
การศึกษา Charge Variants ในยาชีววัตถุ เพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วย Capillary Isoelectric Focusing

วิชชุดา จริยะพันธุ์, ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และสายวรุฬ จตุรภิตตินันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในยาสำเร็จรูปอาจมีหลายแบบเนื่องจากประจุที่แตกต่างกัน (charge heterogeneity) หากมีการเปลี่ยนแปลงอาจส่งผลกระทบต่อความคงสภาพของยา การออกฤทธิ์ และ/หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ก่อให้เกิดอันตราย ดังนั้นคุณภาพของยาแต่ละรุ่นต้องมี charge variants ที่สม่ำเสมอ จึงได้ทำการศึกษาชนิดของ charge variants ของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดสำเร็จรูป 14 ชื่อการค้าที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยด้วยเทคนิค Capillary Isoelectric Focusing ผลการศึกษาจากอิเล็กโตรโฟโกราฟีพบว่ายาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิดมี isoforms ทั้ง 3 แบบและตรงตาม isoforms ของสารมาตรฐาน ค่า pI ของ isoforms อยู่ในช่วง 6 - 10 โดย pI ของพีคชนิด basic และ acidic พีค อยู่ในช่วง 9.48 - 6.70 และ 9.24 - 6.40 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ายาอาจยังมีความคงตัวดีกว่ายาคล้ายคลึงจากการเปรียบเทียบ isoforms เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 วัน สรุปได้ว่าตัวอย่างยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ส่งตรวจประกอบการขึ้นทะเบียนมี charge variants ตรงตามสารมาตรฐานที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามภาครัฐควรพิจารณาแนวทางการติดตามการเฝ้าระวังด้านคุณภาพของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีรุ่นอื่นๆ รวมทั้งความคงสภาพของยาชีววัตถุคล้ายคลึง

บทนำ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: mAb) ที่ผลิตเป็นยารักษาโรคด้วยเทคโนโลยีชีวภาพเป็นยา Biotherapeutic products (BTP) ในการผลิตมีโอกาสได้โมเลกุลของยาที่แตกต่างกัน ความแตกต่างหนึ่งที่จะพบได้คือโมเลกุล mAb ในยาสำเร็จรูปอาจมีประจุที่แตกต่างกัน (charge variants)⁽¹⁾ ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์หรือปฏิกิริยาอื่น (enzymatic และ nonenzymatic modifications) หลายปฏิกิริยา เช่น glycosylation, glycation, deamidation, oxidation, disulfide bond formation หรือการปรับแต่งชนิดของกรดอะมิโนที่ปลายสายโปรตีน (C-/N-terminal amino acids modification) และ peptide bond cleavage เป็นต้น ซึ่งเป็นความแตกต่างเล็กน้อย (microheterogeneity) โดยอาจเกิดระหว่างขบวนการผลิตในเซลล์หรือเกิดในขบวนการที่อยู่นอกเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาเหล่านั้น รวมถึงเกิดระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และขณะเก็บรักษาที่ทำให้เกิดการปรับแต่งโมเลกุลโปรตีน⁽²⁾

