

การทดสอบความถูกต้องของวิธีแคปิลลารีโซน อิเล็กโทรโฟรีซิสในการตรวจเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุ เพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ สายารุฬ จตุรภิตตินันท์ และธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

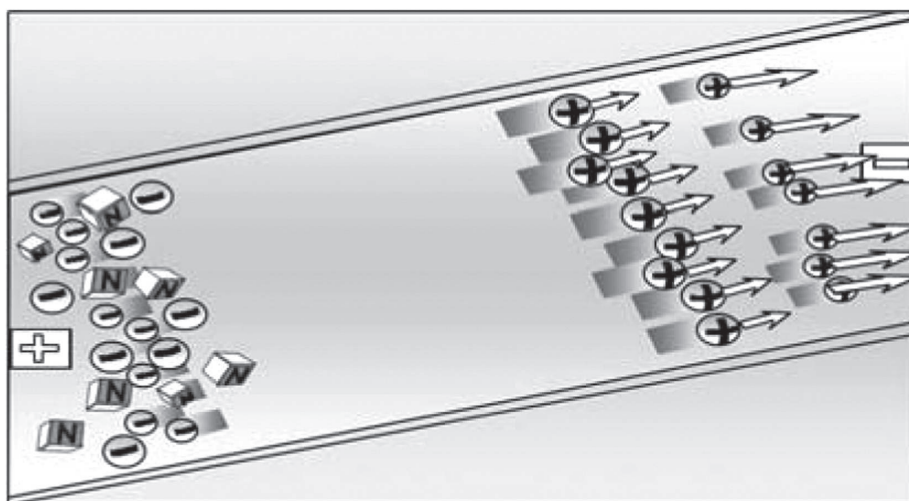
บทคัดย่อ แคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis: CZE) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products: BTP) ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ฮอโมน และไซโตไคน์ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CZE โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี PA 800 plus (Beckman Coulter) แคปิลลารีแบบ neutral coated และเครื่องตรวจวัดแบบ UV ที่ความยาวคลื่น 214 nm ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (BTP) พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะดี ความเที่ยงของวิธีมีค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของสารที่แยกได้ออกมาในพีคหลักน้อยกว่า 0.2 มีความคงทนที่ดีจากการทดสอบโดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์และสารละลายบัฟเฟอร์หรือเปลี่ยนแคปิลลารีก็ไม่มีผลกระทบต่อความถูกต้องของวิธี ซึ่งได้ค่า %RSD ของพีคหลักเพียง 0.2 แสดงให้เห็นว่าวิธี CZE เป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของ BTP ร่วมกับวิธีอื่นเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาของประเทศไทย

Accepted for publication, 19 June 2015

บทนำ

เทคนิคแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis: CZE) เป็นวิธีการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างตามชนิดของประจุของสาร เมื่อเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแคปิลลารีที่บรรจุบัฟเฟอร์ หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ สารที่มีประจุบวก ประจุลบ และสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารี ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน โดยสารประจุบวกจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงสุดไปยังขั้วแคโทดโดยอาศัยการไหลแบบ อิเล็กโทรออสโมติก (Electroosmotic flow) และแรงดึงดูดจากขั้วแคโทด สารประจุลบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่ำ สุดเนื่องจากมีแรงดึงดูดจากขั้วแอโนดในทิศทางตรงกันข้าม ส่วนสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็ว ระหว่างความเร็วของสารประจุบวกและประจุลบ สารที่มีประจุแตกต่างกันในตัวอย่างจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารี โดยอาศัยการไหลแบบอิเล็กโทรออสโมติก⁽¹⁾ โดยมี UV detector เป็นตัวตรวจวัดปริมาณสาร และแสดงผลเป็น อิเล็กโทรโฟรีแกรม (electropherogram) ที่แสดงผลการแยกสารตามประจุไฟฟ้าประกอบด้วยพีคหลักและพีคอื่นที่ มีความแตกต่างทางประจุ และปริมาณสารที่แตกต่างกันตามความสูงของพีค โดยแสดงเวลาที่สารเคลื่อนออกมา (migration time: MT) เป็นนาที่ เทคนิคนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์สารประเภทโปรตีนชนิด ต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ยังสามารถนำมาใช้เป็นหนึ่งในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (Biotherapeutic Products: BTP) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นยาโปรตีน^(2, 3)

