ว กรมวิทย พ 2560; 59 (2) : 104-114

คุณลักษณะของไกลแคนในยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศไทย

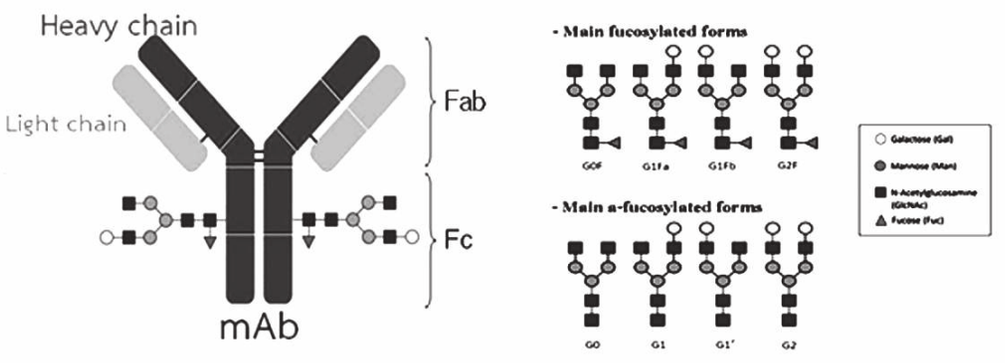
วิชชุดา จริยะพันธุ์ ฐิตาภรณ์ ภูติภิณโยวัฒน์ และสายวรุฬ จดูรกิตตินันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์คุณลักษณะของโครงสร้างและองค์ประกอบของไกลแคนของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) เป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาการผลิตและควบคุมคุณภาพยา หากผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมการผลิตให้สม่ำเสมอ มีโอกาสที่จะได้ไกลแคนที่มีหมู่น้ำตาลแตกต่างกัน ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงคุณภาพของยาและมีผลกระทบต่อความปลอดภัยและประสิทธิผลในการรักษาโรค ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและองค์ประกอบของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของยา mAb ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยในระหว่างปี 2557 - 2559 จำนวน 12 ชนิด โดยวิธี Capillary Electrophoresis แบบ Laser Induced Fluorescence (CE-LIF) การตรวจวัดสารเรืองแสงด้วย 9-aminopyrene-1, 4, 6-trisulfonic acid บนไกลแคนที่ตัดออกจากโมเลกุลของ mAb ด้วยเอนไซม์ PNGase F ได้ผลตรงตามสารมาตรฐานของ mAb ชนิดนั้นๆ และสารมาตรฐาน USP มีไกลแคนหลัก 4 แบบ คือ ชนิด G0F, G1Fa, G1Fb และ G2F ซึ่งเป็นไปตามที่จดแจ้งไว้ในการขึ้นทะเบียน โดย G0F มีปริมาณมากที่สุดในช่วงร้อยละ 39.30 - 85.29 และเวลาที่ตรวจสอบได้จาก CE เป็นช่วงนาทีที่ 9.41 - 9.65

Accepted for publication, 22 June 2017

บทนำ

ยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products: BTP) ชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ (recombinant monoclonal antibody: mAb) มีความสำคัญในการนำมารักษาโรค[1] เช่น โรคมะเร็ง โรคภูมิต้านตนเอง โรคข้ออักเสบรูมาทอยด์ เป็นต้น mAb เป็นอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin: Ig) ที่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ผลิตจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีการเติมหมู่น้ำตาลเรียกว่าไกลแคน (glycan)[2] ในตำแหน่งไนโตรเจนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน (N-linked glycosylation) ในส่วน Fc ของโมเลกุล Ig บนสายโปรตีน จากชนิดของน้ำตาลที่ประกอบอยู่ทำให้ได้ไกลแคนหลายรูปแบบ (glycoforms) ซึ่งชนิดที่ปรากฏในยา mAb เป็นแบบที่มีน้ำตาลต่อเป็น 2 สาย (complex biantennary glycan) มีน้ำตาลประกอบ 7 ตัว (ภาพที่ 1) คือ แมนโนส และ N-acetylglucosamine (GlcAc) และไม่มีน้ำตาลฟิวโคส (a-fucosylated forms) เรียกเป็น G0 และอาจพบไกลแคนรูปแบบอื่น คือ มีการเติมน้ำตาลกาแลกโตสเข้าที่สายใดสายหนึ่งของไกลแคน เรียกเป็น G1 หรือ G1' หากมีการเติมทั้ง 2 สายเรียกเป็น G2 ขณะเดียวกันอาจมีการเติมน้ำตาลฟิวโคส (fucosylated forms) บนโมเลกุลน้ำตาล GlcAc จะเรียกเป็น G0F, G1Fa, G1Fb และ G2F



