วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2565

Journal of Health Science
Vol. 31 No. 1, January - February 2022

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original article*

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ความแรง Monoclonal Antibody ชนิด Rituximab โดยเทคนิค Complement Dependent Cytotoxicity

จิรเดช ปัจฉิม วท.บ.
สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ วท.บ., วท.ม., Ph.D.
สายวรุฬ จดูรกิตตินันท์ วท.บ., วท.ม.
สุภาพร ภูมิอมร วท.บ., วท.ม., Ph.D.
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วันรับ: 2 มิ.ย. 2563
วันแก้ไข: 13 ก.ย. 2564
วันตอบรับ: 23 ก.ย. 2563

บทคัดย่อ Monoclonal antibody ชนิด rituximab ใช้รักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin และโรคอื่น ๆ ปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดเฉพาะ (monograph) ในตำรายาสากล และผู้ผลิตใช้วิธีวิเคราะห์ความแรงที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจความแรงของยาที่สามารถตรวจยาจากหลายผู้ผลิต โดยเลือกใช้เทคนิค complement dependent cytotoxicity ที่อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของยากับเซลล์ WIL2-S ที่ผิวเซลล์มีแอนติเจนชนิด CD-20 เมื่อเติมซีรั่ม complement จะส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตและตาย (cytotoxicity) แล้วคำนวณหาค่าความแรงสัมพัทธ์ของยาเทียบกับยาอ้างอิงด้วยสมการ 4-parameter logistic เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าเฉพาะ rituximab เท่านั้นที่ทำให้เซลล์ WIL2-S เกิด cytotoxicity ตามความเข้มข้นของยา มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ร้อยละ 80.0-125.0 ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเรขาคณิต (%GCV) ของการทำซ้ำและต่างนักวิเคราะห์เท่ากับ 8.2 และ 5.8 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบความแรงอยู่ที่ร้อยละ 50.0-150.0 มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.998 และเมื่อเปลี่ยน passage number ของเซลล์ เวลาในการบ่ม จำนวนเซลล์ และเครื่องมือวัด พบว่าทุกการทดสอบมีค่า %GCV น้อยกว่า 25.0 และเมื่อนำวิธีมาตรวจตัวอย่าง rituximab จำนวน 5 ยี่ห้อ พบว่าให้ค่าความแรงไม่ต่างจากวิธีของผู้ผลิต จึงสรุปได้ว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อการควบคุมคุณภาพความแรงยา rituximab ของหน่วยงาน

คำสำคัญ: **วิธี complement dependent cytotoxicity; ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี; ความแรง; ยา Rituximab**

บทนำ

Monoclonal antibody ชนิด rituximab เป็นยาชีววัตถุที่ใช้ในการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin (NHL; Non-Hodgkin's lymphomas) มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง โรคข้อรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และโรคอื่น ๆ โดยยาออกฤทธิ์เลียนแบบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย มีฤทธิ์การทำงานแบบจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนชนิด ซีดี-20 (CD-20)[1-3] ที่อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งพบมากในผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin ทำหน้าที่ในการกำหนดวงจรการแบ่งเซลล์

(cell cycle) เมื่อ rituximab จับกับ CD-20 จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด complement ส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตและตายลง (cytotoxicity) ลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้ เป็นวงจรที่เรียกว่า Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)

ปัจจุบันยาต้นแบบ (originator/innovator) คือ Rituxan ในสหภาพยุโรป และ MabThera ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้หมดสิทธิบัตรลง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 และปี พ.ศ. 2559[4] ตามลำดับ ทำให้ผู้ผลิตสามารถผลิต rituximab ออกจำหน่ายทั้งในรูปแบบยาใหม่ และยาคล้ายคลึง (biosimilar) เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก monoclonal antibody มีศักยภาพในการรักษาและบรรเทาโรคได้ดี แต่ด้วยยากลุ่มนี้เป็นยาโปรตีน มีโครงสร้างและกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน ต้องอาศัยเทคโนโลยีระดับสูงและใช้สารตั้งต้นจากสิ่งมีชีวิตในกระบวนการผลิต ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย จึงได้มีแนวทางควบคุมกำกับยาชนิดนี้อย่างเหมาะสม โดยเฉพาะยาคล้ายคลึงซึ่งได้กำหนดหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง[5] ที่ต้องมีการยืนยันข้อมูลจากผู้เชี่ยวชาญ ทั้งการพิจารณาข้อมูลเอกสารของผู้ผลิตที่ขอขึ้นทะเบียน และผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อแสดงให้เห็นว่ายาที่ขอขึ้นทะเบียนมีความคล้ายคลึงด้านคุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิผลกับยาต้นแบบหรือยาอ้างอิง[6, 7] ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่าความแรงเป็นข้อมูลหนึ่งทางห้องปฏิบัติการที่มีความสำคัญ สามารถยืนยันคุณสมบัติของยาว่ามีประสิทธิภาพและคุณภาพในการนำมารักษาโรค ดังนั้นสถาบันชีววัตถุจึงได้มีการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความแรง เพื่อนำมาใช้ร่วมกับการทดสอบอื่น ๆ ในการควบคุมคุณภาพยา rituximab ในประเทศ