Capillary Zone Electrophoresis (CZE) in neutral coated capillary



ภาพที่ 1 หลักการแยกสารโดยวิธีแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส⁽⁴⁾

BTP ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไซโตไคน์ ฮอร์โมน เช่น granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) มีข้อดีคือสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างจำเพาะโดยผู้ที่ได้รับยาจะมีอาการข้างเคียงน้อย ขณะเดียวกันยาดังกล่าวซึ่งเป็นสารโปรตีนมีกระบวนการผลิตหลายขั้นตอน โมเลกุลซับซ้อนและโครงสร้างโมเลกุลมีการปรับเปลี่ยนได้ง่ายซึ่งมีผลกระทบจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตั้งแต่การผลิตจนถึงระหว่างการเก็บ จึงทำให้ยาแต่ละรุ่นมี โอกาสที่จะมีโมเลกุลที่มีลักษณะแตกต่างกันซึ่งปรากฏเป็นหลายรูปแบบ (isoforms) โดยเฉพาะความแตกต่างของประจุ (charge heterogeneity)⁽⁵⁾ ซึ่งมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์และความคงตัวของยา การตรวจเอกลักษณ์ของยาแต่ละ รุ่นจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์โมเลกุลที่แตกต่างกันโดยอาศัยหลักการแยกสารโดยประจุ เช่น Isoelectric Focusing (IEF) แบบเจล⁽⁶⁾ แต่มีข้อด้อยคือใช้เวลานาน ผู้วิเคราะห์ต้องมีทักษะที่ดีในการทดสอบ

และวิเคราะห์ผล จึงได้ประยุกต์ใช้วิธี CZE โดยการใช้แคปิลลารีแบบ neutral coated ที่เคลือบด้วย polyacrylamide⁽⁷⁾ และมีสารที่ทำให้เกิด cross link ใน running buffer เกิดเป็นร่างแหทำให้การแยก mAb เป็นแบบ sieving mechanism ที่อาศัยขนาดของโมเลกุลร่วมกับประจุรวมที่แตกต่างกัน เป็นวิธีอัตโนมัติที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน⁽⁶⁾ เพื่อแยกและวิเคราะห์โปรตีนที่มีความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยของประจุบนโมเลกุลในการตรวจเอกลักษณ์ของยาโปรตีนเพื่อให้ทราบถึงคุณภาพของ BTP และความสม่ำเสมอของการผลิตซึ่งเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นเพื่อให้ได้ยามีคุณภาพตามข้อกำหนด⁽⁸⁻⁹⁾ ซึ่งมีการใช้เทคนิคนี้ทั้งในโรงงานผลิตยาและงานวิจัยที่ใช้วิธี CZE ทดสอบคุณภาพของยา mAb หลายชนิด เช่น rituximab, infliximab, trastuzumab, tocilizumab^(5, 10)

ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประยุกต์วิธี CZE และทำการทดสอบความถูกต้อง ความเที่ยง และความคงทนของวิธีโดยทดลองเปลี่ยนท่อแคปิลลารี และทดสอบด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน รวมทั้งการใช้สารละลายที่เตรียมต่างวันกัน

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี (capillary electrophoresis: CE) รุ่น PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch มีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด UV 214 nm และแคปิลลารีแบบ neutral coated ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 50 cm เครื่องเขย่าสาร (Vortex Genie II, Scientific Industries)

สารละลาย และสารมาตรฐาน

Washing/Running buffer: 40 mM ϵ -Amino-n-Caproic Acid (EACA: Sigma # A-7824), 0.2% Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC: Sigma # H-7509) pH 4.5

Blank: Formulation buffer (trisodium citrate dehydrate (Fluka # 71403) 7.35 g, sodium chloride (Sigma # S9888) 8.77 g, 0.7% tween-80 100 ml, ultrapure water)

สารมาตรฐาน : BTP ที่เป็น mAb ชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด สำหรับทดสอบ mAb ชนิด A B C D และ E จากผู้ผลิตตามลำดับ ที่ตรงกับชนิดของตัวอย่างยาที่จะทดสอบ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด คือ mAb ชนิด A B C D และ E ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยา

สารผสมระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างชนิดเดียวกัน (Co-mix) ที่มีปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดเท่ากัน ที่ความเข้มข้นละ 0.5 mg/ml

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานโดยการเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 mg/ml ด้วย ultrapure water

เตรียม Co-Mix โดยการผสมสารมาตรฐานและตัวอย่างชนิดเดียวกันที่เจือจางให้มีความเข้มข้นโปรตีน 0.5 mg/ml ด้วย ultrapure water แล้วปิเปตมาปริมาตรอย่างละ 100 μl

วิธีวิเคราะห์

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

กำหนดสภาวะของเครื่องมือในการแยกสาร และบันทึกลงในโปรแกรมการวิเคราะห์โปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch (Beckman Coulter, USA) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE (PA 800 plus, Beckman Coulter) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ CZE ในขั้นตอนการแยกสาร

step#	event	value	duration	comments
1	rinse-pressure	40.0 psi	2.00 min	ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
2	inject-pressure	1.0 psi	10.0 sec	ฉีดตัวอย่าง
4	separation- voltage	30.0 kV	15.00 min	ขั้นตอนการแยก
5	stop data			สิ้นสุดขั้นตอนการแยก
6	rinse-pressure	40.0 psi	2.00 min	ล้างด้วยน้ำ
7	end		20.0 sec	จบขั้นตอนการวิเคราะห์

psi หมายถึง หน่วยที่ใช้ในการฉีดโดยใช้ความดัน

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทดสอบสารมาตรฐาน mAb ชนิด A ตัวอย่าง mAb ชนิด A และ Co-Mix ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด A ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 mg/ml โดยฉีดที่ความดัน 1 psi เป็นเวลา 10 วินาที ตามสภาวะที่กำหนด (ตารางที่ 1) ชนิดละ 6 ข้ำ แล้วเปรียบเทียบผลอิเล็กโทรโฟรีแกรม และ MT ของสารที่ฉีดทั้ง 3 ชนิด ซึ่งอิเล็กโทรโฟรีแกรมของตัวอย่างและ MT ของตัวอย่างควรเหมือนกับสารมาตรฐาน และทดสอบ blank ที่สภาวะเดียวกัน ซึ่งจะไม่ปรากฏฟีดใด ๆ ในอิเล็กโทรโฟรีแกรม

2. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1 การทดสอบซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

ทดสอบสารมาตรฐาน mAb ชนิด A ตัวอย่าง mAb ชนิด A และ Co-Mix ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด A ตามข้อ 1

2.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision)

ทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ตามข้อ 1 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลวิเคราะห์จากแต่ละวัน

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

3.1 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ข้ำ โดยใช้แคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ ที่เป็นยี่ห้อเดียวกัน แต่ต่างรุ่นการผลิต ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการเปลี่ยนท่อแคปิลลารี

3.2 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์

3.3 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทดสอบ

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบผลของการใช้สารละลาย washing/running buffer ที่เตรียมจำนวน 2 ชุด ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการใช้สารละลายต่างกัน

