

การประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง

โสम्मริสา พวงพรศรี อัจจรรย์ อาเมน ปัทมา บุณนาค จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ ชาญวิทย์ ชูแก้ว
และ ไพศาล พังจันทน์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ Factor VIII เป็นยาชีววัตถุสำหรับรักษาโรคฮีโมฟีเลีย ชนิดเอ โดยปริมาณยาที่ฉีดให้ผู้ป่วยขึ้นกับระดับความรุนแรงและความเข้มข้นที่ระบุบนขวดยา ในการทดสอบความแรงโดยวิธีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงจะทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นที่มีหน่วยเป็น international units (IU) ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งที่ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII ผลการประเมินสารมาตรฐานอ้างอิง Factor VIII แบบผงแห้งดังกล่าว พบว่ามีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนการแบ่งบรรจุเท่ากับ 0.18 ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 16.26 IU/ขวด และค่าร้อยละความชื้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.77 ผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันไม่มีความแตกต่าง และมีลักษณะทางกายภาพและความสามารถละลายที่ดี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.517 การศึกษาความคงตัวแบบ long term เก็บรักษาในสภาวะปกติอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 150 วัน ค่าความแรงไม่ลดลง การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งพบลักษณะทางกายภาพและค่าความเป็นกรด-ด่างปกติ มีค่าร้อยละความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส และความแรงที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าลดลงในวันที่ 3 และ 7 ดังนั้น Factor VIII ชนิดผงแห้ง สามารถใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ได้ โดยมีการนำมาทดสอบค่าความแรงทุก 6 เดือน เพื่อติดตามประสิทธิภาพความคงตัว

คำสำคัญ: สารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง, ความแรง, ความคงตัว

