



วารสารอาหารและยา
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (2566): มกราคม - เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 30 No. 1 (2023): January – April



การตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบด้วยเทคนิค Apoptosis

จิรเดช ปัจฉิม¹ สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน¹ สายวรุษ จตุรภิตตินันท์¹

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ที่อยู่ติดต่อ: จิรเดช ปัจฉิม สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
jiradej.p@dmsc.mail.go.th

Determination Method Validation of Bioactivity of Adalimumab Monoclonal Antibody by Apoptosis Assay

Jiradej Patchim¹, Sompong Sapsutthipas¹, Saiwarul Jadoonkittinan¹

¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand.

Contact address: Jiradej Patchim, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, jiradej.p@dmsc.mail.go.th

Received: 13 March 2022, **Revised:** 11 July 2022, **Accepted:** 1 September 2022

Abstract

Background: Adalimumab is an immunosuppressive drug that works by blocking tumor necrosis factor-alpha, commonly used to treat autoimmune inflammatory diseases. The structure of adalimumab is a fully human recombinant immunoglobulin G1 (IgG1) monoclonal antibody that represents significant specificity for these diseases. At present, the various brand names for adalimumab are imported and registered in Thailand. Consequently, an efficient quality control system of the products, including physicochemical properties and biological activity must be controlled before distribution to the market. Nevertheless, potency assays are not available in the international monographs. As a result, potency analysis is essential for the development and standardisation of methods aimed at increasing laboratory capacity for quality control in a wide range of adalimumab.

Objectives: To verify the validity of biological activity in adalimumab by apoptosis technique using U-937 cells as target cells to be used to standardize the method for laboratory quality control in Thailand.

Methods: This was an experimental study from October 2020 to August 2021 that for method validation of the biological activity of adalimumab by apoptosis on parameters including specificity, precision, robustness, accuracy, linearity, and range by using international standard against the potency of adalimumab.

Results: The results of potency assay demonstrated that this method was specific to the target cells as U-937 cells of adalimumab. Linearity and range showed an $R^2 = 0.996$ in a potency range of 50-100% of relative potency. The %GCV of repeatability and intermediate precision differed by analysts and days but did not exceed five. The percent recovery of accuracy ranged from 80 to 125%. In addition, this method exhibited good robustness as the range of %GCV was from 5.74 to 9.57, with no statistically significant differences ($p > 0.05$), and the relative potency assay ranged from 80 to 125% compared to the international reference standard.

Conclusions: The determination of biological activity for adalimumab by the apoptosis method using U-937 cells as target cells was found to be suitable and reliable for laboratory quality control for both originator and biosimilars of adalimumab.

Keywords: bioactivity, adalimumab, apoptosis

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: ยาอะดาลิอูแมบเป็นยาต้านภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ tumor necrosis factor- α นิยมใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบจากภูมิคุ้มกันต้านทานตนเอง มีความจำเพาะต่อโรคสูงเนื่องจากเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด fully human recombinant immunoglobulin G1 (IgG1) โดยมีการนำเข้ามาขึ้นทะเบียน ในประเทศไทยหลายยี่ห้อ ซึ่งต้องมีการควบคุมคุณภาพยาก่อนจำหน่าย ทั้งด้านเคมี-

ฟิสิกส์ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐานการตรวจสอบความแรงในตำรายาสากล จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาศักยภาพทางห้องปฏิบัติการในการกำหนดวิธีมาตรฐานที่มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือทางวิชาการสามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ยาอะดาลิอูแมบทุก ๆ ยี่ห้อได้

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบด้วยเทคนิค apoptosis โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย สำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของประเทศไทย

วิธีการวิจัย: เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental research) ระหว่างเดือนตุลาคม 2563 ถึงเดือนสิงหาคม 2564 ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบด้วยเทคนิค apoptosis ในพารามิเตอร์ ความจำเพาะ ความเที่ยง ความคงทน ความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ โดยใช้สารมาตรฐานสากลในการเทียบค่าความแรงสัมพัทธ์

ผลการศึกษา: วิธีมีความจำเพาะต่อยาอะดาลิอูแมบที่ใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย มีความเป็นเส้นตรง โดยแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบความแรงที่ 50-100% มีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ $R^2 = 0.996$ มีความเที่ยงสูงทั้งแบบทำซ้ำในวันเดียวกัน และต่างวันหรือต่างนักวิเคราะห์ โดยมีค่า %GCV น้อยกว่า 5 สำหรับความแม่นยำของวิธี พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ 80-125% และมีความคงทนในทุกปัจจัยที่ศึกษา โดยมีค่า %GCV เท่ากับ 5.74-9.57 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผลการวิเคราะห์ความแรงสัมพัทธ์ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 80-125% เทียบกับสารมาตรฐาน