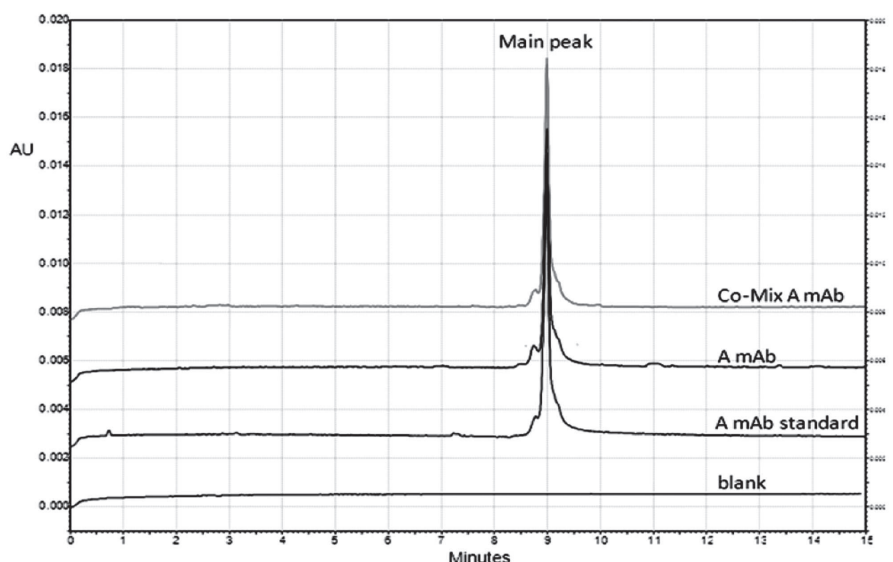
4. การทดสอบตัวอย่าง

วิเคราะห์เอกลักษณ์ของตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 4 ชนิด คือ mAb ชนิด B, C, D และ E

ผล

ความจำเพาะ

จากการตรวจสอบ blank พบว่าไม่มีพีคใดๆ ปรากฏ ในขณะที่สารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix ของ mAb ชนิด A มีอิเล็กโทรโฟโแกรมไม่แตกต่างกัน และมีค่า MT ตรงกันคือที่ 8.98 นาที (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 อิเล็กโทรโฟโแกรมของการทดสอบความจำเพาะซึ่งแสดงผลของ blank, สารมาตรฐาน, ตัวอย่าง และ Co-mix ของ mAb ชนิด A โดยมีแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงและแกนนอนเป็นค่า migration time

ความเที่ยง

ผลตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง ภายในวันเดียวกันและการตรวจสอบซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน วันละ 6 ครั้ง พบว่า %RSD ของพีคหลักมีค่าเพียง 0.06 และ 0.13 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง ภายในวันเดียวกันและ 3 วัน

ครั้งที่	Main peak migration time (min)			
	วันเดียวกัน	ตรวจสอบซ้ำ 3 วัน		
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	8.96	8.98	8.97	9.01
2	8.96	8.98	9.00	9.00
3	8.97	8.99	8.98	9.00
4	8.96	8.99	9.00	9.00
5	8.97	8.98	9.00	9.00
6	8.97	8.98	8.97	9.00
Mean	8.97		8.99	
SD*	0.005		0.012	
%RSD**	0.06		0.13	

* SD = standard deviation

** %RSD = percent relative standard deviation

จากการทดสอบสารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix ซ้ำ 6 ครั้ง และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่า MT ของพีคหลักในแต่ละครั้งของการทดสอบสารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix มีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.02 นาที (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารมาตรฐาน (mAb std.) ตัวอย่าง (mAb ชนิด A) และ Co-Mix ซ้ำ 6 ครั้ง แสดงค่าความแตกต่างของ migration time (Diff)

ครั้งที่	Main peak migration time (min)								
	mAb std.	mAb A	Diff	mAb std.	Co-mix	Diff	mAb A	Co-mix	Diff
1	9.00	8.98	0.02	9.00	8.98	0.02	8.98	8.98	0.00
2	8.99	8.98	0.01	8.99	8.98	0.01	8.98	8.98	0.00
3	8.98	8.99	0.01	8.98	8.99	0.01	8.99	8.99	0.00
4	8.98	8.99	0.01	8.98	8.98	0.00	8.99	8.98	0.01
5	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00
6	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00
Mean			0.01	Mean		0.01	Mean		0.00

ความคงทน

ตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ กับแคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ นักวิเคราะห์ 2 คน และสารละลาย 2 ชุด พบว่าค่า MT ที่ได้ไม่ต่างกัน ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน MT ของพีคหลักน้อยกว่า 0.02 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความคงทนเมื่อตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง เมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี 2 ท่อ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และโดยใช้สารละลาย 2 ชุด