Corresponding E-mail: soammarisa.p@dmsc.mail.go.th

Received: 18 February 2022

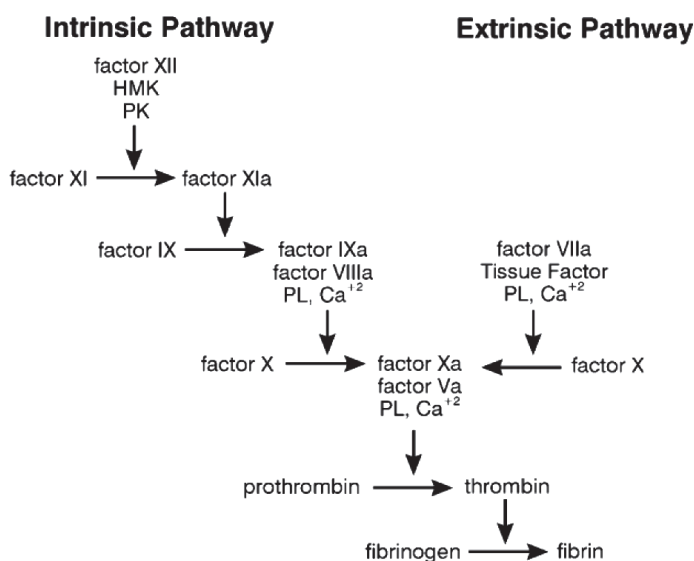
Revised: 11 May 2022

Accepted: 31 May 2022

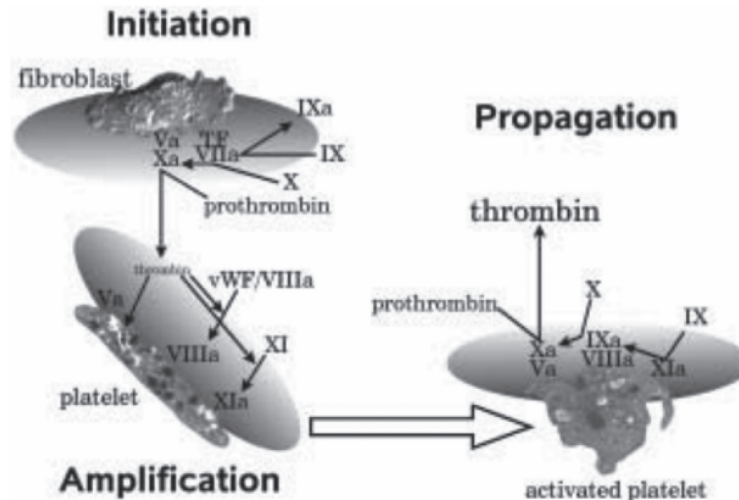
บทนำ

กระบวนการแข็งตัวของเลือดเป็นกลไกสำคัญเพื่อลดการเสียเลือดเมื่อเกิดบาดแผล มีกลไกที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ หลอดเลือด เกิดเลือด และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (factor) การกระตุ้นกระบวนการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมีความซับซ้อน ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดส่วนใหญ่ถูกสร้างในรูป inactive form ได้แก่ Factor II, VII, IX, X, XI, XII และ prekallikrein เมื่อมีการบาดเจ็บของผนังหลอดเลือดจะมีการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือด โดยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดจะเปลี่ยนรูปเป็น active form เพื่อกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดตัวต่อไป ทำให้ cofactor อื่นๆ เริ่มทำงาน ได้แก่ tissue factor (TF), Ca^{2+} , Factor V และ VIII ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพของกลไกการเกิดลิ่มเลือดจนสุดท้ายทำให้ fibrinogen เปลี่ยนเป็น fibrin เกิดเป็นลิ่มเลือดที่บริเวณบาดแผล จากการศึกษาที่ผ่านมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 พบว่ากลไกการแข็งตัวของเลือดอธิบายผ่านกลไกที่เรียกว่า cascade model⁽¹⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยเชื่อว่าเป็นการกระตุ้นผ่าน intrinsic pathway และ extrinsic pathway ซึ่งทั้งสองส่วนทำงานร่วมกันกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน common pathway ได้เป็น fibrin clot มีการ

ศึกษาต่อมาพบว่ารูปแบบนี้มีข้อบกพร่องโดยไม่สามารถอธิบายพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจริงบางอย่าง เช่น ไม่พบว่ามีภาวะเลือดออกผิดปกติในผู้ที่ขาด contact factor ตั้งแต่กำเนิด จึงนำไปสู่แนวคิดใหม่ของกลไกการแข็งตัวของเลือดที่เรียกว่า cell-based model coagulation ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งกระบวนการกระตุ้นการเกิดลิ่มเลือดจะเกิดบนผิวเซลล์เป็นหลัก โดยแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ 1) initiation phase เมื่อเกิดบาดแผล TF จะกระตุ้น Factor VII เกิดเป็น Factor VIIa (active)/TF complex ที่จะกระตุ้นเปลี่ยน Factor X เป็น Xa ซึ่ง Factor Xa จะเปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin ในปริมาณน้อยๆ 2) ระยะ amplification phase ปริมาณ thrombin จากระยะที่ 1 จะกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดชนิด Factor V, VIII, XI และ XIII ให้อยู่ในรูป active form ที่สามารถเปลี่ยน Factor IX เป็น IX ที่ active และเกิดการขยายสัญญาณการกระตุ้นการเกิดลิ่มเลือดให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ 3) propagation phase เป็นการทำงานร่วมกันของ Factor IXa และ VIIIa ทำหน้าที่กระตุ้นเปลี่ยน factor X ให้ active สามารถเปลี่ยน prothrombin ให้เป็น thrombin ได้ปริมาณมากๆ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น fibrinogen ในท้ายที่สุด



ภาพที่ 1 การกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดแบบ cascade model แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ intrinsic pathway, extrinsic pathway และ common pathway⁽¹⁾



ภาพที่ 2 การกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดแบบ cell-based model ประกอบด้วยการทำงานต่อเนื่องกัน 3 ระยะ คือ initiation phase, amplification phase และ propagation phase⁽¹⁾

โรคฮีโมฟีเลีย คือ โรคเลือดออกไหลไม่หยุดหรือเลือดออกง่ายหยุดยาก เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน โรคฮีโมฟีเลียมี 2 ชนิด คือ ฮีโมฟีเลีย A เกิดจากการขาดโปรตีน Factor VIII และ ฮีโมฟีเลีย B เกิดจากการขาดโปรตีน Factor IX สาเหตุของโรคฮีโมฟีเลียเกิดจากความผิดปกติบนโครโมโซมเพศชนิด X ทำให้มักเกิดโรคในเพศชาย และเป็นยีนแฝงในเพศหญิงทำให้โรคสามารถถ่ายทอดความผิดปกติให้บุตรเพศชายได้ อุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทยเท่ากับ 1 ต่อ 13,000–20,000 ของประชากร และช่วงอายุผู้ป่วยที่พบมากที่สุด คือ เด็กเล็กอายุน้อยกว่า 2 ปี อาการของโรคจะมีเลือดออกง่าย โดยอาการจะเป็นๆ หายๆ ตั้งแต่เด็ก รวมถึงอาการฟกช้ำ เลือดออกในกล้ามเนื้อและข้อต่อ อาการเลือดออกที่คงอยู่นานหลังการบาดเจ็บเล็กน้อยหรือการผ่าตัด และอาจรุนแรงหากมีเลือดออกในอวัยวะที่สำคัญ เช่น ที่สมอง การวินิจฉัยโดยสังเกตจากอาการ การเจาะเลือดตรวจระดับ Factor VIII และการตรวจชิ้นเนื้อรกหรือการเจาะน้ำคร่ำในระหว่างตั้งครรภ์ ความรุนแรงของโรคสามารถแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ความรุนแรงมาก พบปัจจัยการแข็งตัวของเลือดน้อยกว่า 1% มีโอกาสเลือดออกได้เองหรือเลือดออกภายหลังบาดเจ็บเล็กน้อย ความรุนแรงปานกลาง พบปัจจัยการแข็งตัวของเลือด 1–5% จะมีเลือดออกเมื่อกระทบหรือเกิดการลิ่ม ความรุนแรงน้อย พบปัจจัยการแข็งตัวของ

