ทดสอบความถูกต้องของวิธี¹²

5.1 การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

1) วิเคราะห์ blank, formulation buffer สารมาตรฐานและตัวอย่างยาอะดาลิบูแมบ เพื่อตรวจสอบความสามารถในการแยกในสภาวะ ที่กำหนด ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein ซึ่งต้องปรากฏพีคของ IS และ ไม่ปรากฏพีคอื่น ๆ ที่รบกวนพีคหลัก

2) วิเคราะห์โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน ที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 10-225 kDa ในสภาวะ

reducing protein ต้องปรากฏพีคตามใบรับรองของผู้ผลิตที่ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10, 20, 35, 50, 100, 150 และ 225 kDa

3) วิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่างยาอะดาลิมุแมบได้แก่ mAb A และ mAb B ที่เตรียมให้มีปริมาณโปรตีน 1 mg/ml ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein ต้องปรากฏพีคของ IS รวมถึงปรากฏพีคของสารมาตรฐานตรงกับสารตัวอย่าง

5.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

1) การวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) วิเคราะห์ mAb A จำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกันและสภาวะเดียวกันทั้งสภาวะ non-reducing และ reducing เปรียบเทียบค่า MT และค่า %Corr A คำนวณค่า %RSD ซึ่งต้องมีค่าไม่เกิน 5

2) การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (inter mediated precision) วิเคราะห์ mAb A จำนวน 3 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวันเป็นเวลา 3 วันทั้งสภาวะ non-reducing และ reducing เปรียบเทียบค่า MT และค่า %Corr A คำนวณค่า %RSD ซึ่งต้องมีค่าไม่เกิน 5 และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างวันโดยสถิติ one-way ANOVA

5.3 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) วิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ใน mAb A ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 mg/ml ทั้งสภาวะ non-reducing และ reducing วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่า Corrected area (CorrA) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วสร้างกราฟเพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟที่ได้ต้องมีค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.990

5.4 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) วิเคราะห์ความแม่นยำโดยการ spike สารมาตรฐาน mAb A ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 0.50, 1.00 และ 1.50 mg/ml (50-150%) ลงในสารละลาย formulation buffer ทั้งสภาวะ non-reducing และ reducing นำค่า Corr A ที่วิเคราะห์ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาคำนวณค่าปริมาณโปรตีน (found concentration) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่เตรียมไว้ (theoretical concentration) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) ตามสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{A}{B} \times 100$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน mAb A ที่วิเคราะห์ได้ (found concentration)

B = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน mAb A ที่คาดว่าจะได้ (theoretical concentration)

โดยค่าเฉลี่ยของ % recovery ควรมีความระหว่าง 90-110

5.5 การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness) วิเคราะห์ผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนรุ่นการผลิต SDS-MW analysis kit วิเคราะห์ mAb A จำนวน 3 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวันเป็นเวลา 3 วันทั้งสภาวะ non-reducing และ reducing โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่างรุ่นการผลิตแล้วเปรียบเทียบค่า MT และ %CorrA ที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่า % RSD ไม่เกิน 5 แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดน้ำยาสำเร็จรูปโดยสถิติ Independent t-test

การวิเคราะห์ข้อมูล

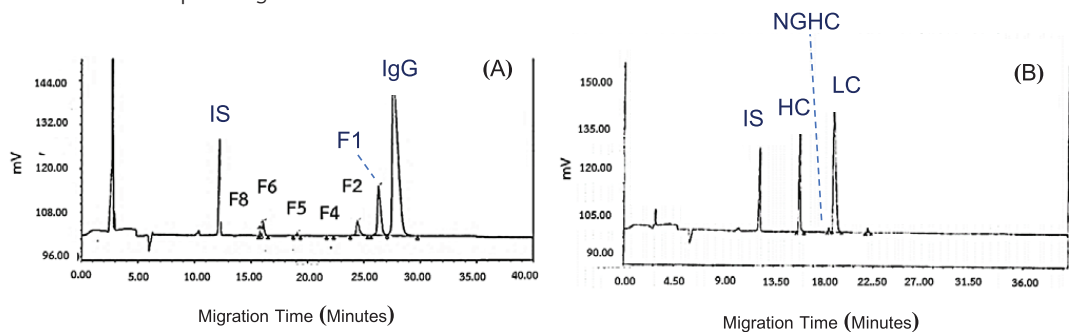
วิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพโดยการเปรียบเทียบลักษณะ electropherogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติแคปิลลารีอิเล็ก

โทโรพีรีซิสและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และทดสอบความแตกต่างระหว่างวันโดย one-way ANOVA วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ CorrA โดย linear regression และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดน้ำยาสำเร็จรูปโดย Independent t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษา

1. ความพร้อมของระบบ (System Suitability)

Electropherogram ที่วิเคราะห์ได้จาก



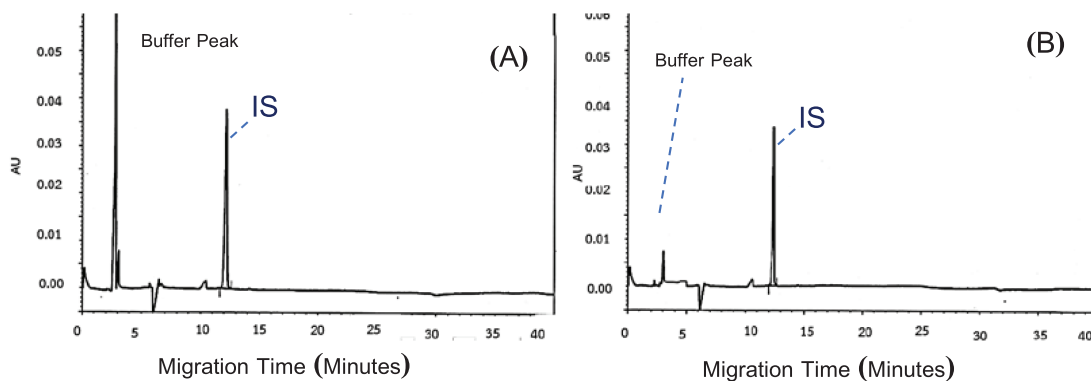
รูปที่ 1 Electropherogram สารมาตรฐาน USP monoclonal IgG system suitability ในสภาวะ non-reducing protein (A) และ reducing protein (B)

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ system suitability ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein ของสารมาตรฐาน USP monoclonal IgG system suitability

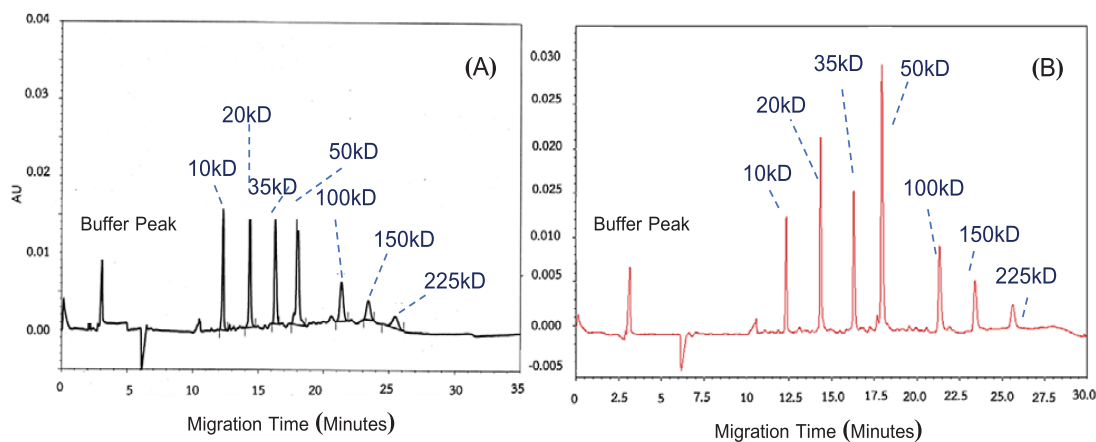
Parameter	Non-reducing protein		Parameter	Reducing protein	
	result (n=3)	suitability requirements		result (n=3)	suitability requirements
electropherogram	consist	consistent with USP certificated	electropherogram	consist	consistent with USP certificated
MT _{IS} (%RSD)	0.05%	≤2.0%	MT _{IS} (%RSD)	0.05%	≤2.0%
IgG (%Corr)	71.76%	61.4% - 86.4%	Ratio of NGHC to HC	1.08%	0.75% - 1.34%
F1 resolution	2.73	≥1.3	NGHC resolution	1.24	≥1.2
IgG resolution	1.58		HC resolution	9.94	