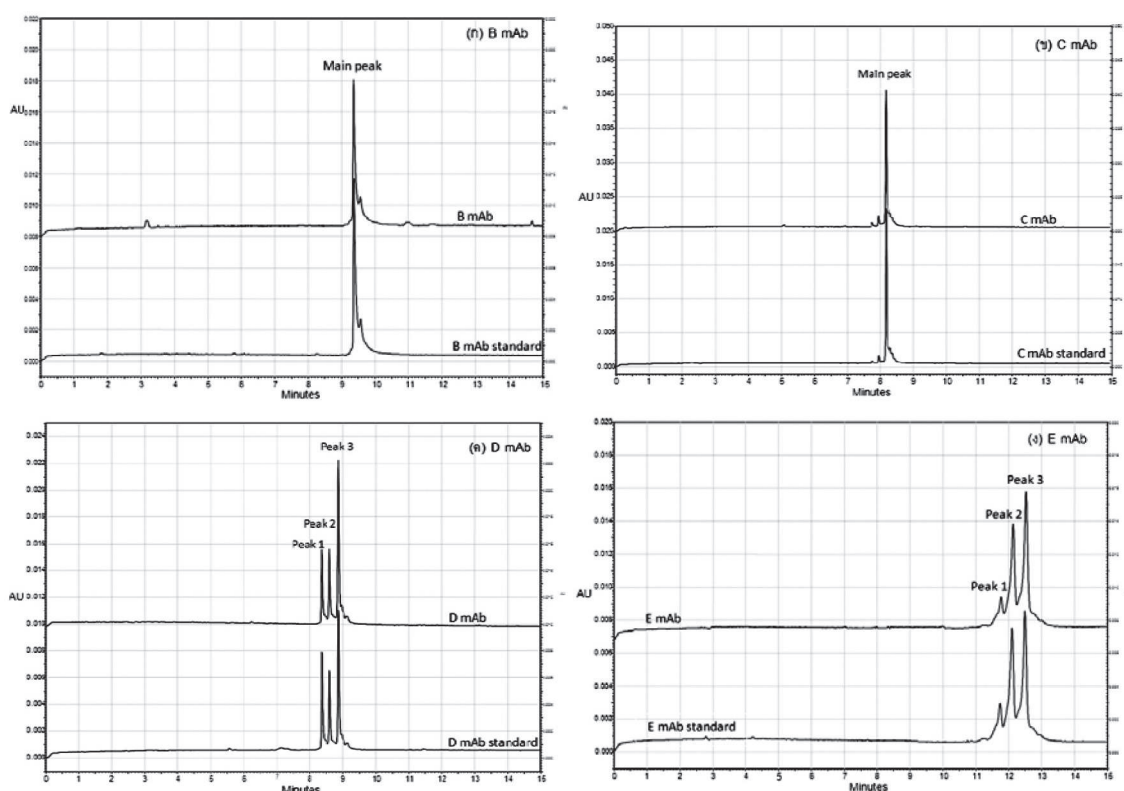
ครั้งที่	Main peak migration time (min)					
	แคปิลลารี 1	แคปิลลารี 2	นักวิเคราะห์ 1	นักวิเคราะห์ 2	สารละลาย 1	สารละลาย 2
1	8.96	8.98	8.96	9.00	8.96	9.01
2	8.96	8.98	8.96	9.00	8.96	9.00
3	8.97	8.99	8.97	8.99	8.97	8.99
4	8.96	8.99	8.96	9.00	8.96	8.99
5	8.97	8.98	8.97	8.99	8.97	8.98
6	8.97	8.98	8.97	8.99	8.97	8.99
Mean	8.97		8.98		8.98	
SD	0.011		0.017		0.017	
%RSD	0.12		0.18		0.19	

* SD = standard deviation

** %RSD = percent relative standard deviation

การตรวจสอบตัวอย่าง Biotherapeutic products

ผลการตรวจสอบตัวอย่าง BTP ชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 ชนิด พบว่าตัวอย่าง mAb ชนิด B, C, D และ E แสดงอิเล็กโทรโฟโกราแกรมและค่า MT ตรงกับสารมาตรฐานของตัวอย่างแต่ละชนิด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 อิเล็กโทรโฟโกราแกรมของการทดสอบสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด B, C, D และ E ตามลำดับ