สรุป: วิธีตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบโดยการตรวจหาค่าความแรงด้วยเทคนิค apoptosis โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่ามีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือในการนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพยาอะดาลิอูแมบที่ขึ้นทะเบียนยาทั้งในรูปแบบยาใหม่และยาคัดลอกในประเทศไทยได้

คำสำคัญ: การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ยาอะดาลิอูแมบ apoptosis

บทนำ

ยาอะดาลิุมแมบ (adalimumab) เป็นยาชีววัตถุกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการลดอาการปวดหรืออักเสบ ซึ่งมักเป็นโรคอักเสบเรื้อรัง เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ สะเก็ดเงิน ข้อกระดูกสันหลังอักเสบยึดติด (ankylosing spondylitis) และลำไส้ใหญ่อักเสบ เป็นต้น มีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ คือ Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)¹ ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันหรือกระบวนการทำงานของเม็ดเลือดขาวที่กระตุ้นการอักเสบหยุดการทำลายเซลล์ของร่างกาย ทำให้อาการปวดลดลง ดังนั้นยาดังกล่าวจึงอยู่ในกลุ่มยากดภูมิคุ้มกันที่ได้มาจากสารภูมิต้านทาน (immunosuppressive antibodies) เช่นเดียวกับยาแอนติไทม์ไฮโดรโกลบูลิน (Antithymocyte Globulin: ATG) มิวโรโมนแนบ (Muromonab-CD3, OKT3) บาซิลิซิแมบ (basiliximab) ดาคลิซูแมบ (daclizumab) นาทาลิซูแมบ (natalizumab) อินฟลิซิแมบ (infliximab) เซอร์โทลิซูแมบ (certolizumab) อีทานอร์เซ็ปต์ (etanercept)²

ยาดันแบบ (originator/ innovator) ของยาอะดาลิุมแมบคือ HUMIRA® เป็น fully human recombinant immunoglobulin G1 (IgG1) ชนิดแรกได้รับอนุมัติสำหรับการใช้ทางการแพทย์เมื่อปี ค.ศ. 2002 ในสหรัฐอเมริกา และเป็นยาชนิดหนึ่งที่มียอดขายดีที่สุดของโรค³ เนื่องจากความสามารถในการออกฤทธิ์ที่จำเพาะในกลุ่มโรคที่มีการป่วยจำนวนมาก จึงมีการผลิตและขึ้นทะเบียนในรูปแบบยาค่ายคลิ่ง เช่น AMEGEVITA® และ Exemptia®³ เป็นต้น แต่เนื่องจากเป็นยาชีววัตถุ

มีโครงสร้างของยาที่ซับซ้อนและมีขนาดใหญ่ประมาณ 148 kDa⁴ ประกอบกับกระบวนการผลิตจะใช้สิ่งมีชีวิตหรือกลไกจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ทำให้มีความยุ่งยากและความแปรปรวนของกระบวนการผลิตสูง ดังนั้น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย ได้กำหนดหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาทั้งยาใหม่ และยาชีววัตถุคล้ายคลึง⁵ ที่ต้องมีการพิจารณาข้อมูลจากผู้เชี่ยวชาญและผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนยามีความคล้ายคลึงด้านคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยเพียงพอ⁶⁻⁷ ซึ่งการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจะมีการทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ทั้งด้านเคมี-ฟิสิกส์ เช่น ลักษณะทางกายภาพ เอกลักษณ์ ความบริสุทธิ์ ปริมาณของตัวยาสำคัญ เป็นต้น และการทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะอาศัยการทดสอบโดยวิธี bioassay ในการตรวจวัดความแรงของยาในการออกฤทธิ์ตามกลไกของยา เช่น Complement-dependent Cytotoxicity (CDC), Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) และ receptor binding, apoptosis เป็นต้น¹

ปัจจุบันวิธีในการตรวจความแรงของยาอะดาลิุมแมบยังไม่มีวิธีการระบุวิธีทดสอบเป็นมาตรฐานในตำรายาสากล ผู้ผลิตแต่ละแห่งจะพัฒนาวิธีตรวจความแรงที่มีความเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ของตนเอง อย่างไรก็ตาม การควบคุมกำกับด้านคุณภาพทางห้องปฏิบัติการในการพิจารณาคุณภาพและ