ภาพที่ 1 โครงสร้าง mAb แสดงส่วน Fc ที่มีไกลแคนประกอบ และแสดงรูปแบบไกลแคนที่พบในยา mAb

จากกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนการสร้างไกลแคนของเซลล์ไม่มีรูปแบบที่ชัดเจนเนื่องจากไม่ได้ถูกกำหนดโดยสารพันธุกรรมแต่ควบคุมจากกระบวนการผลิตและสภาวะการเลี้ยงเซลล์[3,4] และเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถที่จะผลิตโปรตีนจำนวนมากให้มีองค์ประกอบไกลแคนแตกต่างกัน หากไม่สามารถควบคุมการผลิตให้สม่ำเสมอมีโอกาสสูงที่จะได้ไกลแคนที่มีหมู่น้ำตาลแตกต่างไปหลายรูปแบบ (glycoforms) ซึ่งส่วน Fc นี้มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ผ่านกลไก antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) และ complement-dependent cytotoxicity (CDC) เพื่อทำลายเซลล์เป้าหมาย[5] ความแตกต่างของโครงสร้างน้ำตาลเพียงเล็กน้อยบน Fc อาจเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ความปลอดภัยและประสิทธิภาพของยาได้ เช่น อาจทำให้มีความแรงต่างไปจากเดิมและอาจมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน[6] (immunogenicity) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ต้องการในยารักษาโรคชนิดนี้

การวิเคราะห์คุณลักษณะของโครงสร้างและองค์ประกอบของไกลแคนของยา mAb เป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาและควบคุมคุณภาพยา ซึ่ง glycoform profile เป็น critical quality attributes[2] (CQA) ของการผลิต mAb จึงต้องมีความสม่ำเสมอของคุณภาพจากการผลิตยาที่ดีจากรุ่นสู่รุ่น ดังนั้น ต้องมีวิธีตรวจสอบไกลแคนที่เหมาะสม เพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัย มีข้อกำหนดที่ชัดเจนตามที่ภาครัฐกำหนด นอกจากนี้สิทธิบัตรของยา mAb ต้นแบบ (originator/inventor) เริ่มหมดลงจึงเริ่มมีการพัฒนาผลิตยาคล้ายคลึง (biosimilars) ที่มีกระบวนการผลิตไม่เหมือนกับการผลิตยาต้นแบบ (originator/inventor) ทั้งหมด[7,8] เช่น

ชนิดของเซลล์สำหรับการผลิต mAb และสภาวะการเลี้ยงเซลล์อาจแตกต่างกัน รวมทั้งขนาดของกำลังการผลิตที่แตกต่าง ในการควบคุมกำกับคุณภาพของยาที่จำหน่าย ภาครัฐต้องสามารถตรวจเพื่อเปรียบเทียบไกลแคนของยาคล้ายคลึงกับยาต้นแบบและการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่น้ำตาลได้[9,10] ซึ่งวิธีต่าง ๆ สำหรับการตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะของ mAb ซึ่งเป็นยากลุ่ม recombinant DNA-derived products มีแนะนำไว้ในตำรายา เช่น ตำรายาของสหรัฐอเมริกา[11]

โดยทั่วไปผู้ผลิตจะแสดงรายละเอียดคุณลักษณะของไกลแคนไว้แล้วในขั้นตอนการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของตัวยาสำคัญ (drug substance) และไม่ตรวจซ้ำในยาสำเร็จรูปจึงไม่มีข้อมูลไกลแคนของยาที่ได้ขึ้นทะเบียนแล้วและจำหน่ายในประเทศ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของไกลแคน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของยา mAb สำเร็จรูปที่ขึ้นทะเบียนและจำหน่ายในประเทศไทยโดยวิธี Capillary Electrophoresis แบบ Laser Induced Fluorescence[12,13] (CE-LIF) เพื่อให้ได้ข้อมูลไกลแคนของยาที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย และเป็นฐานข้อมูลด้านคุณภาพของยาเพื่อการเฝ้าระวังหลังจำหน่ายและใช้ประกอบการพิจารณาความคล้ายคลึงในการขึ้นทะเบียนยาคล้ายคลึงต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Capillary electrophoresis รุ่น PA 800 plus system ยี่ห้อ Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ ท่อแคปิลลารีแบบ N-CHO Coated ขนาด 50 μm i.d. × 60 cm เครื่องตรวจจับฟลูออเรสเซนต์ด้วยเลเซอร์ ชนิด Ar และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch, heat box, water bath, micro-centrifuge, microcon 10 kDa, centrifugal evaporator

น้ำยาและสารเคมี

ชุดน้ำยา Carbohydrate Labeling & Analysis Kit (Beckman # 477600), HPLC water, ชุดน้ำยาเอนไซม์ N-glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs # P0704S), Sodium Cyanoborohydride

