สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 (2569): กันยายน – ธันวาคม Vol. 33 No. 3 (2026): September – December
https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index

# การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์ประจุยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่าไอโซอิเลคทริก 7.3–9.4

**เกวลิน รักษาสรณ์[1] สุดาทิพย์ สุนสิน[1] สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์[1]**

[1]สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี
**ที่อยู่ติดต่อ:** เกวลิน รักษาสรณ์ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 kawalin.r@dmsc.mail.go.th

# Development of an Efficient Ion-Exchange Chromatography Method for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies within the Isoelectric Point Range of 7.3–9.4

**Kawalin Raksasorn[1], Sudatip Sunsin[1], Saiwarul Jadoonkittinan[1]**

[1]Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand
**Contact address:** Kawalin Raksasorn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, kawalin.r@dmsc.mail.go.th

**Received:** 25 September 2025, **Revised:** 19 November 2025, **Accepted:** 23 March 2026

## Abstract

**Background:** Monoclonal antibodies (mAbs) are biopharmaceuticals used as targeted therapies for immune-related diseases. These large protein molecules, produced through biotechnological processes, possess structural complexity and require stringent manufacturing controls. Variability in production or storage can lead to molecular heterogeneity and charge variants, which may affect critical product attributes such as stability, biological activity, and immunogenicity. Therefore, charge variant analysis is an essential step in quality assurance. Although ion-exchange chromatography (IEC), particularly using pH-gradient separation, is commonly employed for this purpose, it has not yet been established as a compendial standard method, and supporting data remain limited. Consequently, method development and validation are required to ensure effective quality control of mAbs, enabling broader application to various antibodies with different isoelectric points (pI).

**Objectives:** This study aimed to develop a charge variant analysis method using ion-exchange chromatography (IEX) for monoclonal antibodies (mAbs) with an isoelectric points (pI) ranging from 7.3 to 9.4. This study further aimed to validate the method according to international standards to ensure its suitability for the routine quality control of monoclonal antibodies marketed domestically.

**Methods:** This experimental study, conducted from October 2024 to July 2025, aimed to optimize and validate an analytical method for the charge variant profiling of seven monoclonal antibodies (mAbs)—including Omalizumab, Infliximab, Atezolizumab, Adalimumab, Pertuzumab, Trastuzumab,

and Rituximab—with pI ranging from 7.3 to 9.4. Utilizing ion-exchange chromatography, the method development focused on achieving optimal separation conditions, followed by a rigorous validation process in accordance with regulatory standards. The method was evaluated based on critical parameters, including specificity, precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), and robustness, to ensure its suitability for the quality control of commercially available monoclonal antibodies in the domestic market.

**Results:** The developed method successfully characterized charge variants of mAbs with pI ranging from 7.3 to 9.4. It demonstrated high specificity and precision, with intra- and inter-day % RSD values below 5 % and no significant differences observed across instruments or analysts. Linearity was confirmed within the concentration range of 0.50–8.00 mg/ml, with accuracy between 90–110 %. The limits of quantitation was 1.00 mg/ml, while the limits of detection were 0.30 mg/ml, respectively. The method also proved robust under variations in column temperature and mobile phase stability for up to 7 days.

**Conclusions:** The ion-exchange chromatography method demonstrated specificity, accuracy, precision, linearity, and robustness, and was applicable for charge variant analysis of diverse mAbs with pI ranging from 7.3 to 9.4. This validated method is suitable as a standard procedure for quality control and regulatory submission of monoclonal antibody products in Thailand

**Keywords:** monoclonal antibody, charge variants, critical quality attribute, ion-exchange chromatography, isoelectric point

## บทคัดย่อ

**ความสำคัญ:** โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal Antibodies: mAbs) เป็นยากลุ่มชีวเภสัชภัณฑ์ใช้รักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) ในโรคที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและโรคมะเร็ง โครงสร้างเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งมีความซับซ้อนและควบคุมการผลิตอย่างเข้มงวด ความไม่สม่ำเสมอในกระบวนการผลิตหรือการเก็บรักษาสามารถก่อให้เกิดความหลากหลายของโมเลกุลโปรตีนและประจุ (charge variants) ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะสำคัญของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ความคงตัว การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้น การวิเคราะห์ charge variants จึงเป็นสิ่งสำคัญในการประกันคุณภาพ ปัจจุบันใช้วิธี Ion-Exchange Chromatography (IEC) ใช้หลักการแยกประจุโปรตีนตามค่า pH (pH-gradient) หรือความเข้มข้นของสารละลายเกลือในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งถูกนำมาใช้ทั่วไป แต่ไม่มีการกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในตำรายาสากลและมีข้อมูลสนับสนุนอย่างจำกัด จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีและตรวจสอบความถูกต้องเพื่อนำไปใช้ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ mAbs และนำมาประยุกต์ใช้กับ mAbs หลายชนิดที่มีค่าไอโซอิเลกทริก (isoelectric point: pI) ที่แตกต่างกันอย่างมีประสิทธิภาพ

**วัตถุประสงค์:** เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ charge variants โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่า pI ช่วง 7.3-9.4 และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อนำวิธีที่ได้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศ

**วิธีการวิจัย:** เป็นการศึกษาเชิงทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2567 ถึงกรกฎาคม 2568 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ประจุยา (charge variants) ใน mAbs 7 ชนิด ได้แก่ ยาโอมาลิซูแมบ ยาอินฟลิซิแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ ยาอะดาลิมูแมบ ยาเพอร์ทูซูแมบ ยาทราสทูซูแมบ และยาริทูซิแมบ ที่มีค่า pI (isoelectric point) ในช่วง 7.3-9.4 พัฒนาวิธีและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความจำเพาะ ความเที่ยง ความแม่น ความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดเชิงปริมาณและขีดกำจัดในการตรวจพบ และความคงทนของวิธี

**ผลการศึกษา:** พบว่าวิธีสามารถวิเคราะห์ charge variants ของ mAbs ที่มีค่า pI แตกต่างกันในช่วง 7.3-9.4 มีความจำเพาะและความเที่ยงที่ดี มี % RSD ของการทำซ้ำในวันเดียวกันและต่างวันไม่เกิน 5 และไม่มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปลี่ยนเครื่องมือและนักวิเคราะห์ มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.50 ถึง 8.00 mg/ml มีค่าความแม่นอยู่ในช่วง 90-110 % และมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ 1.00 mg/ml และมีขีดจำกัดของการตรวจพบ 0.30 mg/ml วิธีมีความคงทนเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์และระยะเวลาในการเก็บรักษาสารละลายเฟสเคลื่อนที่เก็บได้นาน 7 วัน

**สรุปผล:** วิธีวิเคราะห์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ มีความจำเพาะ ความแม่นและความเที่ยงตรง เป็นเส้นตรงตลอดช่วงการวิเคราะห์ และมีความคงทน สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ charge variants ของ mAbs ได้หลากหลายชนิดที่มีค่า pI ในช่วง 7.3-9.4 เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพและประกอบการขึ้นทะเบียนจำหน่าย mAbs ในประเทศ

**คำสำคัญ:** โมโนโคลนอลแอนติบอดี ประจุของยา ลักษณะทางคุณภาพที่สำคัญ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ไอโซอิเลกทริก