เลือด 5–40% จะมีเลือดออกมากเมื่อเกิดการบาดเจ็บรุนแรง โรคฮีโมฟีเลียไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การรักษาโรคฮีโมฟีเลียทำได้โดยการให้ factor ซึ่งช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น มี 2 รูปแบบ คือ การให้แบบตามอาการ เป็นการให้เมื่อผู้ป่วยได้รับอุบัติเหตุหรือมีเลือดออกจากการกระทบ และการให้แบบป้องกัน เป็นการให้สม่ำเสมอเป็นประจำแม้จะไม่มีอาการ เช่น สัปดาห์ละครั้ง ปริมาณยาที่ให้ผู้ป่วยกำหนดตามความรุนแรงของโรคฮีโมฟีเลีย ซึ่งคำนวณจากปริมาณ Factor VIII ที่ระบุบนขวดยา⁽²⁾

ผลิตภัณฑ์ Factor VIII เป็นยาชีววัตถุ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามวิธีการผลิต คือ ชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์ เป็นการนำเลือดที่ได้รับจากการบริจาค นำมาปั่นเก็บพลาสมาและผ่านกระบวนการผลิต โดยแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการด้วยกระบวนการตกตะกอนโดยการเติมสารเคมี ส่วนอีกชนิดคือ recombinant Factor VIII มีกระบวนการผลิตด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพ เป็นการตัดต่อยีนเข้าไปในเวกเตอร์แล้วนำเข้าไปในเซลล์สิ่งมีชีวิตเพื่อให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ สถาบันชีววัตถุเป็นหน่วยงานภาครัฐทำหน้าที่ควบคุมกำกับยาชีววัตถุที่ใช้ภายในประเทศ การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย การทดสอบลักษณะทางกายภาพ เคมี ความปลอดภัย และความแรง สำหรับการทดสอบความแรง

โดยวิธีตามมาตรฐานสากล European Pharmacopoeia⁽³⁾ จะใช้วิธี chromogenic assay ซึ่งเป็นการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบค่าความแรงแล้ววิเคราะห์รายงานค่าความแรงที่มีหน่วยเป็น international unit (IU) ซึ่งสารมาตรฐาน Factor VIII ที่ใช้สำหรับงานทดสอบความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII นั้นจะได้รับการสนับสนุนโดยการสั่งซื้อจาก National Institute of Biological Standard and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร แต่เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ทั่วโลก NIBSC จึงจำกัดจำนวนการสั่งซื้อ ทำให้มีโอกาสน้อยที่จะเพียงพอต่อการใช้งาน อีกทั้ง Factor VIII เป็นชีวโมเลกุลที่มีความซับซ้อนและมีความคงตัวต่ำเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น pH หรือ อุณหภูมิ⁽⁴⁾ ดังนั้นเมื่อเปิดใช้งานละลายผงแห้งแล้วไม่สามารถแบ่งเก็บเพื่อนำมาทดสอบซ้ำได้อีก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งที่ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII ที่ใช้ในประเทศ

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี ตัวอย่าง ชุดนํ้ายาทดสอบ

สารอ้างอิง WHO International Standard 8th INTERNATIONAL STANDARD FACTOR VIII CONCENTRATE NIBSC code: 07/350, ชุดทดสอบ HemosIL Electrachrome Factor VIII (บริษัท Instrumentation Laboratory, USA), ผลิตภัณฑ์ FACTOR VIII TRCS 500 ผลิตโดยศูนย์ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมา สภาอากาศไทย, formulation buffer (2X) ประกอบด้วย 50 mM Tris buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% w/v trehalose และ 1% human albumin, fluid thioglycollate broth, tryptic soy broth

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ควมคุมอุณหภูมิ รุ่น Axio LabA1 (บริษัท Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany),

เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง รุ่น LyoLab (บริษัท Lyophilization Systems Inc., USA), เครื่องวิเคราะห์ไอออน รุ่น EA940 (บริษัท Orion Inc., USA), เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณน้ำแบบคาร์ลฟิชเชอร์ รุ่น 852 Titrando (บริษัท Metrohm, Switzerland), เครื่อง Microplate reader รุ่น ELx808 (บริษัท BioTek Instruments, USA), เครื่องทดสอบความปราศจากเชื้อ SteritestTM Compact (บริษัท Merck, Germany), และชุดกรองทดสอบความปราศจากเชื้อ Steritest canister (บริษัท Merck, Germany)