2. ความจำเพาะของวิธี CE-SDS

ตรวจสอบความจำเพาะโดยวิเคราะห์ blank พบว่า ไม่ปรากฏพีคอื่นรบกวนพีคหลัก ปรากฏเพียงพีคของ blank ที่มีการเติม IS และพีคของ buffer ผลแสดงดังรูปที่ 3 ปรากฏพีคของโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 10-225 kDa ตามที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ใน COA ผลแสดงในรูปที่ 4

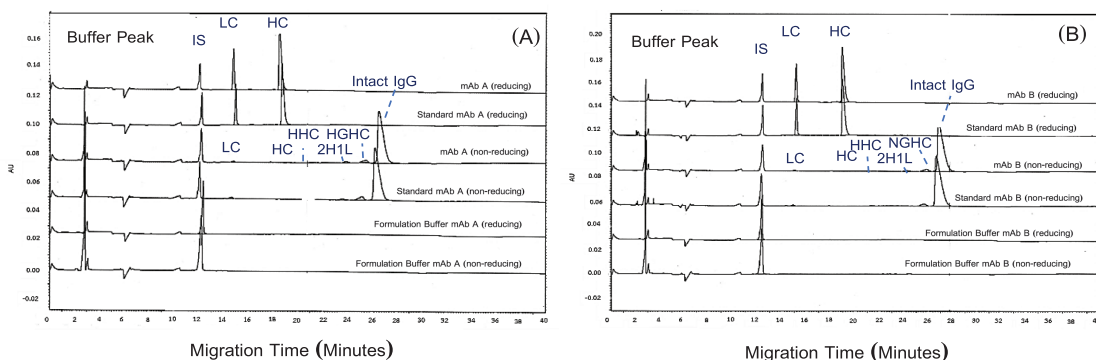


รูปที่ 3 Electropherogram ของ blank (A) สภาวะ non-reducing protein, (B) สภาวะ reducing protein



รูปที่ 4 Electropherogram โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (A) รูปที่วิเคราะห์ได้ (B) ภาพตามใบรับรอง COA

วิเคราะห์ยาอะดาลิบูแมบทั้ง 2 ยี่ห้อ (mAb A และ mAb B) เทียบกับสารมาตรฐานของตัวอย่างยี่ห้ออื่น ๆ และ formulation buffer พบว่า ปรากฏพีค IS ปรากฏพีคของตัวอย่างตรงกับสารมาตรฐาน และ formulation buffer ไม่ปรากฏพีคใด ๆ รบกวนพีคตัวอย่างทุก ๆ ตัวอย่าง ทั้งสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein ผลแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 Electropherogram ของ mAb A (A) และ mAb B (B) เทียบกับสารมาตรฐานของ mAb ยี่ห้อ นั้น ๆ ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein

3. ความเที่ยง

วิเคราะห์ mAb A ซ้ำภายในวันเดียวกัน และวิเคราะห์ซ้ำต่างวันเป็นเวลา 3 วัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน ผลวิเคราะห์ MT และ % CorrA ของ Intact IgG ในสภาวะ non-reducing

และผลวิเคราะห์ MT และ % Corr A ของ LC และ HC ในสภาวะ reducing มีค่า %RSD น้อยกว่า 5 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวันโดยสถิติ ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบความเที่ยงของ mAb A ภายในวันเดียวกันและต่างวัน

