
การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ค่าความแรงยา Pegfilgrastim โดยวิธี Cell Proliferation

สมปอง ทรัพย์สุทธิภรณ์ จิรเดช ปัจฉิม สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยา Pegfilgrastim เป็น growth factor ใช้กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว ปัจจุบันไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงของยาในตำรายาสากล จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ด้วยยาเจือจางที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และวัดปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยใช้สาร luminescence วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยโปรแกรม parallel line analysis ทำให้ทราบค่าความแรงของยาได้ เมื่อนำวิธีที่ได้ไปทดสอบความถูกต้องของวิธี ผลการศึกษาพบว่ายา Pegfilgrastim สามารถกระตุ้นให้เซลล์ adapted M-NSF-60 เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเมื่อทดสอบความแม่นยำ พบว่ามีค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดระหว่าง 80-125% ความเที่ยงของวิธีให้ค่า %GCV ของการทำซ้ำและต่างวันวิเคราะห์เท่ากับ 9.70 และ 9.65 มีความเป็นเส้นตรงและช่วงของทดสอบที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-200% ได้กราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงมีค่า $r^2 = 0.997$ ส่วนความคงทนของวิธีทำโดยเปลี่ยน passage number ของเซลล์ และเวลาในการบ่ม พบว่ามีค่า %GCV <25% และไม่มี ความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพยา Pegfilgrastim 3 ยี่ห้อ ที่นำมาใช้ในการศึกษาสำหรับยาอื่น ๆ ต้องตรวจสอบวิธีก่อนนำไปใช้

คำสำคัญ : Pegfilgrastim, ความแรง, Cell proliferation, ทดสอบความถูกต้องของวิธี, การพัฒนาวิธี

Corresponding author E-mail: sompong.s@dmasc.mail.go.th

Received: 21 February 2020

Revised: 19 October 2020

Accepted: 18 February 2021

บทนำ

Human granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) เป็น glycoprotein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและปลดปล่อยเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ออกจากไขกระดูก (bone marrow) Pegfilgrastim เป็นยาที่มีการรวมโปรตีน recombinant human G-CSF (r-metHuG-CSF), Filgrastim กับโมเลกุลของ polyethylene glycol (PEG) ขนาด 20 กิโลดาลตัน โดยโมเลกุลของ PEGylated G-CSF ถูกทำให้เสถียรด้วย two disulphide bridges โมเลกุลมีขนาด 38,000 ดาลตัน ขณะที่ Filgrastim มีขนาดประมาณ 18,800 ดาลตัน ยา Pegfilgrastim ออกฤทธิ์ภายในร่างกายได้นานกว่า Filgrastim เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า จึงถูกขับออกทางไตได้น้อยกว่า^(1, 2, 3, 4) ซึ่งยา Pegfilgrastim และ Filgrastim มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน คือ เพิ่มจำนวนนิวโทรฟิล มีข้อบ่งใช้ในการรักษา คือ ใช้เพื่อลดระยะเวลาการเกิดภาวะนิวโทรฟิลในเลือดต่ำ (Neutropenia) ลดอุบัติการณ์ของการเกิด febrile neutropenia และลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจากการเกิด febrile neutropenia ในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพื่อรักษาโรคมะเร็ง (ยกเว้น chronic myeloid leukemia และ myelodysplastic syndromes)^(1, 2, 3, 4)

ปัจจุบันมีการผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ของยา Pegfilgrastim ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากยาชีววัตถุต้นแบบ (originator หรือ innovator drug) ครบระยะเวลาของสิทธิบัตรแล้ว ในปัจจุบันยาชีววัตถุคล้ายคลึงนำมาใช้เรียกเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ชีววัตถุประเภทโปรตีนที่ได้มาจากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเท่านั้น เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้สูงและสามารถตรวจสอบคุณลักษณะได้เป็นอย่างดี ตามหลักการแล้วประโยชน์ที่ได้จากการผลิตยากลุ่มนี้คือ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก ราคาจะถูกลงเมื่อเทียบกับยาต้นแบบ ทำให้มีการเข้าถึงยาได้มากขึ้น^(5, 6, 7) การควบคุมคุณภาพของยาชีววัตถุคล้ายคลึงจะทำการศึกษาเปรียบเทียบ (comparability study) กับยาชีววัตถุต้นแบบ หรือสารมาตรฐานอ้างอิง (reference product) โดยประเมินทั้งด้านคุณภาพ (quality), non-clinical และ clinical^(8, 9, 10, 11) ซึ่งยาชีววัตถุคล้ายคลึงจะมีความคล้ายคลึงในแง่คุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพกับยาชีววัตถุต้นแบบ สำหรับการศึกษาระดับคุณภาพ ควรเปรียบเทียบยาชีววัตถุคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานอ้างอิงโดยการศึกษาเปรียบเทียบแบบ head-to-head ด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวกัน โดยวิธีทางชีวภาพ (biological), เคมีกายภาพ (physicochemical) และภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological) ส่วนการเปรียบเทียบด้าน non-clinic และ clinic จะเปรียบเทียบยาชีววัตถุคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานอ้างอิงโดยตรง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความปลอดภัย ซึ่งสารมาตรฐานอ้างอิงที่ใช้ควรเป็นรุ่นการผลิตเดียวกันตลอดการศึกษาเปรียบเทียบ⁽¹²⁾ การทดสอบทางชีวภาพที่สำคัญเพื่อยืนยันคุณภาพของยาชีววัตถุเหล่านี้ คือ การตรวจสอบความแรงของผลิตภัณฑ์เพื่อบ่งบอกว่ายา biosimilars นี้มีความสามารถในการรักษาได้หรือไม่ ซึ่งวิธีทดสอบความแรงของยา biosimilars โดยส่วนใหญ่จะวัดโดยวิธีในหลอดทดลอง (*in vitro* bioassay) ซึ่งที่นิยมมี 2 วิธี คือ receptor binding assays และ cell-based functional assays หรือ cell proliferation assay⁽¹³⁾ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ในประเทศ คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีขึ้น โดยดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Filgrastim ใน U.S. pharmacopeia⁽¹⁴⁾ คือ วิธี cell proliferation assay โดยจะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ตอบสนองต่อ G-CSF โดยทำการทดสอบตัวอย่างยาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง ในขั้นตอนการพัฒนาวิธีจะต้องหาปริมาณเซลล์ ระดับความเข้มข้นของยาที่เหมาะสม และวิธีการอ่านผลการทดสอบ ซึ่งสามารถวัดค่า luminescence หรือ colorimetric หรือ fluorescence ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น (substrate) ที่ใช้เป็นชนิดใด^(15, 16) จากนั้นคำนวณผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม parallel-line analysis และรายงานผลเป็นค่า %relative potency⁽¹²⁾ หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จะทดสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความเที่ยง และความคงทนของวิธี⁽¹⁷⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการหาความแรงของยา Pegfilgrastim ของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Pegfilgrastim USP reference standard ความเข้มข้น 1,000 ng/ml (lot no. F0M527) จาก U.S. Pharmacopeia ส่วนตัวอย่างยา Pegfilgrastim จากบริษัท (ยี่ห้อ) ประกอบด้วย ยี่ห้อ A ขนาด 6 mg/0.6 ml ยี่ห้อ B ขนาด 6 mg/0.6 ml และยี่ห้อ C ขนาด 6 mg/0.6 ml ยารุ่นเดียวกันจำนวน 6 ขวดต่อยี่ห้อ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ Mouse *Mus musculus* myelogenous leukemia, M-NSF-60 (ATCC® CRL-1838™) ที่ตอบสนองต่อ interleukin 3 (IL-3) และ G-CSF และปรับสภาพเซลล์ให้มีความไวสำหรับการทดสอบ โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย G-CSF ความเข้มข้น 1 ng/ml