สารมาตรฐานไกลแคนและสารมาตรฐานสำหรับ CE-LIF

Glucose Ladder Standard (G20), Maltose Quantitative Control/Mobility Marker (1 nmol/μl) (G22), สารมาตรฐาน USP Oligosaccharide System Suitability Mixture A

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน mAb

ตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 12 ยี่ห้อ (Brand) คือ mAb ชนิด 1 - 12 และสารมาตรฐานตามชนิดของตัวอย่าง จำนวน 12 ชนิด โดยมีชนิด mAb - 1 เป็นยาชีววัตถุคล้ายคลึงของ mAb - 2

วิธีการ

ตรวจวิเคราะห์ชนิดของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ด้วยเทคนิค CE-LIF โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

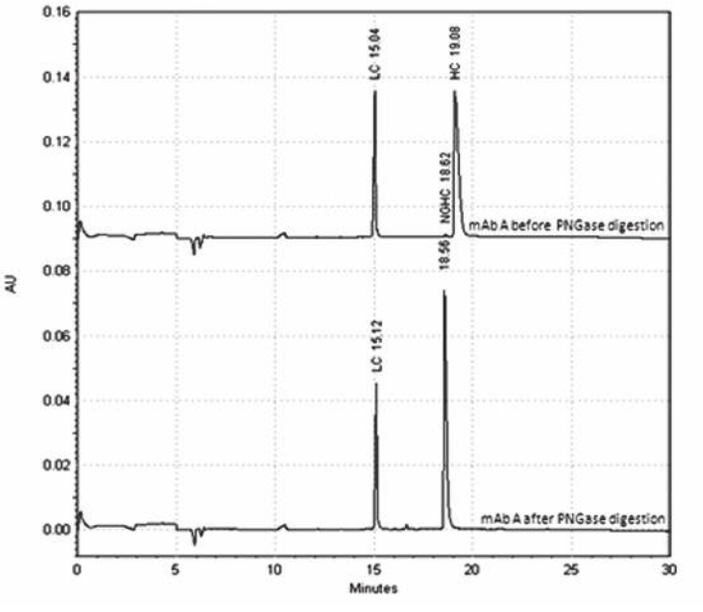
เทคนิค CE-LIF ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน[8] คือ การตัดไกลแคนออกจากโมเลกุลของ mAb ด้วยเอนไซม์ PNGase F และนำไกลแคนส่วนที่ได้นี้มาติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไกลแคนและสารมาตรฐานของ mAb ชนิดนั้น ๆ โดยมีรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การตัดหมู่น้ำตาลออกจากโปรตีนด้วยเอนไซม์ เตรียมตัวอย่างโดยการกำจัดเกลือออกโดยเติมน้ำในตัวอย่างปริมาณ 300 µg ให้ครบ 500 µl ใส่ใน microcon filter device นำไปปั่นที่ 11,000 rpm นาน 30 นาที เติม 1X Glyco buffer ปริมาตร 45 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นคว่ำลงใน tube ใหม่ ไปปั่นที่ 2,000 rpm นาน 2 นาที แล้วเติม Glycoprotein Denaturing Buffer ปริมาตร 1.0 µl อุ่นที่ 100°C นาน 3 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม Nonidet® NP40 ปริมาตร 5 µl และ diluted 1 : 50 PNGase F enzyme (60U) ปริมาตร 6 µl นำไปอุ่นที่ 37°C นาน 15 - 18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 150 µl ethanol ที่แช่เย็นผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็งนาน 15 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที และดูดส่วนใส่ลงใน microtube นำไปทำให้แห้งด้วย centrifugal evaporator ที่ 45°C นาน 90 นาที

ขั้นตอนที่ 2 การติดฉลากด้วย APTS นำสารที่ทำให้แห้งด้วย centrifugal evaporator มาเติม 1 M sodium cyanoborohydride/THF ปริมาตร 2 µl และ APTS Labeling Reagent ปริมาตร 2 µl นำไปอุ่นที่ 55°C นาน 90 นาที เติม HPLC water ปริมาตร 46 µl แล้วปิเปตปริมาตร 5 µl ผสมกับ HPLC water 195 µl ให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วย CE-LIF ซึ่งเตรียมท่อแคปิลลารีโดยการล้างด้วย Gel buffer นาน 3 นาที จึงฉีดตัวอย่างโดยใช้ความดัน 5.0 psi นาน 3 วินาที ใช้กระแสไฟ 30.0 kV นาน 20 นาที สารจะเคลื่อนที่แยกจากกันผ่านตัวตรวจวัด