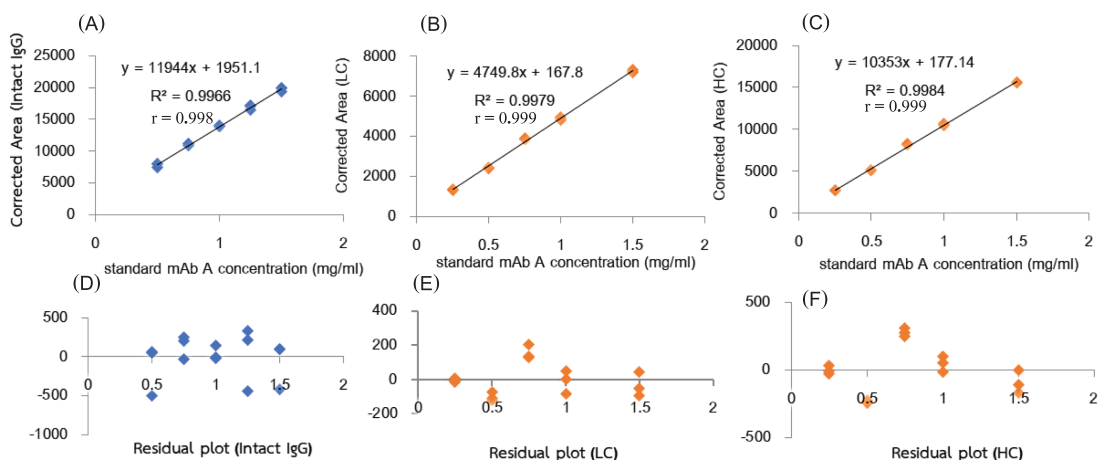
Parameters		MT (min)			% Corr A		
		non-reducing condition		reducing condition	non-reducing condition		reducing condition
		Intact IgG	LC	HC	Intact IgG	LC	HC
repeatability (system precision)	average	26.86	15.26	19.06	92.93	31.54	67.50
N = 6	%RSD	0.48	0.14	0.15	0.10	0.42	0.37
intermediated precision	Average	26.74	15.03	18.78	93.04	31.57	67.47
between-day 3 days	%RSD	0.50	1.30	1.26	0.10	0.36	0.12
N = 9							

non-reducing condition; P -value_{%Corr} (0.16), reducing condition; P -value_{%Corr} (0.36)

4. ความเป็นเส้นตรง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ในสารมาตรฐาน mAb A ที่ความเข้มข้น 5 ระดับกับค่า corrected area ของ Intact IgG ในสภาวะ non-reducing และค่า corrected area ของ LC กับ HC ในสภาวะ reducing ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของ mAb A มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น

ที่ทำการทดสอบ 0.50 - 1.50 mg/ml และค่า y-residuals การกระจายตัวรอบแกนศูนย์ที่ดี ผลแสดงดังรูปที่ 6 และผลวิเคราะห์ linear regression ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.998, 0.999 และ 0.999 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงความเข้มข้นของสารมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับ corrected area ทั้งในสภาวะ non-reducing และ reducing



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ ในสภาวะ non-reducing protein (A; Intact IgG) และในสภาวะ reducing protein (B; HC), (C; LC) และกราฟการกระจายรอบแกนศูนย์ ในสภาวะ non-reducing protein (D; Intact IgG) และในสภาวะ reducing protein (E; HC), (F; LC)

5. ความแม่นยำ

คำนวณปริมาณโปรตีนจากสารมาตรฐาน mAb A ที่ระดับความเข้มข้น 0.50, 1.00 และ 1.50 mg/ml (50-150 % level) มีค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) ในสภาวะ non-reducing protein เท่ากับร้อยละ 96.04, 105.51 และ 106.36 ตามลำดับ ในสภาวะ reducing

protein (HC) ร้อยละ 98.83, 100.31 และ 99.49 ตามลำดับ ในสภาวะ reducing protein (LC) ร้อยละ 100.51, 99.98 และ 99.35 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในช่วง 90-110% ผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ร้อยละการคืนกลับในสารมาตรฐาน mAb A

Spiking level (%)		Recovery (%)			Acceptance criteria
		non-reducing protein	reducing protein		
		Intact IgG	LC	HC	
50	Average	96.04	98.83	100.51	90-110%
	SD	4.85	1.11	0.74	
100	Average	105.51	100.31	99.98	
	SD	1.04	0.44	0.17	
150	Average	106.36	99.49	99.35	
	SD	1.34	0.96	0.27	