variants บางชนิดอาจไม่ก่อให้เกิดผลด้านความปลอดภัย บางชนิดอาจกระทบต่อประสิทธิภาพของยาเมื่อนำไปใช้มากหรือน้อยแล้วแต่ชนิดของโปรตีนนั้น อย่างไรก็ตาม charge variants ของยา mAb มีความสำคัญในแง่ที่มีผลต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของชนิดประจุบนโมเลกุลเพียงเล็กน้อยสะท้อนถึงโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลกระทบต่อความคงตัวของยาหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นอันตราย^(3,4) ขณะเดียวกันยา mAb มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีโอกาสเบี่ยงเบนจากมาตรฐานหากควบคุมการผลิตไม่ดีก็อาจได้ยาที่มีคุณภาพไม่ตรงตามที่ออกแบบไว้ ปัจจุบันยา mAb ที่ใช้ในประเทศไทยเป็นยานำเข้าทั้งหมดจากประเทศต่างๆ ทั้งจากโรงงานใหญ่ที่จำหน่ายยาไปทั่วโลกและโรงงานขนาดเล็กที่ผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ที่จำหน่ายยาในเขตอื่นนอกเหนือจากยุโรปและอเมริกา ดังนั้นในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์นี้จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ด้าน charge variants ของยา mAb ร่วมกับการวิเคราะห์หัวข้ออื่นๆ หากมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตหรือเก็บรักษาเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุล ซึ่งอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุ แต่บางชนิด เช่น การตัดกรดอะมิโนไลซีนที่ C-terminal ของ heavy chain ออกอย่างไม่สมบูรณ์จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงประจุเกิดการจับเป็นวง (cyclization) ของ glutamine ที่ N-terminal หรือมีปฏิกิริยา oxidation เปลี่ยน methionine เป็น methionine sulfoxide ทำให้ได้ basic variants ส่วน acidic variants เกิดจากการเติมน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid) ในส่วน Fc และปฏิกิริยา deamidation เช่น จากกรดอะมิโนแอสพาราจีนเป็นกรดแอสปาร์ติก เป็นต้น^(5,6) ปัจจุบันผู้ผลิตและภาครัฐให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ของโครงสร้างโมเลกุลกับประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของ mAb ซึ่งการเปลี่ยนแปลงประจุอาจไม่กระทบต่อการออกฤทธิ์ของยา แต่เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อมูลด้านนี้จำกัด จึงต้องติดตามตรวจสอบความสม่ำเสมอของคุณลักษณะทางประจุ

เทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ด้านประจุ คือ อิเล็กโทรโฟริซิสแบบแคปิลลารี⁽⁷⁻⁹⁾ (capillary electrophoresis: CE) ชนิด isoelectric focusing (cIEF) โดยพิจารณาจากค่า isoelectric point (pI) ซึ่งแสดงเป็น isoforms มีทั้งแบบ acidic variants และ basic variants นอกเหนือจากโมเลกุลหลัก (main peak) ที่มีค่าประจุรวมเป็นศูนย์ในสนามไฟฟ้าและเปรียบเทียบ isoforms กับสารมาตรฐานร่วมการวิเคราะห์คุณลักษณะด้านอื่นๆ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาคุณลักษณะ charge variants ของยา mAb ชนิดต่างๆ ที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยด้วยเทคนิค cIEF เพื่อตรวจสอบยืนยันคุณลักษณะของยาว่าเป็นไปตามที่จดแจ้งในการขึ้นทะเบียนยา และเพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะด้านประจุของยา mAb ชนิดคล้ายคลึงกับยาอ้างอิง เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังหลังจำหน่ายเพื่อให้ประชาชนได้รับยาที่ดีและปลอดภัย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี

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

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี รุ่น PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) โดยโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch ใช้แคปิลลารีแบบ neutral-coated ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ความยาวทั้งหมด (L) 30.2 cm และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด UV 280 nm สารละลาย cIEF gel

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ยาชีววัตถุเพื่อการรักษาลำเร็จรูปชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 14 ชื่อการค้า (brands) คือ ชนิด A-N ที่ขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยสำหรับการรักษาโรคชนิดต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคข้ออักเสบ โรคกระดูกพรุนและโรคปอดอักเสบ เป็นต้น โดย 1 ชนิดเป็นยาคัดลอก (Biosimilars) และอีก 13 ชนิดเป็นยาต้นแบบ (originators) ซึ่งมี 1 ชนิดเป็นยาอ้างอิง (reference product) ของยาคัดลอก ซึ่งได้รับจากผู้ผลิตรวมทั้งสารมาตรฐานของ mAb ทั้ง 14 ชนิด ตัวอย่างทั้งหมดเป็นทั้งชนิดผงแห้งและน้ำ เก็บที่ 2 - 8°C

โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (cIEF peptide markers: pI 10.0, 9.5, 7.0, 5.5, 4.1 # A58481) จาก Beckman Coulter; USA

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานด้วยน้ำสำหรับยาฉีดให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL เติมน้ำ 10 μL ลงในหลอด micro tube ที่มีสารเหล่านี้ในหลอด คือ 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 μL carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 μL cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 μL anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 μL และ pI มาตรฐาน 2 ชนิด ที่มีค่า pI ใกล้เคียงกับตัวอย่าง ชนิดละ 2.0 μL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 15 วินาที แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง 6,600 rpm ประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนทำการทดสอบ

เตรียมโปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (cIEF peptide markers) โดยเปิด 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 μL ใส่ใน micro tube แล้วเติม pharmalyte 3 - 10 carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 μL cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 μL anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 μL จากนั้นเติม pI markers 10.0, 9.5, 7.0, 5.5 และ 4.1 ชนิดละ 2.0 μL ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนนำไปทดสอบ

วิธีการ

วิเคราะห์ตัวอย่างตามสภาวะที่กำหนดดังนี้ ล้างท่อแคปิลลารีด้วย 4.3 M urea solution โดยใช้ความดัน 50.0 psi นาน 3 นาที และล้างด้วยน้ำที่ความดัน 50.0 psi นาน 2 นาที แล้วจึงฉีดตัวอย่างที่ความดัน 25.0 psi เป็นเวลา 99 วินาที จากนั้นเป็นการแยกสารโดยช่วง focusing step ใช้ความต่างศักย์ 25.0 kV นาน 15 นาที และขั้นตอน mobilization step ปรับความต่างศักย์เป็น 30.0 kV นาน 30 นาที จึงสิ้นสุดการแยก และล้างแคปิลลารีด้วยน้ำที่ความดัน 50.0 psi 2 นาที และให้ความต่างศักย์ลดลงเป็น 15.0 kV เพื่อเตรียมการฉีดตัวอย่างครั้งต่อไป

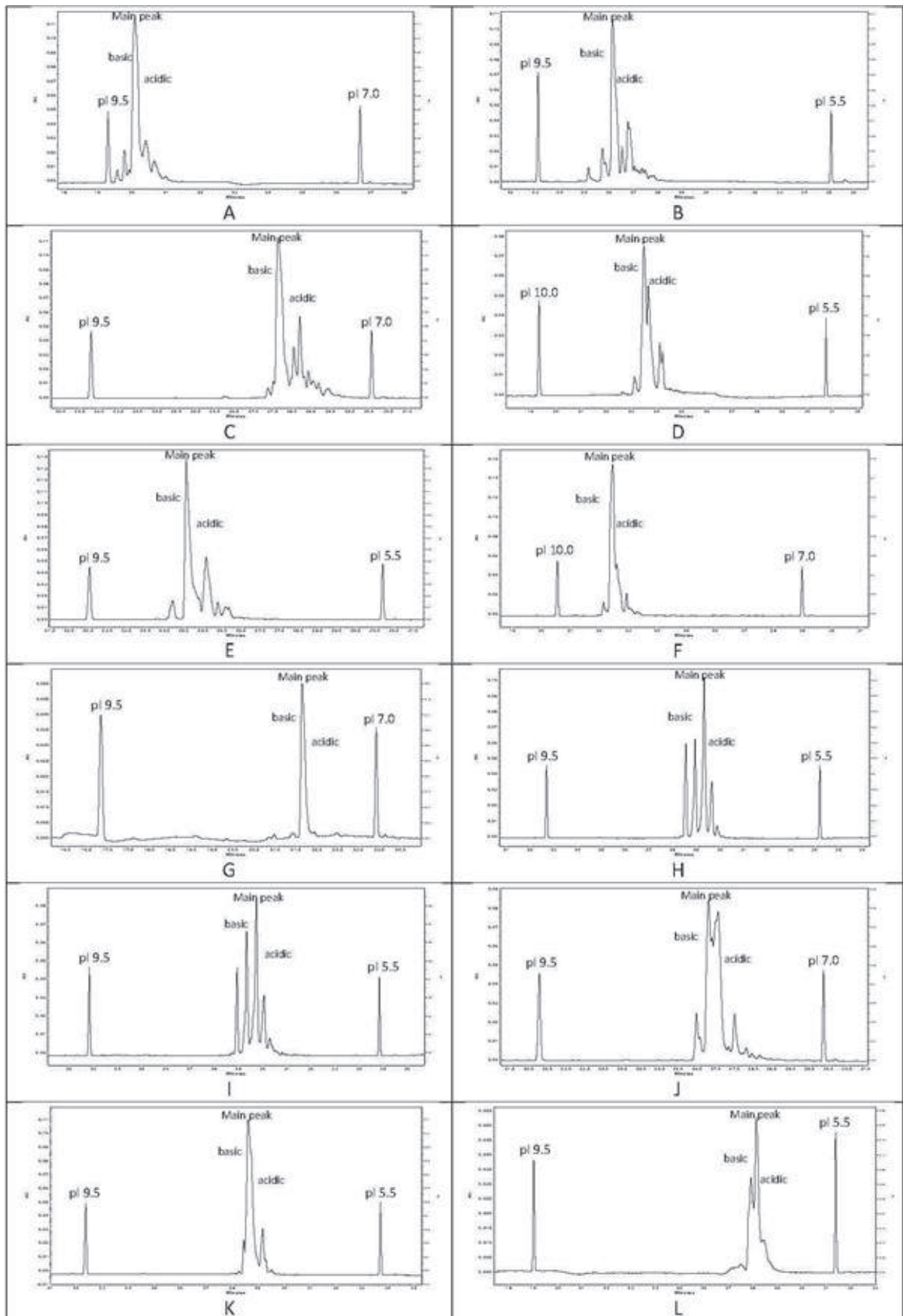
