
การทดสอบความถูกต้องของวิธี Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ และสายวรุฬ จตุรจิตตินันท์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

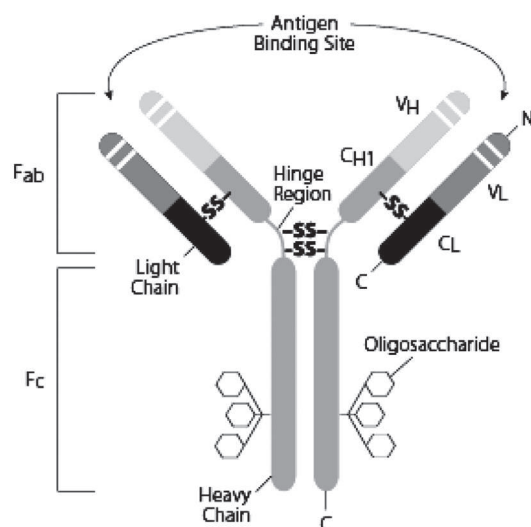
บทคัดย่อ Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนเชิงคุณภาพโดยสามารถใช้แยกโปรตีนได้ตามขนาดโมเลกุลที่นิยมใช้กันมากเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products) ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAbs) การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CE-SDS ในการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุ โดยใช้ชุดเครื่องมือ Beckman PA 800, capillary bare-fused silica, SDS-MW Gel buffer ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบ photodiode array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 220 nm พบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดี สามารถตรวจสอบสารที่ปนเปื้อนมากับตัวยาชีววัตถุ เช่น non-glycosylated heavy chain: NGHC ได้ โดยมีความจำเพาะและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด คือมีค่า % RSD ของ migration time (MT) และ corrected percentage area ของ light chain: LC, heavy chain: HC และ NGHC น้อยกว่าร้อยละ 3 และมีความคงทน โดยการทดลองเปลี่ยนเจลและท่อแคปิลลารีพบว่า MT ของ heavy chain และ NGHC จากท่อแคปิลลารีใหม่เท่านั้นที่มีค่า % RSD มากกว่า 3 เล็กน้อย เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างจริงชนิด mAbs พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานสนับสนุนว่าวิธี CE-SDS นี้เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยา mAbs ที่จำหน่ายในประเทศไทย

Accepted for publication, 26 June 2014

บทนำ

ปัจจุบันยาชีววัตถุที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ^(1, 2) มีปริมาณและคุณภาพสูงขึ้น สามารถนำมาใช้ในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยาชีววัตถุที่ใช้เพื่อการรักษาโรค (biotherapeutic products) ดังกล่าวมีหลายประเภท ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: mAb) โปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), blood clotting factor VIII ยาในกลุ่มฮอร์โมน ได้แก่ erythropoietin, insulin ยาในกลุ่มเอนไซม์ ได้แก่ urate oxidase, glucosidase รวมถึงเปปไทด์ต่างๆ ยาชีววัตถุเหล่านี้มีกระบวนการสร้างและผลิตที่ซับซ้อนในเซลล์สิ่งมีชีวิต ตลอดจนต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ จึงต้องมีการออกแบบและควบคุมการผลิตเป็นอย่างดีเพื่อให้มั่นใจว่าจะได้ยาที่มีคุณภาพตามที่กำหนด การตรวจวิเคราะห์คุณภาพจึงเป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการนำมาใช้เพื่อการรักษา^(3, 4)

โมเลกุลของแอนติบอดีประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (light chain: LC) 2 สาย และโปรตีนสายยาว (heavy chain: HC) 2 สาย เชื่อมกันเป็นรูปตัววาย (Y shape) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และมีโมเลกุลน้ำตาลประกอบอยู่บน HC⁽⁵⁾ (glycosylated HC) (ภาพที่ 1)⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการปรับแต่งโมเลกุลหลังจากการสร้างโปรตีนของเซลล์ (post-translational modification)^(5, 7, 8) โดยชนิดและรูปแบบการเรียงตัวของหมู่ น้ำตาลในการเกิด glycosylation จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ โดยเซลล์ที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งผลิต ได้แก่ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และยีสต์ นอกจากนั้นสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิต วิธีการเลี้ยงเซลล์ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ แอนติบอดีที่มีการออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพควรเป็นโมเลกุลเดี่ยวที่สมบูรณ์ (monomer) แต่เนื่องจากในกระบวนการสร้าง mAb ในเซลล์ กระบวนการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์รวมทั้งในขั้นตอนการเก็บรักษาอาจทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะต่างๆ เช่น เกิดการแตกของโมเลกุล (fragmentation) หรือการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลแอนติบอดี (aggregation)^(3, 9) รวมทั้งการเกิดโมเลกุลที่สภาพไม่สมบูรณ์เนื่องมาจากไม่มีการเติมน้ำตาลที่ HC ซึ่งมีผลต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ของแอนติบอดี และทำให้ได้เป็น non-glycosylated heavy chain: NGHC ซึ่งโมเลกุลชนิดนี้จัดเป็นสารปนเปื้อนที่มาพร้อมกับตัวยา (product-related impurities) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการควบคุมปริมาณ NGHC นี้^(10, 11)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของแอนติบอดี และหมู่ น้ำตาล บน HC