การเตรียม Factor VIII และการบรรจุ

ผลิตภัณฑ์ FACTOR VIII ขนาด 500 IU ได้รับจากศูนย์ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมา สภาอากาศไทย แล้วนำมาเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII 80 IU/มิลลิลิตรด้วย formulation buffer แบ่งบรรจุปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (40 IU/ขวด) ลงขวดแก้ว (borosilicate glass type I) ขณะบรรจุให้ผสมโดยใช้แท่งเหล็กกวนตลอดเวลา ปิดจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายในห้องปลอดเชื้อ

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง การศึกษาหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ผ่านมาของการเตรียมสารมาตรฐานแบบแห้งของสถาบันชีววัตถุ^(5,6) ทำโดยตั้งค่าโปรแกรมการทำแห้งของเครื่องดังนี้ กำหนดค่าอุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเยือกแข็ง (freeze) โดยสมบูรณ์ ในชั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำแห้ง (primary drying process) เพิ่มอุณหภูมิจาก -60 เป็น -40 องศาเซลเซียส และกำหนดความดันที่ 100 mTorr เป็นเวลา 63 ชั่วโมง จากนั้นขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำแห้ง (secondary drying process) ปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส ความดันเท่าเดิม นาน 14 ชั่วโมง สารมาตรฐาน Factor VIII ที่เตรียมเสร็จแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส การนำมาศึกษาคุณภาพให้ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (water for injection, WFI)

วิธีวิเคราะห์ความแรง chromogenic assay

การวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ HemosIL Elettachrome Factor VIII โดยนำ factor reagent และ chromogenic substrate ที่เตรียมมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนเริ่มการทดสอบ เจือจางสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของชุดทดสอบ เป็น 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.000625, 0.00125, 0.0025 และ 0.005 IU/มิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงใน 96 well cell culture plate บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เติม factor reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลาเติม chromogenic substrate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 20% acetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ลบด้วยค่า 490 นาโนเมตร ตามที่ระบุไว้ในคู่มือชุดทดสอบ โดยกลุ่มควบคุมเติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนการเติมสารละลายตัวอย่าง ทดสอบความแรงใช้ตัวอย่าง 2 ขวด ทำ 2 ซ้ำ แบบเป็นอิสระต่อกัน คำนวณค่าความแรงเทียบกับสารอ้างอิงด้วยโปรแกรม parallel line analysis

การประเมินประสิทธิภาพ

ก่อนการทำแห้ง

สุ่มชั่งน้ำหนักขวดก่อนและหลังบรรจุตัวอย่างช่วงเริ่ม ช่วงกลาง และช่วงปลายของการบรรจุ จำนวน 10 ขวด เพื่อหาน้ำหนักการแบ่งบรรจุและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation, %CV) ของการแบ่งบรรจุ

หลังการทำแห้ง

การทดสอบความแรง

นำสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด ทดสอบความแรง วิเคราะห์ค่า Geomean เพื่อรายงานเป็นค่าความแรงของสารมาตรฐานที่เตรียมได้ โดยค่า %CV ไม่ควรมากกว่า 10%

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

สุ่มเก็บสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด ทดสอบความแรง ขวดละ 2 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน

การทดสอบทางกายภาพ การละลาย ความเป็นกรด-ด่าง

สุ่มสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด โดยวางที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องสำหรับตรวจทางกายภาพ ซึ่งมีแสงสว่างอยู่ในช่วง 2,000–3,750 ลักซ์ โดยค่อยๆ หมุนขวดและสังเกตลักษณะของตัวอย่างในบริเวณจากหลังสีขาว 5 วินาที และบริเวณจากหลังสีดำ 5 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างขวดเดิมตรวจความสามารถในการละลาย โดยใช้ไซริงค์ตัดหัวเข็ม ดูดน้ำ WFI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดลงในขวดตัวอย่าง แล้วจดบันทึกเวลาที่ใช้ในการละลาย สำหรับการทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง นำตัวอย่างที่ผ่านการตรวจการละลายจำนวน 3 ขวด pooled รวมกันแล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

การทดสอบหาปริมาณความชื้น

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำด้วยวิธี volumetric Karl-Fischer เป็นวิธีการไตเตรทน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง ทำปฏิกิริยาระหว่าง HYDRANAL-Composite 5 ซึ่งเป็นสารไทแทนท์ บันทึกค่า KFR (Karl-Fischer reagent mg/mL) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำโดยเทียบค่าอ้างอิง KFR ของน้ำ standardization water for injection ที่มีค่า 100% ทำการวิเคราะห์ 3 ขวด

การทดสอบความปราศจากเชื้อ

นำสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 4 ขวดวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อโดยวิธี membrane filtration