โปรตีนที่มีค่า pI สูงกว่าค่า pH จะมีประจุบวก โปรตีนที่มีค่า pI ต่ำกว่า pH จะมีประจุลบ เมื่อเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งใดที่ประจุมบนโมเลกุลเป็นศูนย์ โปรตีนจะหยุดการเคลื่อน ณ จุดนี้คือค่า pI แสดงผลอิเล็กโตรโฟโแกรมเป็นพีคซึ่งมีความหมายทั้งตำแหน่งซึ่งบอกเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (migration time: MT) ความสูง (peak height) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ที่บอกถึงปริมาณพีคที่ขนาดใหญ่หรือสูงที่สุดจะเป็นพีคหลัก (major peak/main peak) ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดและมักจะมีพีคอื่นประกอบตามชนิดขององค์ประกอบในตัวอย่่างที่วิเคราะห์โดยพีคที่อยู่ด้านขวาของพีคหลักจะมีค่า pH ต่ำกว่าพีคหลักเรียกเป็น acidic peak และในด้านตรงกันข้ามค่า pH สูงกว่าพีคหลักคือ basic peak ในการตรวจเอกลักษณ์ของโปรตีนจะคำนวณหาค่า pI ของตัวอย่างจาก MT ซึ่งค่า pI และอิเล็กโตรโฟโแกรมของตัวอย่างต้องตรงกับสารมาตรฐานชนิดนั้น ๆ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของยา (product specification) นอกจากนี้ได้ทำ forced degradation ของ mAb ของยาชนิดคล้ายคลึงโดยการอุ่นในตู้อบที่ 37°C นาน 1 - 5 วัน เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับยาอ้างอิง โดยทุกตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