การศึกษาประสิทธิภาพของ rituximab โดยการทดสอบหาค่าความแรงทางห้องปฏิบัติการ มีหลายวิธีตามกลไกการออกฤทธิ์ ได้แก่ complement dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), cell-based antibody binding และ apoptosis[8,9] ปัจจุบันยังไม่มีการระบุวิธีทดสอบความแรงที่เป็นมาตรฐานในตำรายาสากล ดังนั้น ผู้ผลิตแต่ละบริษัทจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ขึ้นมาเพื่อใช้ในการทดสอบยาของตนเอง ทำให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะสำหรับยาของบริษัทนั้น ๆ ซึ่งวิธีที่ผู้ผลิตพัฒนาขึ้นก็เป็นการจำลองกลไกการออกฤทธิ์ภายในร่างกายโดยการใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อน หรือใช้เซลล์เป้าหมายที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับศักยภาพของผู้ผลิต ซึ่งทุกวิธีสามารถวิเคราะห์ความแรงของ rituximab ได้

สถาบันชีววัตถุในฐานะหน่วยงานควบคุมกำกับด้านคุณภาพทางห้องปฏิบัติการมีหน้าที่ในการวิเคราะห์เพื่อประเมินประสิทธิภาพและคุณภาพของยาก่อนจำหน่ายในประเทศ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ค่าความแรงที่มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และสามารถใช้ได้ครอบคลุมทุก ๆ ผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธี CDC เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์แบบ CDC เป็นลักษณะเด่นและมีความจำเพาะในการออกฤทธิ์เพื่อทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ CD-20 มากกว่าปกติได้โดยตรง[10] ซึ่งการจำลองกลไกดังกล่าวในหลอดทดลอง (*in vitro*) จะทำได้ง่ายไม่ต้องอาศัยเซลล์หลายชนิดหรือเครื่องมือวิเคราะห์ที่ซับซ้อนเหมือนการทดสอบด้วยกลไกอื่น ๆ เมื่อเทียบกับวิธี ADCC หรือ apoptosis คณะผู้วิจัยได้พัฒนาโดยเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจือจางระดับความเข้มข้นยา ชนิดของเซลล์เป้าหมาย ชนิดและความเข้มข้นของซีรั่ม complement เพื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์เป้าหมาย[3] แล้ววัดปริมาณเซลล์มีชีวิตที่คงเหลือด้วยการวัดค่า absorbance, fluorescence หรือ luminescence ตามชนิดของสารตั้งต้น (substrates)[11] วิเคราะห์ค่าความแรงเทียบกับสารมาตรฐานหรือยาอ้างอิง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาและค่าสัญญาณของเซลล์ที่มีชีวิต ที่มีความสัมพันธ์เป็น sigmoidal curve ทำโดยการใช้ Parallel line analysis: 4-parameter logistic regression[12] เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้ว จึงตรวจสอบความใช้ได้

ของวิธีตามระบบคุณภาพ[13,14] เพื่อประเมินว่าวิธีมีความเหมาะสม น่าเชื่อถือ สำหรับนำมาเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่าความแรงของยา rituximab ที่ใช้ในประเทศ

วิธีการศึกษา

สารมาตรฐานและตัวอย่าง

สารมาตรฐานเป็น in-house reference standard ความเข้มข้น 10.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากบริษัทผู้ผลิต A

ตัวอย่าง monoclonal antibody ชนิด rituximab จำนวน 5 ยี่ห้อจากผู้ผลิตต่าง ๆ คือ ยี่ห้อ A ขนาด 500 mg ยี่ห้อ B ขนาด 500 mg และขนาด 100 mg ยี่ห้อ C ขนาด 500 mg และขนาด 100 mg ยี่ห้อ D ขนาด 500 mg และยี่ห้อ E ขนาด 1,000 IU (0.1 mg) และตัวอย่าง monoclonal antibody ชนิด trastuzumab ขนาด 150 mg จำนวน 1 ยี่ห้อ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง microplate reader รุ่น ELx808IU (BioTek®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล Gen5 version 1.11.5 เครื่อง microplate reader รุ่น SpectraMax iD5 (Molecular devices®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล SoftMax Pro version 7.1 ตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์อุณหภูมิ 37±1 °C รุ่น Galaxy® 170R (New Brunswick, USA) ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet) รุ่น NU-430-600E (NUAIRE, USA) กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ทรุ่น CK2 (Olympus, Japan) เพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-wells flat tissue culture plate, Corning, USA)

เซลล์เพาะลี้ยง

เซลล์ WIL2-S คือเซลล์ Spleen suspension สายพันธุ์ Human (Homo sapiens) เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ continuous cell line ประเภท B lymphoblast (ATCC® CRL-8885™) เป็นเซลล์เป้าหมายเนื่องจากผิวเซลล์มีแอนติเจนชนิด CD-20 และเซลล์ Mouse, *Mus musculus* myelogenous leukemia, M-NFS-60 (ATCC® CRL-1838™)

อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมี

RPMI 1640 (ATCC modification) medium (Cat. No. A10491-01, GIBCO, USA) Heat-inactivated fetal bovine serum (Cat. No. 26140-079, GIBCO, USA) 1M HEPES (Cat. No. H-6147, Sigma) Penicillin-Streptomycin (10,000 unit/ml) (Cat. No. 15140-122, GIBCO) 2% Triton™ X-100 (Cat. No. X100, Sigma) 0.4% Trypan Blue solution (Cat. No. T8154, Sigma) Baby rabbit complement (Cat. No. C12CA, RIO-RAD) Cell Counting Kit-8 (CCK-8) Reagent (Cat. No. HY-K0301, MCE®; MedChem Express, USA)