ประสิทธิภาพของยาที่ขึ้นทะเบียนก่อนจำหน่าย จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาศักยภาพทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบความแรง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกกลไกการออกฤทธิ์แบบ apoptosis มาเป็นต้นแบบของวิธีตรวจค่าความแรง โดยการนำสารมาตรฐาน และตัวอย่างยาอะดาลิอูแมบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับ TNF- α ที่ความเข้มข้นคงที่ ซึ่ง TNF- α คงเหลือที่ไม่ถูกยับยั้ง จะเข้าจับกับ TNF receptor บนผิวเซลล์เป้าหมาย แล้วกระตุ้นให้สารประกอบโปรตีนภายในเซลล์ เปลี่ยนเป็นเอนไซม์ caspase ส่งผลให้เส้นใยโปรตีน ที่เชื่อมโยงเป็นโครงสร้างเซลล์ถูกทำลาย นำไปสู่ การตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่สามารถ ติดตามการตายของเซลล์จากเอนไซม์ caspase ด้วย Caspase-Glo[®]3/7 ทำให้สามารถวิเคราะห์ค่า ความแรงสัมพัทธ์ด้วยสมการ 4-parameter logistic regression⁸ ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างยา เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการตรวจสอบ ความถูกต้องของวิธีตามระบบคุณภาพเพื่อให้เกิด ความเชื่อมั่นว่าวิธีมีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้ เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบความแรงใน ผลิตภัณฑ์ยาอะดาลิอูแมบจากผู้ผลิตต่าง ๆ ทำให้ การควบคุมคุณภาพเป็นมาตรฐานเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ ตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบด้วยเทคนิค apoptosis โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย

2. เพื่อนำวิธีมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการ ควบคุมคุณภาพยาอะดาลิอูแมบที่ขึ้นทะเบียนยา ทั้งในรูปแบบยาใหม่และยาค้ายคลึง

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) ระหว่างเดือนตุลาคม 2563 ถึง เดือน สิงหาคม 2564 เป็นการตรวจสอบการออกฤทธิ์ ทางชีวภาพของยาอะดาลิอูแมบด้วยวิธี apoptosis เพื่อหาค่าความแรงของยาในการยับยั้งการทำงานของ TNF- α ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของยา โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด อะดาลิอูแมบ จำนวน 2 ยี่ห้อ คือ ยี่ห้อ A ขนาด 40 mg/ 0.8 ml และยี่ห้อ B ขนาด 40 mg/ 0.8 ml จากผู้ผลิตต่างกัน และตัวอย่างยาโมโนโคลนอล แอนติบอดี ชนิดทราสทูซูแมบ ขนาด 150 mg จำนวน 1 ยี่ห้อ

เครื่องมือ

1. สารมาตรฐานสากล adalimumab (WHO 1st International standard, Code 17/236, NIBSC)

2. เซลล์เพาะเลี้ยง ได้แก่ เซลล์ U-937 (ATCC[®] CRL-1593.2TM) เป็นเซลล์เป้าหมาย และ เซลล์ WIL2-S (ATCC[®] CRL-8885TM) เป็น non-specific cell

3. อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมี ได้แก่ RPMI 1640 medium (Cat.no. A10491-01, GibcoTM), Heat-inactivated fetal bovine serum (Cat. No. SH30070.03, HycloneTM), Penicillin-Streptomycin (10,000 unit/ml) (Cat. no. 15140-122, GibcoTM), Recombinant human tumor necrosis factor-alpha (Cat. No. 210-TA-020/CF, R&D systems®), 0.4% Trypan blue (Cat. No. T8154, Sigma Aldrich®), Caspase-Glo® 3/7 assay (Cat.no. G8091, Promega®)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่ เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์รุ่น SpectraMax iD5 (Molecular devices®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล SoftMax®Pro version 7.1 ตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์อุณหภูมิ 37+1 °C รุ่น BINDER® CB170 (BINDER®, Germany) เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ เพลทเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขากันใส ชนิด 96 หลุม (96-wells flat tissue culture plate, Corning®, USA) สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) (MARIENFELD®, Germany)