## บทนำ

ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibodies: mAbs) เป็นไกลโคโปรตีนที่มีความซับซ้อน (heterogeneous glycoprotein) โครงสร้างมีขนาดใหญ่[1] เป็นอิมมูโนโกลบูลินจี (immunoglobulin G) ทั้งรูปแบบ murine, chimeric, humanized และ human antibodies[2] และแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 ซึ่งมีลำดับอะมิโน (amino acid sequence) และพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bone) ที่แตกต่างกัน[3-4] ส่งผลต่อกลไกการออกฤทธิ์ของยา (mechanism of action) เช่น กระตุ้นการทำงานของ Fc mediated effector function (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity: ADCC, Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis (ADCP) และ Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC)) นอกจากนี้มีกลไกในการยับยั้งการส่งสัญญาณกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้องอก ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นการตายของเซลล์เนื้องอกแบบ apoptosis และการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เป็นต้น mAbs ชนิด IgG1 ถูกนำมาใช้ในทางเภสัชกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ยาโอมาลิซูแมบ (omalizumab)[5] ยาอินฟลิซิแมบ (infliximab)[6] ยาอะทีโซลิซูแมบ (atezolizumab) ยาอะดาลิมูแมบ (adalimumab) ยาเพอร์ทูซูแมบ (pertuzumab) ยาทราสทูซูแมบ (trastuzumab) และยาริทูซิแมบ (rituximab) เป็นต้น ส่วนใหญ่ใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการอักเสบในอวัยวะต่างๆ และโรคมะเร็ง[1,3] ขณะที่ IgG3 พบการใช้น้อยเนื่องจากมีความเสี่ยงสูงต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ในผู้ป่วย[3]

ปัจจุบัน mAbs ผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (recombinant DNA technology) โดยใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cell line) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม กระบวนการผลิตมีความซับซ้อนและจำเป็นต้องมีการควบคุมอย่างเข้มงวดในทุกขั้นตอน ตั้งแต่ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น วิตามิน เกลือแร่ น้ำตาล รวมทั้งความเป็นกรด-ด่างและออสโมลาลิตี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม[7] การคัดเลือกโคลนที่มีเสถียรภาพ (stable clone) ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงการแยกเซลล์ (isolation and centrifugation) การทำให้บริสุทธิ์ (purification process) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีหลายชนิดในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเชื้อก่อโรค และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่เหมาะสม หากการควบคุมกระบวนการผลิตไม่ดี อาจก่อให้เกิดความแตกต่างของโครงสร้างโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของประจุ (charge variants) อันเนื่องมาจากการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (post-translational modifications) รวมถึงการเสื่อมสลาย (degradations) หรือการดัดแปลง

(modifications) ลำดับอะมิโนของโปรตีน (protein sequence) เช่น การเกิด C-terminal lysine clipping ที่ทำให้เกิดอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก (basic variants) รวมทั้งการเกิด deamidation, glycation และการเกิด sialic acid ของไกลแคนชนิด N-linked และ O-linked บนโมเลกุลของโปรตีนทำให้เกิดอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ (acidic variants) ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะสำคัญของยา (critical quality attribute) ทั้งการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และความคงตัวของยา[1,2,7,14] โดยในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ (molecular identity) และโครงสร้าง (structural integrity) รวมทั้งลักษณะ charge variants ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ mAbs แต่ละชนิด

ตำรายาของยุโรป คือ European Pharmacopoeia (Ph.Eur) แนะนำให้ใช้วิธีการวิเคราะห์อย่างน้อย 2 เทคนิคเพื่อยืนยันคุณภาพ ที่นิยมใช้ได้แก่ peptide mapping, isoelectric focusing, ion- exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, oligosaccharide mapping, monosaccharide content และ mass spectrometry[8] เทคนิคที่ใช้กันแพร่หลายในการวิเคราะห์ charge variants ได้แก่ แคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง (capillary Isoelectric Focusing: cIEF) สำหรับใช้แยกโปรตีนตามค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point: pI) ซึ่งกำหนดวิธีมาตรฐานใน Ph. Eur[9] และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography: IEC) สามารถจำแนกเป็นชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion-Exchange Chromatography: AEX) สำหรับการวิเคราะห์ charge variants ของ mAbs ที่มีค่า pI ต่ำกว่า 6 และชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation-Exchange Chromatography: CEX) ใช้วิเคราะห์ mAbs ที่มีค่า pI สูงกว่า 8 อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังไม่ได้กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในตำรายาสากลและมีข้อมูลจำกัด ปัจจุบัน mAbs ส่วนใหญ่มีค่า pI มากกว่า 6 นิยมใช้ CEX ในการวิเคราะห์ โดยทั่วไปการแยก charge variants ด้วย AEX และ CEX อาศัยสองหลักการสำคัญ ได้แก่ การปรับความเข้มข้นของเกลือซึ่งเป็นเทคนิคดั้งเดิมที่ใช้อย่างแพร่หลายและมีความจำเพาะต่อ mAbs แต่ละชนิด ใช้ระยะเวลานานในการปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการแยกแต่ละชนิด และการปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH-gradient) ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่[2,6,9] ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายฉบับที่พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยการปรับ pH-gradient ซึ่งมีข้อดีที่สำคัญคือการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก การลดระยะเวลาการวิเคราะห์ และความสามารถในการแยกประจุโดยใช้สภาวะเดียวกันสำหรับ mAbs ที่มีค่า pI แตกต่างกัน[1,6,11-13] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ charge variants ของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่า pI ในช่วง 7.3-9.4 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทาง ICH Q2(R2)[14] เพื่อยืนยันความเหมาะสมและความน่าเชื่อถือของวิธี สามารถนำไปประยุกต์ในห้องปฏิบัติการด้านชีววัตถุสำหรับควบคุมคุณภาพยา mAbs ที่จำหน่ายในประเทศ ให้ผู้ป่วยได้รับยาที่มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยสูงสุด

## วัตถุประสงค์

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์ charge variants โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่า pI ช่วง 7.3-9.4

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อนำวิธีที่ได้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศ

## ระเบียบวิธีวิจัย

### วิธีวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental research) ระหว่างเดือนตุลาคม 2567 ถึงกรกฎาคม 2568 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ charge variants ใน mAbs 7 ชนิดที่มีค่า pI ในช่วง 7.3-9.4 วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการแยก charge variants จากค่าความสามารถในการแยก (resolution: Rs) ระหว่าง acidic peaks และ main peak รวมทั้งค่า number of the theoretical plates (N)[15] จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (IEC)

**กลุ่มตัวอย่าง**

ตัวอย่าง mAbs ที่จัดซื้อจากตัวแทนจำหน่ายของบริษัทผู้ผลิต จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ยาโอมาลิซูแมบ ยาอินฟลิซิแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ ยาอะดาลิมูแมบ ยาเพอร์ทูซูแมบ ยาทราสทูซูแมบ และยาริทูซิแมบ ที่มีค่า pI ในช่วง 7.3-9.4 โดยมีการแยก mAbs ตามค่า pI แบ่งเป็น 3 ช่วง ในการตรวจสอบแต่ละพารามิเตอร์ จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง และสารมาตรฐานของ mAbs (in-house reference standard) ทั้ง 7 ชนิด ประกอบด้วย

1. ช่วง pI 7.3-7.6 คือ ยาโอมาลิซูแมบ ขนาด 75 mg/0.50 ml (pI 7.3)[11] และยาอินฟลิซิแมบ ขนาด 120 mg/ml (pI 7.6)[1,6]

2. ช่วง pI 8.6-8.9 คือ ยาอะทีโซลิซูแมบ ขนาด 1,200 mg/20 ml (pI 8.6)[6] และยาอะดาลิมูแมบ ขนาด 40 mg/0.80 ml (pI 8.9)[1,6]

3. ช่วง pI 9.0-9.4 คือ ยาเพอร์ทูซูแมบ ขนาด 420 mg/14 ml (pI 9.0)[6] ยาทราสทูซูแมบ ขนาด 440 mg/20 ml (pI 9.1)[1,6] และยาริทูซิแมบ ขนาด 100 mg/10 ml (pI 9.4)[1,6]