เกณฑ์ยอมรับการประเมินการบรรจุ %CV ใช้เกณฑ์กำหนดของ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ที่กำหนดไว้ไม่เกิน 1% สำหรับสารที่มีความหนืด เกณฑ์พารามิเตอร์อื่นๆ ใช้เกณฑ์ข้อมูลมาตรฐานการควบคุมคุณภาพของชีววัตถุแบบผงแห้ง ได้แก่ ความสามารถในการละลายเฉลี่ยตามเกณฑ์กำหนดควรน้อยกว่า 3 นาที⁽⁷⁾ การทดสอบ

ความเป็นกรด-ด่าง ควรอยู่ระหว่าง 6–8.5 ค่าความชื้นของชีววัตถุผงแห้งทั่วไปที่ใช้สำหรับฉีดในคนกำหนดไว้ไม่เกินร้อยละ 3⁽⁸⁾

การศึกษาความคงตัว

ความคงตัวในสภาวะปกติ long term stability study เก็บ Factor VIII ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 150 วัน เมื่อครบเวลานำตัวอย่างตรวจความแรง ลักษณะทางกายภาพ ความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือ

ความคงตัวในสภาวะเร่ง accelerated stability study เก็บ Factor VIII ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน เมื่อครบเวลานำตัวอย่างตรวจความแรง ลักษณะทางกายภาพ ความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือ

ผล

จากการผลิต Factor VIII พบว่าได้จำนวนสารมาตรฐาน Factor VIII ที่เตรียมเป็นผงแห้ง จำนวน

289 ขวด โดยในขั้นตอนหลังแบ่งบรรจุได้ประเมินประสิทธิภาพความสม่ำเสมอของการบรรจุ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารที่บรรจุเท่ากับ 0.516 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.001 และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุเท่ากับ 0.18 แล้วนำไปประเมินหลังการทำแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง ความเป็นเนื้อเดียวกัน ลักษณะทางกายภาพ และความคงตัว

ค่าความแรงของสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง เป็นตัวแปรสำคัญที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารมาตรฐาน ผลวิเคราะห์ค่าความแรงต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 14.6–17.9 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.26 IU/ขวด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.13 %CV เท่ากับ 6.90 ดังแสดงในตารางที่ 1

จากผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าสารมาตรฐาน จำนวน 289 ขวด มีผลค่าความแรงไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p = 0.058$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแรงสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง

การทดสอบ	ค่าความแรง (IU/ขวด)
1	17.1
2	16.7
3	17.1
4	17.0
5	17.9
6	16.9
7	14.6
8	15.6
9	15.2
10	14.9
Geomean	16.26
SD	1.13
%CV	6.90

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/ขวด)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	15.1	14.9	13.4	16.9	15.9	14.4	14.8	15.9	15	15.2
2	14.0	13.4	15.2	16.9	16.1	15.8	14.4	15.2	15.4	14.6
Geomean	14.54	14.13	14.27	16.90	16.00	15.08	14.60	15.55	15.20	14.90

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหลังการทำแห้งพบว่า ได้ค่าร้อยละความชื้นต่ำสุดเท่ากับ 1.70 และสูงสุด 1.88 คิดเป็นค่าร้อยละเฉลี่ยเท่ากับ 1.77 ดังแสดงในตารางที่ 3 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ พบว่ามีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อนำมาละลายด้วย

WFI สามารถละลายได้ทันทีโดยไม่ต้องเขย่า มีค่าการละลายอยู่ในช่วง 16–18 วินาที ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.64 วินาที เมื่อนำตัวอย่างที่ละลายแล้วมาทดสอบความเป็นกรด-ด่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 8.51–8.52 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.517 การทดสอบความปราศจากเชื้อ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารมาตรฐาน Factor VIII หลังการทำแห้ง

	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของการแบ่งบรรจุ (%CV) (n = 10)	การละลาย (วินาที) (n = 6)	pH (n = 3)	ความชื้น (%) (n = 3)	ความปราศจากเชื้อ (n = 4)
Geomean	0.516	17.64	8.517	1.77	ไม่พบ
SD	0.001	1.03	0.006	0.098	
%CV	0.18	5.85	0.068	5.54	



ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว

การศึกษาความคงตัวในสภาวะปกติที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เมื่อนำ Factor VIII ออกจากเครื่องทำแห้งและทำการทดสอบโดยนับเป็นวันที่ 0 ของการศึกษาความคงตัว ผลการทดสอบพบลักษณะทางกายภาพปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดสอบค่าความแรงมีแนวโน้มไม่ลดลง ค่าความแรงระยะเวลาที่ 0, 1, 3, 7 และ 150 วัน เท่ากับ 15.29, 15.53, 17.58, 19.33