ขั้นตอนดำเนินการ

1. หาค่าความแรงของยาในการยับยั้งการทำงานของ TNF- α ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของยาโดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมายเนื่องจาก TNF- α เป็นไซโตไคน์ที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ แล้วกระตุ้นให้เซลล์ U-937 เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านกลไกการทำงานของเอนไซม์

caspase ดังนั้น ตัวอย่างยาและสารมาตรฐานที่เตรียมให้มีความเข้มข้นของโปรตีนยาเท่ากัน ทำปฏิกิริยากับ TNF- α ที่ความเข้มข้นคงที่ ส่งผลให้ TNF- α ถูกยับยั้งตามระดับความเข้มข้นของยา เมื่อเติมเซลล์ U-937 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยการตรวจหา caspase 3/7 activity โดยใช้ยาสำเร็จรูป Caspase-Glo®3/7 ซึ่งทำปฏิกิริยาภายในเซลล์แล้วแสดงออกเป็นพลังงาน luminescence ทำการวัดค่าสัญญาณ luminescence ที่เกิดขึ้น โดยค่าสัญญาณจะมีค่าผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของยา คำนวณค่าความแรงเป็นร้อยละของความแรงสัมพัทธ์ของยา (%relative potency) เทียบกับสารมาตรฐานหรือยาอ้างอิง โดยใช้ parallel line analysis ตามสมการ 4-parameter logistic regression โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SoftMax®Pro และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในปัจจัยต่าง ๆ เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความเหมาะสม และน่าเชื่อถือ ที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานตามหลักเกณฑ์มาตรฐานสากล

2. วิธีตรวจสอบความแรง โดยเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างยาอะดาลิมุแมบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 1.75-fold serial dilution ให้ได้ 12 ความเข้มข้น คือ 1,200 – 2.55 ng/ml (ความเข้มข้นสุทธิ 300-0.64 ng/ml) ดูดสารมาตรฐานและตัวอย่างยา ใส่เพลทเพาะเลี้ยงเซลล์สี่ขากันใส ชนิด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 25 μ l ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วเติมสารละลาย TNF- α

ที่ความเข้มข้น 12 ng/ml ปริมาตร 25 μ l ทุกหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม เซลล์ U-937 ที่นับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น เซลล์ 2.0×10^5 cells/ml ทุกหลุม หลุมละ 50 μ l นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติม Caspase-Glo® 3/7 ปริมาตร 100 μ l ทุกหลุม เขย่าเพลาเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยป้องกันการโดนแสงสว่าง เมื่อครบเวลาทำการอ่านค่า luminescence ด้วย เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์รุ่น SpectraMax iD5 วิเคราะห์ค่าความแรงด้วยโปรแกรม SoftMax®Pro โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณ luminescence ที่วัดได้กับความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยา ในแต่ละระดับความเจือจาง (300-0.64 ng/ml) โดยใช้สมการ 4-parameter logistic regression และคำนวณค่าความแรงสัมพัทธ์ (relative potency) ของยาเทียบกับสารมาตรฐานด้วย parallel line analysis โดยค่าร้อยละความแรงสัมพัทธ์มีค่าอยู่ในช่วง 80-125%

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) 9-10

3.1 การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) ของตัวอย่างยาอะดาลิฟูแมบในการยับยั้ง TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ของเซลล์เป้าหมาย โดยการตรวจสอบค่าความแรงของยาอะดาลิฟูแมบ และยาทราสทูซูแมบภายใต้วิธี และสภาวะเดียวกัน

แล้วทดสอบความจำเพาะในการแสดงออก โดยใช้เซลล์ต่างชนิดกัน คือ U-937 และเซลล์ WIL2-S ผลการทดสอบต้องสามารถแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของยาต่อการ apoptosis ต่อเซลล์ U-937 ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย โดยแสดงความสัมพันธ์ของค่าสัญญาณ luminescence ตามระดับความเข้มข้นของยา (dose response) เป็น sigmoidal curve แต่จะไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในยาหรือเซลล์ชนิดอื่น

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) ทำการตรวจค่าความแรง โดยนักวิเคราะห์ 1 คน จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน และใช้ตัวอย่างยารุ่นการผลิตเดียวกัน แล้วนำค่าร้อยละความแรงสัมพัทธ์มาคำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean: GM) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation: GSD) และ ร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเรขาคณิต (Geometric Coefficient of Variation: %GCV) โดย %GCV ต้องมีค่าไม่เกิน 15% สำหรับการวิเคราะห์ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ (intermediate precision) ตรวจสอบความแรงโดยนักวิเคราะห์ 2 คน จำนวนคนละ 3 การทดสอบต่างวันกัน โดยใช้ตัวอย่างยารุ่นการผลิตเดียวกัน จากนั้นวิเคราะห์ค่า %GCV ซึ่งต้องมีค่าไม่เกิน 25% และไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ

4. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วง การทดสอบ (linearity and range) โดยประเมินความเป็นเชิงเส้นของตัวอย่างยาที่เจือจางให้มี