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate luminometer) รุ่น Orion L ของ Titertex Berthold ประเทศเยอรมนี กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (Inverted microscope) รุ่น CK2 ของ Olympus ประเทศญี่ปุ่น ตู้ชีววิทย (Biological Safety Cabinet) ตู้เพาะเชื้อแบบใช้ CO₂ (CO₂ Incubator) อุณหภูมิ 37 ± 1 °C รุ่น Galaxy 170R ของ New Brunswick ประเทศเยอรมนี ไมโครเพลทสีขาวกันแบน 96 หลุม มีกันเพลทใส ผลิตภัณฑ์ของ Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI medium 1640 (Cat. No. A10491-01, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา Heat-inactivated Fetal Bovine Serum (Cat. No. 26140-079, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 21985-023, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Cat. No. G7572) ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

การตรวจสอบความแรงโดยวิธี Cell proliferation

การตรวจสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ใช้วิธี cell proliferation โดยอาศัยความสามารถของเซลล์ M-NSF-60 ที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยยา Pegfilgrastim ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ (assay medium) และสภาวะในการทดสอบเป็นไปตามตำราสากลสำหรับการวิเคราะห์ค่าความแรงยา Filgrastim⁽¹⁴⁾ โดยกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 จำนวน 5×10^3 cells/50 µl/หลุม ในเพลท 96 หลุม ด้วยตัวอย่างยาและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 ng/ml จากนั้นเจือจางเป็น two folds serial dilution (จำนวน 8 dilutions) แล้วดูดใส่ในเพลทที่มีเซลล์ปริมาตร 50 µl/หลุม ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.001953 - 0.25 ng/ml ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงช่วงการวิเคราะห์ นำเพลทไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 29 ชั่วโมง โดยมีสารมาตรฐาน Pegfilgrastim ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็น positive control และ assay medium เป็น negative control เมื่อครบเวลาวัด cell proliferation โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA) โดยเติม CellTiter-Glo solution ปริมาตร 100 µl/หลุม แล้วนำไปวัดค่า luminescence ด้วยเครื่อง Microplate luminometer รุ่น Orion L (Titertex Berthold, Germany) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist โดยใช้ parallel-line

model รายงานผลเป็นค่า %relative potency คำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, GM), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation, GSD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Geometric Coefficient of Variation, %GCV)

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

ทำการทดสอบความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธี

ความจำเพาะ (Specificity) โดยการกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ด้วยสารมาตรฐาน ยา Pegfilgrastim ยี่ห้อต่างๆ และ formulation buffer ของยา Pegfilgrastim แต่ละยี่ห้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวัน โดยมีเกณฑ์การพิจารณา คือ เฉพาะสารมาตรฐานและตัวอย่างยาเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ส่วน formulation buffer ของยาไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงจะถือว่าวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range) ตรวจวิเคราะห์ค่าความแรง Pegfilgrastim USP reference standard ที่เตรียมให้มีค่าความเข้มข้นคิดเป็น 50% (0.25 ng/ml), 75% (0.375 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml), 150% (0.75 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ Coefficient of determination; r^2) และ %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ $r^2 > 0.990$ และ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทดสอบจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

ความแม่นยำ (Accuracy) ตรวจสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของค่าความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคิดเป็น 50% (0.25 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน คำนวณ %recovery ดังนี้

$\%recovery = (\text{ค่าเฉลี่ยของ \%relative potency ที่วัดได้} / \%relative potency \text{ ที่ทราบค่า}) \times 100$
โดยเกณฑ์ยอมรับ %recovery เท่ากับ 80-125%

ความเที่ยง (Precision) ตรวจสอบใน 2 หัวข้อ ได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ทดสอบความเที่ยงโดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หา %GCV และการทำซ้ำต่างวัน (Intermediate precision) โดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์หา %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทดสอบจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