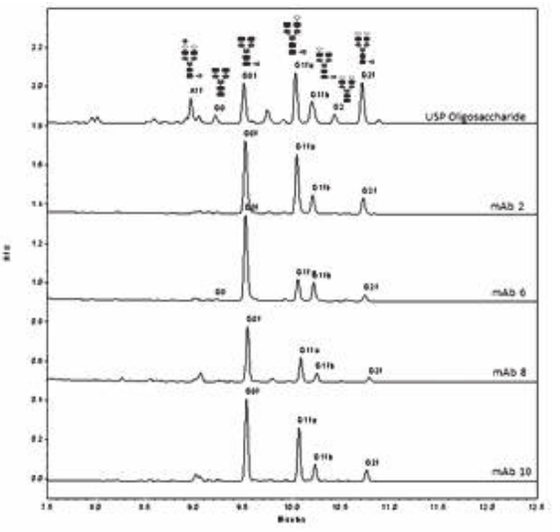
ผล

เมื่อใช้เอนไซม์ PNGase F ตัดหมู่น้ำตาลออกมาจากสายโปรตีนและตรวจสอบการตัดด้วย CE - SDS แบบ reducing condition ได้พีคของ heavy chain ที่ไม่มีหมู่น้ำตาล (non-glycosylated heavy chain: NGHC) อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับพีค heavy chain เดิม ในลักษณะที่เคลื่อนออกมาก่อนมี migration time (MT) ที่ 18.56 นาที และไม่ปรากฏพีคของ heavy chain ซึ่งเดิมมี MT ที่ 19.08 นาทีอีก (ภาพที่ 2)



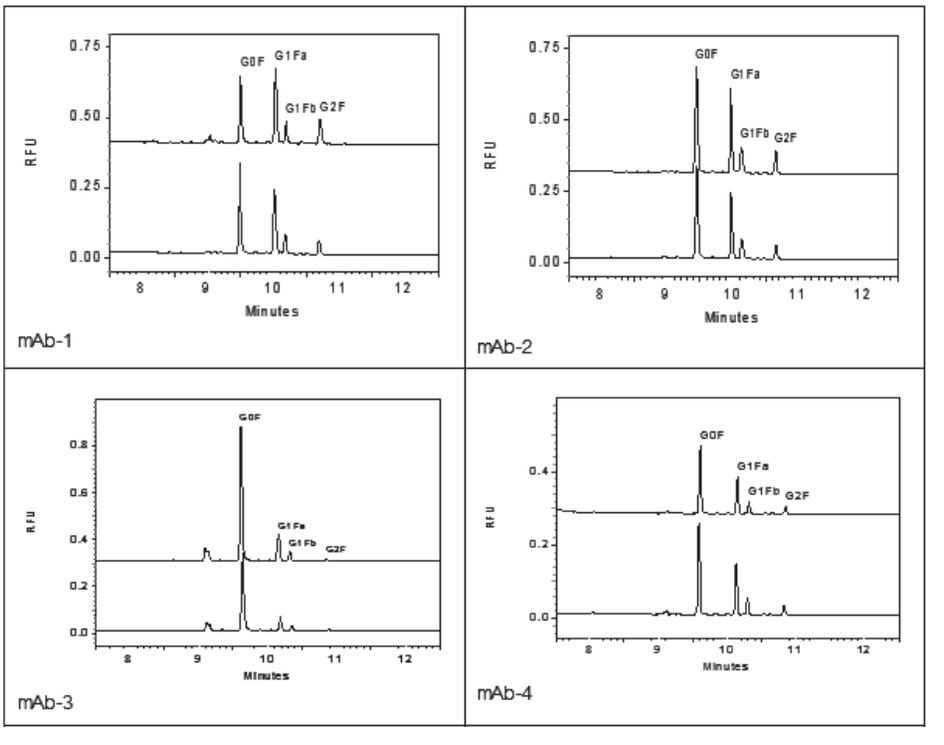
ภาพที่ 2 พีคของ mAb A ที่วิเคราะห์ด้วย CE-SDS แบบ reducing (บน) ก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ PNGase F ปรากฏพีค NGHC (ล่าง) หลังการตัด