ความเข้มข้นสุทธิเท่ากับ 50% (150 ng/ml), 75% (225 ng/ml), 100% (300 ng/ml), 125% (375 ng/ml) และ 150% (450 ng/ml) แล้วเจือจางแบบ 1.75-fold serial dilutions โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง เป็นอิสระต่อกัน นำค่าความแรงที่วิเคราะห์ได้มาประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า %expected relative potency กับ %found mean relative potency ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of correlation; R^2) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95 และค่า %GCV ไม่เกิน 25%

5. การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีในการหาค่าความแรงของยาที่ความเข้มข้นสุทธิ 50%, 100% และ 150% โดยการคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) จากสมการ %recovery = (%found mean relative potency / %expected relative potency) x 100 โดยค่า %recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-125%

6. การทดสอบความคงทนของวิธี (robustness) ในการให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงการทดสอบที่แตกต่างไปจากเดิม คือ (1) Passage number ของเซลล์ U-937 ที่ต่างกันอย่างน้อย 5 passage number (2) ความเข้มข้นของเซลล์ U-937 ที่ 1.5×10^5 , 2.0×10^5 และ 2.5×10^5 cells/ml และ (3) ความแตกต่างของระยะเวลาในการบ่มหลังเติม Caspase-Glo® 3/7 คือ 45, 60 และ 75 นาที โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่า %GCV ต้องน้อยกว่า 25% และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความแรงโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปตามสมการ 4-parameter logistic regression ดังนี้

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

2. วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (GM) โดยใช้สูตรดังนี้

$$GM = \sqrt[n]{y_1 \times y_2 \times y_3 \dots y_N}$$

$$= \exp \left[\frac{\ln(y_1) + \dots + \ln(y_n)}{n} \right]$$

3. วิเคราะห์ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (GSD) โดยใช้สูตรดังนี้

$$GSD = \exp^{(SD(\ln(y_1), \ln(y_2), \ln(y_3), \dots, \ln(y_N)))}$$

4. วิเคราะห์ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเรขาคณิต (%GCV) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%GCV = \sqrt{\exp^{(\ln(GSD))^2} - 1} \times 100$$

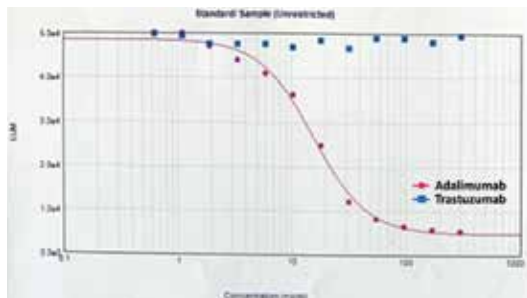
ผลการศึกษา

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

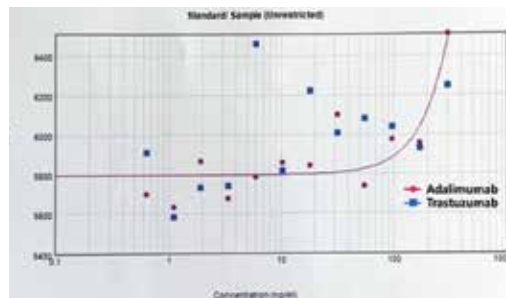
ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี พบว่าเฉพาะตัวอย่างอะดาลิฟูแมบที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ TNF- α ที่ส่งผลให้เกิด apoptosis ตามระดับความเข้มข้นของตัวอย่างยา โดยมีเซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ของค่า luminescence กับ dose response เป็น sigmoidal curve แต่

ไม่เกิดขึ้นในเซลล์ WIL2-S และ ยาพลาซามูแมบ
 ดังแสดงในรูปที่ 1 และการวิเคราะห์ค่า %relative
 potency ของยาอะดาลิอูแมบทั้ง 2 ยี่ห้อ พบว่า

มีค่าความแรงสัมพัทธ์เฉลี่ยคือ 104.63% และ
 103.86% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 80-125%
 ดังตารางที่ 1



(ก)



(ข)

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์การเกิด apoptosis ตามระดับความเข้มข้นของยาอะดาลิอูแมบ และยาพลาซามูแมบ
 โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย (ก) และ ใช้เซลล์ WIL2-S เป็นเซลล์เป้าหมาย (ข)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ยาอะดาลิอูแมบ 2 ยี่ห้อ

ตัวอย่าง	ขนาด	ครั้งที่	%Relative potency	GM	GSD	%GCV
A	40 mg/ 0.8 ml	1	100.60	104.63%	1.05	4.45
		2	103.70			
		3	109.80			
B	40 mg/ 0.8 ml	1	108.50	103.86%	1.07	6.33
		2	106.90			
		3	96.60			