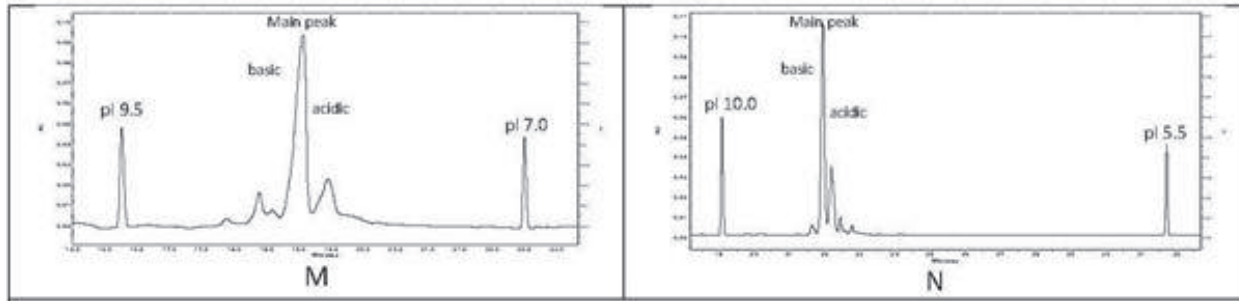
ผล

ผลการวิเคราะห์ mAb ทั้ง 14 ชนิดด้วย cIEF นาน 30 นาทีได้อิเล็กโตรโฟแกรมแสดง isoforms ของตัวอย่างแต่ละชนิด ในภาพรวม isoforms มีค่า pI ภาพ รวมอยู่ในช่วง 6 - 10 (ตารางที่ 1) เป็นกลุ่มของพีคที่มีความสูง จำนวนพีคและค่า MT แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) โดยเริ่มปรากฏพีคแรกประมาณ 20 นาทีเป็นต้นไป เช่น ตัวอย่าง mAb ชนิด A โดยตัวอย่างทุกชนิดมี charge variants ทั้ง 3 รูปแบบ คือชนิด basic และ acidic นอกเหนือจากพีคหลักซึ่งเป็นพีคที่สูงที่สุด โดย pI ของพีคชนิด basic และ acidic พีค อยู่ในช่วง 9.48 - 6.70 และ 9.24 - 6.40 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า mAb ทุกตัวอย่างมีอิเล็กโตรโฟแกรมตรงกับสารมาตรฐานของตัวเอง ทั้งลักษณะรูปแบบการกระจายตัว จำนวนพีค และความสูงของพีคที่สอดคล้องกัน ซึ่งได้แสดงผลการเปรียบเทียบของ mAb ชนิด I และ C เป็นตัวอย่าง (ภาพที่ 2) ส่วนการศึกษา forced degradation ของ mAb ชนิด H และ I พบว่าลักษณะของอิเล็กโตรโฟแกรมของชนิด I แตกต่างไปจากเดิมคือมีจำนวนพีคเพิ่มมากขึ้นจาก (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ค่า pI ของตัวอย่าง mAb 14 ชนิด

products	pI main peak
M	6 - 7
C G H I K L	7 - 8
B D E N J	8 - 9
A F	9 - 10

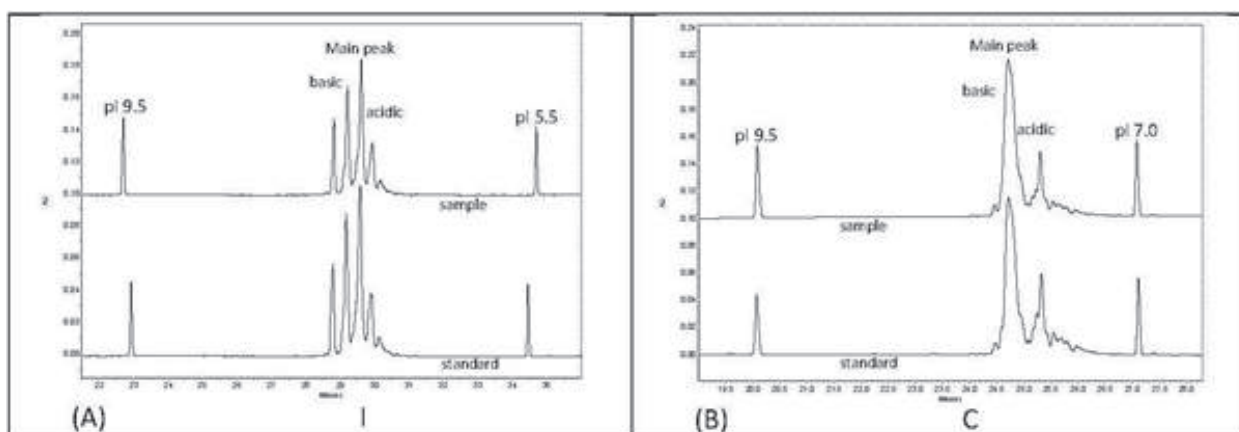




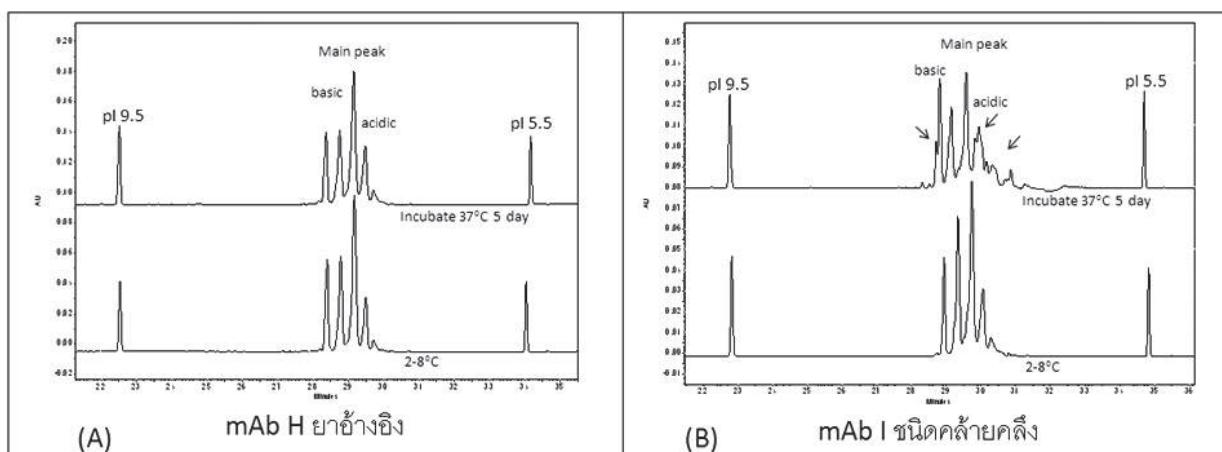
ภาพที่ 1 อิเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่าง mAb ทั้ง 14 ชนิด (ชนิด A-N)