ความคงทน (Robustness) โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงยา โดยใช้ passage number 12, 16 และ 19 ในการทดสอบ นอกจากนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการบ่ม (incubate) โดยใช้ที่ 27 ชั่วโมง และที่ 29 ชั่วโมง และนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณค่า %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์และแสดงโดยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ GM GSD และ %GCV โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้

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

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

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

ผล

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

ความจำเพาะของวิธี โดยการกระตุ้น adapt M-NSF-60 cell lines ด้วยยา Pegfilgrastim ยี่ห้อต่างๆ และ formulation buffer ของยา Pegfilgrastim แต่ละยี่ห้อ ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ต่างวันกัน พบว่ามีเฉพาะตัวอย่างยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A, B และ C สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของ %relative potency เท่ากับ 115.3%, 108.1% และ 102.8% ตามลำดับ ในขณะที่ formulation buffer ของยาทุกยี่ห้อไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด cell proliferation ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความจำเพาะของวิธี cell proliferation ในการวิเคราะห์ความแรงของยา Pegfilgrastim และ formulation buffer โดยทดสอบต่างวัน

ยี่ห้อ	ครั้งที่	%relative potency	formulation Buffer
A	1	101.2	- *
	2	123.1	-
	3	122.9	-
	GM	115.26	
	GSD	1.12	
	%GCV	11.30	
B	1	111.4	-
	2	123.0	-
	3	98.7	-
	GM	108.06	
	GSD	1.16	
	%GCV	14.78	
C	1	103.5	-
	2	113.9	-
	3	92.1	-
	GM	102.78	
	GSD	1.11	
	%GCV	10.67	

*เซลล์ไม่เกิดการเพิ่มจำนวน

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ค่าความแรง Pegfilgrastim reference standard ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50% (0.25 ng/ml), 75% (0.375 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml), 150% (0.75 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบแปรผันตามระดับความเข้มข้นเมื่อนำค่า expected potency และค่า found GM relative potency มาสร้างกราฟและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ พบว่าได้กราฟที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 50 - 200% และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ Coefficient of determination; r^2) เท่ากับ 0.9967 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ($r^2 \geq 0.990$) แสดงให้เห็นว่า range ที่ทำการทดสอบมีความเหมาะสมจากการคำนวณค่า linear regression ได้ค่า r^2 เท่ากับ 0.9967 และได้ค่า F-test ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า F-test จากตาราง (critical value for the F-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) แสดงว่า กราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่วิเคราะห์ และพบว่าค่าความแรงแปรผันตรงต่อระดับความเข้มข้น และค่า %GCV ของความแม่นยำของการทำซ้ำเท่ากับ 3.33, 4.73, 13.09, 15.20 และ 14.05 ตามลำดับ มี %recovery เท่ากับ 91.6%, 101.6%, 96.0%, 108.3% และ 106.5% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard

expected relative potency (%)	ครั้งที่	found relative potency (%)	GM	%GCV	%recovery
50	1	45.1	45.8	3.33	91.6
	2	44.8			
	3	47.6			
75	1	78.5	76.2	4.73	101.6
	2	78.2			
	3	72.2			
100	1	107.9	96.0	13.09	96.0
	2	83.4			
	3	98.2			
150	1	167.3	162.4	15.20	108.3
	2	137.8			
	3	185.6			
200	1	249.2	212.9	14.05	106.5
	2	190.9			
	3	202.7			

ความแม่นยำของวิธี แสดงด้วยค่า %recovery โดยในตัวอย่างที่เตรียมให้มีค่าความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard ที่ expected relative potency เท่ากับ 50%, 100% และ 200% พบว่าตัวอย่างที่ expected relative potency ที่ 50% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 45.8% และ %recovery เท่ากับ 91.6% ขณะที่ตัวอย่างที่ expected relative potency ที่ 100% สามารถตรวจได้ค่า GM เท่ากับ 96.0% และ %recovery เท่ากับ 96.0% และเมื่อตัวอย่างที่ expected relative potency เป็น 200% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 212.9 และ %recovery เท่ากับ 106.5% รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความแม่นยำของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard

expected relative potency (%)	ครั้งที่	found relative potency (%)	GM	%recovery
50	1	45.1	45.8	91.6
	2	44.8		
	3	47.6		
100	1	107.9	96.0	96.0
	2	83.4		
	3	98.2		
200	1	249.2	212.9	106.5
	2	190.9		
	3	202.7		