วิธีวิเคราะห์ความแรง

การพัฒนาการวิเคราะห์ความแรงของ monoclonal antibody ชนิด rituximab ด้วยวิธี CDC อาศัยความสามารถในการทำลายเซลล์ WIL2-S ของ rituximab เปรียบเทียบกับยาอ้างอิงโดยยาจะเข้าจับกับแอนติเจนชนิด CD-20 บริเวณผิวของเซลล์ เมื่อเติม Baby rabbit complement จะมีผลให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวและตายลง (cytotoxicity) ซึ่งสามารถวัดอัตราการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตตามระดับความเข้มข้นของโปรตีนยา วิธีวิเคราะห์ทำโดยบ่มเซลล์ WIL2-S ในเพลท 96 หลุม จำนวน 5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม กับตัวอย่างยา/ยาอ้างอิงปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ที่ความเข้มข้นสุทธิ คือ 10 ถึง 0.001024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ baby rabbit complement ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม นำเพลทบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 120 นาที แล้วจึงเติม cell counting kit-8 (CCK-8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/หลุม ซึ่ง CCK-8 เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีชีวิต บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโมเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 630 นาโมเมตร โดยค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแสดงถึงปริมาณเซลล์คงเหลือที่มีชีวิตซึ่งจะ

มีค่าผกผันกับค่าความแรงของยา ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นยา กับค่าดูดกลืนแสงเป็น sigmoidal curve (non-linear) นำค่าที่วัดได้มาวิเคราะห์ด้วยสมการ 4-parameter logistic regression และ คำนวณค่าความแรง (relative potency) ของยาด้วย parallel line analysis ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ รายงานผลเป็นค่า %relative potency

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity)

ทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง rituximab และ trastuzumab ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ต่างวันกัน โดยใช้เซลล์ WIL2-S เป็นเซลล์เป้าหมาย เพื่อศึกษาความจำเพาะในการเข้าจับและทำลายเซลล์เป้าหมาย

ทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง rituximab และ trastuzumab ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ต่างวันกัน โดยใช้เซลล์ M-NSF-60 เพื่อศึกษาความจำเพาะในการออกฤทธิ์ เมื่อเปลี่ยนชนิดของเซลล์

ทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง rituximab ยี่ห้อ/รุ่นการผลิตต่าง ๆ ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง/ผลิตภัณฑ์ โดยใช้เซลล์ WIL2-S เพื่อศึกษาความใช้ได้ของวิธี เมื่อทดสอบกับยายี่ห้อต่าง ๆ

การทดสอบความถูกต้อง (accuracy)

วิเคราะห์ค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของความแรงสัมพัทธ์ยา rituximab ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยาเท่ากับร้อยละ 50.0 (5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 100.0 (10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 150.0 (15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 การทดสอบ โดยค่าร้อยละการคืนกลับคำนวณจาก %recovery = (%found mean relative potency/%expected relative potency) x 100 เกณฑ์การตัดสินคือ %recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0

การทดสอบความเที่ยง (precision)

วิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab ยี่ห้อ A จำนวน 6 การทดสอบ ภายในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว เกณฑ์การตัดสินคือ ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเรขาคณิต (%GCV) ไม่เกินร้อยละ 25.0

วิเคราะห์ต่างนักวิเคราะห์ (intermediate precision) โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab ยี่ห้อ A จำนวน 3 การทดสอบ ด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน ต่างวันกัน เกณฑ์การตัดสินคือ ค่า %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

วิเคราะห์ความแรงสัมพัทธ์ของ rituximab ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยาเท่ากับ ร้อยละ 50.0 (5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 75.0 (7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 100.0 (10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 125.0 (12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 150.0 (15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 การทดสอบ พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า %expected relative potency กับ %found mean relative potency โดยเกณฑ์การตัดสินคือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2) มากกว่า 0.95 และ %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0

การทดสอบความคงทนของวิธี (robustness)

ศึกษาผลกระทบเมื่อเปลี่ยนแปลง passage number ของเซลล์ WIL2-S โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab โดยใช้เซลล์ WIL2-S ที่มี passage number ต่างกันอย่างน้อย 5 passage เกณฑ์การตัดสินคือ ค่า %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0

ศึกษาผลกระทบเมื่อเปลี่ยนแปลงเวลาในการบ่ม โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab ก่อนเติม CCK-8 ที่ระยะเวลา 105, 120 และ 135 นาที และทดสอบหลังเติม CCK-8 ที่ระยะเวลา 16, 18 และ 20 ชั่วโมง โดยเกณฑ์การตัดสินคือ ค่า %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้สถิติ ANOVA: Single factor

ศึกษาผลกระทบเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์

WIL2-S โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab โดยใช้เซลล์ WIL2-S ที่มีปริมาณเซลล์ 4.5 x 10^5, 5.0 x 10^5 และ 5.5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเกณฑ์การตัดสินคือ ค่า %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้สถิติ ANOVA: Single factor