6. ความคงทนของวิธี

ทดสอบตัวอย่าง mAb A โดยเปลี่ยนรุ่นการผลิต SDS-MW analysis kit ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein พบว่าวิธีมีความคงทนในการ

วิเคราะห์โดยค่า %Corr A ที่วิเคราะห์มีค่า %RSD ไม่เกิน 5 และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดรุ่นการผลิต โดยสถิติ Independent t-test พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลความคงทนของวิธีเมื่อมีการเปลี่ยนรุ่นการผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปในตัวอย่าง mAb A

SDS-MW analysis kit		Non-reducing protein		Reducing protein			
		Intact IgG		HC		LC	
		MT (min)	%Corr	MT (min)	%Corr	MT (min)	%Corr
Lot A	Average	26.74	93.04	15.03	31.57	18.78	67.47
n = 9	% RSD	0.54	0.11	1.30	0.36	1.26	0.12
Lot B	Average	26.47	93.11	15.06	32.37	18.82	66.79
n = 9	% RSD	1.55	0.20	0.48	1.37	0.81	0.66

non-reducing condition; P -value_{%Corr} (0.43), reducing condition; P -value_{%Corr} (0.43)

อภิปรายผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิฟูแมบโดยวิธี CE-SDS เพื่อทดสอบความเหมาะสมของวิธีสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพยาอะดาลิฟูแมบ ดำเนินการทดสอบตามสภาวะของวิธีตามที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือได้ตรวจสอบความถูกต้อง (ตารางที่ 1) การเตรียมตัวอย่างและสภาวะที่ใช้ในการทดสอบรวมถึงความยาวของท่อแคปิลลารี คือ 30.2 cm อ้างอิงจากตำรายาสากล USP^{11,14} ผลที่ได้ให้ค่าทางสถิติที่เหมาะสมจึงดำเนินการใช้สภาวะการทดสอบนี้เป็นสภาวะที่ใช้ในการทดสอบกับตัวอย่างจริง และใช้ IS ที่เป็นโปรตีนมาตรฐานขนาด 10 kDa ทดสอบร่วมกับตัวอย่างทุกครั้งเพื่อเป็นตัวบ่งชี้การเคลื่อนที่ (mobility marker) ของโมเลกุลตัวอย่าง โดยจากผลการทดสอบตามสภาวะของวิธีมีลำดับขั้นตอนเช่นการล้างท่อ

แคปิลลารี ด้วย 0.1 N NaOH ตามด้วย 0.1 N HCl ตามด้วยน้ำก่อนเข้าสู่การเดิม SDS gel separation buffer ในท่อแคปิลลารี และฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบที่ดำเนินการภายใต้แรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดการแยกโปรตีน และตรวจวัดสัญญาณของโปรตีนที่แยกได้โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ PDA ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร วิเคราะห์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส รุ่น PA 800 plus pharmaceutical analysis system จำนวนต่างเครื่อง ต่างห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ในตัวอย่าง mAb IgG1 พบว่ามีค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของ Intact IgG (monomer) ร้อยละ 95.7-96.7 และ LC+HC ร้อยละ 97.2-98.0⁷ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างในตัวอย่างอะดาลิฟูแมบ ร้อยละ 92.5-93.5 และ 98.0-99.0 ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein ตามลำดับ

การทดสอบความพร้อมของระบบใช้สารมาตรฐาน IgG system suitability สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการแยกของโมเลกุลโปรตีนทั้งในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein เพื่อยืนยันความเหมาะสมของระบบและเครื่องมือ ว่ามีความแม่นยำ และไม่มีผลคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ ก่อนทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง โดยลักษณะ electropherogram ที่วิเคราะห์ได้ ปรากฏ 7 พีคหลักในสภาวะ non-reducing protein และปรากฏ 3 พีคหลักในสภาวะ reducing protein รวมถึงผลการทดสอบที่ได้มีค่าทางสถิติ และเกณฑ์การยอมรับเป็นไปตามเกณฑ์สอดคล้องกับผลการทดสอบที่วิเคราะห์โดยใช้วิธีสภาวะ และสารมาตรฐานชนิดเดียวกัน^{11,15}