ตารางที่ 2 ช่วงค่า pI ของ isoforms จากเทคนิค cIEF ของตัวอย่าง ทั้ง 14 ชนิด

products	pI basic peak	main peak	pI acidic peak
A	9.41 – 9.34	9.24	9.13 – 8.93
B	8.81 – 8.62	8.48	8.35 – 7.95
C	7.94	7.85	7.63 – 7.4
D	8.69 – 8.50	8.36 – 8.29	8.11 – 8.06
E	8.37	8.18	8.01 – 7.65
F	9.48 – 9.42	9.30	9.24 – 8.99
G	7.76	7.67	7.56
H	7.46 – 7.33	7.19	7.08 – 7.00
I	7.46 – 7.33	7.20	7.14 – 7.01
J	8.11	8.01 – 7.93	7.83 – 7.56
K	7.43 – 7.36	7.30	7.11 – 6.99
L	6.70	6.57–6.50	6.40
M	8.85–8.66	8.38	8.23
N	9.04	8.92	8.84–8.61
range	9.48–6.70	9.30–6.50	9.13–6.40



ภาพที่ 2 ลักษณะของอิเล็กโทรโฟโแกรมจาก cIEF (A) ของยา mAb ชนิด I และ (B) mAb ชนิด C เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน



ภาพที่ 3 ลักษณะอิเล็กโทรโฟโแกรมของ mAb H ยี่ห้ออ้างอิง (A) และชนิดคล้ายคลึง mAb I (B) เมื่อเก็บที่ 37 °C นาน 5 วัน

วิจารณ์

ตัวอย่างยา mAb จำนวน 14 ชนิด (A-N) ที่นำมาศึกษา 13 ชนิดเป็นยี่ห้ออ้างอิงและหนึ่งชนิดเป็นยาคล้ายคลึงที่ขอขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยสำหรับรักษาโรคชนิดต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคข้ออักเสบ โรคกระดูกพรุน และโรคปอดอักเสบ เป็นต้น

การศึกษานี้วิเคราะห์ charge variants ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารีชนิด cIEF ที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว⁽¹⁰⁾ และได้ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ทุกชนิดด้วยสภาวะเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ mAb ทุกชนิดได้ charge variants ที่มี isoforms ทั้ง 3 แบบ คือชนิดพิคหลัก ชนิด basic และชนิด acidic variants แสดงถึงความหลากหลายของประจุบนโมเลกุลของยา ถือว่าเป็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (microheterogeneity) ซึ่งพบได้ในโมเลกุลของโปรตีน ในการวิเคราะห์ได้เติม pI markers 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในช่วงค่า pI 10.0 - 5.5 เพื่อการคำนวณค่า pI ของ isoforms จากโปรแกรมของเครื่องมือ cIEF ตามที่เหมาะสมกับชนิดตัวอย่าง isoforms ที่ได้แสดงให้เห็นว่า mAb เกือบทุกชนิดเป็น basic variants (ตารางที่ 1) คือ มีอิเล็กโทรโฟโแกรมอยู่ระหว่าง pI markers 7.0 - 10.0 (ภาพที่ 1) มี 1 ชนิดที่ pI ของพิคหลักเป็นชนิด acidic variant คือ mAb ชนิด M

จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า mAb ทุกชนิดมีอิเล็กโทรโฟโแกรมของ isoforms ตรงกับสารมาตรฐานของตัวเอง ซึ่งได้แสดงผลจาก mAb ชนิด I และ C เป็นตัวอย่าง (ภาพที่ 2) แสดงว่าตัวอย่างและสารมาตรฐานมีโครงสร้างที่มีเอกลักษณ์ตรงกัน เนื่องจากหากอิเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงจากเดิมหรือของยาแต่ละรุ่นแตกต่างกัน หรือแตกต่างจากสารมาตรฐานจะทำให้ทราบถึงความผิดปกติของโมเลกุล⁽¹⁾ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น จากลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมเลกุลหลังการผลิต หรือในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ในขณะที่ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์อาจเป็นไปตามเกณฑ์และการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของยาอาจไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้

เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ isoforms ของ mAb จากงานวิจัยอื่นด้วยเทคนิค cIEF⁽¹¹⁻¹⁵⁾ เช่น ตัวอย่าง E⁽¹²⁾ ซึ่งมีสภาวะ cIEF แตกต่างกัน พบว่ารูปแบบของอิเล็กโทรโฟโแกรม และความสูงของพิคหลักเหมือนกันและอยู่ในช่วง pI marker 8.4 - 10.0 เช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างของตำแหน่งพิคเล็กน้อย เนื่องจากผลการศึกษานี้มีค่า MT ที่เริ่มในช่วงเวลาที่ช้ากว่า และมีจำนวนพิคชนิด acidic variants มากกว่า ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากปฏิกิริยา deamidation ของกรดอะมิโนไลซีนที่ปลายสายโปรตีน (C-terminal) หรือมีการเติมน้ำตาลกรดไฮอะลิก รวมทั้งอาจเกิดสลายตัวและการจับตัวกันของโปรตีน (aggregation)^(3,15,16) ในโมเลกุลของยารุ่นที่ส่งมาตรวจนี้

เนื่องจากประเทศไทยมีประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาว่าด้วยการขึ้นทะเบียนยาคล้ายคลึงในปี 2556⁽¹⁷⁾ ดังนั้นยา mAb ชนิดใดที่ขึ้นทะเบียนก่อนปี 2556 แม้จะเป็นยาคล้ายคลึงก็จะขึ้นทะเบียนเป็นยาใหม่ จึงไม่มีข้อมูลการศึกษาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงระหว่างยาต้นแบบที่ใช้เป็นยาอ้างอิงของยาคล้ายคลึงแสดงไว้ในการขึ้นทะเบียน ซึ่งได้แก่ mAb ชนิด I จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงด้านประจุในการทดสอบเดียวกัน (head-to-head comparison) ผลคือได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมตรงตามยาอ้างอิง คือ mAb ชนิด H แสดงถึงโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 1) แต่ที่น่าสนใจคือผลจากการทดลอง forced degradation โดยการอุ่นตัวอย่างในตู้บัพที่ 37 °C นาน 5 วัน พบว่าอิเล็กโทรโฟโกราแกรมของยาอ้างอิงยังคงเดิมส่วนของยาคล้ายคลึงคือ mAb ชนิด I เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างชัดเจนจากจำนวนพีคที่เพิ่มมากขึ้นในส่วนของ acidic variants (ภาพที่ 3) เมื่อพิจารณาสูตรตำรับของยาอ้างอิงและยาคล้ายคลึงพบว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นความคงตัวที่ต่างกันนี้อาจเกิดจากกระบวนการผลิตที่ต่างกัน เช่น จากปฏิกิริยาทางเคมี deamidation หรือการตัดกรดอะมิโนไลซีนบน C-terminal หรือการเติมน้ำตาลกรดไซอะลิกในส่วน Fc เป็นต้น