ศึกษาผลกระทบเมื่อเปลี่ยนเครื่อง microplate reader และโปรแกรมวิเคราะห์ผล โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab โดยใช้เครื่อง microplate reader รุ่น ELx-808IU (BioTek®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล Gen5 version 1.11.5 และเครื่อง microplate reader รุ่น SpectraMax iD5 (Molecular devices®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล SoftMax Pro version 7.1 เกณฑ์การตัดสินคือ ค่า %GCV ไม่เกินร้อยละ 25.0 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้สถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. วิเคราะห์ความแรงโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ตามสมการ 4-parameter logistic regression ดังนี้

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

2. วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean; GM) โดยใช้สูตรดังนี้

$$GM = \sqrt[N]{y_1 \times y_2 \times y_3 \ldots y_N} = exp\left[\frac{\ln(y_i) + \ldots + \ln(y_n)}{n}\right]$$

3. วิเคราะห์ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (geometric standard deviation; GSD) โดยใช้สูตรดังนี้

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

4. วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเรขาคณิต (geometric coefficient of variation; GCV) โดยใช้สูตรดังนี้

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

ผลการศึกษา

การทดสอบความจำเพาะของวิธี

การทดสอบตัวอย่าง rituximab A และ trastuzumab ใช้เซลล์ WIL2-S เป็นเซลล์เป้าหมาย พบว่า มีเฉพาะ rituximab ที่ทำให้เกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ WIL2-S คือ สามารถวัดสัญญาณของเซลล์ที่มีชีวิตที่ลดลงตามระดับความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้น (10-0.001024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยแสดงลักษณะกราฟเป็น sigmoidal curve มีค่า %relative potency เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 105.4 แต่ไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าวในตัวอย่าง trastuzumab ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบตัวอย่าง rituximab A และ trastuzumab โดยใช้เซลล์ M-NSF-60 เป็นเซลล์เป้าหมาย พบว่า ทั้งตัวอย่าง rituximab และ trastuzumab ไม่ทำให้เกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ M-NSF-60 โดยไม่สามารถวิเคราะห์ค่าสัญญาณของเซลล์ที่มีชีวิตต่อระดับความเข้มข้นของยาเป็นลักษณะ sigmoidal curve ได้ แสดงว่า เซลล์ M-NSF-60 ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา ดังแสดงในภาพที่ 2

การทดสอบเพิ่มเติมในตัวอย่าง rituximab ยี่ห้อ/รุ่นการผลิตต่าง ๆ พบว่า ตัวอย่าง rituximab ทุกยี่ห้อ/รุ่นการผลิตต่างกัน สามารถหาค่าความแรงด้วยวิธี CDC ได้ โดยมีค่า %relative potency อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 ผ่านเกณฑ์กำหนดทุกการทดสอบ ตามตารางที่ 1

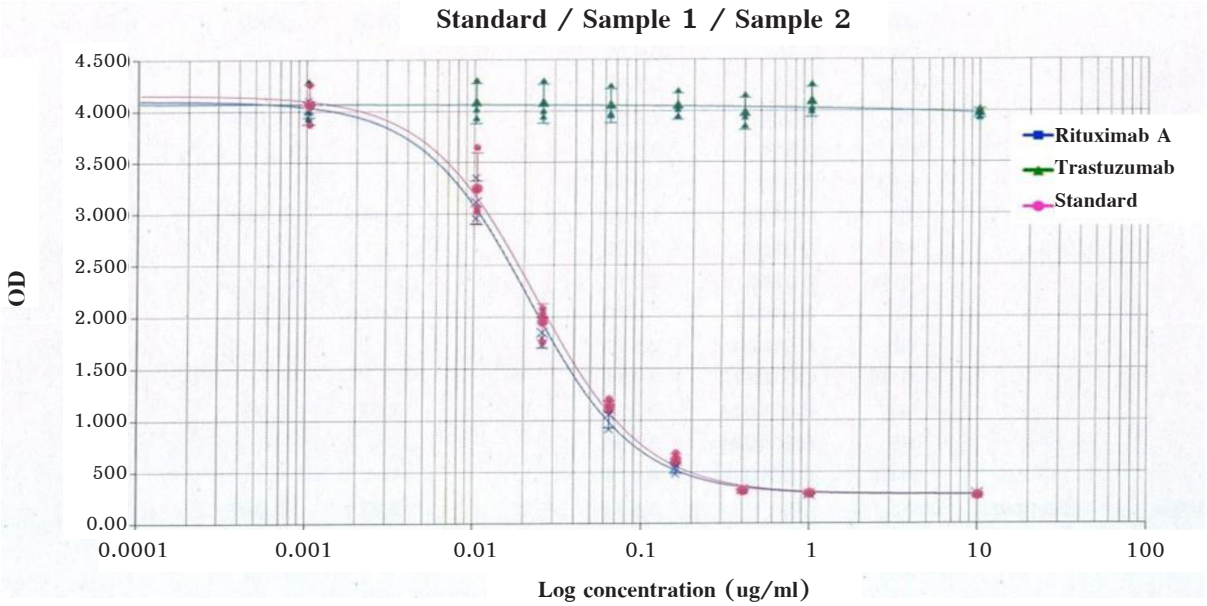
การทดสอบความถูกต้อง

ทดสอบหาค่าความแรงของ rituximab A ที่ความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยา (expected relative potency) เท่ากับร้อยละ 50.0, 100.0 และ 150.0 จำนวน 3 การทดสอบ พบว่า มีค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับร้อยละ 92.2, 94.7 และ 98.2 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