การวิเคราะห์เอกลักษณ์จากคุณลักษณะของโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานและการตรวจสอบความบริสุทธิ์เป็นส่วนสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาชีววัตถุ เนื่องจากสามารถแสดงให้เห็นถึงคุณภาพของยาและความสม่ำเสมอของกระบวนการผลิต การเก็บและการขนส่งที่เหมาะสมของยา⁽¹²⁾ โดยตำรายาสากลแนะนำให้ตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาเหล่านี้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ต่างกันมากกว่า 1 วิธี⁽¹³⁾ เพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปมีคุณภาพตามที่กำหนดโดยดูจากผลการวิเคราะห์ว่าเป็นไปตามข้อกำหนดและสอดคล้องกัน วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นิยมใช้ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟี และอิเล็กโทรโฟรีซิส^(13, 14) เช่น size exclusion chromatography (SEC-HPLC), reversed-phase chromatography (RP-HPLC), sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing (IEF) และ capillary electrophoresis (CE)⁽¹⁵⁾ เป็นต้น

Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนที่ใช้หลักการเดียวกับ SDS-PAGE แบบเจลโดยพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นกว่าวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีข้อจำกัดในการใช้เวลานานในการเตรียมเจล ความยุ่งยากในการวิเคราะห์รวมทั้งมีการใช้สารเคมีที่อันตราย^(16, 17) ปัจจุบัน CE-SDS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ระบุไว้ใน European Pharmacopoeia⁽³⁾ ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพยาโปรตีนในการควบคุมคุณภาพยาชีววัตถุชนิด mAb ด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์โดยการตรวจสอบปริมาณโมเลกุลแอนติบอดีที่สมบูรณ์และผลรวมของ LC และ HC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งผู้ผลิตจะกำหนดเป็นค่าร้อยละที่เหมาะสมสำหรับยาแต่ละชนิด หลักการของ CE-SDS คือ SDS จะจับกับโมเลกุลโปรตีนทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพโครงสร้างแบบทุติยภูมิและตติยภูมิได้เป็นสายของกรดอะมิโน เมื่อผ่านเข้าไปในท่อแคปิลลารีจะเกิดการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกแยกออกมาก่อน ตามด้วยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (migration time: MT) ของแต่ละโมเลกุลจะเป็นค่าเฉพาะ โดยจะปรากฏพีคที่มีความสูงแปรตามตามจำนวนของโมเลกุลที่แยกได้โดยปริมาณของสารที่แยกได้นี้จะถูกคำนวณเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (corrected percentage area) ต่อไป โดยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ในสภาวะ non-reducing เพื่อตรวจสอบปริมาณของโมเลกุลชนิด monomer หรือวิเคราะห์ในสภาวะ reducing โดยการสลายโครงสร้างของโมเลกุลแอนติบอดี โดยการตัดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลแอนติบอดี ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีพีคของ LC และ HC ที่แยกออกจากกัน จากผลการวิเคราะห์จะทำให้ทราบว่ายา mAb มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดหรือไม่^(18, 19) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของ CE-SDS เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศร่วมกับวิธีอื่นในการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาชนิด mAb ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี 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 photodiode array (PDA) และแคปิลลารีแบบ uncoated ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 μ m ยาว 30.2 cm

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป และสารมาตรฐาน

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป : SDS-MW analysis kit (Beckman coulter, USA) ประกอบด้วยโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 10-225 kDa และ internal standard (IS) ขนาด 10 kDa, Gel buffer (proprietary formulation, pH 8, 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 (BIO-RAD, US), DTT (GE, US), iodoacetamide (GE, US), milli-Q water

สารมาตรฐาน : สารมาตรฐาน mAb และ G-CSF จากบริษัทฯ ผู้ผลิตตัวอย่างชนิดนั้นๆ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธีเป็นยาชีววัตถุเพื่อการรักษา 2 กลุ่ม คือ mAb ชนิด A ซึ่งผลิตจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) และ granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) ที่ผลิตจาก *E. coli* จำนวน 1 ชนิด สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C ซึ่งเป็นยาชีววัตถุเพื่อการรักษาที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยา

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ **non-reducing**

เจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2–2.0 mg/ml ด้วย sample buffer เติม IS ปริมาตร 2 µl และ 250 mM iodoacetamide ปริมาตร 5 µl ลงในตัวอย่างปริมาตร 95 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบ

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะ **reducing**

เจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.2–2.0 mg/ml ด้วย sample buffer เติม IS ปริมาตร 2 µl และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 5 µl ลงในตัวอย่างปริมาตร 95 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบ

วิธีวิเคราะห์

นำสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ ฉีดเข้าเครื่อง CE ขั้นตอนการแยกสารของ CE-SDS ประกอบด้วย การสลายโมเลกุลโปรตีนด้วยความร้อนในสภาพที่มี SDS จากนั้นนำไปผ่านแคปิลลารีโดยมีชุดน้ำยาโปรตีนที่มีน้ำหนักมาตรฐานในช่วง 10, 20, 35, 50, 100, 150, และ 225 kDa และ ใช้ IS ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 10 kDa เติมในตัวอย่างเพื่อเป็น mobility marker โดยมีสภาวะของเครื่อง (ตารางที่ 1) และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ CE-SDS ในขั้นตอนการทำงานขั้นตอนต่างๆ

step#	event	value	duration	comments
1	rinse-pressure	70.0 psi	3.00 min	0.1 N NaOH rinse
2	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	0.1 N HCl rinse
3	rinse-pressure	70.0 psi	1.00 min	H ₂ O rinse
4	rinse-pressure	70.0 psi	10.00 min	SDS gel rinse
5	wait		0.00 min	H ₂ O dip
6	wait		0.00 min	H ₂ O dip
7	inject -voltage	5.0 kV	20.0 sec	sample injection
8	wait		0.00 min	H ₂ O dip
9	separate -voltage	15.0 kV	30.00 min	separation

การหาความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

ก่อนการทดสอบความถูกต้องของวิธีได้ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณสารตัวอย่างต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb A ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนที่ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/ml และหาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมในการฉีดเข้าเครื่อง CE โดยใช้ mAb A และตั้งค่าปริมาตรฉีดที่ 5, 10, 20, 40 และ 80 วินาที ตามลำดับ

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method of Validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

1.1 วิเคราะห์ blank, blank ที่เติม IS, โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน และโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่เติม IS แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ เพื่อดูความสามารถในการแยกของสภาวะที่กำหนด

1.2 วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb และ G-CSF ที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 1 mg/ml และสารมาตรฐานของตัวอย่างนั้น ๆ ที่เตรียมโดยใช้สภาวะ non-reducing และ reducing แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้

2. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

System precision วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb โดยทดสอบตัวอย่างละ 6 ซ้ำ โดยทดสอบภายในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

Method precision วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ที่เตรียมจำนวน 6 หลอด ทดสอบหลอดละ 1 ครั้ง ในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

2.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision)

วิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวันเป็นเวลา 3 วัน และเปลี่ยนนักวิเคราะห์จำนวน 2 คน คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC ทั้ง 3 วัน และคำนวณ %RSD ของแต่ละค่าที่ได้ ซึ่งต้องมีค่าไม่มากกว่า 3

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

3.1 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยน SDS-MW analysis kit โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ โดยใช้ SDS MW analysis kit จำนวน 2 รุ่น คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้ kit ทั้งสองชุด

3.2 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb จำนวน 6 ซ้ำ กับแคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ คำนวณค่า MT และ corrected percentage area ที่ตำแหน่ง LC, NGHC และ HC แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้แคปิลลารีทั้งสองท่อ

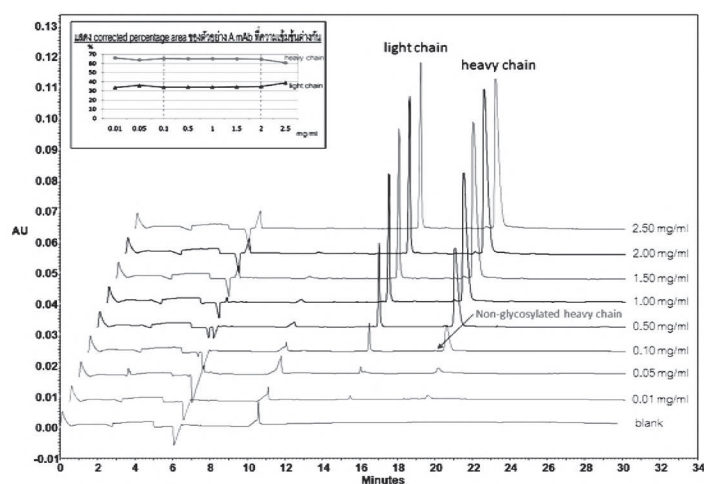
การทดสอบตัวอย่างยา mAb

วิเคราะห์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของตัวอย่างยา mAb ชนิด B และ C ที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียน

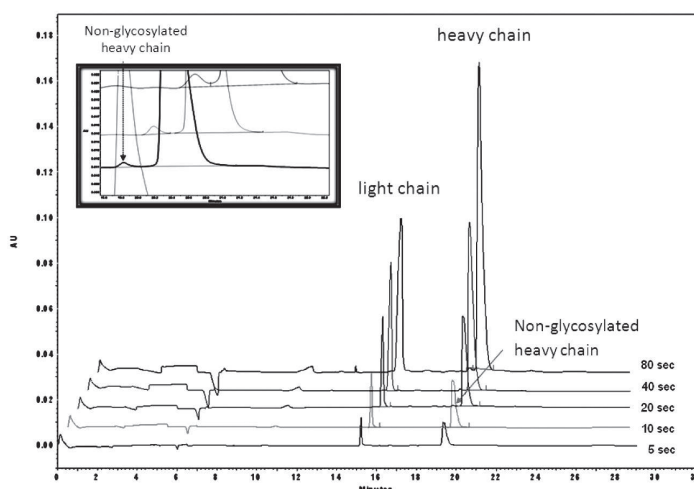
ผล

การหาความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาตรสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

จากการเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 0.01–2.50 mg/ml พบว่าสามารถตรวจพบทั้ง LC, HC และ NGHC ได้ชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ขึ้นไป (ภาพที่ 2) และเมื่อปริมาณโปรตีนเพิ่มความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ ส่วนปริมาตร mAb ที่ฉีดเข้าเครื่องจาก 5 ถึง 80 วินาที พบว่ามีความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นกัน (ภาพที่ 3) แต่ปรากฏพีคของ NGHC ได้ตั้งแต่การฉีดสาร 20 วินาทีขึ้นไป



ภาพที่ 2 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing ที่มีปริมาณโปรตีน 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/ml ตามลำดับ

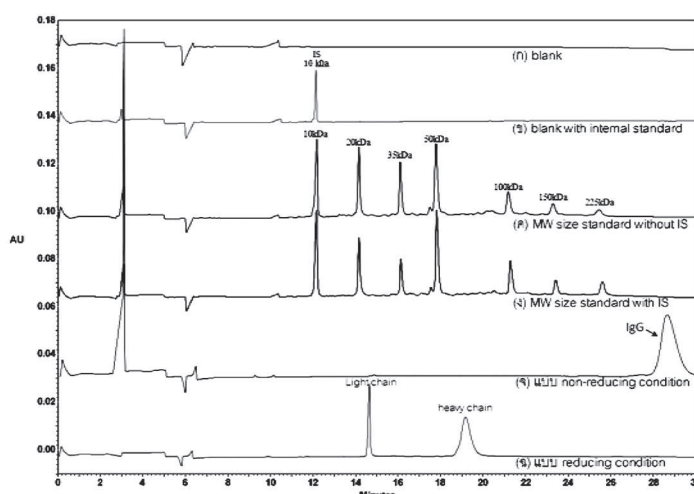


ภาพที่ 3 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing ที่กำหนดปริมาตรฉีดเป็น 5, 10, 20, 40 และ 80 วินาที ตามลำดับ

1. ความจำเพาะของวิธี CE-SDS

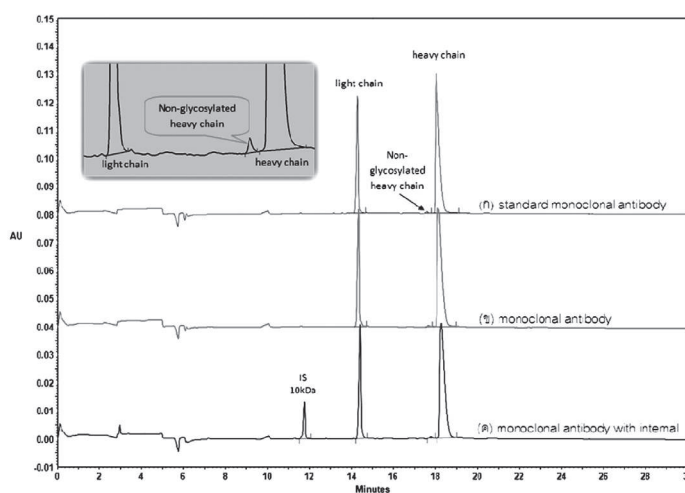
จากการวิเคราะห์ blank พบว่าไม่มีพีคอื่นปรากฏนอกจากพีคของสารละลาย buffer และ blank ที่เติม IS พบพีคของ IS ปรากฏชัดเจน และตรงกับโปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่ 10 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ IS (ภาพที่ 4 ก ข และ ค) สำหรับกรณีเติม IS ลงในโปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน พบว่าความสูงของพีคที่ตำแหน่ง 10 kDa สูงกว่ากรณีไม่เติม IS (ภาพที่ 4ง)

ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ชนิด A ที่เตรียมในสภาวะ reducing ปรากฏพีคของ LC และ HC แยกออกจากกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4ฉ) และในสภาวะ non-reducing ปรากฏพีคของ intact molecule ของ mAb ชนิด A (ภาพที่ 4จ) โดยไม่มีพีคอื่นปรากฏเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบพีคปรากฏที่ MT เดียวกัน