**เครื่องมือและสารเคมี**

1. เครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น Prominence และรุ่น Fully Automatic สำหรับตรวจวัดสารแบบไดโอดอะเรย์ (Photo Diode Array: PDA) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LabSolutions คอลัมน์ชนิด Ion Exchange ProPacTMWCX-10 Analytical column (Thermo fisher scientific) (4×250 mm ขนาด 10 µm) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง เครื่องวิเคราะห์ไอออน (pH meter) และแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.20 µm

2. น้ำ ชนิด HPLC grade และสารเคมี AR grade (Sigma-Aldrich) ได้แก่ CX-1 pH gradient buffer A, pH 5.6, Cat No. 303274, Thermo Fisher Scientific, CX-1 pH gradient buffer B, pH 10.2, Cat No. 303275, Thermo Fisher Scientific, disodium hydrogen phosphate CAS. No. 7558-79-4, sodium dihydrogen phosphate monohydrate CAS No. 10049-21-5, sodium chloride CAS No.7647-14-5, sodium hydroxide CAS No.1310-73-2 และ MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4-Morpho lineethanesulfonic acid) CAS No. 4432-31-9

**สภาวะที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Charge variants โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (IEC)**

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยทบทวนวรรณกรรม และปรับให้เหมาะสมกับเครื่องมือ อุปกรณ์ คอลัมน์ชนิด Ion Exchange ProPac™ WCX-10 Analytical column (Thermo fisher scientific) (4×250 mm ขนาด 10 µm) และชนิดของ mAbs โดยใช้หลักการแยก charge variants 2 วิธี ได้แก่

A) การปรับความเข้มข้นของเกลือ (salt concentration) ใน 2 สภาวะ คือ 1) phosphate buffer: เฟสเคลื่อนที่ A คือ 20 mM sodium phosphate, pH 6.2 และเฟสเคลื่อนที่ B คือ 20 mM sodium phosphate, pH 6.2, 300 mM NaCl เวลาที่ใช้วิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง 40 นาที โดยใช้ gradient elution ในการแยกสาร เริ่มจากเฟสเคลื่อนที่ A 90% และ B 10 % และลดความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 50 % ภายใน 30 นาที และเพิ่มความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 90 % ใน 40 นาที อัตราการไหล 1.00 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C ปริมาณการฉีดสารในการวิเคราะห์ 10 µl และความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 280 nm และ 2) MES buffer condition: เฟสเคลื่อนที่ A คือ 20 mM MES solution containing 60 mM NaCl, pH 5.6 และ B คือ 20 mM MES solution containing 500 mM NaCl, pH 5.6 การวิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง เท่ากับ 40 นาที โดยใช้ gradient elution ในการแยกสาร เริ่มจากเฟสเคลื่อนที่ A 85% และ B 15% และลดความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 55 % ภายใน 30 นาที และเพิ่มความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 85 % ใน 40 นาที อัตราการไหล 1.00 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C ปริมาณการฉีดสารในการวิเคราะห์ 5 µl และความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 280 nm และ B) การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-gradient) ใน 2 สภาวะ คือ phosphate buffer: เฟสเคลื่อนที่ A คือ 20 mM phosphate buffer, pH 7.3 และ B คือ 20 mM phosphate buffer, pH 8.7 การวิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง เท่ากับ 57 นาที โดยใช้ gradient elution ในการแยกสาร เริ่มจากเฟสเคลื่อนที่ A 100 % และ B 0 % และเพิ่มความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ B

เป็น 100 % ใน 57 นาที อัตราการไหล 0.80 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C ปริมาณการฉีดสารในการวิเคราะห์ 10 µl และความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 280 nm และ CX-1 pH gradient buffer: เฟสเคลื่อนที่ A คือ (10X) CX-1 pH gradient buffer A, pH 5.6 และ B คือ (10X) CX-1 pH gradient buffer B, pH 10.2 การวิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง เท่ากับ 40 นาที โดยใช้ gradient elution ในการแยกสาร เริ่มจากเฟสเคลื่อนที่ A 90 % และ B 10 % และลดความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 50 % ภายใน 30 นาที และเพิ่มความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ A เป็น 90 % ใน 40 นาที อัตราการไหล 1.00 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C ปริมาณการฉีดสารในการวิเคราะห์ 5 µl และความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 280 nm

## ขั้นตอนดำเนินการ

1. เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน mAbs ทั้ง 7 ชนิด โดยเจือจางด้วยน้ำ HPLC grade ให้มีความเข้มข้น 5.00 mg/ml แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรองไนลอน ขนาด 0.20 µm สำหรับการวิเคราะห์ และการตรวจสอบความพร้อมของระบบ (system suitability)

2. ตรวจสอบความพร้อมของระบบก่อนวิเคราะห์ทุกครั้ง โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานของยา mAbs ทั้ง 7 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลที่ได้ค่า $R_S$ ระหว่าง acidic peaks และ main peak ต้องไม่น้อยกว่า 1.00 และค่า %peak area ของ main peak ต้องมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation: % RSD) ไม่เกิน 2.00 และ % peak area ของ acidic peaks และ basic peaks มีค่า % RSD ไม่เกิน 5.00

3. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

3.1 ความจำเพาะของวิธี (specificity) โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง สารมาตรฐาน formulation buffer ของ mAbs ทั้ง 7 ชนิด blank และตัวอย่าง mAbs ทั้ง 7 ชนิด ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง (stress condition) ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่างที่ได้ต้องให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ chromatographic profile คล้ายคลึงกันโดยไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง และในสภาวะ stress พบลักษณะโครมาโทแกรมที่แตกต่างไปจากสภาวะปกติ

3.2 ความเที่ยง (precision) โดยวิเคราะห์ยาโอมาลิซูแมบ ขนาด 75 mg/0.50 ml อะทีโซลิซูแมบ ขนาด 1200 mg/20 ml และริทูซิแมบ ขนาด 100 mg/10 ml จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน (repeatability) และต่างวัน จำนวน 3 ซ้ำ 3 วัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (intermediate precision) คำนวณ % RSD ของค่าเฉลี่ย % peak area ของ acidic peaks และ basic peaks ไม่เกิน 5.00 และ main peak ไม่เกิน 2.00 และวิเคราะห์ผลต่างวัน โดยใช้สถิติ one-way ANOVA เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์และนักวิเคราะห์ 2 คน ใช้สถิติ independent-sample t-test

3.3. ความแม่น (accuracy) โดยการ spike สารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ ความเข้มข้น 3.00, 5.00 และ 8.00 mg/ml ลงใน formulation buffer ของ mAbs แต่ละชนิด วิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery) โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วง 90.00-110.00

3.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) เจือจางยาโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยค่า LOD คือความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise ratio: S/N) เท่ากับ 3:1 และ LOQ คือความเข้มข้นของสารที่ให้ค่า S/N เท่ากับ 10:1 และจากนั้นทำการวิเคราะห์ความเที่ยง (precision) และความถูกต้อง (accuracy) เพื่อยืนยันค่า LOQ

3.5 ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของสารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ ความเข้มข้น 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 8.00 mg/ml จำนวน 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ mAbs ดังกล่าวและค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks กราฟที่ได้ต้องมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: $R^2$) มีค่าใกล้เคียง 1

หรือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) ≥ 0.999[16]

