



การทดสอบความถูกต้องของวิธี Cell Proliferation สำหรับการตรวจสอบ ความแรงของผลิตภัณฑ์ฟิลแกรสติม Method Validation of Cell Proliferation Assay for Filgrastim Potency Testing

สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์

จิเรเดช ปัจฉิม

สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์

สุภาพร ภูมิอมร

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Email: sompong.s@dmcs.mail.go.th

รับต้นฉบับ 11 มิถุนายน 2562 ปรับปรุง 1 ตุลาคม 2562 รับผิดชอบ 24 มีนาคม 2563

Sompong Sapsutthipas

Jiradej Patchim

Saywarul Jadoonkittinan

Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้เริ่มมีการผลิตยาชีววัตถุฟิลแกรสติมขึ้นเองในประเทศ การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ฟิลแกรสติมจึงมีความจำเป็น การตรวจสอบความแรงด้วยวิธีเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) เป็นที่นิยมใช้ในหลายประเทศ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยงทั้งการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและต่างวัน ความเป็นเส้นตรงและความคงทนของวิธี ผลการศึกษาความจำเพาะพบว่า มีเฉพาะสารมาตรฐานและยาฟิลแกรสติมเท่านั้นที่กระตุ้นให้เซลล์ adapted M-NSF-60 เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเมื่อเทียบกับ formulation buffer และเมื่อทดสอบความแม่นยำโดยวัดค่าความแรงของยาฟิลแกรสติมของสารมาตรฐานที่ %relative potency ที่ 50% 100% และ 200% พบว่าค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดระหว่าง 80-125% ความเที่ยงของวิธีให้ค่า %GCV น้อยกว่า 25% ส่วนความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ให้ค่า $r^2 = 0.9979$ โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-200% relative potency ส่วนความคงทนของวิธีทำโดยเปลี่ยน passage number ของเซลล์และ incubation time ในการทดสอบ พบว่าสามารถใช้ cell passage ในช่วงตั้งแต่ passage ที่ 4-20 และ incubation time ที่ 27 และ 29 ชั่วโมง โดยค่า %GCV น้อยกว่า 25% นอกจากนี้ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.11$) จากข้อมูลทั้งหมดแสดงว่าวิธี cell proliferation มีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และมีความคงทนของวิธีวิเคราะห์ จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ความแรงของ ฟิลแกรสติม

คำสำคัญ: Cell proliferation ฟิลแกรสติม ความแรง

Abstract

Nowadays, biosimilar filgrastim is being to produce in domestic, quality control of filgrastim products is therefore necessary. The strength examination by using a cell proliferation method is common used in many countries. The study aimed to measure the accuracy of the methods in various parameters which include: specificity, accuracy, precision, linearity, and robustness. The results showed that this method revealed specificity to only filgrastim standard and samples. They were able to trigger the proliferation of adapted M-NSF-60 cells when compared with the formulation buffer. For the accuracy, the relative potency of filgrastim standard at 50, 100, and 150% was analyzed and showed that the %recovery were within the acceptance criteria from 80 to 125%. The precision of the method was less than 25% of GCV. Linearity and range exhibited the $r^2 = 0.9979$ in the suitable range at 50-200% of relative potency. The robustness of the method was tested by modifying the passage numbers of cells and the incubation time. The robustness indicated that the 4 to 20 passage numbers of cells was able to use and incubation time by 27 and 29 hours, whereas %GCV was less than 25% at 95% confidence level ($p = 0.11$). All of the results confirmed that the cell proliferation method had the specificity, accuracy, precision, and robustness. It is clear that this method is suitable to use as a standard method for the potency test of filgrastim products.