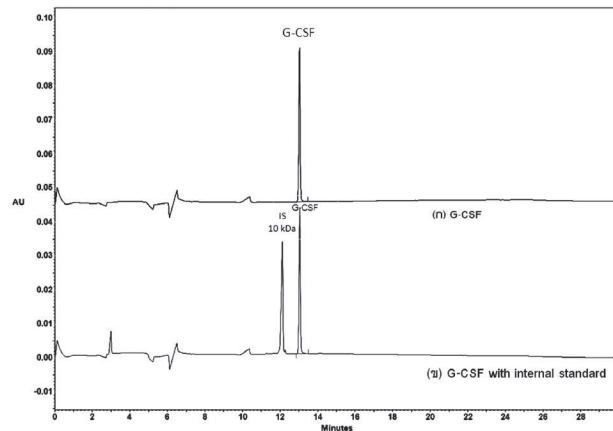


ภาพที่ 4 Electropherogram ของ blank (ก) เปรียบเทียบกับ blank ที่เติม IS (ข) โปรตีนอ้างอิงมาตรฐานที่ไม่เติม IS (ค) และเติม IS (ง) ตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ non-reducing (ฉ) และในสภาวะ reducing (จ)

เมื่อวิเคราะห์ mAb ชนิด A และ G-CSF ในสภาวะ reducing โดยเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่ามี MT ตรงกับสารมาตรฐานเช่นเดียวกันทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 5 และ 6) ตามลำดับ และในกรณีเติม IS ลงในตัวอย่าง จะพบพีคของ IS ที่ตำแหน่ง 10 kDa ทุกครั้ง และไม่รบกวนพีคของสารตัวอย่าง



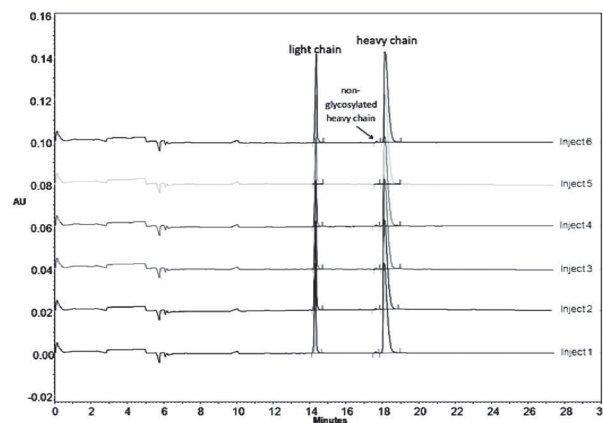
ภาพที่ 5 Electropherogram การศึกษาความจำเพาะของวิธีจากตัวอย่าง mAb ชนิด A ในสภาวะ reducing



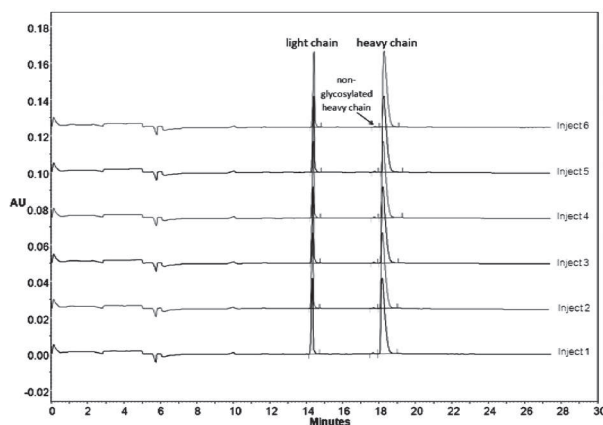
ภาพที่ 6 Electropherogram การศึกษาความจำเพาะของวิธีจากตัวอย่าง G-CSF ในสภาวะ reducing

2. ความเที่ยง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ ในแต่ละหัวข้อการทดสอบ คือ ความเที่ยงในวันเดียวกันได้ electropherogram ที่ตำแหน่งตรงกันของทั้ง 6 ครั้ง (ภาพที่ 7 และ 8) และคำนวณปริมาณ LC, HC และ NGHC ของ mAb ชนิด A รวมทั้งผลของความเที่ยงระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน และความแม่นยำจากการวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 2 คน (ตารางที่ 2) โดยที่ค่า % RSD น้อยกว่า 3



ภาพที่ 7 Electropherogram ในสภาวะ reducing ของ Repeatability (system precision) จาก mAb ชนิด A



ภาพที่ 8 Electropherogram ในสภาวะ reducing ของ Repeatability (method precision) จาก mAb ชนิด A

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงด้วย mAb ชนิด A และการวิเคราะห์จากนักวิเคราะห์ 2 คน

parameters		migration time (min)			corrected percentage area (%)		
		LC	NGHC	HC	LC	NGHC	HC
repeatability (system precision) N = 6	Average	14.35	17.66	18.11	34.07	0.44	65.49
	% RSD	0.14	0.12	0.13	0.05	1.97	0.03
repeatability (method precision) N = 6	Average	14.29	17.62	18.13	34.56	0.44	65.01
	% RSD	0.27	0.27	0.29	0.05	1.99	0.03
intermediate precision, between-days 3 days N = 18	Average	14.61	17.99	18.49	34.18	0.44	65.38
	% RSD	2.41	2.45	2.54	0.36	2.96	0.20
intermediate precision, 2 analysts	Average	14.46	17.80	18.28	34.19	0.44	65.37
	% RSD	0.86	0.87	1.01	0.39	2.27	0.21