วิจารณ์

ในตำราฯ เช่น USP⁽⁸⁾, Ph Eur⁽⁹⁾ ได้มีการระบุการใช้เทคนิค CZE สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ของยาโปรตีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพไว้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีโดยทดสอบสภาวะของเครื่องมือตามที่กำหนดในด้านความจำเพาะ ความเที่ยงของวิธีรวมทั้งความคงทนของสภาวะเมื่อเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่าง ตัวอย่าง mAb ที่นำมาทดสอบทั้ง 5 ชนิดเป็นตัวอย่างยานำเข้าจากต่างประเทศส่งมาเพื่อขอรับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและนำผลไปประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาซึ่งทั้งหมดเป็น BTP ชนิดต้นแบบ (originator) มีทั้งชนิดที่เป็นโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่มีโมเลกุลมีขนาดน้ำหนักประมาณ 145 – 150 kDa ใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคลูปัส (Systemic Lupus Erythematosus) โรครูมาตอยด์ มะเร็งกระดุก มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งเต้านม และถึงแม้ว่า mAb จะมีน้ำหนักใกล้เคียงกันดังกล่าว การแยกสารในท่อแคปิลลารีชนิด neutral coated ซึ่งไม่มีประจุบนผิวท่อที่จะมีปฏิกิริยากับประจุบนโมเลกุลของสารนี้ แต่อาศัยการแยกโดยใช้ทั้งน้ำหนักและประจุรวมบนโมเลกุลในการวิ่งไปยังปลายขั้ว จึงสามารถใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ได้

การศึกษาก่อนหน้าได้ทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมแล้ว พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml โดยฉีดที่ความดัน 1 psi เป็นเวลา 10 วินาที ตามสภาวะที่กำหนดนี้สามารถมองเห็นพีคที่เล็กที่สุดได้อย่างชัดเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ตลอดการศึกษา และเนื่องจากยา mAb แต่ละชนิดมีจำนวนน้อยและราคาสูง จึงทำการสุ่มเลือกเพียง 1 ชนิด คือ mAb ชนิด A เป็นตัวแทนสำหรับทดสอบสภาวะของเทคนิคในการศึกษานี้ ผลการทดสอบสภาวะของวิธีที่กำหนดนี้ให้ผลในด้านความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีที่เหมาะสม จากการตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้ตัวอย่าง mAb ชนิด A สารมาตรฐาน และ Co-mix ของ mAb ชนิด A ได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมและค่า MT ไม่แตกต่างกัน วิธีมีความเที่ยงจากการวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวัน ได้ค่า MT ของพีคหลักมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพียง 0.01 และน้อยกว่า 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ผลการตรวจสอบความเที่ยงโดยการเปรียบเทียบค่า MT ระหว่างพีคหลักของสารมาตรฐานกับ mAb ชนิด A และสารมาตรฐานกับ Co-Mix รวมทั้งตัวอย่าง mAb ชนิด A กับ Co-mix ทั้ง 6 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันโดยมีค่า MT แตกต่างกันไม่เกิน 0.02 นาที (ตารางที่ 3) ส่วนผลการตรวจสอบความคงทน (ตารางที่ 4) จากการใช้แคปิลลารียี่ห้อเดียวกันแต่ต่างรุ่นการผลิต การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน รวมทั้งการใช้ elution buffer ที่เตรียมแต่ละครั้งพบว่า การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ไม่มีผลกระทบต่อสภาวะของวิธี CZE นี้ เนื่องจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า MT ของพีคหลักมีน้อยกว่า 0.02 นอกจากนี้ อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่ได้มีลักษณะเป็น sharp peak แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดการดูดซับ (protein adsorption) โปรตีนกับผนังแคปิลลารีหรือเกิดน้อยมาก

เมื่อทดลองใช้วิธี CZE ตามสภาวะที่ได้ทดสอบแล้วมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของ mAb ชนิด B, C, D และ E พบว่าอิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่ได้เป็นไปตามชนิดของยา (ภาพที่ 3) ซึ่งประกอบด้วยพีคขนาดเล็กและใหญ่ โดยพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเป็นพีคหลัก พีคที่ออกมาก่อนเป็น basic peak โดยมี acid peak ออกมาภายหลัง ตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C ให้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่มีพีคหลักชัดเจนและมีพีคเล็กอยู่ด้านซ้ายและขวาของพีคหลัก ส่วนอิเล็กโทรโฟโกราแกรมของ mAb ชนิด D และ E มีพีคใหญ่ที่เห็นชัดเจนอย่างน้อย 3 พีค รวมทั้งพีคหลักมี basic peak 2 พีค และมีพีคขนาดเล็กเป็น acid peak ด้านขวา ตัวอย่าง mAb ทุกชนิดที่ทดสอบได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่มีค่า MT และจำนวนพีคที่ปรากฏตรงกับสารมาตรฐาน ซึ่งในการขึ้นทะเบียนจะถือว่าผ่านเกณฑ์การตรวจเอกลักษณ์ตามข้อกำหนด^(8, 9)