3.6 ความคงทนของวิธี (robustness) ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของเทคนิคโครมาโทกราฟีตาม ICH Q2(R2) guideline[14] ได้แก่ อุณหภูมิในการวิเคราะห์ ชนิดและยี่ห้อของคอลัมน์ รวมทั้งความแตกต่างระหว่างรุ่นการผลิต (lot number) ของคอลัมน์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเคลื่อนที่ และอัตราการไหล ดังนั้นในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์นี้ ทำการวิเคราะห์ยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์ จาก 30°C ตามสภาวะที่เลือกไว้ เป็น 25 และ 35°C และเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A และ B จากเดิมเตรียมแล้วใช้ทันที เปลี่ยนเป็นเก็บได้นาน 7 และ 14 วัน และเปรียบผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย % peak area ของพื้นที่ main peak โดยใช้สถิติ one way-ANOVA

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ใช้สูตร

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

2. วิเคราะห์ค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery) ใช้สูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1-C2)}{C3} \times 100$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน formulation buffer ที่วัดได้หลังจากเติมสารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน formulation buffer ที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ

C3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และริทูซิแมบ ที่ทราบค่า

## ผลการศึกษา

### สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ charge variants โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (IEC)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า สภาวะที่วิเคราะห์ด้วย CX-1 pH gradient buffer มีค่า $R_S$ ระหว่าง acidic peaks และ main peak มากกว่า 1.0 รวมทั้งมีค่า N มากกว่า 8,000 แสดงว่า สภาวะนี้มีประสิทธิภาพในการแยก charge variants ใน mAbs ที่มี pI 7.3-9.4 ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ charge variants ใน mAbs ที่มี pI 7.3-9.4

| สภาวะที่ศึกษา | Salt concentration | | | | pH gradients | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Phosphate buffer | | MES buffer | | Phosphate buffer[12] | | CX-1 pH gradient buffer | |
| พารามิเตอร์/ ตัวอย่าง mAbs | $R_S$ (n=6) | N (n=6) | $R_S$ (n=6) | N (n=6) | $R_S$ (n=6) | N (n=6) | $R_S$ (n=6) | N (n=6) |
| ยาโอมาลิซูแมบ | 0.89 | 2,617.33 | * | * | * | * | 1.43 | 8,355.00 |
| ยาอินฟลิซิแมบ | 0.72 | 7,099.67 | * | * | * | * | 1.18 | 12,738.33 |
| ยาอะทีโซลิซูแมบ | 0.34 | 5,577.67 | * | * | * | * | 1.48 | 24,357.33 |
| ยาอะดาลิซูแมบ | 0.35 | 39,260.33 | * | * | 1.49 | 19,034.67 | 1.11 | 102,014.00 |
| ยาเพอร์ทูซูแมบ | 0.75 | 19,471.33 | 0.24 | 5,661.00 | 2.52 | 6,007.00 | 1.56 | 70,449.33 |
| ยาทราสทูซูแมบ | 2.27 | 16,546.33 | 1.73 | 10,387.00 | 4.51 | 4,566.33 | 3.57 | 40,829.00 |
| ยาริทูซิแมบ | 0.68 | 26,915.33 | 0.23 | 3,693.67 | 1.43 | 19,243.00 | 1.38 | 38,341.67 |
| **เกณฑ์การยอมรับ** | **≥1** | **≥8000** | **≥1** | **≥8000** | **≥1** | **≥8000** | **≥1** | **≥8000** |

* หมายถึง ไม่สามารถแยกตัวอย่าง mAbs ได้

## การวิเคราะห์ System Suitability

ผลวิเคราะห์ system suitability ของสารมาตรฐาน mAbs ทั้ง 7 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดโดยค่า $R_S$ ระหว่าง acidic peaks และ main peak มีค่ามากกว่า 1.00 และค่าเฉลี่ย % peak area ของ main peak มีค่า % RSD ไม่เกิน 2.00 และ %RSD ของ acidic peaks และ basic peaks ไม่เกิน 5.00 ดังแสดงในตารางที่ 2

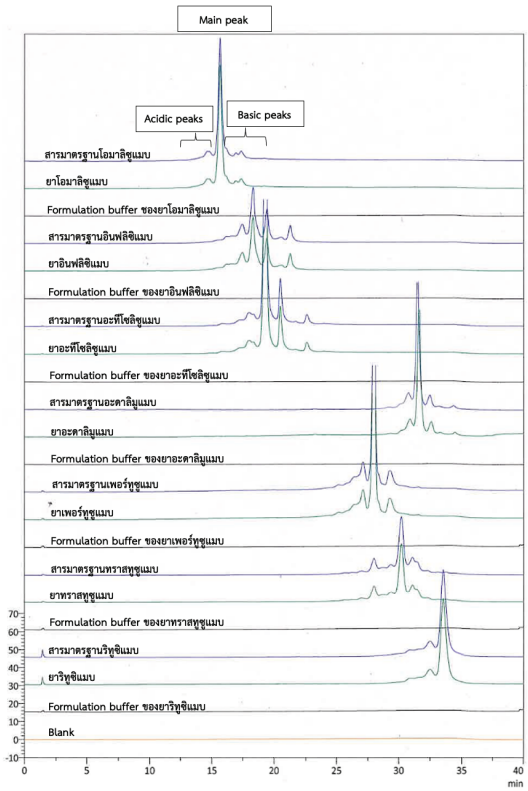
**ตารางที่ 2** ผลการวิเคราะห์ System Suitability

| สารมาตรฐาน mAbs | % RSD (n=3) ของ % peak area | | | $R_S$ เฉลี่ยระหว่าง acidic peaks และ main peak (n=3) |
|---|---|---|---|---|
| | Acidic peaks | Main peak | Basic peaks | |
| ยาโอมาลิซูแมบ | 3.20 | 0.99 | 4.54 | 1.23 |
| ยาอินฟลิซิแมบ | 0.36 | 0.70 | 0.47 | 1.02 |
| ยาอะทีโซลิซูแมบ | 4.07 | 1.04 | 2.24 | 1.43 |
| ยาอะดาลิมูแมบ | 0.96 | 0.60 | 2.84 | 1.01 |
| ยาเพอร์ทูซูแมบ | 1.68 | 0.27 | 1.99 | 1.53 |
| ยาทราสทูซูแมบ | 1.80 | 0.85 | 0.72 | 2.95 |
| ยาริทูซิแมบ | 3.66 | 0.80 | 2.94 | 1.05 |
| **เกณฑ์กำหนด** | **≤5.00** | **≤2.00** | **≤5.00** | **≥1.00** |