ความเที่ยงของวิธี ในหัวข้อ repeatability เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว พบว่า %relative potency อยู่ในช่วงค่า 89.2 – 120.4%, $GM \pm GSD$ เท่ากับ $102.06 \pm 1.10\%$ และ %GCV เท่ากับ 9.70 ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับการศึกษา intermediate precision ของผู้วิเคราะห์คนที่ 1 พบว่า %relative potency มีค่าอยู่ในช่วง 97.0 – 117.2% $GM \pm GSD$ เท่ากับ $104.33 \pm 1.11\%$ และ %GCV เท่ากับ 10.20 ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบ %relative potency อยู่ในช่วง 88.2 – 97.2% $GM \pm GSD$ เท่ากับ $92.73 \pm 1.05\%$ และ %GCV เท่ากับ 4.87 ดังแสดงในตารางที่ 5

ความความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงยา A ได้ค่า %GCV เท่ากับ 4.97 นอกจากนี้ ได้ทำการเปลี่ยนแปลง incubation time จากเดิม 29 เป็น 27 ชั่วโมง ผลการทดสอบได้ค่า %GCV เท่ากับ 10.96 และ 11.12 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง incubation time 27 และ 29 ชั่วโมง โดยใช้สถิติ t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances พบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่า t-Stat (1.56) ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า t Critical one-tail (2.13)

ตารางที่ 4 ความเที่ยงของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A โดย การทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว

ครั้งที่	%relative potency
1	100.2
2	89.2
3	104.1
4	120.4
5	101.4
6	99.5
GM	102.06
GSD	1.10
%GCV	9.70

ตารางที่ 5 ความเที่ยงของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A โดยการทดสอบต่างวัน โดยผู้วิเคราะห์สองคน

ครั้งที่	%relative potency	
	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1	ผู้วิเคราะห์คนที่ 2
1	117.2	97.2
2	99.9	93.0
3	97.0	88.2
GM	104.33	92.73
GSD	1.11	1.05
%GCV	10.20	4.87

ตารางที่ 6 ความคงทนของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A เมื่อ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Cell passage number	%relative potency	GM	GSD	%GCV
12	107.8	101.82	1.05	4.97
16	98.5			
19	99.4			

ตารางที่ 7 ความคงทนของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A เมื่อเปลี่ยนเวลาที่ใช้ใน incubate ที่ 37 °C จาก 29 ชั่วโมง เป็น 27 ชั่วโมง

Incubation time (ชั่วโมง)	%relative potency	GM	GSD	%GCV
29	95.3	90.98	1.12	10.96
	80.3			
	98.4			
27	98.3	104.79	1.12	11.12
	98.3			
	119.1			