Key words: cell proliferation, filgrastim, potency

บทนำ

ฟิลแกรสติม (filgrastim) เป็นยาชีววัตถุที่ผลิตจากสิ่งที่มีชีวิตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิต จึงมีความแปรปรวนของการผลิตสูง filgrastim หรือ Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) เป็น glycoprotein ที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด จึงใช้เพื่อลดระยะเวลาการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลต่ำ ปัจจุบันมีการผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ของยาฟิลแกรสติมในหลายประเทศเนื่องจากยาชีววัตถุต้นแบบ (originator หรือ innovator drug) ครบระยะเวลาของสิทธิบัตรแล้ว ซึ่งยา biosimilars จะมีความคล้ายคลึงในแง่คุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพกับยาชีววัตถุต้นแบบ ในปัจจุบันยา biosimilars นำมาใช้เรียกเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ชีววัตถุประเภทโปรตีนที่ได้มาจากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเท่านั้น เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถทำให้

บริสุทธิ์ได้สูงและสามารถตรวจสอบคุณลักษณะได้เป็นอย่างดี ตามหลักการแล้วประโยชน์ที่ได้จากการผลิตยา กลุ่มนี้จะทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก ราคาจะถูกลงเมื่อเทียบกับยาต้นแบบ ทำให้มีการเข้าถึงยาได้มากขึ้น⁽¹⁾ ปัจจุบันยาชีววัตถุฟิลแกรสติมมีการผลิตในประเทศ หน่วยงานควบคุมกำกับคุณภาพในห้องปฏิบัติการของประเทศจำเป็นต้องทดสอบเพื่อยืนยันในคุณภาพของยาชีววัตถุเหล่านี้ ที่สำคัญคือการตรวจสอบความแรงของผลิตภัณฑ์เพื่อบ่งบอกว่ายา biosimilars นี้มีความสามารถในการรักษาได้หรือไม่ ซึ่งวิธีทดสอบความแรงของยา biosimilars โดยส่วนใหญ่จะวัดโดยชีววิธีในหลอดทดลอง (*in vitro* bioassay) ใน 2 วิธี คือ receptor-binding assays และ cell-based functional assays หรือ cell proliferation assay⁽²⁾ สำหรับวิธีทดสอบความแรงของยา Filgrastim จะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation)

ที่ตอบสนองต่อ G-CSF ซึ่งเซลล์ที่ใช้มีหลายชนิดแตกต่างกันรวมทั้งวิธีการทดสอบ ระดับความเข้มข้นของยาและวิธีการอ่านผลการทดสอบซึ่งสามารถวัดค่า luminescence หรือ colorimetric หรือ fluorescence ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น (substrate) ที่ใช้เป็นชนิดใด^(3,4) ดังนั้นผู้วิจัยจึงพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี cell proliferation และทดสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงของยาฟิลแกรสติมเพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

สารมาตรฐานและตัวอย่างยาฟิลแกรสติม

สารมาตรฐานที่ใช้เป็น Filgrastim USP reference standard ความเข้มข้น 0.98 mg/ml (lot no. F0L526) จัดซื้อจาก U.S. Pharmacopeia ส่วนตัวอย่างยาฟิลแกรสติมที่นำมาศึกษามาจากหลายบริษัทผู้ผลิตประกอบด้วย ยี่ห้อ A ขนาด 30 Mill International Units (MIU)/ml และ 48 MIU/ml ยี่ห้อ B ขนาด 30 MIU/ml ยี่ห้อ C ขนาด 30 MIU/0.5 ml และยี่ห้อ D ขนาด 30 MIU/0.5 ml จำนวน 6 ตัวอย่างต่อยี่ห้อ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ Mouse *Mus musculus* myelogenous leukemia, M-NSF-60 (ATCC[®] CRL-1838TM) เป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อ interleukin 3 (IL-3) และ G-CSF โดยได้ปรับสภาพเซลล์ (adapt) ให้มีความไวสำหรับการทดสอบโดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย G-CSF ความเข้มข้น 1 ng/ml

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Micro plate luminometer) รุ่น Orion L ของ Titertex Berthold ประเทศเยอรมัน กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (Inverted microscope) รุ่น CK2 ของ Olympus ประเทศญี่ปุ่น ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet) ตู้บเพาะเชื้อแบบใช้ CO₂ (CO₂ Incubator) อุณหภูมิ 37 ± 1°C รุ่น Galaxy 170R ของ New Brunswick ประเทศเยอรมัน ไมโครเพลท

สีขาวกันแบน 96 หลุม มีกันเพลทใส ผลิตภัณฑ์ของ Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