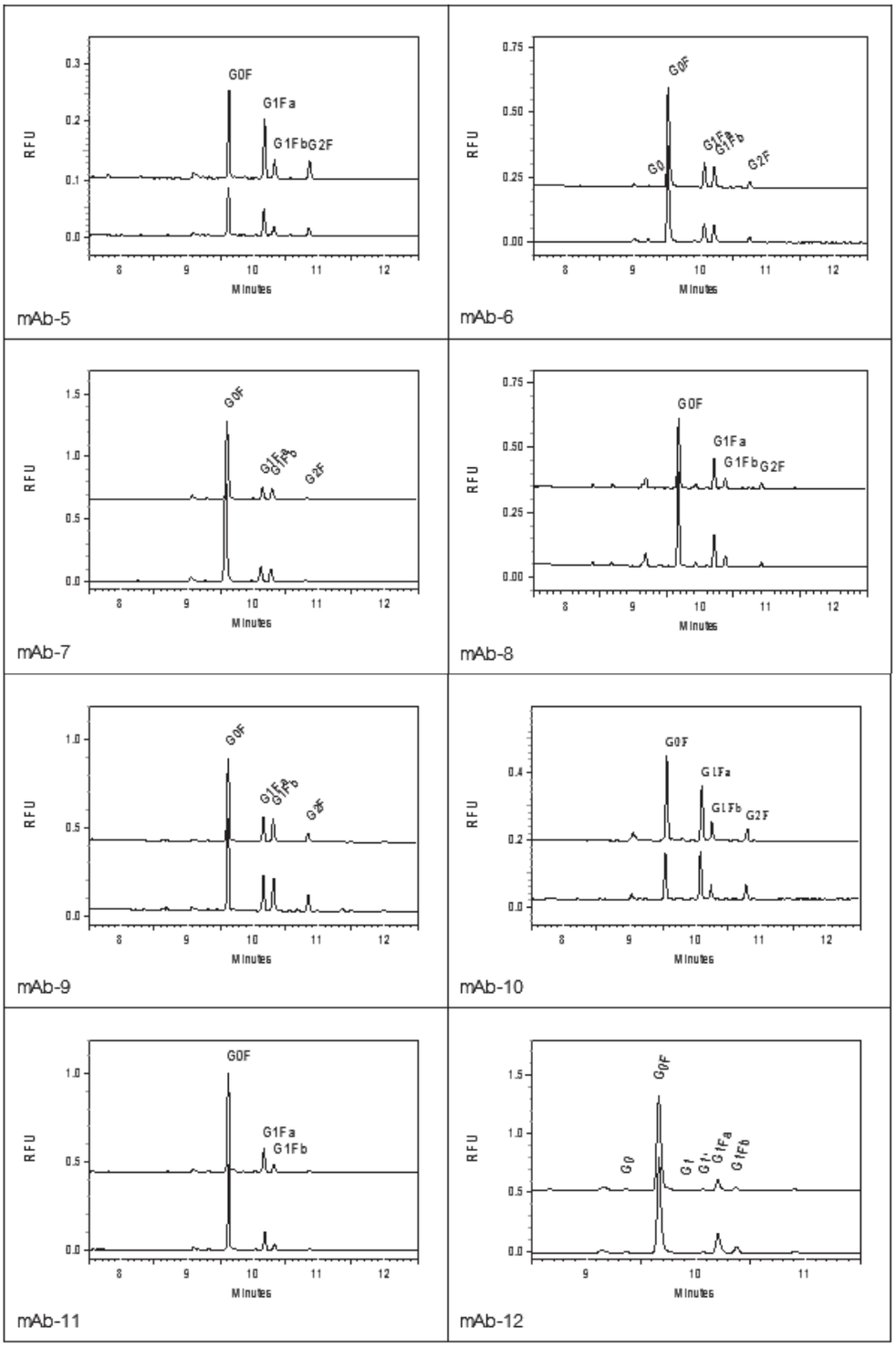
ผลการวิเคราะห์ด้วย CE - LIF เมื่อทดลองเปรียบเทียบยา mAb ชนิด 1 - 4 กับสารมาตรฐานของ USP (ภาพที่ 3) ได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมของยา mAb ทั้ง 4 ชนิด เป็น G0F, G1Fa, G1Fb และ G2F ซึ่งมีน้ำตาลฟิวโคสประกอบอยู่



ภาพที่ 3 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่าง mAb 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ USP Oligosaccharide System Suitability Mixture A

ผลการวิเคราะห์ด้วย CE-LIF ได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมของยา mAb ทั้ง 12 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของตัวเองทุกชนิดให้อิเล็กโทรฟีโรแกรมตรงตามสารมาตรฐานชนิดนั้น ๆ (ภาพที่ 4) มีลำดับก่อนหลังการเคลื่อนออกจากท่อแคปิลลารีของไกลแคนหลักทั้ง 4 ชนิด เป็น G0F, G1F (รวม G1F ทั้ง 2 ชนิด) และ G2F ตามลำดับ โดยตรวจพบไกลแคนทุกชนิดในช่วงเวลานาทีที่ 9.41 - 9.65 (migration time: MT) (ตารางที่ 1) จากการคำนวณร้อยละของพื้นที่ (% corrected peak area: % CPA) ของไกลแคนหลักที่ประกอบในตัวอย่าง mAb ทั้ง 12 ชนิด มีปริมาณของ G0F มากที่สุด คืออยู่ในช่วงร้อยละ 39.30 - 85.29 (ตารางที่ 2)





ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบอิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่าง mAb ทั้ง 12 ชนิด (เส้นบน) กับสารมาตรฐาน (เส้นล่าง) ที่วิเคราะห์โดย CE-LIF

ตารางที่ 1 ค่า MT เฉลี่ยของ mAb 12 ยี่ห้อจากการวิเคราะห์โดย CE-LIF

Brands	MT of major peak (G0F) (minute)
1	9.50
2	9.41
3	9.58
4	9.63
5	9.61
6	9.50
7	9.54
8	9.65
9	9.57
10	9.53
11	9.63
12	9.63
range	9.41 - 9.65

ตารางที่ 2 ปริมาณไกลแคนที่ประกอบในตัวอย่าง mAb วิเคราะห์โดย CE - LIF คำนวณจาก %CPA

Brands	G0F	G1Fa	G1Fb	G2F
1	39.30 ± 0.15	38.12 ± 0.16	10.79 ± 0.10	11.79 ± 0.11
2	45.33 ± 0.14	35.12 ± 0.04	10.41 ± 0.11	9.14 ± 0.10
3	80.30 ± 0.75	13.97 ± 0.46	4.47 ± 0.24	1.25 ± 0.15
4	55.61 ± 0.20	29.61 ± 0.12	9.14 ± 0.14	5.65 ± 0.17
5	49.48 ± 0.14	31.74 ± 0.23	10.05 ± 0.16	8.73 ± 0.13
6	66.10 ± 0.16	15.45 ± 0.08	12.99 ± 0.10	4.42 ± 0.10
7	78.10 ± 0.23	10.92 ± 0.11	9.20 ± 0.11	1.78 ± 0.05
8	61.38 ± 0.18	25.27 ± 0.13	9.04 ± 0.07	4.32 ± 0.12
9	61.24 ± 0.06	17.32 ± 0.07	15.50 ± 0.10	5.93 ± 0.07
10	52.23 ± 0.45	31.48 ± 0.13	9.85 ± 0.17	6.45 ± 0.30
11	77.54 ± 0.29	17.24 ± 0.32	5.22 ± 0.17	ไม่พบ
12	85.29 ± 0.16	9.77 ± 0.07	3.10 ± 0.04	ไม่พบ
range	39.30 - 85.29	13.97 - 38.12	3.10 - 15.50	0 - 11.79

วิจารณ์

ยา mAb ที่นำมาศึกษานี้ยื่นขอขึ้นทะเบียนในประเทศไทยในปี 2557 – 2559 ซึ่งเป็นยาต้นแบบ 11 ชนิด ผลการวิเคราะห์ยา mAb ทั้ง 12 ชนิด มีไกลแคนที่ประกอบอยู่เป็นชนิด N-linked เนื่องจากไกลแคนถูกตัดออกมาจากสายโปรตีนด้วยเอนไซม์ PNGase F ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนแอสพาราจีน เมื่อตรวจสอบการตัดด้วย CE-SDS แบบ reducing condition ได้พีคของ HC ที่ไม่มีหมู่น้ำตาลอย่างสมบูรณ์เป็น NGHC (ภาพที่ 2) โดยตำแหน่งของ NGHC อยู่ก่อนพีค HC ไปในลักษณะที่เคลื่อนออกมาก่อน แสดงถึงน้ำหนักที่น้อยกว่าและแสดงถึงการตัดเป็นไปอย่างสมบูรณ์ด้วยสภาวะการตัดและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้สามารถตัดไกลแคนจากสายโปรตีนได้ทั้งหมด

จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของยา mAb แต่ละชนิด และ USP mixture A ผลการวิเคราะห์ยา mAb ทั้ง 12 ชนิด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานดังกล่าว พบไกลแคนหลัก[1] (major glycan) 4 ชนิด คือ G0F, G1Fa, G1Fb และ G2F ที่มีน้ำตาลฟิวโคส เป็นลักษณะของไกลแคนที่ผลิตได้จากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลักษณะเป็น biantennary glycan[6] และสอดคล้องกับการเปรียบเทียบกับ Glucose ladder standards ในการระบุชนิดของไกลแคนโดย G0F, G1Fa, G1Fb และ G2F มีน้ำตาลทั้งหมดเป็น 8, 9 และ 10 ตัว ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล) โดยที่ G1Fa และ G1Fb มีน้ำตาลกาแลกโตสประกอบอยู่ 1 ตัวในต่างสายกัน (isomers) การวิเคราะห์นี้ใช้ท่อแคปิลลารีความยาว 50 ซม. สามารถแยก isomers ออกจากกันและเห็นพีคชัดเจนภายในการแยกสาร 12 นาที มีการศึกษาอื่นเกี่ยวกับไกลแคนในยา mAb มาแล้วหลายชนิด[14,15] ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษานี้แม้จะใช้ชนิดท่อแคปิลลารี สภาวะการวิเคราะห์และชนิดของฟลูโอเรสเซนต์ที่ใช้ติดฉลากแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของตัวอย่างทุกชนิดให้อิเล็กโทรฟีโรแกรมตรงตามสารมาตรฐานชนิดนั้น ๆ (ภาพที่ 4) และตรงตามข้อกำหนดเฉพาะ (specification) ของยาแต่ละชนิดที่จดแจ้งในการขึ้นทะเบียน (ข้อมูลจากการขึ้นทะเบียนยา) สำหรับปริมาณของไกลแคนหลักในยา mAb ที่ศึกษานี้ วิเคราะห์จากความสูงและปริมาณของพื้นที่ใต้พีค มีปริมาณของ G0F มากที่สุด (ตารางที่ 2) โดยมีความแตกต่างกันในยาแต่ละชนิด