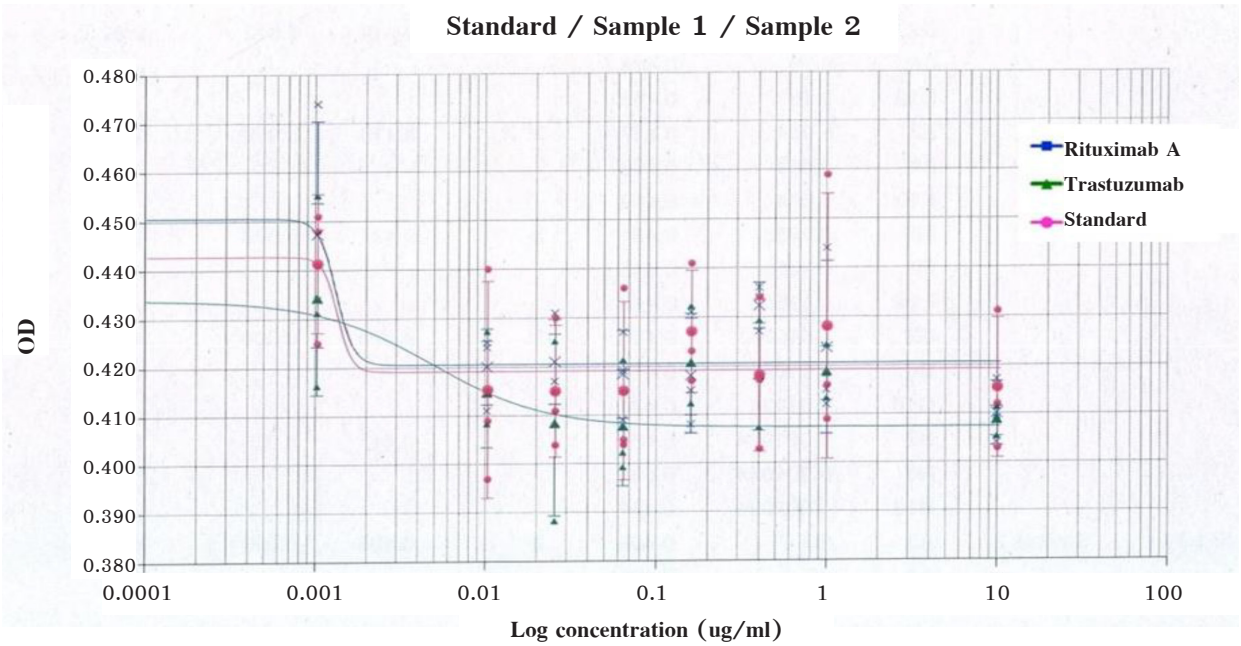
การทดสอบความเที่ยง

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab ยี่ห้อ A จำนวน 6 การทดสอบ พบว่า %relative potency มีค่า GM เท่ากับร้อยละ 91.1 และค่า %GCV เท่ากับ 8.2 ซึ่งเป็นไปตาม

ภาพที่ 1 การเกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ WIL2-S ตามระดับความเข้มข้นของ rituximab และ trastuzumab



ภาพที่ 2 การเกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ M-NSF-60 ตามระดับความเข้มข้นของ rituximab และ trastuzumab



เกณฑ์ที่กำหนด (%GCV <25.0) ตามตารางที่ 3

การวิเคราะห์ต่างนักวิเคราะห์ (intermediate precision) โดยวิเคราะห์ความแรง rituximab ยี่ห้อ A จำนวน 3 การทดสอบ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ต่างวันกัน พบว่า %relative potency มีค่า GM เท่ากับ ร้อยละ 105.4 และค่า %GCV เท่ากับ 5.8 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (%GCV <25.0) ตามตารางที่ 4

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ

ผลวิเคราะห์ความแรงสัมพัทธ์ของ rituximab ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยาเท่ากับร้อยละ 50.0, 75.0, 100.0, 125.0 และ 150.0 ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 การทดสอบ พบว่า มีค่าความแรง

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ rituximab ยี่ห้อ/รุ่นการผลิตต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ขนาด	ครั้งที่	% Relative potency	Geometric mean (GM)	Geometric standard deviation (GSD)	% Geometric coefficient of variation (GCV)
A		1	111.0	105.4	1.1	8.2
	500 mg	2	96.0			
		3	110.0			
B		1	100.0	94.1	1.1	9.7
	500 mg	2	84.2			
		3	99.0			
		1	99.1	94.7	1.1	8.7
	100 mg	2	100.0			
		3	85.6			
C		1	112.0	105.9	1.1	7.5
	500 mg	2	109.0			
		3	97.3			
		1	102.0	108.6	1.1	5.5
	100 mg	2	111.0			
		3	113.0			
D		1	93.6	99.2	1.7	6.3
	500 mg	2	106.0			
		3	98.3			
E	1,000 IU (0.1 mg)	1	116.0	110.9	1.1	5.1
		2	105.0			
		3	112.0			

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแรง rituximab ที่ความเข้มข้นสุทธิของโปรตีนยาเท่ากับร้อยละ 50, 100 และ 150

ครั้งที่	Expected relative potency (%)		
	50	100	150
1	43.7	93.1	130.0
2	46.3	91.3	178.0
3	48.5	100.0	138.0
GM	46.1	94.7	147.3
GSD	1.1	1.1	1.2
%GCV	5.2	4.8	16.8
% Recovery	92.2	94.7	98.2