วิธี Cell proliferation

การตรวจสอบความแรงของยาฟิลแกรสติม⁽⁵⁾ จะวัด cell proliferation หลังกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 จำนวน 5×10^3 cells/50 μ l/หลุม ในเพลท 96 หลุม ด้วยตัวอย่างยาและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 ng/ml จากนั้นเจือจางเป็น two folds serial dilution (จำนวน 8 dilutions) แล้วดูดใส่ในเพลทที่มีเซลล์ปริมาตร 50 μ l /หลุม ความเข้มข้นสุดท้ายในเพลทของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.001953, 0.0039062, 0.0078125, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125 และ 0.25 ng/ml และนำไปบ่มที่ 37 °C ในสภาวะที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 29 ชั่วโมง โดยมีสารมาตรฐาน G-CSF 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 μ l/หลุม แล้วนำไปวัดค่า luminescence ด้วยเครื่อง Microplate luminometer รุ่น Orion L (Titertex Berthold, Germany) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist โดยใช้ Parallelline model รายงานผลการทดสอบเป็นค่า relative potency คำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean: GM), ส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation: GSD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Geometric Coefficient of Variation: %GCV)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ทำการทดสอบความจำเพาะ ความเที่ยงตรง ความถูกต้อง ความเป็นเส้นตรงช่วงการวิเคราะห์และความคงทน

ความจำเพาะ (specificity) โดยการกระตุ้น adapted M-NSF-60 cell lines ด้วยสารมาตรฐาน ยาฟิลแกรสติมยี่ห้อต่าง ๆ และ formulation buffer ของยา Filgrastim แต่ละยี่ห้อทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวัน

ความเที่ยงตรง (precision) ตรวจสอบใน 2 หัวข้อ ได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) ทดสอบความเที่ยงโดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยา ฟิลแกรสติม ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หา % GCV และการทำซ้ำต่างวัน (intermediate precision) โดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยาฟิลแกรสติม ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวันกันโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์หา %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25%

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

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) ตรวจวิเคราะห์ค่าความแรง Filgrastim USP reference standard ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคิดเป็น 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 ซ้ำเป็นอิสระต่อกัน วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) และ %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ $r^2 \geq 0.990$ และ %GCV น้อยกว่า 25%

ความคงทน (robustness) โดยการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่าความแรงยา และนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณค่า % GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25%

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์และแสดงโดยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ GM GSD และ %GCV โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้

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

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

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

ผลการศึกษา

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ความจำเพาะของวิธี โดยการกระตุ้น adapt M-NSF-60 cell lines ด้วย ยา Filgrastim ยี่ห้อต่าง ๆ และ formulation buffer ของยาฟิลแกรสติมแต่ละยี่ห้อ ทำการทดสอบ 3 ครั้งต่างวันกัน พบว่า มีเฉพาะตัวอย่างยาฟิลแกรสติม ยี่ห้อ A, B, C และ D สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของ %relative potency เท่ากับ 116.5%, 93.1%, 117.0% และ 108.6% ตามลำดับ ในขณะที่ formulation buffer ของยาทุกยี่ห้อ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด cell proliferation ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความจำเพาะของวิธี Cell proliferation ในการวิเคราะห์ความแรงของยาฟิลแกรสตีมและ formulation buffer โดยทดสอบต่างวัน

ยี่ห้อ	ครั้งที่	Relative potency	% relative potency	Formulation Buffer
A	1	0.63891	127.8	- *
	2	0.56203	112.4	-
	3	0.55022	110	-
	GM	0.5824	116.5	
	GSD =. 1.08 %GCV = 8.10			
B	1	0.48020	96	-
	2	0.48297	96.6	-
	3	0.43463	86.9	-
	GM	0.4654	93.1	
	GSD =. 1.06 %GCV = 5.93			
C	1	0.62628	125.3	-
	2	0.63616	127.2	-
	3	0.50244	100.5	-
	GM	0.5850	117.0	
	GSD =. 1.14 %GCV =13.25			
D	1	0.57848	115.7	-
	2	0.55911	111.8	-
	3	0.49428	98.9	-
	GM	0.5427	108.6	
	GSD =. 1.09 %GCV =8.29			