สำหรับพีค A1F ที่ปรากฏในให้อิเล็กโทรฟีโรแกรมของ USP mixture A (ภาพที่ 3) คือไกลแคน G0 ที่มีน้ำตาลฟิวโคส และน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid/N – acetylneuramimic acid: A) อย่างละ 1 โมเลกุล และพีค G2 ที่มีน้ำตาลกาแลกโตส 2 โมเลกุลนั้น ไม่ปรากฏชัดเจนในอิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่าง ซึ่งอาจจะไม่มีหรือมีปริมาณน้อยมากจนสังเกตไม่ได้ จัดเป็นไกลแคนชนิดรอง (minor glycan) นอกจากนี้พบไกลแคนชนิดรองที่เป็น a – fucosylated forms ในปริมาณน้อยมาก (ภาพที่ 4) เช่น mAb – 6 ซึ่งเป็นไกลแคนชนิด G0F แต่พบพีคเล็ก ๆ ข้างหน้าในตำแหน่งของ G0 เล็กน้อย ส่วน mAb – 12 พบ G1 และ G1’ ปริมาณเล็กน้อย

แม้ตัวอย่าง mAb แต่ละชนิดจะมีไกลแคนหลักตรงตามสารมาตรฐาน แต่พบอีเล็กโทรฟีโรแกรมของ mAb บางยี่ห้อแตกต่างกับสารมาตรฐานในแง่ของความสูงของพีค เช่น mAb 3, 5, 6, 10 และ 11 มีพีคไกลแคนหลักสูงกว่าของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 4) ส่วน mAb – 4 และ 8 มีพีคไกลแคนหลักต่ำกว่าของสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (microheterogeneity) ที่อาจพบและยอมรับได้[16] แต่ต้องมีความสม่ำเสมอของการผลิต ซึ่งควรได้รับการติดตามตรวจสอบยารุ่นอื่น ๆ ด้วย เนื่องจากถ้าไม่ควบคุมการผลิตให้เหมาะสม ก็อาจได้ยาที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอแตกต่างจากรุ่นอื่น ๆ เช่น หากมีปริมาณน้ำตาลกรดไซอะลิกและแมนโนสมากจะผลต่อการทำงานของยา เช่น น้ำตาลกรดไซอะลิกมีผลต่อการกำจัดยาออก[17] หรือกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาและน้ำตาลแมนโนสมีผลต่อการทำงานของ effector และอาจมีผลต่อโครงสร้างของ Fc ของยา[5] แต่การศึกษานี้ต้องการตรวจสอบเฉพาะชนิดของไกลแคนหลักที่ประกอบในยา mAb หากมีตัวอย่างยี่ห้อละหลาย ๆ รุ่นจะสามารถแสดงแนวโน้มของความสม่ำเสมอของไกลแคนที่ประกอบในยาแต่ละชนิดได้

สำหรับการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยา mAb นั้น ชนิดและปริมาณไกลแคนที่ประกอบในยาเป็นหัวข้อหนึ่งที่ต้องวิเคราะห์ ผลการเปรียบเทียบปริมาณไกลแคนของ mAb - 1 ซึ่งเป็นยาคล้ายคลึงของ mAb - 2 มีไกลแคนหลักตรงกันทั้ง 4 ชนิด แต่ mAb - 1 มีปริมาณ G0F เพียงร้อยละ 39.30 ใน ขณะที่ mAb - 2 มีปริมาณ G0F ร้อยละ 45.33 ซึ่งความแตกต่างด้านปริมาณนี้สามารถตรวจพบได้ระหว่างยาต้นแบบกับยาคล้ายคลึง รวมทั้งพบได้ในยาต้นแบบของยารุ่นก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิต[13,15,18] โดยที่อาจไม่มีผลเสียด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามต้องพิจารณาในรายละเอียดเป็นราย ๆ ไป และเนื่องจากยาคล้ายคลึงชนิดที่นำมาศึกษานี้มีเพียง 1 รุ่น จึงยังไม่สามารถสรุปถึงแนวโน้มความสม่ำเสมอหรือผลกระทบได้