เมื่อดำเนินการทดสอบตามแนวทาง ICH Q2 พบว่าวิธีสามารถแยกโปรตีนมาตรฐานในช่วงที่มีขนาดโมเลกุล 10-225 KDa ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การวิเคราะห์ mAb A และ mAb B สามารถแยกโมเลกุลเดี่ยว (monomer) ได้และเมื่อทำการทดสอบในสภาวะ reducing protein ที่สภาวะการทดสอบมีการสลายพันธะไดซัลไฟด์สามารถแยกโมเลกุลของ HC และ LC ออกจากกันได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการทดสอบในตัวอย่าง ยาชีววัตถุ คล้ายคลึงชนิดอะดาลิอูแมบ (SB5) และ reference product ของยาอะดาลิอูแมบที่มีการเผยแพร่ในปี ค.ศ 2019 พบว่ามีลักษณะของ electropherogram สอดคล้องกับกับผลที่วิเคราะห์ได้ทั้งในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein¹⁶⁻¹⁷

การดำเนินการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ดำเนินการทดสอบตามพารามิเตอร์ ICH Q2 โดยจำนวนซ้ำ

ในการทดสอบและค่าสถิติที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบแต่ละพารามิเตอร์มีเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานทางสถิติ ผลการทดสอบตามพารามิเตอร์ในตัวอย่าง mAb A และ mAb B ในสภาวะ non-reducing protein และ reducing protein มีผลสอดคล้องตามเกณฑ์กำหนด โดยปัจจุบันได้มีการดำเนินการทดสอบโดยใช้สภาวะที่มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างอะดาลิอูแมบที่นำเข้าเพื่อมาจำหน่ายในประเทศมากกว่า 3 ชนิด โดยพบว่าปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อ การทดสอบ เช่น การเปลี่ยนเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โพรโทรีซิสแบบแคปิลลารีที่ใช้ในการวิเคราะห์ หรือตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างชนิดกัน หรือชนิดเดียวกันแต่มีองค์ประกอบของ excipient หรือชนิดของ formulation buffer ที่แตกต่างกัน จะมีความเสถียรของตัวอย่างที่แตกต่างกัน อาจส่งผลกระทบต่อ การวิเคราะห์ เช่น แรงดันไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก ระยะเวลาในการแยก รวมถึงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและระยะเวลาการบ่มตัวอย่าง ที่มีความแตกต่างกัน และการเปลี่ยนรุ่นการผลิตของชุดน้ำยาสำเร็จรูป SDS-MW analysis kit อาจก่อให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของ SDS gel buffer ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการแยกของโปรตีนได้อย่างแม่นยำ เพื่อประเมินผลกระทบดังกล่าวจึงได้มีการทดลองเปลี่ยนรุ่นการผลิตของชุดน้ำยาสำเร็จรูปพบว่าวิธียังมีความคงทนโดยร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ MT และ %CorrA มีค่าไม่เกิน 5 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปผล

จากผลการศึกษา วิถีวิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิอูแมบโดยวิธี CE-SDS ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะ ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ และความคงทนของ วิถีวิเคราะห์สูง มีประสิทธิภาพในการแยกแยะ สำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ ภายในประเทศไทยเพื่อควบคุมคุณภาพด้าน เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ในยาอะดาลิอูแมบ