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแรง rituximab A จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน (repeatability)

ครั้งที่	% Relative potency
1	85.8
2	81.9
3	99.2
4	91.3
5	88.8
6	101.0
GM	91.1
GSD	1.1
%GCV	8.2

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแรง rituximab A โดยนักวิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 การทดสอบต่างวันกัน (intermediate precision)

นักวิเคราะห์	ครั้งที่	% relative potency	Geometric mean (GM)	Geometric standard deviation (GSD)	% Geometric coefficient of variation (GCV)
คนที่ 1	1	111.0	105.4	1.1	8.2
	2	96.0			
	3	110.0			
คนที่ 2	1	110.0	105.3	1.0	4.3
	2	101.0			
	3	105.0			
GM (n=6)		105.4			
GSD (n=6)		1.1			
%GCV (n=6)		5.8			

สัมพัทธ์แปรผันตามระดับความเข้มข้นของโปรตีนยาโดยมีค่า %GCV เท่ากับ 5.2, 3.0, 4.8, 13.9 และ 16.8 ตามลำดับ และมีค่า %recovery เท่ากับร้อยละ 92.2, 89.7, 94.7, 98.3 และ 98.2 ตามลำดับ ตามตารางที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เชิงเส้นตรงของค่า expected relative potency และค่า found mean relative potency พบว่า มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงร้อยละ 50.0-150.0 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ เท่ากับ 0.998 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด (R^2>0.95) ดังภาพที่ 3

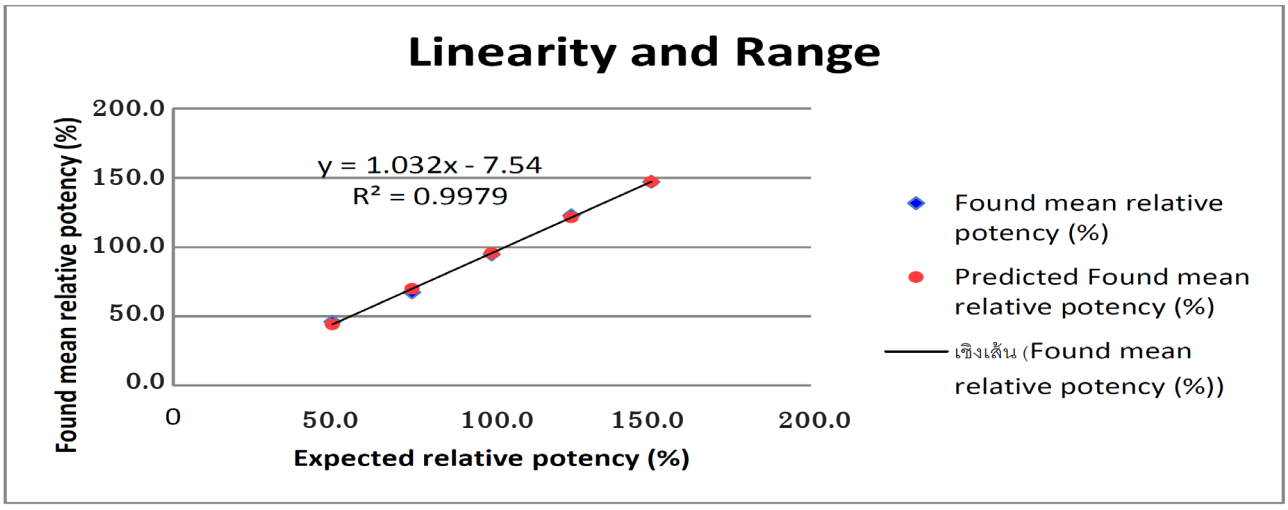
การทดสอบความคงทนของวิธี

ทดสอบความคงทนของวิธี เมื่อใช้ passage number ของเซลล์ WIL2-S ที่ #6, #11, #16 และ #21 พบว่าสามารถวิเคราะห์ความแรงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 โดยมีค่า GM เท่ากับร้อยละ 103.8 และมีค่า %GCV เท่ากับ 7.0 สำหรับการเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มก่อนเติม CCK-8 ที่ระยะเวลา 105, 120 และ 135 นาที พบว่า มีค่า GM เท่ากับร้อยละ 101.7, 101.8 และ 99.7 ตามลำดับ มีค่า %GCV เท่ากับ 5.0 ไม่มีความแตก

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าความแรงของ rituximab A ที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 50.0, 75.0, 100.0, 125.0 และ 150.0 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำเป็นอิสระต่อกัน

ครั้งที่	Expected relative potency (%)				
	50.0	75.0	100.0	125.0	150.0
1	43.7	65.8	93.1	115.0	130.0
2	46.3	66.5	91.3	112.0	178.0
3	48.5	69.6	100.0	144.0	138.0
GM	46.1	67.3	94.7	122.9	147.3
GSD	1.1	1.0	1.1	1.2	1.2
%GCV	5.2	3.0	4.8	13.9	16.8
%Recovery	92.2	89.7	94.7	98.3	98.2

ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง expected relative potency (%) และค่า found mean relative potency (%)



ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 (p=0.898) มีค่า F (0.110) ที่คำนวณได้ น้อยกว่า F-Critical (5.143) เมื่อทดสอบโดยใช้สถิติ ANOVA: Single factor และการเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มหลังเติม CCK-8 ที่ระยะเวลา 16, 18 และ 20 ชั่วโมง พบว่า มีค่า GM เท่ากับ ร้อยละ 106.3, 106.2 และ 105.9 โดยมีค่า %GCV เท่ากับ 7.7 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.999) มีค่า F (0.001) ที่คำนวณได้ น้อยกว่า F-Critical (5.143) การเปลี่ยนปริมาณเซลล์ WIL2-S ที่ $4.5x10^5$, $5.0x10^5$ และ $5.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า สามารถทดสอบหาความแรงได้อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 โดยมีค่า GM เท่ากับร้อยละ 105.5, 106.5 และ 107.8 ตามลำดับ และมีค่า %GCV เท่ากับ 8.1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.966) มีค่า F (0.035) ที่คำนวณได้น้อยกว่า F-Critical (5.143) นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ความแรงเปรียบเทียบ ระหว่างเครื่อง microplate reader รุ่น ELx808IU (BioTek®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล Gen5 version 1.11.5 กับเครื่อง microplate reader

รุ่น SpectraMax iD5 (Molecular devices®, USA) ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์ผล SoftMax Pro version 7.1 พบว่าค่า GM (n=15) เท่ากับร้อยละ 103.5 และ 102.6 ตามลำดับ และมีค่า %GCV เท่ากับ 9.1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ ไม่เกินร้อยละ 25.0 และ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.213) มีค่า t-Stat (1.306) ที่คำนวณได้ น้อยกว่า t critical two-tail (2.145)

วิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ความแรง rituximab ด้วยวิธี CDC ที่พัฒนาขึ้นพบว่าวิธีมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ความแรงผลิตภัณฑ์ rituximab ได้ โดยมีค่า %relative potency เปรียบเทียบกับยาอ้างอิงอยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 ตามเกณฑ์การยอมรับสำหรับค่าความแรงในผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ[7] มีความจำเพาะต่อยาโดยมีเซลล์ WIL2-S เป็นเซลล์เป้าหมาย สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ในพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้แก่ ความถูกต้อง ความเที่ยง ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องตามระดับความเข้มข้นของโปรตีนยา สามารถแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรงตลอดช่วงค่าความเข้มข้นร้อยละ 50.0-150.0 และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.998 มีความเที่ยงของวิธีทั้งการทำซ้ำภายในวันเดียวกัน หรือต่างนักวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีความคงทนของวิธี สำหรับปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของผลการทดสอบ เช่น passage number ของเซลล์ที่แตกต่างกัน ระยะเวลาในการบ่มก่อนและหลังเติม CCK-8 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบหรือแม้แต่เครื่อง microplate reader ที่มีโปรแกรมคำนวณ parallel line analysis ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าค่า %GCV มีค่าน้อยกว่า 25.0[14] และการเปรียบเทียบผลทางสถิติพบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าสภาวะและวิธีดังกล่าวมีความคงทน และจากการใช้วิธีนี้ในการตรวจผลิตภัณฑ์ยา rituximab ยี่ห้อหรือรุ่นการผลิตต่าง ๆ จำนวน 5 ผลิตภัณฑ์ พบว่า ทุกผลิตภัณฑ์มีค่าความแรงของตัวอย่างเทียบกับยาอ้างอิงให้ค่า %relative potency อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 เป็นไปตามเกณฑ์ที่เหมาะสม และสอดคล้องกับเกณฑ์ที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ ปัจจุบันหน่วยงาน The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ซึ่งเป็นผู้ผลิตสารมาตรฐานให้กับ World Health Organization (WHO) ได้จัดเตรียมสารมาตรฐานสากลสำหรับ rituximab โดยมีห้องปฏิบัติการจำนวน 16 ห้องปฏิบัติการจากทั่วโลก ร่วมกันทดสอบเพื่อกำหนดค่าความแรงของสารมาตรฐานสากลโดยแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ CDC, ADCC, Binding และ Apoptosis ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา rituximab ซึ่งวิธีทดสอบที่แต่ห้องปฏิบัติการใช้นั้นแม้จะเป็นวิธีเดียวกัน แต่มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง หรือสารวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างกัน[9] โดย NIBSC ได้วิเคราะห์ผลทั้งหมดและประกาศค่าความแรงร่วมกันในหน่วย International Unit (IU) แยกตามแต่ละวิธีทดสอบ แต่ด้วยข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณที่ได้รับการจัดสรรไม่เพียงพอ ทำให้การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถนำสารมาตรฐานสากลมาเป็นสารมาตรฐานหลักในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีได้ จึงได้ทดสอบค่าความแรงของสารมาตรฐานสากล (ตัวอย่าง E) กับ in-house reference standard ด้วยวิธี CDC พบว่า มีค่า %relative potency อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 สอดคล้องกับผลการทดสอบกับ 16 ห้องปฏิบัติการ[9] แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ความแรงที่พัฒนาขึ้นที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ความแรงของผลิตภัณฑ์ยา monoclonal antibody ชนิด rituximab ที่ใช้ในประเทศ เพื่อประเมินประสิทธิภาพและคุณภาพด้านชีวภาพสำหรับควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ยา rituximab ควบคู่กับการควบคุมคุณภาพด้านเคมี-ฟิสิกส์[2] เพื่อให้ประชาชนที่ได้รับผลิตภัณฑ์ rituximab ที่มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ทั้งนี้ในอนาคตห้องปฏิบัติการจะนำสาร