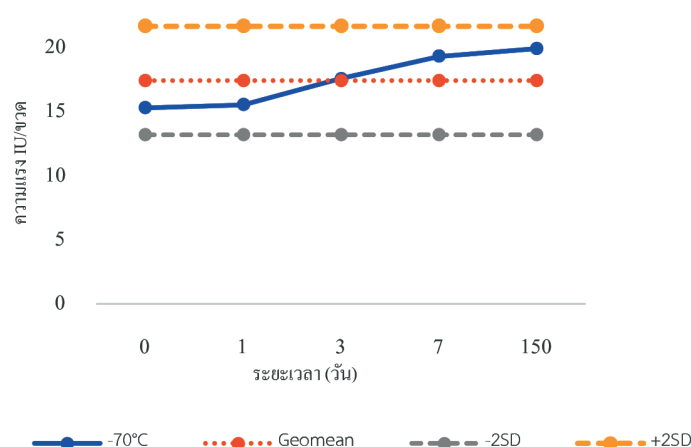
และ 19.92 IU/ขวด ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย $\pm 2SD$ เท่ากับ 17.43 ± 4.23 ดังแสดงในภาพที่ 4

การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง เมื่อนำสารมาตรฐาน Factor VIII เก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติ คือ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความคงตัวในสภาวะปกติ (-70 องศาเซลเซียส)

การทดสอบ	ระยะเวลา (วัน)				
	0	1	3	7	150
ลักษณะทางกายภาพ	P	P	P	P	P
ความเป็นกรด-ด่าง	8.56	8.51	8.52	8.30	8.54
ความชื้น (%)	1.77	2.06	1.83	ND	ND
ความแรง (IU/ขวด)	15.29	15.53	17.58	19.33	19.92

ND = not done, P = มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น



ภาพที่ 4 ผลทดสอบค่าความแรงในสภาวะปกติ (-70 องศาเซลเซียส) ที่ 1, 3, 7 และ 150 วัน

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง

การทดสอบ / ระยะเวลา (วัน)	4°C			25°C			37°C		
	1	3	7	1	3	7	1	3	7
ลักษณะทางกายภาพ	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ความเป็นกรด-ด่าง	8.56	8.46	8.30	8.39	8.51	8.33	8.40	8.37	8.39
ความชื้น (%)	1.92	1.99	ND	1.96	2.03	ND	2.52	2.78	ND
ความแรง (IU/ขวด)	15.74	15.59	19.77	16.85	15.85	16.58	16.60	14.64	13.77

ND = not done, P = มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น

ผลการตรวจทางกายภาพในทุกสภาวะพบมีลักษณะปกติ ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในสภาวะเร่งทั้ง 3 ช่วงอุณหภูมิ ตลอดระยะเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.977$) ผลการทดสอบค่าความชื้นพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าร้อยละความชื้นสูงกว่าสารมาตรฐานที่เก็บในสภาวะปกติและสภาวะเร่งที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.006$) ที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงไม่ลดลง ซึ่งต่างจากที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ความแรงมีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 3-7

เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงที่สภาวะเร่งในอุณหภูมิต่างๆ เทียบกับค่าความแรงที่เก็บในสภาวะปกติ

-70 องศาเซลเซียส ที่เวลาเดียวกัน (100%) ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน มีค่าเท่ากับร้อยละ 101, 89 และ 102 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าความแรงในวันที่ 3 และ 7 มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน เท่ากับร้อยละ 108, 90 และ 86 ตามลำดับ เช่นเดียวกันผลทดสอบเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วันที่ 1, 3 และ 7 มีค่าเท่ากับร้อยละ 107, 83 และ 71 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลทดสอบค่าความแรงของการศึกษาความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)/ระยะเวลา (วัน)	ค่าความแรง (%)					
	1 วัน		3 วัน		7 วัน	
	(IU/ขวด)	%	(IU/ขวด)	%	(IU/ขวด)	%
-70	15.53	100	17.58	100	19.33	100
4	15.74	101	15.59	89	19.77	102
25	16.85	108	15.85	90	16.58	86
37	16.60	107	14.64	83	13.77	71

วิจารณ์

จากการเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งโดยสถาบันชีววัตถุ พบว่าการทดสอบความแรงสามารถกำหนดค่าความเข้มข้นได้เท่ากับ 16.26 IU/ขวด มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ผลการทดสอบทั่วไป ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ ความสามารถในการละลาย ความเป็นกรด-ด่าง และความปราศจากเชื้อ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกพารามิเตอร์ การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นวิธีรักษาคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของโปรตีนได้ดี สะดวกในการเก็บรักษาและง่ายในการขนส่ง⁽⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ก่อนการเตรียมสารมาตรฐาน ได้หาสภาวะการทำแห้งโดยการทดสอบผสม Factor VIII และสูตรบัฟเฟอร์เดียวกับที่เตรียม WHO International Standard 8th INTERNATIONAL STANDARD FACTOR VIII CONCENTRATE⁽¹⁰⁾