ผลการทดสอบความเที่ยง (1) วิเคราะห์
 ซ้ำในวันเดียวกัน พบว่า ทั้ง 6 ซ้ำ มีค่า %relative
 potency อยู่ในช่วง 80-125% มีค่า GM เท่ากับ
 101.71% และ %GCV เท่ากับ 2.45% (2) วิเคราะห์
 ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ พบว่า การทดสอบ
 ต่างวันกันของนักวิเคราะห์แต่ละคนมีค่า %GCV
 เท่ากับ 4.45% และ 2.90% ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า

25% และการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของ
 ผลวิเคราะห์ค่าความแรงของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน
 ด้วย Independent-sample t-test พบว่า ไม่มี
 ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ
 เชื่อมั่น 95% ($p=0.99$) และมีค่า %GCV เท่ากับ
 3.36 ซึ่งน้อยกว่า 25% ดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความแรงภายในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน (repeatability)

ครั้งที่	% Relative potency (%)
1	102.20
2	100.70
3	105.60
4	99.10
5	99.40
6	103.40
GM	101.71
GSD	1.02
%GCV	2.45

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแรง โดยนักวิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ครั้ง ต่างวันกัน (intermediate precision)

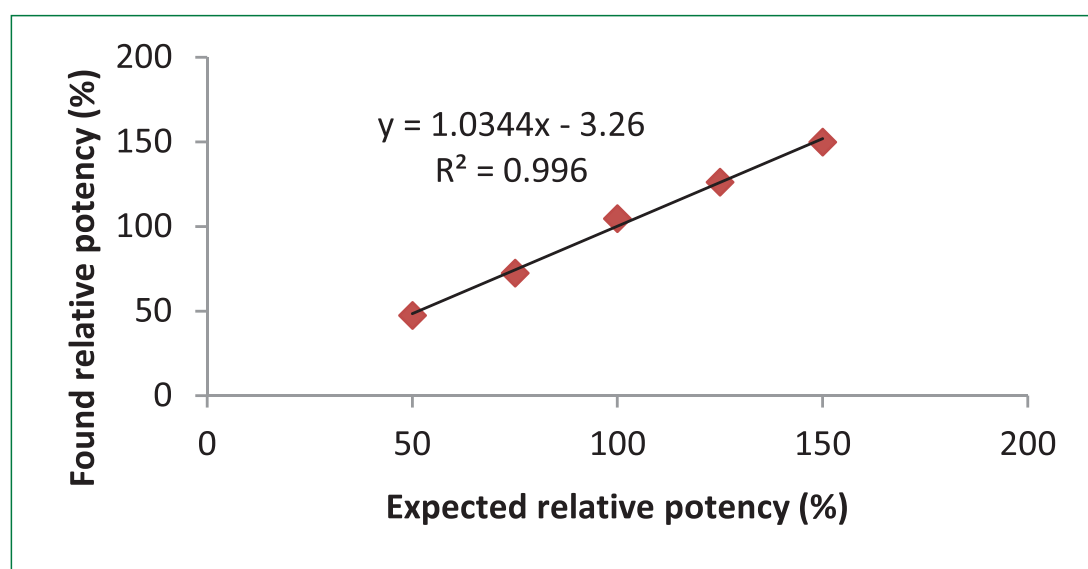
นักวิเคราะห์	ครั้งที่	%Relative potency (%)	GM	GSD	%GCV
คนที่ 1	1	100.60	104.63	1.05	4.45
	2	103.70			
	3	109.80			
คนที่ 2	1	102.90	104.64	1.03	2.90
	2	102.90			
	3	108.20			
GM (n=6)		104.63			
GSD (n=6)		1.03			
%GCV (n=6)		3.36			

ผลการทดสอบความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรง และช่วงการทดสอบ ในการหาค่าความแรงตามช่วง การทดสอบที่ให้ค่ามีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็น เส้นตรง โดยผลวิเคราะห์ค่าความแรงสัมพัทธ์เทียบกับ สารมาตรฐานของตัวอย่างยาอะคาลิมูแมบที่เจือจาง ให้มีความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยาเท่ากับ 50%, 75%, 100%, 125% และ 150% พบว่า ค่าความแรง ที่วิเคราะห์ได้แปรผันตามระดับความเข้มข้นของยา โดยมีค่า %GCV เท่ากับ 3.00-8.22% ผ่านเกณฑ์