สรุป

การรักษาโรคด้วยยาชีววัตถุ Biotherapeutic product ชนิด mAb ต้องการการวิเคราะห์คุณภาพของยาเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัย แม้ว่าการศึกษานี้จะมีตัวอย่าง mAb แต่ละชื่อการค้าเพียง 1 รุ่น แต่ผลการศึกษา charge variants ของยา mAb ทั้ง 14 ชื่อการค้าที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยพบว่ายาทุกชื่อการค้ามีคุณลักษณะเป็นไปตามมาตรฐานที่จัดแจ้ง และผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงด้านประจุเป็นประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังและตรวจสอบคุณภาพของยาเหล่านี้ในรุ่นต่อ ๆ ไปที่นำมาจำหน่ายในประเทศ ซึ่งภาครัฐจะต้องวางแผนการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอของคุณภาพและความคงตัวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Liu H, Gaza-Bulsecu G, Falu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 2008; 97(7): 2426-47.
2. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85(2): 715-36.
3. Zhao SS, Chen DDY. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics. *Electrophoresis* 2014; 35(1): 96-108.
4. Liu X, Sosic Z, Krull IS. Capillary isoelectric focusing as a tool in the examination of antibodies, peptides and proteins of pharmaceutical interest. *J Chromatogr A* 1996; 735(1-2): 165-90.
5. Mack S, Cruzado-Park ID, Ratnayake CK. High Resolution cIEF of therapeutic monoclonal antibodies: a platform method covering pH 4-10 (A-12026A). [online]. Fullerton, CA: Beckman Coulter; 2014. [cited 2013 Dec 16]. Available from: <https://sciex.com/Documents/tech%20notes/A-12026A.pdf>
6. Tang S, Nesta DP, Maneri LR, Anumula KR. A method for routine analysis of recombinant immunoglobulins (rIgGs) by capillary isoelectric focusing (cIEF). *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19(3-4): 569-83.

7. จูฑาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, วิชชุดา จริยะพันธุ์, สายวรุฬ จตุรภิตตินันท์, อีรนารถ จิระไพศาลพงศ์. การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีแคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (cIEF). ว เกษศาสตร์อีสาน 2558; 11(2): 45-54.
8. Santora LC, Krull IS, Gran K. Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor- α antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing. Anal Biochem 1999; 275: 98-108.
9. Hunt G, Moorhouse KG, Chen AB. Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2. J Chromatogr A 1996; 744(1-2): 295-301.
10. Hunt G, Hotaling T, Chen AB. Validation of a capillary isoelectric focusing method for the recombinant monoclonal antibody C2B8. J Chromatogr A 1998; 800(2): 355-67.
11. López-Morales CA, Miranda-Hernández MP, Juárez-Bayardo LC, Ramírez-Ibáñez ND, Romero-Díaz AJ, Piña-Lara N, et al. Physicochemical and biological characterization of a biosimilar trastuzumab. BioMed Res Int 2015; 2015: 1-10.
12. Bandyopadhyay S, Mahajan M, Mehta T, Singh AK, Parikh A Gupta AK, et al. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-3197. Biosimilars 2015; 5: 1-18.
13. Khawli LA, Goswami S, Hutchinson R, Kwong ZW, Yang J, Wang X, et al. Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. mAbs 2010; 2(6): 613-24.
14. Neergaard MS, Nielsen AD, Parshad H, Van De Weert M. Stability of monoclonal antibodies at high-concentration: head-to-head comparison of the IgG1 and IgG4 Subclass. J Pharm Sci 2014; 103(1): 115-27.
15. Ito T, Tsumoto K. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. Protein Sci 2013; 22(11): 1542-51.
16. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง เอกสารหลักฐานการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 174 ง (ลงวันที่ 4 ธันวาคม 2556).

Charge Variants Analysis of Biotherapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Isoelectric Focusing

Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saywarul Jadoonkittinan

Institute of Biological Product, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Monoclonal antibody molecules of therapeutic finished products could have variations due to their charge variants. Changes of charge profile could alter drug stability, bioactivity and/or induce harmful immunogenicity. Therefore, each batch should contain a consistent charge variant profile. This study was conducted to analyse charge heterogeneity of 14 brands of therapeutic monoclonal antibodies registered in Thailand using cIEF technique. The electropherogram results of all products showed 3 isoforms and complied with their reference material isoforms. Their pI range was within 7 – 10, while pI ranges of basic and acidic variants were 9.48 – 6.70 and 9.24 – 6.40, respectively. In addition, reference product showed better stability than its biosimilars when compared to their isoforms after incubation at 37 °C for 5 days. In conclusion, the therapeutic monoclonal antibodies registered in Thailand contained charge variants according to their reference materials; however, quality monitoring of lots of those therapeutic monoclonal antibody drug products should be considered including stability of biosimilars

Keywords: monoclonal antibodies, charge variants, biosimilars, capillary isoelectric focusing