มี 1% trehalose และ albumin เป็น stabilizer ผลการทำแห้งได้ลักษณะเป็นก้อนเค้กสีขาว มีความชื้นต่ำและละลายได้ดี ค่าความแรงหลังการทำแห้งน้อยกว่าก่อนทำแห้ง มีความเป็นไปได้เพราะ Factor VIII เป็นชีวโมเลกุลโครงสร้างใหญ่ มีความคงตัวต่ำ ลักษณะโครงสร้างมีความอ่อนไหวจากความกดดันเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น มีระดับ pH หรืออุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป การเตรียมสารมาตรฐานในครั้งนีจึงเตรียมความเข้มข้นก่อนการแบ่งบรรจุ ให้มีความเข้มข้นสูงในระดับที่ไม่ส่งผลต่อการละลายหลังการทำแห้ง ในการทดสอบเพื่อกำหนดค่าความแรงโดยวิธี chromogenic assay ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านการทวนสอบโดยห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุ ผลการทวนสอบผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกพารามิเตอร์⁽¹¹⁾ ผลทดสอบรายงานมีหน่วยเป็น IU

(international units) ที่สามารถสอบกลับได้ ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่าค่าความแรงมีความถูกต้องและแม่นยำ สามารถนำมากำหนดเป็นค่าความแรงสารมาตรฐาน Factor VIII ได้ นอกจากนี้ตามข้อกำหนดมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO Guide 34:2009)⁽¹²⁾ ระบุว่าในการเตรียมสารมาตรฐานจำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งจากผลวิเคราะห์ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าสารมาตรฐานแบบผงแห้งทุกขวดมีค่าความแรงเท่ากัน

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือหลังการทำแห้ง พบว่ามีปริมาณความชื้นเหลือเฉลี่ยต่ำกว่าค่าความชื้นของวัคซีนผงแห้งทั่วไปที่ใช้สำหรับฉีดในคนที่กำหนดไว้ไม่เกินร้อยละ 3⁽⁸⁾ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงที่ผลิตโดยห้องปฏิบัติการองค์การอนามัยโลกพบว่า อยู่ในช่วงร้อยละ 0.1–2.9 ซึ่งพบว่ามียาใช้งานได้นาน 10–20 ปี⁽⁹⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Duralliu A และคณะ รายงานว่าการเตรียมพลาสมาเข้มข้นแบบผงแห้งที่ความชื้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีผลความคงตัวได้มากกว่า 12 เดือน⁽¹³⁾ จากข้อมูลการเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII มีความชื้นหลงเหลืออยู่น้อย จึงเป็นไปได้มากที่สารมาตรฐานนี้น่าจะมีความคงตัวดี

จากประสบการณ์และข้อมูลของ NIBSC พบว่าปัจจัยที่สำคัญที่มีผลทำให้เพิ่มความคงตัวของสารมาตรฐานชีววัตถุแบบผงแห้ง คือ ความแม่นยำ (precision) ของการแบ่งบรรจุ ร่วมกับการทำให้ผงแห้งมีความชื้นน้อยที่สุด ซึ่งจากการทำแห้งสารมาตรฐาน protein C ที่เตรียมจากพลาสมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 มีความคงตัวและใช้งานอยู่ได้นานถึง 29 ปี นอกจากนี้ผลการศึกษาจาก NIBSC รายงานว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บสารมาตรฐานจากพลาสมา รวมถึง Factor VIII คือ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และยังสามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า เช่น -70 หรือ -150 องศาเซลเซียส ได้โดยค่า coagulation activity ยังมีค่าสูงถึง 99% ในเวลาเกิน 5 ปี⁽¹⁴⁾ แสดงให้เห็นว่าที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บสารมาตรฐาน Factor VIII ได้ องค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ระบุวันหมดอายุของการเตรียมสารมาตรฐาน⁽¹⁵⁾ แต่ให้เฝ้าติดตามโดยวิเคราะห์ข้อมูล trend analysis เพื่อประเมินประสิทธิภาพ trend

analysis คือ วิเคราะห์ทางสถิติเป็นการนำค่าการทดสอบของตัวอย่างจำนวนที่มากเพียงพอ หาค่าเฉลี่ยและค่า $\pm 2SD$ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแรงและเวลา แล้วกำหนดเกณฑ์เพื่อการแจ้งเตือนหากค่าเกินนอก $\pm 2SD$ จากการศึกษาพบว่าค่าความแรงที่เก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 150 มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยมีค่าความแรงอยู่ในช่วง $\pm 2SD$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงจำเป็นต้องติดตามประเมินค่าในช่วงที่มีการนำไปใช้งานด้วยเพื่อให้มั่นใจว่าค่าความแรงยังอยู่ในช่วงที่ใช้งานได้ สำหรับวิธีทดสอบทาง bioassay เป็นวิธีที่มีความแปรปรวน ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้พบผลทดสอบความคงตัวแบบเร่งที่สภาวะ 4 °C มีค่าลดลงในวันที่ 3 และสูงขึ้นในวันที่ 7 ซึ่งจากข้อมูลแล้วอาจจำเป็นต้องเพิ่มระยะเวลาการศึกษาให้นานขึ้น สำหรับการทดสอบทางกายภาพเป็นการดูด้วยตาเปล่าโดยไม่มีการเปิดขวดบรรจุและการทดสอบการละลายหลังเติมน้ำกลั่นเป็นวิธีเดียวกับการเตรียมตัวอย่างชนิดผงแห้งที่ทำก่อนการทดสอบ pH เมื่อพิจารณาต่อค่าการทดสอบ⁽³⁾