3. ความคงทนของวิธีวิเคราะห์

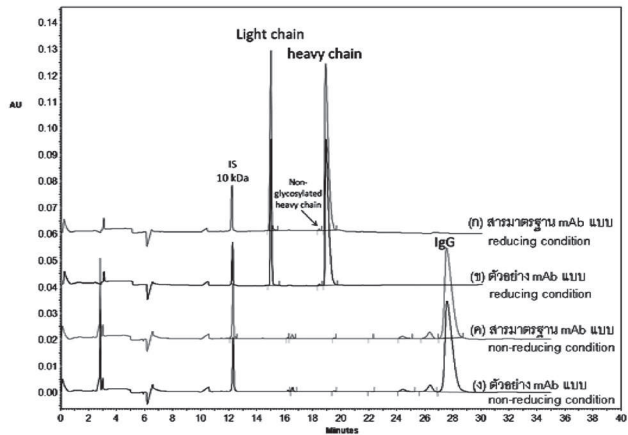
เมื่อตรวจสอบความคงทนของวิธีโดยการเปลี่ยนแปลง analysis kit รุ่นใหม่ พบว่าผลการวิเคราะห์ตัวอย่างของ analysis kit อยู่ในเกณฑ์ที่ดี (ตารางที่ 3) มีค่า %RSD ของทั้ง MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3

ผลของการตรวจสอบความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารีใหม่เปรียบเทียบกับท่อเดิม พบว่าพีคของ HC และ LC มีค่า %RSD น้อยกว่า 4 ทั้ง MT และ corrected percentage area (ตารางที่ 3)

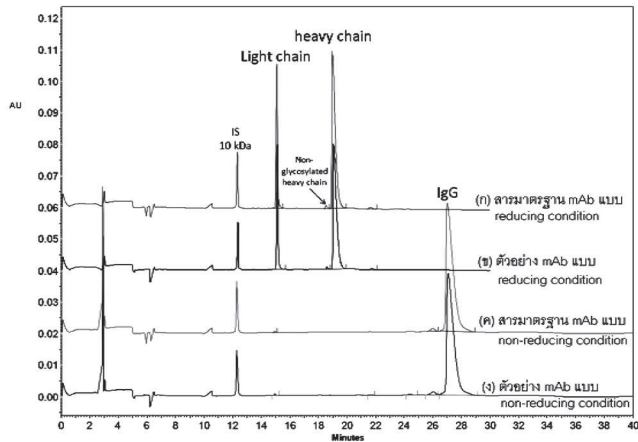
ตารางที่ 3 การทดสอบความคงทนของ analysis kit และแคปิลลารี จากการวิเคราะห์ mAb ชนิด A

parameters		migration time (min)			corrected percentage area (%)		
		LC	NGHC	HC	LC	NGHC	HC
robustness ต่าง analysis kit	Average	14.72	18.13	18.62	34.11	0.44	65.45
	%RSD	2.65	2.71	2.87	0.18	1.83	0.10
robustness ต่าง capillaries	Average	14.76	18.19	18.68	34.32	0.44	65.24
	%RSD	2.92	3.05	3.22	0.79	2.82	0.41

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างจริงทั้ง mAb ชนิด B และ C ตามสภาวะของวิธี CE-SDS ที่ได้ตรวจสอบแล้วนี้ ทั้ง 2 ชนิด ให้ electropherogram ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 9 และ 10) และสามารถคำนวณปริมาณ LC และ HC (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 9 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด B เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ในสภาวะ non-reducing และ reducing



ภาพที่ 10 Electropherogram ของตัวอย่าง mAb ชนิด C เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในสภาวะ non-reducing และ reducing

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบในตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C

ตัวอย่าง	migration time (min)			corrected percentage area (%)			
	non-reducing condition		reducing condition	non-reducing condition		reducing condition	
	IgG	LC	HC	IgG	LC	HC	LC+HC
mAb ชนิด B	27.10	15.16	19.09	97.45	31.47	67.46	98.93
SD	0.03	0.04	0.05	0.29	0.05	0.04	0.01
% RSD	0.10	0.23	0.26	0.30	0.16	0.06	0.01
mAb ชนิด C	27.61	14.91	18.81	91.69	33.44	66.21	99.64
SD	0.02	0.00	0.01	0.13	0.36	0.36	0.00
% RSD	0.08	0.00	0.04	0.15	1.08	0.54	0.00