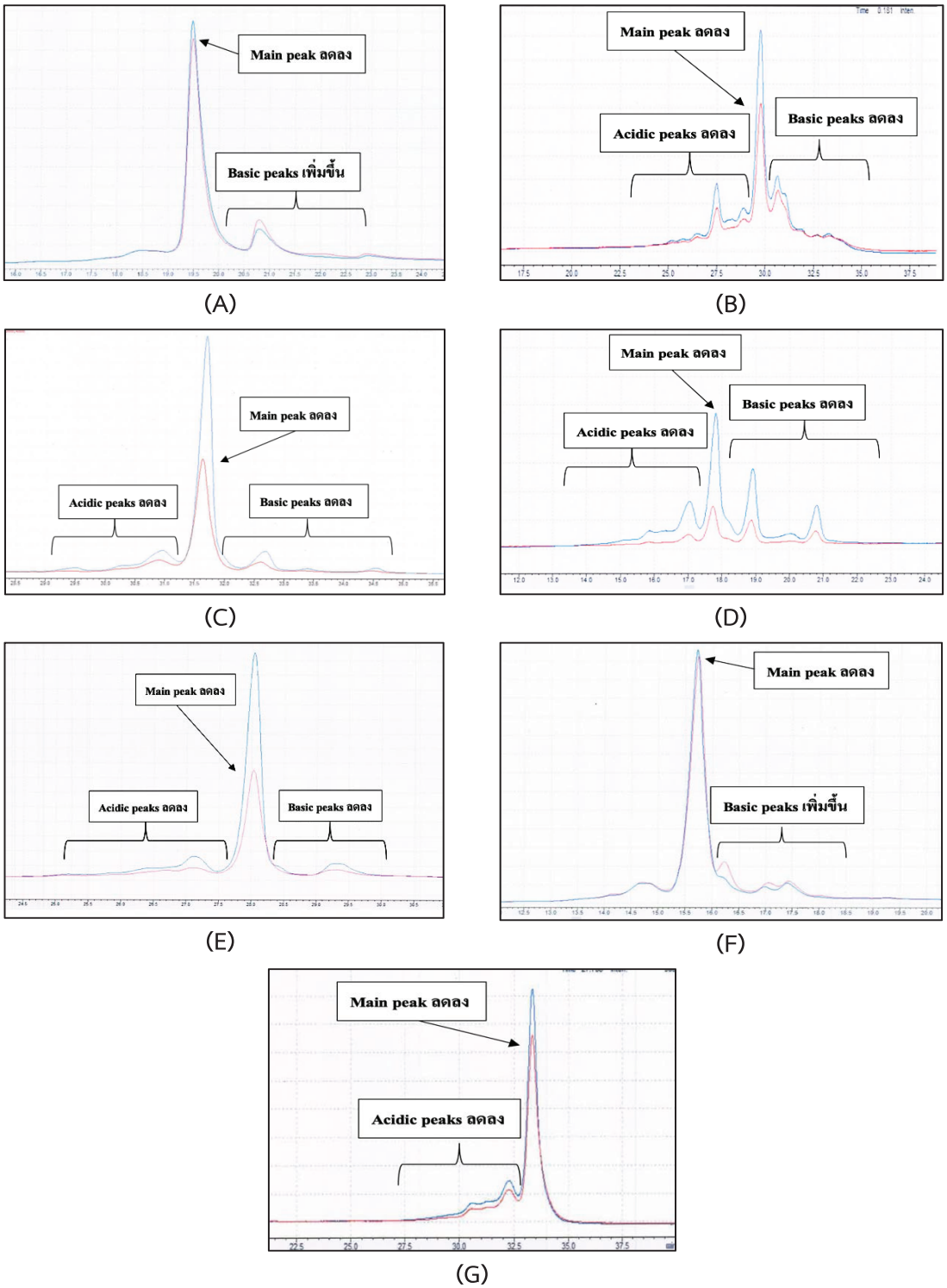
## ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

**ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)** วิเคราะห์ตัวอย่าง สารมาตรฐาน formulation buffer ของ mAbs ทั้ง 7 ชนิด และ blank แล้วเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้ พบว่ามี chromatographic profile คล้ายคลึงกันระหว่างตัวอย่างและสารมาตรฐานของ mAbs ชนิดนั้นๆ โดยไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง ไม่ปรากฏ peak ใน formulation buffer และ blank ดังรูปที่ 1 และตัวอย่าง mAbs ทั้ง 7 ชนิด ในภาวะ stress ปรากฏลักษณะโครมาโทแกรมที่แตกต่างไปจากโครมาโทแกรมปกติ ดังรูปที่ 2

**ความเที่ยง (Precision)** ผลการวิเคราะห์ยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน (repeatability) และวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 3 ซ้ำ 3 วัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (intermediate precision) พบว่า % RSD ของค่าเฉลี่ย % peak area ของ acidic peaks และ basic peaks ไม่เกิน 5.00 และ main peak ไม่เกิน 2.00 และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ต่างวัน ใช้สถิติ one-way ANOVA เปลี่ยนเครื่อง HPLC และนักวิเคราะห์ ใช้สถิติ independent-sample T-Test พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังตารางที่ 3




**รูปที่ 1** โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ตัวอย่างยา formulation buffer ของยา mAbs ทั้ง 7 ชนิด และ blank




**รูปที่ 2** โครมาโทแกรมของตัวอย่างในภาวะปกติเทียบกับภาวะ stress: (A) ยาอะทีโซลิซูแมบ (B) ยาทราสทูซูแมบ (C) ยาอะดาลิมูแมบ (D) ยาอินฟลิซิแมบ (E) ยาเพอร์ทูซูแมบ (F) ยาโอมาลิซูแมบ (G) ยาริทูซูแมบ

*หมายเหตุ: **สีน้ำเงิน** แสดงภาวะปกติ **และสีแดง** แสดงภาวะ stress*

**ตารางที่ 3** ผลความเที่ยงของยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบที่วิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน ต่างวัน ต่างนักวิเคราะห์และต่างเครื่องมือ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

| Parameters | | % peak area | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ยาโอมาลิซูแมบ | | | ยาอะทีโซลิซูแมบ | | | ยาริทูซิแมบ | | |
| | | Acidic peaks | Main peak | Basic peaks | Acidic peaks | Main peak | Basic peaks | Acidic peaks | Main peak | Basic peaks |
| **Repeatability** | Mean | 8.80 | 79.72 | 11.49 | 8.16 | 78.26 | 13.57 | 18.97 | 78.92 | 2.11 |
| N = 6 | %RSD | 3.26 | 0.36 | 0.86 | 2.66 | 0.54 | 2.07 | 1.18 | 0.22 | 2.98 |
| **Intermediate precision** | | | | | | | | | | |
| **1. Between-day 3 days** | Mean | 8.82 | 79.46 | 11.72 | 7.69 | 78.53 | 13.89 | 18.48 | 79.42 | 2.10 |
| N = 9 | %RSD | 2.28 | 0.43 | 3.33 | 4.75 | 0.33 | 1.88 | 2.25 | 0.53 | 3.30 |
| *P value* | | | 0.09 | | | 0.31 | | | 0.14 | |
| **2. Between-analyte** | | | | | | | | | | |
| Analyte 1 | Mean | 8.82 | 79.46 | 11.72 | 7.69 | 78.53 | 13.89 | 18.48 | 79.42 | 2.10 |
| N=9 | %RSD | 2.28 | 0.43 | 3.33 | 4.75 | 0.33 | 1.88 | 2.25 | 0.53 | 3.30 |
| Analyte 2 | Mean | 8.80 | 79.51 | 11.70 | 7.81 | 78.59 | 13.60 | 18.22 | 79.75 | 2.02 |
| N=9 | %RSD | 1.32 | 0.17 | 1.62 | 2.35 | 0.38 | 1.54 | 3.02 | 0.68 | 2.14 |
| *P value* | | | 0.73 | | | 0.69 | | | 0.16 | |
| **3. Between- HPLC** | | | | | | | | | | |
| HPLC, Fully Automatic | Mean | 8.59 | 79.80 | 11.61 | 7.70 | 78.52 | 13.78 | 18.79 | 79.21 | 2.00 |
| N = 9 | %RSD | 3.24 | 0.49 | 3.11 | 3.55 | 0.54 | 1.67 | 1.86 | 0.44 | 2.76 |
| HPLC, Prominence | Mean | 8.82 | 79.47 | 11.72 | 7.71 | 78.76 | 13.54 | 18.48 | 79.42 | 2.10 |
| N = 9 | %RSD | 2.28 | 0.43 | 3.33 | 4.73 | 0.33 | 2.39 | 2.25 | 0.53 | 3.30 |
| *P value* | | | 0.07 | | | 0.17 | | | 0.28 | |