สรุป

ไกลแคนใน mAb ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี CE-LIF มีคุณลักษณะและองค์ประกอบตรงตามสารมาตรฐานและตามที่จดแจ้งขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลสำคัญในการควบคุมคุณภาพของยา mAb ชนิดต่าง ๆ ในอนาคต รวมทั้งจะเป็นข้อมูลเพื่อการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในการขึ้นทะเบียนยาคล้ายคลึงต่อไป และด้วยโอกาสที่จะเกิดความแตกต่างของคุณลักษณะของไกลแคนซึ่งมีความสำคัญต่อความปลอดภัยและประสิทธิภาพของยา ภาครัฐควรมีการติดตามตรวจสอบคุณภาพยา mAb หลังจำหน่ายในยาหลาย ๆ รุ่น เพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอในการเฝ้าระวังหลังจำหน่าย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Uçaktürk E. Analysis of glycoforms on the glycosylation site and the glycans in monoclonal antibody biopharmaceuticals. J Sep Sci 2012; 35(3): 341-50.
2. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. Anal Chem 2013; 85(2): 715-36.
3. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJS Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. Glycobiology 2000; 10(5): 477-86.
4. Guttman A. Capillary electrophoresis in the N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals. TrAc Trends Anal Chem 2013; 48: 132-143.
5. Higel F, Seidl A, Sörgel F, Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. Eur J Pharm Biopharm 2016; 100: 94-100.
6. Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. Glycobiology 2015; 25(12): 1325-34.
7. Bandyopadhyay S, Mahajan M, Mehta T, Singh AK, Parikh A, Gupta AK, et al. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-3197. Biosimilars. 2015; 5: 1-18.
8. Ma S, Nashabeh W. Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Anal Chem 1999; 71(22): 5185-92.

9. Berkowitz1 SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. Nat Rev Drug Discov 2012; 11(7): 527-40.
10. Beck A, Diemer H, Ayoub D, Debaene F, Wagner-Rousset E, Carapito C, et al. Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. TrAC Trends Anal Chem 2013; 48: 81-95.
11. The United States Pharmacopoeia 39-The National Formulary. 3rd ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2016. p. 204-210, 249-260, 1165-1177.
12. Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Van Antwerpen P, Delporte C. Glycan characterization of biopharmaceuticals: updates and perspectives. Anal Chim Acta 2016; 921: 13-27.
13. Kamoda S, Ishikawa R, Kakehi K. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. J Chromatogr A 2006; 1133(1-2): 332-9.
14. Liu J, Eris T, Li C, Cao S, Kuhns S. Assessing analytical similarity of proposed amgen biosimilar ABP 501 to adalimumab. BioDrugs 2016; 30(4): 321-38.
15. Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kin YJ, et al. Physicochemical characterization of Remsima. MAbs 2014; 6(5): 1163-77.
16. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmiederer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. BioDrugs 2013; 27(5): 495-507.
17. Sanchez-De Melo I, Grassi P, Ochoa F, Bolivar J, Garcia-Cozar FJ, Duran-Ruiz MC. N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. J Proteomics 2015; 8(127): 225-33.
18. Byrne B, Donohoe G, O'Kennedy R. Sialic acid: carbohydrate moieties that influence of biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. Drug Discovery Today 2007; 12(7-8): 319-26.
19. Schiestl M, Stangler T, Torella C, Cepeljnik T, Toll H, Grau R. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. Nat Biotechnol 2011; 29(4): 310-12.

Characteristics of Glycan in Biotherapeutic Monoclonal Antibodies Marketed in Thailand

Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saiwarul Jadoonkittinan
Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Characterization of the structure and composition of glycan in biotherapeutic monoclonal antibodies (mAb) is essential for drug development and quality control. If the production process is not consistently controlled, there is a possibility to obtain mAb with different forms of glycan (glycoforms). The different glycoforms may alter the quality and safety of mAb as well as affect drug efficacy. Therefore, characterization of glycan in 12 brands of mAb registered in Thailand during 2014 - 2016 was performed with capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence (CE-LIF) method. The results of LIF detection of 9-aminopyrene - 1, 4, 6-trisulfonic acid labeled on glycan after digestion of mAb with PNGase F showed that mAb complied with their reference materials as well as USP glycan standards. All 12 brands of mAb consisted of four major types of glycoforms: G0F, G1Fa, G1Fb and G2F which complied with their registration. Glycan type G0F had the highest amount in the range of 39.30 - 85.29 % and migration time detected by CE-LIF was within 9.41 - 9.65 minutes.

Key words: Glycan, CE-LIF, Monoclonal antibody