ที่กำหนดว่าต้องน้อยกว่า 25% และมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 80-125% ตามตารางที่ 4 และจากกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างค่า %expected relative potency กับ %found mean relative potency พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นตรง มีแนวโน้ม ไปในทิศทางเดียวกันตลอดช่วงค่า relative potency 50-150% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย linear regression มีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ $R^2 = 0.996$ ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบค่าความแรงที่ความเข้มข้น 50 - 150% ทำการทดสอบ 3 ครั้ง เป็นอิสระต่อกัน

ครั้งที่	Expected relative potency (%)				
	50	75	100	125	150
1	46.10	67.70	100.60	125.50	144.70
2	50.00	72.90	103.70	122.80	164.80
3	46.50	77.60	109.80	130.30	141.60
GM	47.50	72.62	104.63	126.16	150.02
GSD	1.05	1.07	1.05	1.03	1.09
%GCV	4.46	6.84	4.45	3.00	8.22
%recovery	95.00	96.83	104.63	100.93	100.01



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง expected relative potency (%) และค่า found mean relative potency (%)

ผลการทดสอบความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ เช่น การเปลี่ยน passage number ของเซลล์เพาะเลี้ยง การเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่ม และการเปลี่ยนปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ครั้ง อิสระต่อกัน พบว่า ทุกปัจจัยที่ทำการศึกษามีการวิเคราะห์ค่าความแรงอยู่ในช่วง 80-125% มีค่า %GCV น้อยกว่า 25%

และไม่มีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย ANOVA: Single factor สอดคล้องกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่ศึกษาไม่มีผลกระทบต่อวิธีการวิเคราะห์ค่าความแรง ดังนั้นวิธีตรวจสอบค่าความแรงดังกล่าวมีความคงทน ให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี

การเปลี่ยนแปลงสภาวะ ของการทดสอบ		%Relative potency	GM	GSD	%GCV	GM (n=9)	GSD (n=9)	%GCV (n=9)	ANOVA, α=0.05	
Passage No.	# 6	117.00	112.25	1.04	3.62	3103.28	1.10	9.57	p=0.09	
		109.40								
		110.50								
	# 13	102.20	102.81	1.02	2.43					
		100.70								
		105.60								
	# 20	109.80	95.45	1.13	12.21					
		88.20								
		89.80								
ปริมาณเซลล์ U-937 (cells/ml)	1.5 x10 ⁵	112.00	103.52	1.07	7.13	104.82	1.07	6.51	p=0.90	
		97.50								
		101.60								
	2.0 x10 ⁵	117.00	106.35	1.09	8.32					
		100.60								
		102.20								
	2.5 x10 ⁵	109.70	104.62	1.07	6.62					
		97.00								
		107.60								
ระยะเวลาในการบ่มหลังเติม Caspase-Glo®3/7 (นาที่)	45	108.80	105.31	1.07	6.80	103.88	1.06	5.74	p=0.87	
		110.20								
		97.40								
	60	108.50	103.86	1.07	6.33					
		106.90								
		96.60								
	75	106.00								
		106.60								
		95.30								

อภิปรายผล

การประเมินคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยากลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการตรวจสอบค่าความแรงด้วยวิธี bioassay เป็นวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่อาศัยการจำลองกลไกการออกฤทธิ์ของยา ได้แก่ CDC, ADCC, binding, apoptosis เป็นต้น สำหรับยาอะดาลิอูแมบ ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มยับยั้งการทำงานของ TNF- α เช่นเดียวกับยา Golimumab, Infliximab, Certolizumab และ Etanercept กลไกการออกฤทธิ์สามารถออกฤทธิ์ได้หลายกลไกทำงานร่วมกันเพื่อลดอาการเจ็บปวด หรืออักเสบที่เกิดจาก TNF- α ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐานสากลในตรวจสอบความแรงในตำรายาสากล การศึกษานี้จึงได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบความแรงของยาอะดาลิอูแมบโดยอาศัยเทคนิค apoptosis มาประเมินคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยพบว่า วิธีมีความสามารถในการตรวจสอบโดยแสดงค่า %relative potency อยู่ในช่วง 80-125%เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด มีความจำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของ TNF- α โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย มีความเที่ยงสูง เมื่อทำการทดสอบซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) หรือต่างวัน (intermediate precision) หรือแม้แต่ต่างนักวิเคราะห์ โดยมีค่า %GCV น้อยกว่า 10% วิธีสามารถตรวจสอบความแรงได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เจือจาง ความเข้มข้นของโปรตีนยาที่ความเข้มข้น 50-150%