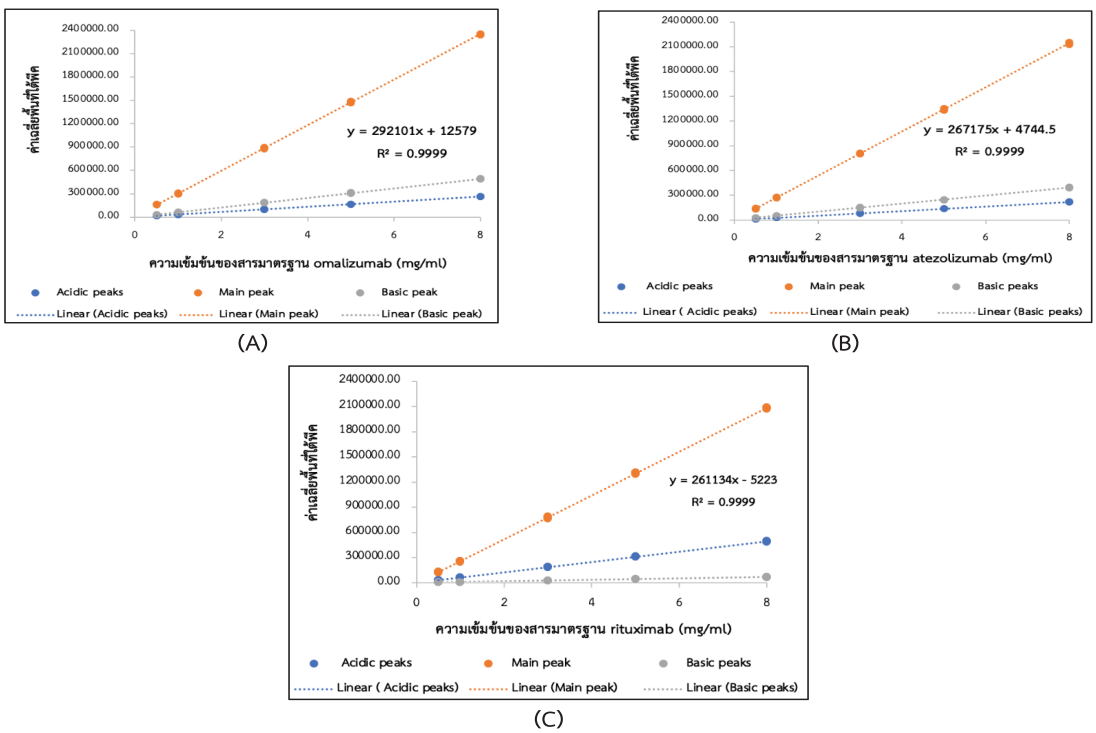
**ความแม่น (Accuracy)** ผลวิเคราะห์ %recovery ของยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบที่ได้อยู่ในช่วง 90.00-110.00 เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ค่า % recovery ในยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ

| ครั้งที่ | ยาโอมาลิซูแมบ | | | ยาอะทีโซลิซูแมบ | | | ยาริทูซิแมบ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Spiked 3.00 mg/ml | Spiked 5.00 mg/ml | Spiked 8.00 mg/ml | Spiked 3.00 mg/ml | Spiked 5.00 mg/ml | Spiked 8.00 mg/ml | Spiked 3.00 mg/ml | Spiked 5.00 mg/ml | Spiked 8.00 mg/ml |
| 1 | 103.06 | 105.68 | 100.98 | 102.79 | 101.94 | 102.18 | 97.56 | 98.08 | 103.67 |
| 2 | 102.56 | 104.61 | 99.31 | 102.75 | 100.78 | 102.05 | 98.26 | 100.38 | 101.10 |
| 3 | 102.72 | 104.54 | 99.61 | 102.80 | 100.02 | 101.74 | 96.23 | 99.34 | 100.90 |
| Mean | 102.78 | 104.94 | 99.97 | 102.78 | 100.91 | 101.99 | 97.35 | 99.26 | 101.89 |
| Overall Mean | | 102.56 | | | 101.89 | | | 99.50 | |

**ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ** ตัวอย่าง mAbs ให้ค่า S/N ใกล้เคียง 3 พบว่า ยาโอมาลิซูแมบ เท่ากับ 0.30 mg/ml (S/N เท่ากับ 3.68 โดยมี % RSD เท่ากับ 4.87) ยาอะทีโซลิซูแมบ เท่ากับ 0.50 mg/ml (S/N เท่ากับ 4.08 โดยมี %RSD เท่ากับ 1.85) และยาริทูซิแมบ เท่ากับ 0.30 mg/ml (S/N เท่ากับ 3.18 โดยมี % RSD เท่ากับ 2.44) ความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ใกล้เคียง 10 พบว่า ยาโอมาลิซูแมบ มีค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/ml ให้ค่า S/N เท่ากับ 15.63 การประเมินความเที่ยงที่ระดับ LOQ จากการทดสอบจำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน พบว่าค่า % RSD ของค่าเฉลี่ย % peak area ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks เท่ากับ 1.14, 0.80 และ 4.64 ตามลำดับ ทั้งนี้การประเมินความถูกต้องแสดงค่า % recovery เท่ากับ 102 % สำหรับยาอะทีโซลิซูแมบ พบค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/ml ให้ค่า S/N เท่ากับ 16.08 ผลการวิเคราะห์ความเที่ยงของค่า LOQ จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน พบค่า % RSD ของค่าเฉลี่ย % peak area ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks เท่ากับ 1.24, 0.47 และ 2.70 ตามลำดับ โดยมีค่า % recovery เท่ากับ 102.33 % ส่วนยาริทูซิแมบ พบค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/ml ให้ค่า S/N เท่ากับ 1.85 ผลการประเมินความเที่ยงของค่า LOQ จำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน พบค่า % RSD ของค่าเฉลี่ย % peak area ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks เท่ากับ 2.63, 0.59 และ 1.93 ตามลำดับ โดยมีค่า % recovery เท่ากับ 97.92 % แสดงว่าวิธีนี้มี LOD เท่ากับ 0.30 mg/ml และ LOQ เท่ากับ 1.0 mg/ml

**ความเป็นเส้นตรง** กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโอมาลิซูแมบ อะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ ที่ 0.50 – 8.00 mg/ml และค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks พบว่าเป็นกราฟเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: $R^2$) มีค่าใกล้เคียง 1 หรือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) ≥ 0.999




**รูปที่ 3** กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (A) โอมาลิซูแมบ (B) อะทีโซลิซูแมบ และ (C) ยาริทูซิแมบ ที่ 0.50-8.00 mg/ml และค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ acidic peaks, main peak และ basic peaks

**ความคงทนของวิธี (Robustness)** จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์และระยะเวลาในการเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A และ B ในการวิเคราะห์ยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ พบว่าค่าเฉลี่ย %peak area ของ main peak ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า *p* เท่ากับ 0.64, 0.13 และ 0.29 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย % peak area ของ main peak ภายใต้การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A และ B ในยา mAbs ทั้ง 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เตรียมใหม่กับเตรียมเสร็จและเก็บ 7 วันก่อนนำมาวิเคราะห์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p เท่ากับ 0.18, 0.63 และ 0.31 ตามลำดับ) ขณะที่การเก็บรักษานาน 14 วัน พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (p เท่ากับ 0.00006, $2.11*10^{-5}$ และ 0.00003 ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ค่าเฉลี่ย % peak area ของ main peak ในยาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบ

| สภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง | ตัวอย่าง | | ค่าเฉลี่ย % peak rea ของ main peak | %RSD | เปรียบเทียบความแตกต่าง |
|---|---|---|---|---|---|
| อุณหภูมิของคอลัมน์ | ยาโอมาลิซูแมบ ขนาด 75 mg/0.50 ml (N=9) | 25°C | 79.34 | 0.49 | ANOVA; $p$ = 0.64 |
| | | 30°C | 79.46 | 0.43 | |
| | | 35°C | 79.30 | 0.55 | |
| | ยาอะทีโซลิซูแมบ ขนาด 1200 mg/20 ml (N=9) | 25°C | 78.30 | 0.69 | ANOVA; $p$ = 0.13 |
| | | 30°C | 78.60 | 0.14 | |
| | | 35°C | 78.70 | 0.59 | |
| | ยาริทูซิแมบ ขนาด 100 mg/10 ml (N=9) | 25°C | 79.16 | 0.41 | ANOVA; $p$ = 0.29 |
| | | 30°C | 79.42 | 0.53 | |
| | | 35°C | 79.28 | 0.34 | |
| ระยะเวลาการเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A และ B | ยาโอมาลิซูแมบ ขนาด 75 mg/0.50 ml (N=3) | 0 วัน | 79.50 | 0.29 | T-test ($D_0$ Vs $D_7$); $p$ = 0.18<br>T-test ($D_0$ Vs $D_{14}$); $p$ = 0.00006 |
| | | 7 วัน | 79.83 | 0.33 | |
| | | 14 วัน | 77.51 | 00.4 | |
| | ยาอะทีโซลิซูแมบ ขนาด 1200 mg/20 ml (N=3) | 0 วัน | 78.56 | 0.14 | T-test ($D_0$ Vs $D_7$); $p$ = 0.63<br>T-test ($D_0$ Vs $D_{14}$); $p$ =$2.11*10^{-5}$ |
| | | 7 วัน | 78.48 | 0.33 | |
| | | 14 วัน | 73.77 | 0.46 | |
| | ยาริทูซิแมบ ขนาด 100 mg/10 ml (N=3) | 0 วัน | 79.64 | 0.52 | T-test ($D_0$ Vs $D_7$); $p$ = 0.31<br>T-test ($D_0$ Vs $D_{14}$); $p$ = 0.00003 |
| | | 7 วัน | 79.59 | 0.54 | |
| | | 14 วัน | 76.46 | 0.34 | |

## อภิปรายผล

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (CEX) มีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ mAbs ที่มีค่า pI อยู่ในช่วง 7.3–9.4 เนื่องจากในช่วงดังกล่าวโมเลกุลโปรตีนมีแนวโน้มคงสภาพประจุบวก ทำให้สามารถจับกับคอลัมน์ที่มีประจุลบและถูกแยกออกตามลักษณะของ charge variants ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบด้วย acidic variants (acidic peaks) ถูกชะออกมาก่อน ตามด้วย main peak และ basic variants (basic peaks) ซึ่งออกมาภายหลัง การแยกขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของประจุโปรตีนตามค่า pH หรือความเข้มข้นของเกลือในเฟสเคลื่อนที่[2] เมื่อเปรียบเทียบ mAbs ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ ยาโอมาลิซูแมบ ยาอินฟลิซิแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ ยาอะดาลิมูแมบ ยาเพอร์ทูซูแมบ ยาทราสทูซูแมบ และยาริทูซิแมบ พบว่าความแตกต่างของรูปแบบโครมาโทแกรมสะท้อนถึงความหลากหลายของ isoforms ซึ่งสัมพันธ์กับคุณสมบัติเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ charge variants

ของ mAbs ยังไม่มีการกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในตำรายาสากลทั้งอเมริกา (USP) และยุโรป (European Pharmacopoeia) การศึกษานี้จึงพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้หลักการแยก charge variants ของโมเลกุลโปรตีนตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิด CX-1 buffer โดยเฟสเคลื่อนที่ A คือ (10X) CX-1 pH gradient buffer A, pH 5.6 และเฟสเคลื่อนที่ B คือ (10X) CX-1 pH gradient buffer B, pH 10.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับ[13] เช่น Goyon และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 ทำการวิเคราะห์ charge variants ในยา mAbs จำนวน 25 ชนิด ซึ่งครอบคลุมประเภทและชนิดที่หลากหลายของ immunoglobulin พบว่า สภาวะ pH gradient (CX-1 pH gradient buffer) มีประสิทธิภาพสูงกว่า salt-gradient ในการแยกประจุ mAbs แต่มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ mAbs ที่มีประจุลบ (pI <7)[6] นอกจากนี้ผลการศึกษาของ Farrell และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 แสดงให้เห็นว่า การใช้ CX-1 buffer สามารถแยก charge variants ของยาบีวาซิซูแมบ ยาเซทูซิแมบ ยาอินฟลิซิแมบ และยาทราสทูซูแมบ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีเพิ่มความเข้มข้นของเกลือใน MES buffer หรือ phosphate buffer[11] ในการศึกษานี้ได้ใช้ค่า pI ของยาเพื่อคัดเลือกตัวแทนในการทดสอบให้ครอบคลุมช่วง 7.3-9.4 โดยเลือกยาโอมาลิซูแมบ (pI 7.3) เป็นตัวแทนของกลุ่มค่า pI ต่ำ (7.3–7.6) ยาอะทีโซลิซูแมบ (pI 8.6) เป็นตัวแทนของกลุ่มค่า pI ปานกลาง (8.6–8.9) และยาริทูซิแมบ (pI 9.4) เป็นตัวแทนของกลุ่มค่า pI สูง (9.0–9.4) เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH Q2(R2)[14] พบว่าวิธีมีความจำเพาะ โดย mAbs ทั้ง 7 ชนิดให้โครมาโทแกรมสอดคล้องกับสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่น (formulation buffer) และตัวอย่างภายใต้สภาวะ stress ให้โครมาโทแกรมที่แตกต่างชัดเจน แสดงถึงความจำเพาะของวิธี การตรวจสอบความเที่ยง พบว่ายาโอมาลิซูแมบ ยาอะทีโซลิซูแมบ และยาริทูซิแมบที่วิเคราะห์ซ้ำทั้งในวันเดียวกัน ต่างวันและเครื่องมือต่างนักวิเคราะห์ ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยืนยันความเที่ยงสูงของวิธี ส่วนความแม่น พบว่าค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ 90 –110 สำหรับค่า LOD และ LOQ ที่มีความเที่ยงและความแม่น มีค่าเท่ากับ 0.30 mg/ml และความแม่น เท่ากับ 1.00 mg/ml ตามลำดับ

นอกจากนี้มีการศึกษาความคงทนของวิธีโดยการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ ที่อาจกระทบความถูกต้องของการทดสอบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A และ B พบว่า ผลการวิเคราะห์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ A ((10X) CX-1 pH gradient buffer A, pH 5.6) และเฟสเคลื่อนที่ B ((10X) CX-1 pH gradient buffer B, pH 10.2) นาน 14 วัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ A ในวันที่ 0, 7 และ 14 มีค่าเท่ากับ 5.63, 5.68 และ 5.83 ตามลำดับ และสารละลายเฟสเคลื่อนที่ B วัดค่าความเป็นกรด-ด่างในวันที่ 0, 7 และ 14 มีค่าเท่ากับ 10.24, 10.29 และ 10.45 ตามลำดับ ซึ่งอยู่นอกเกณฑ์การยอมรับ certificate of analysis ของ CX-1 pH gradient buffer A, pH 5.6 และ CX-1 pH gradient buffer , pH 10.2 เท่ากับ 5.6±0.2 และ 10.2±0.2 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามการเก็บรักษาสารละลายเฟสเคลื่อนที่นาน 7 วันก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์ พบว่า ให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการเตรียมและใช้งานทันที ดังนั้นสารละลายเฟสเคลื่อนที่ A และ B สามารถเก็บได้นานไม่เกิน 7 วัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่าเกิดจากการคายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษาเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H+) ลดลงและค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง[17-18] รวมทั้งการชะล้างไอออนโลหะอัลคาไลจากภาชนะแก้วและการเกิดโซเดียมไฮดรอกไซด์ในสารละลาย ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายเฟสเคลื่อนที่สูงขึ้น[19] เป็นต้น การศึกษาความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จาก 30 เป็น 25°C และ 35°C พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสามารถกำหนดช่วงอุณหภูมิที่ยอมรับได้เท่ากับ 30 ±5 ℃ ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ระบุว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิส่งผลต่อความสามารถในการจับ (binding capacity) ของเรซินในการแลกเปลี่ยนไอออนโดยขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่ถูกดูดซับและสารดูดซับไม่ได้จำกัด