มาตรฐานสากลที่จัดเตรียมโดย WHO มาเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแรงของผลิตภัณฑ์ยา rituximab ทุกๆ ยี่ห้อ เพื่อเป็นมาตรฐานเดียวกันในการตัดสินประเมินคุณภาพทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้องค์ความรู้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีให้เป็นไปตามมาตรฐานของระบบคุณภาพนั้น สามารถเผยแพร่หรือให้คำแนะนำแก่ผู้ผลิตในประเทศไทย ที่มีแนวโน้มจะพัฒนาการผลิตยาชีววัตถุมากขึ้นในปัจจุบัน ตามแนวทางส่งเสริมผู้ผลิตในประเทศเพื่อสร้างความยั่งยืนด้านการแพทย์และสาธารณสุขตามแนวนโยบายของประเทศ Thailand 4.0 ต่อไป

สรุป

การวิเคราะห์ความแรงของยา rituximab ด้วยวิธี CDC โดยใช้เซลล์ WIL2-S เป็นเซลล์เป้าหมาย เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีและได้ทดสอบในผลิตภัณฑ์ rituximab ต่างผู้ผลิต พบว่าวิธีมีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความเที่ยง ความคงทนของวิธี และมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ มีค่า %relative potency อยู่ในช่วงร้อยละ 80.0-125.0 จึงสรุปได้ว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพความแรงยา rituximab ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขที่สนับสนุนงบประมาณให้การศึกษาสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, Brakel JH, Beers SA, French RR, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. J Immunol 2006;177(1),362-71.
2. Miranda-Hernández MP, López-Morales CA, Ramírez-Ibáñez ND, Piña-Lara N, Pérez NO, Molina-Pérez A, et al. Assessment of physicochemical properties of rituximab related to its immunomodulatory activity. Journal of Immunology Research [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 23];2015: 910763. Available from: https://downloads.hindawi.com/journals/jir/2015/910763.pdf
3. Chand S, Kumar B, Prathap VM, Singh SP, Mahajan R. Quality assurance of rituximab (anti-CD 20) antibodies by potency testing: determining the system suitability criteria and sample acceptance criteria. Current Science 2018;114(12):2513-8.
4. Derbyshire M, Shina S. Patent expiry dates for biologicals: 2018 update. Gabi Journal-Generics and Biosimilars Initiative Journal 2019;8(1):24-31.
5. สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือและหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars). กรุงเทพมหานคร: อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2561.
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. Geneva: World Health Organization; 2013.
8. Taylor RP, Lindorfer MA. Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease-the immune complex decoy hypothesis. Nature Clinical Practice Rheumatology 2007;3(2):86-95.
9. Prior S, Fox B, Dougall T, Rigsby P, Hufton S. Report on a collaborative study for proposed candidate1st international standard for the biological activities of Rituximab. Geneva: World Health Organization; 2017.
10. Cerny T, Borisch B, Introna M, Johnson P, Rose AL.

Mechanism of action of rituximab. Anticancer Drugs 2002;13(Suppl 2):S3-S10.

11. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. Expert Opinion on Drug Discovery 2008;3(6):655-69.
12. 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): 262-9.
13. European Medicines Agency. ICH topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. (CPMP/ICH/381/95) [Internet]. 1995 [cited 2021 June 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
14. ASEAN. ASEAN guidelines for validation of analytical procedures for vaccines [Internet]. 2018 [cited 2021 June 19]. Available from: https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccines-docx.pdf

Abstract: Method Validation for Potency Testing of Rituximab Monoclonal Antibody by Complement Dependent Cytotoxicity Assay

Jiradej Patchim, B.Sc.; Sompong Sapsutthipas, B.Sc., M.Sc., Ph.D.; Saiwarul Jadoonkittinan, B.Sc., M.Sc.; Supaporn Phumiamorn, B.Sc., M.Sc., Ph.D.

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand

Journal of Health Science 2022;31(1):183-94.

Rituximab is monoclonal antibody used for the treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma and other diseases. At present, there is no monograph for potency assay in the pharmacopeias therefore the manufacturers used various methods for estimating the potency of rituximab. In this study, we developed a potency assay by using complement dependent cytotoxicity (CDC) which could be applied for difference rituximab products. Basically, this method is based on activity of rituximab binding to CD-20 receptors on the surface of WIL2-S cells that activates complement system in serum and leads to cytotoxicity response to concentration of rituximab. The relative potency of rituximab was calculated against its reference drug using 4-parameter logistic equation. The results showed the specificity of the CDC assay to rituximab and WIL2-S cells. The method presented %recovery between 80.0-125.0. Repeatability and intermediate precision of the method showed a geometric coefficient of variation (GCV) values of 8.2 and 5.8% respectively. The relative potency curve had linearity at a range between 50.0-150.0% with a coefficient of determination of 0.998. The data obtained from changing of passage numbers of cells, incubation time, the density of cells and equipment presented that %GCV was less than 25.0. Furthermore, 5 rituximab products were tested by this method, all results were comparable to those of the manufacturers. Taken together, we concluded that the potency test by CDC assay could be used as a standard method for quality control of rituximab.

Keywords: complement dependent cytotoxicity; method validation; potency; rituximab