เทียบกับสารมาตรฐาน โดยผลทดสอบพบว่า มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 80-125% และมีค่า %GCV อยู่ในช่วง 3.00-8.22 ซึ่งอยู่ภายใต้เกณฑ์ที่กำหนดคือไม่เกิน 25% และมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจสูงกว่า 0.95

นอกจากนี้วิธียังมีความคงทนให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบ คือ การเปลี่ยน passage no. ของเซลล์ U-937 การเปลี่ยนปริมาณเซลล์ U-937 ที่ใช้ และการเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มหลังเติม Caspase-Glo[®]3/7 พบว่า มีค่า %GCV ต่ำกว่า 13% และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการทดสอบในตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ พบว่า มีค่าความแรงอยู่ในช่วง 80-125% สอดคล้องกับเกณฑ์ที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ โดยการทดสอบความถูกต้องของวิธีครั้งนี้ใช้สารมาตรฐานสากลที่ผลิตจาก The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ผลิตสารมาตรฐานให้กับ World Health Organization (WHO) คือ adalimumab (WHO 1st International Standard, Code 17/236)4 เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณค่าความแรงสัมพัทธ์โดยสมการ 4-parameter logistic regression ซึ่งสารมาตรฐานดังกล่าวผ่านการกำหนดค่าความแรงร่วมกันจาก 26 ห้องปฏิบัติการทั่วโลก โดยแต่ละห้องปฏิบัติการจะใช่วิธีที่แตกต่างกัน เช่น CDC, ADCC, reporter gene binding, ELISA และ apoptosis4

เพราะฉะนั้น การทดสอบความถูกต้องของวิธีในครั้งนี้ มีความน่าเชื่อถือ ให้ผลสอดคล้องและสามารถเทียบเคียงห้วงปฏิบัติการอื่น ๆ ได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจสอบค่าความแรงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อประเมินคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการควบคุมคุณภาพยาอะดาลิμουแมบควบคู่กับการควบคุมคุณภาพด้านเคมี-ฟิสิกส์ ในผลิตภัณฑ์ยาอะดาลิμουแมบทั้งที่ผลิตในรูปแบบยาใหม่หรือจะผลิตในรูปแบบยาคัดลอกในอนาคต เพื่อให้ประชาชนที่ได้รับยาที่มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย

สรุปผล

จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอะดาลิμουแมบ โดยการตรวจหาความแรงด้วยเทคนิค apoptosis โดยใช้เซลล์ U-937 เป็นเซลล์เป้าหมาย พบว่า เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดในทุกพารามิเตอร์ แสดงว่าวิธีมีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ยาอะดาลิμουแมบที่ขึ้นทะเบียนยาก่อนการจำหน่าย ทั้งในรูปแบบยาใหม่และยาคัดลอกในประเทศไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขที่สนับสนุนงบประมาณให้การศึกษาสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. ŽIGON-BRANC, Sara; BARLIČ, Ariana; JERAS, Matjaž. in vitro cell-based assays for potency testing of anti-TNF- α biological Drugs. In: Cytokines. IntechOpen, 2019.
2. Focosi D., Maggi F., Pistello M., Boggi U., Scatena F. Immunosuppressive monoclonal antibodies: current and next generation. Clinical microbiology and infection 2011;17(12): 1759 - 68.
3. GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative. Biosimilars of adalimumab [Internet]. Mol, Belgium: Pro Pharma Communications International; [cited 2022 Jan 12] Available from: <https://gabionline.net/biosimilars/general/Biosimilars-of-adalimumab>
4. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Report on a Collaborative Study for Proposed Candidate 1st International Standard for Adalimumab. World Health Organization; WHO/BS/2019.2365.
5. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือและหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilars) [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: อักษรกราฟฟิกแอนด์ดีไซน์; 2561 [เข้าถึงเมื่อ 23 ก.พ. 2563]. 125 หน้า. เข้าถึงได้จาก:<http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/Biosimilars/Biosimilar.pdf>

6. สุชาติ จองประเสริฐ. ยาชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilars) ในบริบทสาธารณสุข. วารสารอาหารและยา 2557; 21(1): 9-14.
7. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Annex 2: Guideline on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO technical report series No. 977. World Health Organization 2013: 51-89.
8. Yang H, Kim HJ, Zhang L, Strouse RJ, Schenerman M, Jiang X. Implementation of parallelism testing for four-parameter logistic model in bioassays. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2012; 66(3): 262-69.
9. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (CPMP/ICH/381/95) [Internet]. 1995 [cited 2021 Jun 19]. 15 p. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
10. United States Pharmacopeia (2022). General Chapter, <1033> Biological Assay Validation. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M912_01_01