วิจารณ์

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะของวิธี โดยพบว่าเฉพาะตัวอย่างยา Pegfilgrastim ที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบมีผลกระตุ้นให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ขณะที่ formulation buffer ของยาแต่ละชนิดไม่สามารถกระตุ้นได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะและ formulation buffer ไม่มีผลต่อการทดสอบ นอกจากนี้การทดสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีทั้งแบบทำซ้ำในวันเดียวกัน ทำซ้ำต่างวันกัน และความแม่นยำของวิธี พบว่าผ่านเกณฑ์ในทุกพารามิเตอร์ การทดสอบความเป็นเส้นตรงพบว่ากราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงค่าร้อยละความเข้มข้น 50 – 200% และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9967 ความคงทนของวิธีสามารถใช้เซลล์ที่ passage 4 ถึง 20 และ incubation time ที่ 27–29 ชั่วโมง โดยผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันจากผลการทดสอบ โดยทั่วไปการควบคุมคุณภาพของยา Pegfilgrastim จะตรวจสอบทั้งด้าน physicochemical และ biological activity ของยา⁽²⁰⁾ ซึ่งการตรวจสอบความแรงของยา Pegfilgrastim จะใช้วิธี cell proliferation assay โดยจะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของ adapted M-NSF-60 cells หลังกระตุ้นด้วย Pegfilgrastim ซึ่งห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจะใช้วิธีการทดสอบ ชนิดของเซลล์ที่ใช้วิธีการอ่านผลการทดสอบแตกต่างกันไป ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกัน^(21, 22, 23) นอกจากนี้ยังมีวิธีการทดสอบความแรงด้วยวิธีอื่น ๆ ได้แก่ วิธี receptor binding assay โดยใช้เครื่อง flow cytometer ในการวัดปริมาณ Pegfilgrastim ที่จับกับ G-CSF receptor และวิธีการวัด binding kinetic โดยวิธี Surface Plasmon Resonance (SPR)⁽²³⁾ จากการศึกษาโดย Biotherapeutics Group of NIBSC ซึ่งเป็นผู้ผลิตสารมาตรฐานของ WHO ได้จัดเตรียมสารมาตรฐานและส่งให้ห้องปฏิบัติการต่างๆ จำนวน 24 ห้องปฏิบัติการทุกห้องปฏิบัติการใช้วิธี cell proliferation assay จำนวน 13 ห้องปฏิบัติการใช้ M-NSF-60 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 2 ห้องปฏิบัติการ ที่ใช้วิธีการอ่านค่า luminescence เหมือนที่ใช้ในการศึกษานี้ จากสรุปผลการทดสอบพบว่าห้องปฏิบัติการที่ใช้เซลล์และวิธีการอ่านผลการทดสอบเหมือนการศึกษานี้มีค่า %GCV น้อยกว่า 25% และมีค่า %GCV ต่ำเมื่อเทียบกับห้องปฏิบัติการที่ใช้เซลล์และวิธีการอ่านผลที่ต่างไป เช่น ใช้การอ่านค่าโดย colorimetric (MTT) นอกจากนี้วิธีการอ่านค่า luminescence ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบสั้นกว่าเมื่อเทียบกับวิธี colorimetric⁽²⁴⁾ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ คือ เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบควรมีสภาพของเซลล์ดี ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย เชื้อราและไม่โครพลาสมา ควรใช้เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย G-CSF เพื่อให้เซลล์มีความไวต่อการกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนด้วยยา Pegfilgrastim ควรใช้เซลล์ passage ที่ 4–20 ในการทดสอบ จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้เห็นได้ว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของยาได้ทั้ง 3 ยี่ห้อ ที่ใช้ในการศึกษา แต่จะนำวิธีนี้ไปพิสูจน์ทดลองใช้กับยี่ห้ออื่นภายหลัง

สรุป

การทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim โดยวิธี cell proliferation ที่พัฒนาขึ้น เมื่อทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีการทดสอบมีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธี โดยมีค่า %relative potency อยู่ในช่วง 80-125% ซึ่งสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นการควบคุมคุณภาพยา Pegfilgrastim 3 ยี่ห้อ ที่นำมาใช้ในการศึกษา สำหรับยี่ห้ออื่นๆ ต้องตรวจสอบวิธีก่อนนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr Pharm Des* 2004; 10(11): 1235-44.
2. Yang BB, Kido A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50(5): 295-306.
3. Molineux G. Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients. *Anticancer Drugs* 2003; 14(4): 259-64.
4. Curran MP, Goa KL. Pegfilgrastim. *Drugs* 2002; 62(8): 1207-13.
5. Knezevic I, Griffiths E. Biosimilars – global issues, national solutions. *Biologicals* 2011; 39(5): 252-5.
6. Knezevic I. Evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs): scientific principles and their implementation. *Biologicals* 2011; 39(5): 256-61.
7. Roger SD. Biosimilars: current status and future directions. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(7): 1011-8.
8. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products. [online]. 2005; [cited 2018 Jul 19]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-first-version_en.pdf.
9. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en.pdf.
10. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-1.pdf.
11. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). In: WHO expert committee on biological standardization. Geneva, 19-23 Oct 2009. [online]. 2010; [cited 2018 Jul 19]; [34 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf.