ข้อเสนอแนะ

การเตรียมตัวอย่างการทดสอบควร ดำเนินการภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยควบคุม อุณหภูมิและระยะเวลาให้เหมาะสมเพื่อป้องกันการ แตกตัวของผลิตภัณฑ์ที่อาจส่งผลต่อการทดสอบ และระหว่างการทดสอบควรมีการตรวจสอบ ความเสถียรของ IS เนื่องจากใช้ในการทดสอบ ควบคู่กับตัวอย่างทุกครั้งในการทดสอบ เพื่อให้ผล การทดสอบมีความแม่นยำและสามารถเปรียบเทียบ ผลการทดสอบระหว่างขณะทำการทดสอบได้ นอกจากนี้ควรมีการขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ ให้ครอบคลุมในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด อื่น ๆ เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความสามารถ ของวิธีที่มีความหลากหลายมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Ellis CR, Azmat CE. Adalimumab. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls; 2025 Jan [cited 2024 Jan 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557889>
2. Mordor Intelligence Research & Advisory. Adalimumab drugs market size & share analysis—growth trends & forecasts (2024–2029) [Internet]. Mordor Intelligence; 2024 [cited 2024 Oct 18]. Available from: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/adalimumab-drugs-market>
3. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves Amjevita, a biosimilar to Humira [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2020 [cited 2024 Nov 20]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-amjevita-biosimilar-humira>
4. GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative. Biosimilars of adalimumab [Internet]. Mol (BE): Pro Pharma Communications International; 2024 Mar 11 [cited 2023 Jan 20]. Available from: <https://gabionline.net/biosimilars/general/Biosimilars-of-adalimumab>
5. De Putte V, Salfeld J, Kaymakcalan Z. Adalimumab. In: Moreland LW, Emery P, editors. TNF inhibition in the treatment of rheumatoid arthritis. London: Martin Dunitz; 2003.
6. Wiesner R, Scheller C, Krebs F, Wätzig H, Oltmann-Norden I. A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: influences of sample preparation on

- molecular weight determination of proteins. Electrophoresis. 2021 Feb;42(3):206–18. doi: 10.1002/elps.202000199. Epub 2020 Nov 30. PMID: 33185281.
7. Li M, Yu C, Wang W, Wu G, Wang L. Interlaboratory method validation of capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) methodology for analysis of mAbs. Electrophoresis. 2021 Oct;42(19):1900–13. doi: 10.1002/elps.202000396. Epub 2021 Aug 6. PMID: 34240427.
 8. De Griend S-van CE. CE-SDS method development, validation, and best practice—an overview. Electrophoresis. 2019 Oct;40(18–19):2361–74. doi: 10.1002/elps.201900094. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31141192.
 9. สำนักงาน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือและหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilars) [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: อักษรกราฟฟิกแอนดี้ไซน์; 2561 [เข้าถึงเมื่อ 2021 ก.พ. 19]. เข้าถึงได้จาก: <https://drug.fda.moph.go.th/media.php?id=509750409062129664&name=13%20Biosimilar.pdf>
 10. Duhamel L, Gu Y, Barnett G, Tao Y, Voronov S, Ding J, et al. Therapeutic protein purity and fragmented species characterization by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate using systematic hybrid cleavage and forced degradation. Anal Bioanal Chem. 2019 Aug;411(24):5617–29. doi: 10.1007/s00216-019-01942-8. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31214752.
 11. United States Pharmacopoeia. General chapter, <129> Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies [Internet]. MD: USP-NF; 2022 [cited 2023 Feb 15]. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-AEE677A4-5F8C-46B3-B949-D5D3DF112DB8_2_en-US
 12. European Medicines Agency. ICH Topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. CPMP/ICH/381/95 [Internet]. 1995 [cited 2022 Jul 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
 13. Council of Europe. European Pharmacopoeia. Vol I. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2022.
 14. United States Pharmacopoeia. <1053> Capillary electrophoresis [Internet]. MD: USP-NF; 2023 [cited 2023 Feb 15]. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-89EA57F1-8148-4707-BAD5-536BE8DCC4EE_3_en-US

15. Esterman AL, Katiyar A, Krishnamurthy G. Implementation of USP antibody standard for system suitability in capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) for release and stability methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2016 Sep;128:447–54. doi: 10.1016/j.jpba.2016.06.006. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27344634.
16. Lee N, Lee JJ, Yang H, Baek S, Kim S, Kim S, et al. Evaluation of similar quality attribute characteristics in SB5 and reference product of adalimumab. *MAbs.* 2019 Jan;11(1):129–44. doi: 10.1080/19420862.2018.1530920. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30296198; PMCID: PMC6343792.
17. Zhang E, Xie L, Qin P, Lu L, Xu Y, Gao W, et al. Quality by Design-Based assessment for analytical similarity of adalimumab biosimilar HLX03 to Humira®. *AAPS J.* 2020 May;22(3):69. doi: 10.1208/s12248-020-00454-z. PMID: 32385732; PMCID: PMC7210234.