วิจารณ์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ CE-SDS นี้ ได้ทดลองใช้สภาวะของวิธีตามที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว⁽¹⁶⁾ (ตารางที่ 1) รวมทั้งความยาวของแคปิลลารี คือ 30.2 cm และอุณหภูมิสำหรับการเชื่อม SDS กับโมเลกุลโปรตีนที่ 70 °C นาน 3 นาที⁽¹⁷⁾ ผลที่ได้ให้ค่าต่างๆ ทางสถิติเหมาะสม จึงได้กำหนดเป็นสภาวะจริงเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และใช้ IS ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานขนาด 10 kDa เป็นตัวบ่งชี้การเคลื่อนที่ (mobility marker) เพื่อความถูกต้องของการอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่าง

จากทดลองหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ พบว่าพีคของ NGHC ซึ่งมีปริมาณน้อยจะปรากฏให้เห็นเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างตั้งแต่ 0.1 mg/ml (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างและเมื่อพิจารณาค่า log ของความเข้มข้นของโปรตีนที่ศึกษา พบว่าค่าความเข้มข้นโปรตีนระหว่าง 0.1–2.0 mg/ml มีกราฟเป็นเส้นตรง (ภาพที่ 2 ในกรอบ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นในช่วงค่านี้เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์⁽¹⁹⁾ และจากการทดลองหาปริมาตรสารที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โดยทดลองฉีดตัวอย่าง mAb เข้าเครื่อง CE-SDS เป็นช่วงเวลา 5–80 วินาทีนั้น พบว่าความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 3) ปริมาตรที่น้อยที่สุดและปรากฏพีคของ NGHC ที่สามารถมองเห็นคือ ที่การฉีด 20 วินาที ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นโปรตีนที่ 0.2 mg/ml และปริมาตรการฉีดสาร 20 วินาที ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CE-SDS นี้

ผลการทดสอบสภาวะของวิธีที่กำหนดนี้ให้ผลทั้งความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีอย่างเหมาะสม สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 10–225 kDa ได้ดี เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb (ภาพที่ 4 จ–ฉ) ในสภาวะ non-reducing เพื่อดูโมเลกุลชนิด monomer ของแอนติบอดีและในสภาวะ reducing ซึ่งมีการตัดไธซัลไฟด์บอนด์ในโมเลกุลแอนติบอดีเพื่อแยก LC และ HC พบว่ามีการแยกของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดในตำแหน่งที่ชัดเจนรวมทั้งสามารถแยก NGHC ได้ (ภาพที่ 5) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ G-CSF ซึ่งเป็นโปรตีนสายเดี่ยวน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18.8 kDa และไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ในสภาวะ reducing พบว่าแสดงผลเป็นโมเลกุลโปรตีนสายเดี่ยวที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 6) ผลการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันและระหว่างวัน (ภาพที่ 7–8) และผลจากนักวิเคราะห์ 2 คนได้ % RSD ของ MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3% ตามที่กำหนด⁽²⁰⁾

ปัจจัยอื่นที่อาจมีผลกระทบต่อวิธี คือ analytical kit เนื่องจากการวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องเติมเจล (0.2% SDS gel buffer) ดังนั้นคุณภาพของเจลแต่ละรุ่นแม้จะแตกต่างกันเล็กน้อย แต่อาจมีผลกระทบต่อความถูกต้องของผลวิเคราะห์ นอกจากนี้คุณภาพของแคปิลลารีก็มีความสำคัญต่อการแยกสารในการเกิดประจุที่สม่ำเสมอบนผนังด้านในของท่อ เมื่อทดลองเปลี่ยนเจลและท่อแคปิลลารีพบว่าสภาวะของวิธี CE-SDS นี้ มีความคงทน (ตารางที่ 3) ได้ค่า % RSD ของ MT และ corrected percentage area น้อยกว่า 3 โดยพบค่า MT ของ HC และ NGHC เมื่อเปลี่ยนแคปิลลารีจะให้ค่า % RSD มากกว่า 3 เพียงเล็กน้อย

เมื่อทดลองใช้สภาวะที่ศึกษานี้มาทดสอบตัวอย่างยา mAb ชนิด B และ C ซึ่งเป็น IgG1 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 140–155 kDa และมีน้ำตาลบนโมเลกุล HC (ภาพที่ 9–10) ผลการตรวจเอกลักษณ์โดยใช้สภาวะ non-reducing ได้ MT ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน และไม่พบ aggregates ใดๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ในสภาวะ reducing สามารถแยก HC ในรูป glycosylated HC ออกจาก NGHC ได้ ซึ่งมี MT ของ HC และ LC ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน จากการคำนวณปริมาณโมเลกุล monomer ของแอนติบอดี และผลรวมปริมาณ LC และ HC ของตัวอย่างทั้ง 2 พบว่ามีค่ามากกว่า 92% และ 95% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของยาทั้ง 2 ชนิด (specification) ที่ผู้ผลิตกำหนดไว้ในการขอขึ้นทะเบียนยา วิธี CE-SDS ที่กำหนดขึ้นนี้เป็นวิธีที่ใช้กับเครื่องอัตโนมัติ จึงมีความรวดเร็วสามารถวิเคราะห์โมเลกุลแอนติบอดีและตรวจสอบสารปนเปื้อนได้ภายในเวลา 30 นาที สามารถทำซ้ำได้มาก มีความผิดพลาดน้อย ตลอดจนประหยัดเวลาและแรงงานในการวิเคราะห์ นอกจากนี้

สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และตรวจหา NGHC แล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบยาค้ายคลึง (biosimilar) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับยาต้นแบบได้อีกด้วย⁽²¹⁾

สรุป

วิธี CE-SDS ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพการแยกสูง เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพด้านเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของยา mAb ที่ใช้ในประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้แล้วเสร็จได้ด้วยงบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Roche. Biotechnology: new directions in medicine. 3rd ed. Basel: F. Hoffmann-La Roche Ltd; 2008.
2. Dubel S. Recombinant therapeutic antibodies. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 74(4): 723-9.
3. Shukla AA, Thommes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. Trends Biotechnol 2010; 28(5): 253-61.
4. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Annex 2: Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO technical report series No. 977. Geneva: World Health Organization; 2013. p. 51-89.
5. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Editors. Kuby immunology. 6th ed. New York: W.H. Freeman & Company; 2006. p. 85-9.
6. Mader SS. Antibody (IgG) structure. [online]. 1997; [cited 2014 Jun 13]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.mhhe.com/biosci/ap/dynamichuman2/content/lymphatic/visuals.mhtml>
7. Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. Trends Pharmacol Sci 2009; 30(7): 356-62.
8. Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol. [serial online] 2009; [cited 2014 Jun 13]; 20(6): 678-84. Available from: URL: http://pef.aibn.uq.edu.au/wordpress/wp-content/blogs.dir/1/files/Support/Purification/Literature/Pharmacological_significance_of_glycosylation_in_therapeutic_proteins-Li-2009.pdf
9. Hong P, Koza S, Bouvier ESP. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. J Liq Chromatogr Relat Technol 2012; 35(20): 2923-50.
10. Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y. Application of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. Electrophoresis 2008; 29(17): 3612-20.
11. Note for guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (CPMP/ICH/365/96). London: European Medicines Agency; 1999.
12. The United States Pharmacopoeia 36 - The National Formulary 31. 31st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2013. p. 551, 605-9.

13. European Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2011. p. 692-3.
 14. Lacher NA, Roberts RK, He Y, Cargill H, Kearns KM, Holovics H, et al. Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. *J Sep Sci* 2010; 33(2): 218-27.
 15. Felten C, Solano OS. Capillary electrophoresis in quality control: Part I: application for therapeutic proteins. [online]. 2008; [cited 2014 Jun 13]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=B2010-11629.pdf>
 16. Salas-Solano O, Gennaro L, Felten C. Optimization approaches in the routine analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis. *LCGC Europe* 2008; 21(12): 615-23.
 17. Guo A, Camblin G, Han M, Meert C, Park S. Role of CE in biopharmaceutical development and quality control. In: Ahuja S, Jimidar MI, Editors. *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 357-99.
 18. Salas-Solano O, Tomlinson B, Du S, Parker M, Strahan A, Ma S. Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of monoclonal antibodies. *Anal Chem* 2006;78(18): 6583-94.
 19. Apostol L, Krull I, Kelner D. Analytical method validation for biopharmaceuticals. [online] 2013; [cited 2014 Jun 13]; [20 screens]. Available from: URL: <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/40718>
 20. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmeiderer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs* 2013; 27(5): 495-507.
-

Method validation of Capillary Electrophoresis–Sodium Dodecyl Sulfate for Identity and Purity analysis of Monoclonal Antibodies

Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan and Saiwarul Jadoonkittinan

Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Capillary electrophoresis–sodium dodecyl sulfate (CE–SDS) is a qualitative technique for protein analysis and is widely use for separation of protein by molecular size. This technique is increasingly applied to analysis of biotherapeutic products derived from biotechnology including monoclonal antibodies (mAbs). This study, validation of CE–SDS technique for identity and purity analysis of biotherapeutic products was performed by using Beckman PA 800, capillary bare–fused silica, SDS–MW Gel buffer with photodiode array (PDA) detector at wavelength 220 nm. The results showed that it has high resolution for detection of product – related impurity such as non–glycosylated heavy chain: NGHC. The obtained data has specificity and precision related to standard criteria as shown that the %RSD of migration time (MT) and corrected percentage area of light chain: LC, heavy chain: HC and NGHC were less than 3. The robustness was also determined by using new lot of SDS gel buffer and capillary in analysis. It's found that only %RSD of MT of HC and NGHC were slightly exceed 3 when using new capillary. This method was used to analyze 2 mAb samples, the results were correlated with results of standard material supported that CE–SDS is suitable technique for using as standard method for identity and purity analysis for quality control of marketed mAbs in Thailand.

Keywords: CE–SDS, monoclonal antibody, biotherapeutic products