เฉพาะคุณสมบัติทางกายภาพของสารละลาย การเปลี่ยนอุณหภูมิอาจทำให้ความสามารถในการจับเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ ขึ้นกับชนิดของสารและสภาวะที่ใช้[20] ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานของ Rea และคณะที่รายงานว่าการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จาก 30 ±1°C ไม่ส่งผลต่อความคงทนของการวิเคราะห์ charge variants ใน mAbs ที่มีค่า pI 7.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[21] อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์เพียงยี่ห้อเดียว จึงควรมีการศึกษาคอลัมน์จากผู้ผลิตรายอื่นเพื่อรองรับกรณีที่เกิดการล่าช้าในการจัดส่งหรือหยุดผลิตในอนาคต รวมทั้งเพิ่มการศึกษากับ mAbs ชนิดอื่น เช่น IgG2 และ IgG4 เพื่อยืนยันความเหมาะสมของสภาวะที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ charge variants ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุได้จำนวนชนิดที่ครอบคลุมที่มีจำหน่ายในประเทศ

## สรุปผล

วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์ charge variants ของ mAbs ที่มีค่า pI 7.3-9.4 โดยมีผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมคุณภาพ mAbs ที่จำหน่ายในประเทศได้

## ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาต่อไปควรพิจารณาการใช้คอลัมน์จากผู้ผลิตหลายราย เพื่อเพิ่มทางเลือกในการทดแทนในกรณีที่เกิดความล่าช้าในการจัดส่งหรือการหยุดผลิตจากผู้ผลิตรายใดรายหนึ่ง

2. การศึกษาที่ครอบคลุม mAbs ชนิดอื่น เช่น IgG2 และ IgG4 จะช่วยขยายขอบเขตและเพิ่มศักยภาพของวิธีในการวิเคราะห์ charge variants ในยา mAbs อื่นๆ ได้มากยิ่งขึ้น

## เอกสารอ้างอิง


1. Trappe A, Füssl F, Carillo S, Zaborowska I, Meleady P, Bones J. Rapid charge variant analysis of monoclonal antibodies to support lead candidate biopharmaceutical development. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2018 [cited 2025 Jul 1]; 15(1095):166-76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30077097/ doi: 10.1016/j.jchromb.2018.07.037. Epub 2018 Jul 29. PMID: 30077097.
2. Rea JC, Wang YJ, Moreno TG, Parikh R, Lou Y, Farnan D. Monoclonal antibody development and physicochemical characterization by high performance ion exchange chromatography. In: Agbo EC, editor. Innovations in Biotechnology. Rijeka: InTech [Internet]; 2012 [cited 2025 Sep 12]. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/30056.
3. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. J Hematol Oncol [Internet]. 2020 [cited 2025 Jul 1]; 13(1):45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32370812/ doi: 10.1186/s13045-020-00876-4. PMID: 32370812; PMCID: PMC7201658
4. United States Pharmacopeial Convention. General chapter <129> analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies [Internet]. USP-NF. 2025 [cited 2025 Jul 5]. Available from: DOI:10.31003/USPNF_M6297_03_01.
5. Çildağ S, Şentürk T. The effect of omalizumab treatment on IgE and other immunoglobulin levels in patients with chronic spontaneous urticaria and its association with treatment response. Postepy Dermatol Alergol [Internet]. 2018 [cited 2025 Jul 7]; 35(5):516-9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30429712/ doi: 10.5114/ada.2017.71422. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30429712; PMCID: PMC6232555
6. Goyon A, Zhang T, Francois YN, Guillarme D, Fekete S. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2017 [cited 2025 Jul 12]; 1065-1066:119-28. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28961486/ doi: 10.1016/j.jchromb.2017.09.033. Epub 2017 Sep 22. PMID: 28961486
7. Kaur R, Borgayari D, Rathore A. Impact of media components on CQAs of monoclonal antibodies. BioPharm Int [Internet]. 2017 [cited 2025 Aug 3]; 30(9):40-6. Available from: https://www.biopharminternational.com/view/impact-media-components-cqas-monoclonal-antibodies

8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Monoclonal Antibodies for Human Use. In: European pharmacopoeia supplement 11.2th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2025. P.4843-4845.
9. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Capillary Isoelectric Focusing for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies. In: European pharmacopoeia supplement 11.8th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2025. P.6767-6770.
10. Wang Y, He Y, Zhang J, Li J, Liu H, Wu C, et al. Characterization and pre-clinical assessment of a proposed biosimilar to its originator omalizumab. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 10]; 178:106292. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36089232/ doi: 10.1016/j.ejps.2022.106292. Epub 2022 Sep 8. PMID: 36089232
11. Farrell A, Jakes C, Bones J. Evaluation and application of salt- and pH-based ion-exchange chromatography gradients for analysis of therapeutic monoclonal antibodies [Internet]. Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific; 2018 [cited 2025 Sep 12]. Available from: https://appslab.thermofisher.com/App/4159/phbased-gradients-for-charged-variant-analysis.
12. เกวลิน รักษาสารณ์, สุดทิพย์ สุนสิน, สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ charge variants ในยาอะดาลิมูแมบ โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ. วารสารอาหารและยา [อินเทอร์เน็ต]. 2566 [เข้าถึงเมื่อ 10 ส.ค 2568]; 30(2):35-46. เข้าถึงได้จาก: https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/view/265175/178633
13. Wagner-Rousset E, Fekete S, Morel-Chevillet L, Colas O, Corvaïa N, Cianférani S, et al. Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies. J Chromatogr A [Internet]. 2017 [cited 2025 Aug 15]; 1498:147-54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28400066/ doi: 10.1016/j.chroma.2017.02.065. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28400066
14. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline Q2(R2): validation of analytical procedures [Internet]. London: European Medicines Agency; 2024.
15. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <621> Chromatography. USP-NF. 2025. DOI:10.31003/USPNF_M99380_09_01.
16. Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. [cited 2025 Sep 10]. Available from: https://www.fda.gov/media/ 75643/download
17. Du M. Effect of pH on desorption of CO2 from alkanolamine-rich solvents [Internet]. AIP Conf Proc. 2017 [cited 2025 Sep 10]; 1864:020091. Available from: https://doi.org/10.1063/1.4992908.
18. Klinger C, Trinkaus V, Wallocha T. Novel Carbon Dioxide-Based Method for Accurate Determination of pH and pCO2 in Mammalian Cell Culture Processes. Processes [Internet]. 2020 [cited 2025 Aug 15]; 8(5):520. Available from: https://www.researchgate.net/publication/341025917_Novel_Carbon_Dioxide-Based_Method_for_Accurate_Determination_of_pH_and_pCO2_in_Mammalian_Cell_Culture_Processes
19. Duffer PF. How to prevent glass corrosion [Internet]. Harmar Township (PA): Vitro; 2016 [cited 2025 Sep 12]. Available from: https://vitro.com/technical-documents/TD-105.
20. Mihelic I, Podgornik A, Koloini T. Temperature influence on the dynamic binding capacity of a monolithic ion-exchange column. J Chromatogr A [Internet]. 2003 [cited 2025 Aug 15]; 987(1):159-68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12613808/ doi: 10.1016/s0021-9673(02)01811-3. PMID: 12613808
21. Rea JC, Moreno GT, Lou Y, Farnan D. Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations. J of Pharm Biomed Anal [Internet]. 2011 [cited 2025 Aug 16]; 54(2):317–23. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20884149/ doi: 10.1016/j.jpba.2010.08.030. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20884149