12. Thorpe R, Wadhwa M. Intended use of reference products & WHO international standards/reference reagents in the development of similar biological products (biosimilars). *Biologicals* 2011; 39(5): 262-5.
13. Annex 2: guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). In: WHO expert committee on biological standardization, sixtieth report. (WHO technical report series, no. 977). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013. p. 51-89.
14. U.S. Pharmacopeia National Formulary. USP 42 NF 37, Vol. 1: Rockville, MD.: The United States Pharmacopeial Convention; 2019. p. 1844-1845.
15. Wadhwa M, Bird C, Dilger P, Mire-Sluis T, Thorpe R. Quantitative biological assays. In: Balkwill FR, editor. *Cytokine cell biology: a practical approach*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2000. p. 207-238.
16. Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP. Truncation of the c-myc gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1986; 83(14): 5010-4.
17. European Medicines Agency. ICH topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. (CPMP/ICH/381/95). [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [15 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
18. ASEAN guidelines for validation of analytical procedures for vaccines. [online]. 2018; [cited 2018 Jul 19]; [19 screens]. Available from: URL: <https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccinesdocx.pdf>.
19. Schofield TL. Assay development. In: Chow SC, editor. *Encyclopedia of biopharmaceutical statistics*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 55-62.
20. Sorgel F, Lerch H, Lauber T. Physicochemical and biologic comparability of a biosimilar granulocyte colony-stimulation factor with its reference product. *BioDrugs* 2010; 24(6): 347-57.
21. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, Health AB, Matejtschuk P, Thorpe R, et al. The 2nd international standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods* 2011; 367(1-2): 63-9.
22. Brokx S, Scrocchi L, Shah N, Dowd J. A demonstration of analytical similarity comparing a proposed biosimilar pegfilgrastim and reference pegfilgrastim. *Biologicals* 2017; 48: 28-38.
23. Tiwari K, Wadhane M, Haque S, Govender T, Kruger HG, Mishra MK, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol* 2015; 53(6): 849-54.
24. Wadhwa M, Bird C, Dougall T, Rigsby P, Bristow A, Thorpe R, et al. Establishment of the first international standard for PEGylated granulocyte colony stimulating factor (PEG-G-CSF): report of an international collaborative study. *J Immunol Methods* 2015; 416: 17-28.

Development of Pegfilgrastim Potency Testing by Cell Proliferation

**Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim Saiwarul Jadoonkittinan
and Supaporn Phumiamorn**

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

ABSTRACT Pegfilgrastim is a growth factor that stimulates the growth of white blood cells. At present, there is no standard method for determining the potency of this drug in any international pharmacopoeia. Therefore, a cell proliferation assay was developed by stimulating the adapted M-NSF-60 with diluted drugs at a suitable concentration. The increasing number of cells was measured by using luminescence substrate. The results were analyzed using a parallel line analysis program to determine the drug potency. After the method had been validated, the results showed that pegfilgrastim could stimulate the adapted M-NSF-60 multiplication. For the accuracy, the %recovery within the acceptance criteria from 80% to 125%. The precision of the method, the %GCV of repeatability and intermediate precision were 9.70 and 9.65, respectively, with a linearity and appropriate range between 50–200%. The linearity and range exhibited the r^2 value of 0.997. The robustness of the method was tested by modifying the passage numbers of cells and the incubation time., the %GCV was <25% and there was no significant difference at the 95% confidence level. All data show that the newly developed method is suitable for use as a method for determining the potency of pegfilgrastim 3 brands used in this study. For other brands of drugs must verify the method before applying.

Keywords : Pegfilgrastim, Potency, Cell proliferation, Method validation, Method development