*เซลล์ไม่เกิดการเพิ่มจำนวน

ความเที่ยงของวิธี ในหัวข้อ repeatability เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแรงของยาฟิลแกรสตีม ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว พบว่า %relative potency อยู่ในช่วงค่า 85.3 – 112.2%, GM±GSD เท่ากับ 102.4 ±1.11% และ %GCV เท่ากับ 10.11 ดังตารางที่ 2 สำหรับการศึกษา

intermediate precision ของผู้วิเคราะห์คนที่ 1 พบว่า %relative potency มีค่าอยู่ในช่วง 92.6–113.7% GM±GSD เท่ากับ 102.1 ±1.11% และ %GCV เท่ากับ 10.37 ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบ % relative potency อยู่ในช่วง 90.97–106.4% GM ± GSD เท่ากับ 100.0 ±1.09% และ %GCV เท่ากับ 8.32 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ความเที่ยงตรงของวิธี Cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยาฟิลแกรสตีมโดยการทดสอบ ในวันและเวลาเดียวกัน

ครั้งที่	Relative potency	% relative potency
1	0.48974	97.9
2	0.56108	112.2
3	0.52746	105.5
4	0.54980	110.0
5	0.42667	85.3
6	0.53067	106.1
GM	0.5121	102.4
GSD = 1.11. %GCV = 10.11		

ตารางที่ 3 ความเที่ยงตรงของวิธี Cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยาฟิลเกรสติมโดยการทดสอบต่างวัน

ครั้งที่	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1		ผู้วิเคราะห์คนที่ 2	
	Relative potency	% relative potency	Relative potency	% relative potency
1	0.50513	101.0	0.53204	106.4
2	0.46286	92.6	0.45484	90.97
3	0.56874	113.7	0.51582	103.2
GM	0.5104	102.1	0.4998	100.0
GSD= 1.11 %GCV=10.37			GSD= 1.09 %GCV=8.32	

ความถูกต้องของวิธี แสดงด้วยค่า %recovery โดยในตัวอย่างที่เตรียมให้มีค่าความแรงของ Filgrastim USP reference standard ที่ expected relative potency เท่ากับ 50%, 100% และ 200% พบว่าตัวอย่างที่ expected relative potency ที่ 50% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 47.6% และ %recovery เท่ากับ 95.2% ขณะที่ตัวอย่างที่

expected relative potency ที่ 100% สามารถตรวจได้ค่า GM เท่ากับ 100.3% และ %recovery เท่ากับ 100.3% และเมื่อตัวอย่างที่ expected relative potency เป็น 200% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 223.5 และ %recovery เท่ากับ 111.8% ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความถูกต้องของวิธี Cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Filgrastim USP reference standard

Expected relative potency (%)	ครั้งที่	Found relative potency (%)	GM	% recovery
50	1	46.9	47.6	95.2
	2	40.8		
	3	56.2		
100	1	101.5	100.3	100.3
	2	89.7		
	3	110.8		
200	1	240.3	223.5	111.8
	2	213.4		
	3	217.8		

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ค่าความแรง Filgrastim 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 ซ้ำเป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบแปรผันตามระดับความเข้มข้น เมื่อนำค่า expected potency และค่า found GM relative potency มาสร้างกราฟและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์

ความสัมพันธ์ พบว่า ได้กราฟที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 50 – 200% และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient: r^2) เท่ากับ 0.9979 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ($r^2 \geq 0.990$) แสดงให้เห็นว่า range ที่ทำการทดสอบมีความเหมาะสมจากการคำนวณค่า linear regression ได้ค่า r^2 เท่ากับ 0.997924 และได้ค่า F-test ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า F-test จากตาราง (critical value for the F-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) แสดงว่า กราฟ

เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่วิเคราะห์ และพบว่าค่าความแรงแปรผันตรงต่อระดับความเข้มข้น และค่า % GCV ของความแม่นยำของการทำซ้ำ เท่ากับ 16.10, 2.28, 9.10,

4.85 และ 12.63 ตามลำดับ มี % recovery เท่ากับ 101.4%, 100.1%, 97.1%, 95.4% และ 99.4% ตามลำดับ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของวิธี Cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Filgrastim USP reference standard

Expected relative potency (%)	ครั้งที่	Found relative potency (%)	GM	%GCV	% recovery
50	1	52.7	50.7	16.10	101.4
	2	42.5			
	3	58.1			
75	1	74.8	75.1	2.28	100.1
	2	73.5			
	3	76.9			
100	1	95.1	97.1	9.10	97.1
	2	89.7			
	3	107.2			
150	1	146.4	143.1	4.85	95.4
	2	135.3			
	3	147.8			
200	1	211.2	198.8	12.63	99.4
	2	172.0			
	3	216.2			

ความความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงยา A ได้ค่า %GCV เท่ากับ 4.59 นอกจากนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลง incubation time จากเดิม 29 เป็น 27 ชั่วโมง ผลการทดสอบได้ค่า % GCV เท่ากับ 9.74 และ 7.61 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง incubation time 27 และ 29 ชั่วโมง โดยใช้สถิติ t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.111112$) โดยค่า t-Stat (-2.04) ที่คำนวณได้ มีค่าน้อยกว่าค่า t Critical one-tail (2.13)

อภิปรายผล

การควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสติมจะตรวจสอบทั้งด้าน physiochemical และ biological

activity ของยา⁽⁶⁾ ซึ่งการตรวจสอบความแรงของยาฟิลแกรสติมจะใช้วิธี cell proliferation assay โดยจะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของ adapted M-NSF-60 cells หลังกระตุ้นด้วย G-CSF ซึ่งห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจะใช้วิธีการทดสอบ ชนิดของเซลล์ที่ใช้วิธีการอ่านผลการทดสอบแตกต่างกันไป ทำให้ผลการวิเคราะห์ความแรงมีความแตกต่างกัน⁽⁷⁾ จึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของยาฟิลแกรสติมขึ้นมาเพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐาน โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ เช่น ปริมาณเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ระดับความเข้มข้นของตัวอย่างยาที่ใช้ในการทดสอบ โดยทำการทดสอบควบคู่ไปกับ reference standard ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้ระยะเวลาในการทดสอบประมาณ 27-29 ชั่วโมง การอ่านผล cell proliferation ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็วโดยอ่านค่า luminescence และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist version 3.0 โดยใช้ Parallel line model รายงานผลการทดสอบ

เป็นค่า relative potency นอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นวิธีที่เหมาะสมให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง จึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่าง ๆ ซึ่งผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมา มีความจำเพาะ โดยพบว่าเฉพาะตัวอย่างยาฟิลแกรสติมนำมาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบมีผลกระทบต่อนำจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ขณะที่ formulation buffer ของยาแต่ละชนิดไม่สามารถกระตุ้นได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะและ formulation buffer ไม่มีผลต่อการทดสอบ นอกจากนี้การทดสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้แก่ ความเที่ยงของวิธี ทั้งแบบทำซ้ำในวันเดียวกัน ทำซ้ำต่างวันกันและความแม่นยำของวิธีพบว่าผ่านเกณฑ์ในทุกพารามิเตอร์ การทดสอบความเป็นเส้นตรง พบว่ากราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงค่าร้อยละความเข้มข้น 50-200% และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9979 ความคงทนของวิธีสามารถใช้เซลล์ที่ passage 4 ถึง 20 และ incubation time ที่ 27-29 ชั่วโมง โดยผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันจากผลการทดสอบ สามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ความแรงของยาฟิลแกรสติมต่อไปได้

สรุปผล

การทดสอบความแรงของยาฟิลแกรสติมโดยวิธี cell proliferation ที่พัฒนาขึ้น เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า วิธีทดสอบมีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยงและความคงทนของวิธี โดยมีค่า %relative potency อยู่ในช่วง 80-125% ซึ่งสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพยาฟิลแกรสติมต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Knezevic I, Griffiths E. Global issues, national solutions. *Biologicals* 2011; 39: 252-5.
2. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixtieth report. Geneva: World Health Organization; 2013: Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 977. Available from : URL: http://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_977_60th_report.pdf?ua=1. [cited 2018 July 19].
3. Wadhwa M, Bird C, Dilger P, Mire-Sluis AR, Thorpe R. Quantitative biological assays for cytokines, In: Balkwill F.R. (Ed.), *Cytokine Cell Biology-A Practical Approach*, 3rd Edition. Oxford University Press, Oxford, p. 207. *Infect Immun* 1996; 64(1): 1-9.
4. 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* 83(14), 5010.
5. U.S. Pharmacopeia National Formulary USP 41 NF 36, 2018: p. 1740-1741.
6. 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.
7. 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: 63-9.