สรุป

สารมาตรฐานอ้างอิง Factor VIII แบบผงแห้งสามารถใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ได้ โดยมีความคงตัวดีเมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส เมื่อนำออกจากที่เก็บในสภาวะปกติแล้วควรใช้ทำการทดสอบทันที และเพิ่มความถี่ของการสอบเทียบอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง รวมทั้งการติดตามประสิทธิภาพความคงตัวระยะยาวโดยวิเคราะห์แนวโน้มเหมือนกับชีววัตถุมาตรฐานทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. นกขญญ เอื้อประเสริฐ. Current concepts on cell based model of coagulation and roles of factor VIIa and tissue factor on hemostasis, thrombosis, and pathogenesis of other related disease. ว โโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551; 18(4): 331-41.
2. Bhardwaj R, Rath G, Goyal AK. Advancement in the treatment of haemophilia. Int J Biol Macromol 2018; 118(Pt A): 289-95.
3. Assay of human coagulation factor VIII. In: European Pharmacopoeia 10.0 Vol. 1. Strasbourg, France: Council of Europe; 2020. p. 2844-45.
4. Grillo AO, Edwards KLT, Kashi RS, Shipley KM, Hu L, Besman MJ, et al. Conformational origin of the aggregation of recombinant human factor VIII. Biochemistry 2001; 40(2): 586-95.
5. อัครจริย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. ว กรมวิทย พ 2554; 53(2): 97-112.
6. สุภาพร ภูมิอมร, อัครจริย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, สิริรัตน์ ร่มพร, สุกัลยาณี ไชยมี. การประเมินความคงตัวของวัคซีนปัสสาวะชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศไทย. ว วิชาการสาธารณสุข 2557; 23(2): 369-80.
7. Varshney D, Singh M. Lyophilized biologicals and vaccines: modality-based approaches. New York: Springer; 2015.
8. World Health Organization. Requirement for measles, mumps and rubella vaccine and combined vaccine (Live). In: Expert committee on biological standardization; Annex 3: Forty-third report. WHO Technical Report Series 840. Geneva: WHO; 1994.
9. Rey L, May JC, editors. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Publisher; 2004.
10. WHO International Standard. 8th International Standard Factor VIII Concentrate, NIBSC code: 07/350 Version 1.0. [online]. 2010; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/07-350.pdf>.
11. โสมมริสา พวงพศรี, วิฑิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, ไพศาล พังจุนันท์. การทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic Assay. ว กรมวิทย พ 2564; 63(3): 721-31.
12. 5.13 Assessment of homogeneity. In: ISO/ Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
13. Duralliu A, Matejtschuk P, Stickings P, Hassall L, Tierney R, Williams DR. The influence of moisture content and temperature on the long-term storage stability of freeze-dried high concentration immunoglobulin G (IgG). Pharmaceutics 2020; 12(4): 303. (16 pages).
14. Hubbard AR. International biological standards for coagulation factors and inhibitors. Semin Thromb Hemost 2007; 33(3): 283-9.
15. World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO Technical Report Series 2006; 932: 73-131

Evaluation of Factor VIII Freeze-Dried Reference Standard for Potency Testing

Soammarisa Paungpornsri, Assajun Amen, Pattama Bunnag, Titaporn Pootipinyowat, Chanwit Chukaeo, and Paisan Pangjunan

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Factor VIII is a biopharmaceutical product for the treatment of haemophilia A patients. The injection dosage varies depending on disease severity and the specified drug label concentration. The potency testing against reference standard leads to the concentration value as international units (IU). The objective of this study was to prepare and evaluate Factor VIII freeze-dried reference standard prepared by the Institute of Biological Products for the potency testing of Factor VIII products. The evaluation of the product revealed that the variation coefficient of packing was 0.18%. The potency value was about 16.26 IU/vial and the moisture content was approximately 1.77%. The homogeneity was not significantly different and it had good physical characteristics and reconstitution. Its pH was approximately 8.517. A long-term stability study in storage condition at -70°C for 150 days suggested that the potency did not decrease. An accelerated stability study suggested that appearance and pH were normal. The moisture content at 37°C was higher than those at 4°C and 25°C and the potency at 25 and 37°C declined on days 3 and 7. Thus, the lyophilized Factor VIII could be used as a reference standard for the potency testing of Factor VIII products and potency testing should be undertaken every 6 months for long-term stability evaluation.

Keywords: Lyophilized reference Factor VIII, Potency, Stability