นอกจากนี้วิธี CZE ยังมีข้อดีคือใช้เวลาทำการทดสอบสั้นเพียง 30 นาที (ตารางที่ 1) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้วิเคราะห์โมเลกุลโปรตีนจากความแตกต่างของประจุ เช่น IEF แบบเจลที่ต้องใช้เวลาทำการทดสอบถึง 180 นาที ส่วน Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) ใช้เวลาทำการทดสอบมากกว่า 60 นาที นอกจากนั้น CZE ยังสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถึง 4 ตัวอย่าง ภายในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง

สรุป

วิธี CZE ตามสภาวะที่ใช้นี้มีความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนที่ดี มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนและไกลโคโปรตีนสูง ใช้เวลาน้อยจึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาร่วมกับวิธีอื่นๆ ตามข้อกำหนด⁽¹¹⁾ เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. ลีณา สุนทรสุข. ตำราแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2550.
2. Moritz B, Schnaible V, Kiessig S, Heyne A, Wild M, Finkler C, et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies. *J Chromatogr B* 2015; 983-984: 101-10.
3. Nuchtavorn N, Suntornsuk L. Simultaneous analysis of biologically active pyridines in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr Sci* 2012; 50(2): 151-6.
4. Majors RE. Basics of capillary electrophoresis. [online].[cited 2015 Jul 10]; [58 screens]. Available from: URL: http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/cnq533/CE_Basics.pdf.
5. Espinosa-de la Garza CE, Perdomo-Abúndez FC, Padilla-Calderón J, Uribe-Wiechers JM, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, et al. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2013; 34(8): 1133-40.
6. Shi Y, Li Z, Qiao Y, Lin J. Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb. *J Chromatogr B* 2012; 906: 63-8.
7. Place setter CE in biotechnology. The Newsletter for Capillary Electrophoresis. [online]. 1998 [cited 2015 Jul 10]; 2(2): [13 screens]. Available from: URL: [http://www.beckmancoulter.com/products/CELeader/newsletters/\[vol02no2\]paceset2_2.pdf](http://www.beckmancoulter.com/products/CELeader/newsletters/[vol02no2]paceset2_2.pdf).
8. USP 37-NF 32. The United States pharmacopoeia 37 - The national formulary 32. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2014. p. 723-9.
9. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014. p. 79-82, 753-5.
10. Taga A, Kita S, Nishiura K, Hayashi T, Kinoshita M, Sato A, et al. Analysis of an antibody pharmaceutical, tocilizumab, by capillary electrophoresis using a carboxylated capillary. *J Sep Sci* 2008; 31(5): 853-8.
11. ICH harmonised tripartite guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (Q6B). London: European Medicines Agency; 2006.

Method Validation of Capillary Zone Electrophoresis Technique for Identity Testing of Biotherapeutic Products: Monoclonal Antibody

**Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan Saiwarul Jadoonkittinan
and Teeranart Jivapaisarnpong**

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the analytical techniques for identity testing of biotherapeutic products (BTP) produced by biotechnological techniques for example: monoclonal antibody, hormones and cytokines. Therefore, this study was aimed to validate CZE by using PA 800 plus capillary electrophoresis system (Beckman Coulter), neutral coated capillary and UV detector at 214 nm. The proposed CZE condition showed high specificity and percent relative standard deviation (%RSD) of precision of main peak was less than 0.2. Moreover, the method was robust as shown in results of 0.2 %RSD when tested by two different analysts and different lots of elution buffers or capillary tubes. The obtained data suggested that CZE is potential for using as one of analytical methods for identity testing of BTP for marketing authorization in Thailand.

Key words: CZE, biotherapeutic products, monoclonal antibody