

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับสูงของ ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Circular Dichroism Spectroscopy

พันวิทย์ นทกุล¹ และอนุรักษ์ เมืองสงวน²

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนกำแพงเพชร กรุงเทพฯ 10210

บทคัดย่อ ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นยาโปรตีนที่มีโครงสร้างของกรดอะมิโนเฉพาะตัว การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือขั้นตอนการผลิต เช่น pH อุณหภูมิ หรือการเพิ่มกำลังการผลิต อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพ ความปลอดภัย และความคงตัว และประสิทธิภาพในการรักษาของยาได้ โดยปกติจะมีการตรวจสอบคุณลักษณะด้านโครงสร้างของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการผลิตและในตัวยาสำคัญ (Drug substance) แต่ไม่ทำการตรวจสอบในขั้นตอนสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ (Finished products) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของผลิตภัณฑ์ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยเป็นยาต้นแบบ 4 ชนิด และยาค่ายคลิ่ง 1 ชนิด ด้วยเทคนิค Circular Dichroism Spectroscopy ในช่วงความยาวคลื่น 190-250 nm (far-UV) และ 250-350 nm (near-UV) ผลการศึกษาพบว่าโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวมีลักษณะเฉพาะตามชนิดของยาตรงตามที่ได้จดแจ้งไว้ในทะเบียนตำรับ และโครงสร้างโปรตีนของยาต้นแบบและยาค่ายคลิ่งมีลักษณะเหมือนกัน

คำสำคัญ: ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี, ยาค่ายคลิ่ง, โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิ, โครงสร้างโปรตีนระดับตติยภูมิ

Corresponding author E-mail: puntawit.n@dmsc.mail.go.th

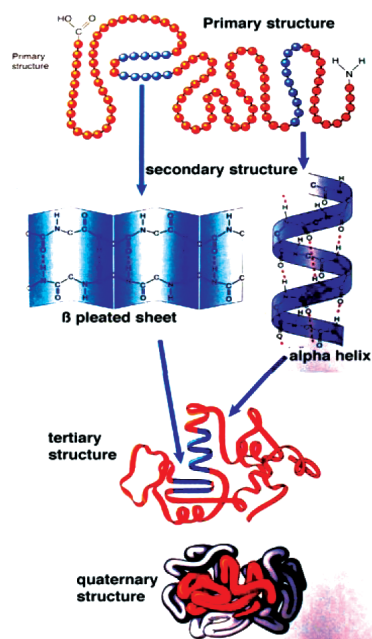
Received: 18 November 2020

Revised: 8 January 2021

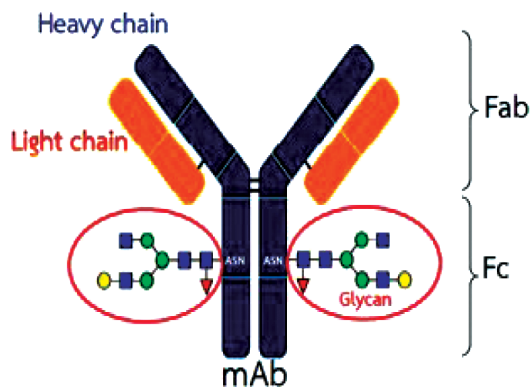
Accepted: 14 March 2021

บทนำ

ยาชีววัตถุ (biopharmaceutical products) เป็นยาแผนปัจจุบัน ผลิตโดยกระบวนการทางชีววิทยา เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคอักเสบรุมาทอยด์ โรคภูมิต้านตนเอง โรคมะเร็ง และความผิดปกติทางเลือด⁽¹⁾ เป็นต้น ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นยาชีววัตถุชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นยาโปรตีนที่มีขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายโพลีเปปไทด์เรียกว่า โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เมื่อพันธะไฮโดรเจนซึ่งอยู่ในตำแหน่งห่างกันสม่ำเสมอเกิดปฏิกิริยาดึงดูดกันทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนขึ้นเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) มี 2 แบบ คือ แบบอัลฟาเฮลิคซ์ (α -helix) ที่ขดเป็นเกลียว และแบบเบตาชีท (β -sheet) ที่อยู่ในรูปซิกแซกคล้ายจีบของพัด สำหรับโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เกิดจากพันธะต่างๆ บนสายโพลีเปปไทด์เดียวกันจับกันเป็นกลุ่มก้อนเป็นโครงสร้างที่ทำให้โปรตีนสามารถทำงานได้^(2,3) ซึ่งจะได้โมเลกุลของแอนติบอดีที่ประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (light chain: LC) 2 สาย และโปรตีนสายยาว (heavy chain: HC) 2 สาย เชื่อมกันเป็นรูปตัววาย (Y shape) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond)⁽⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1



(ก)



(ข)

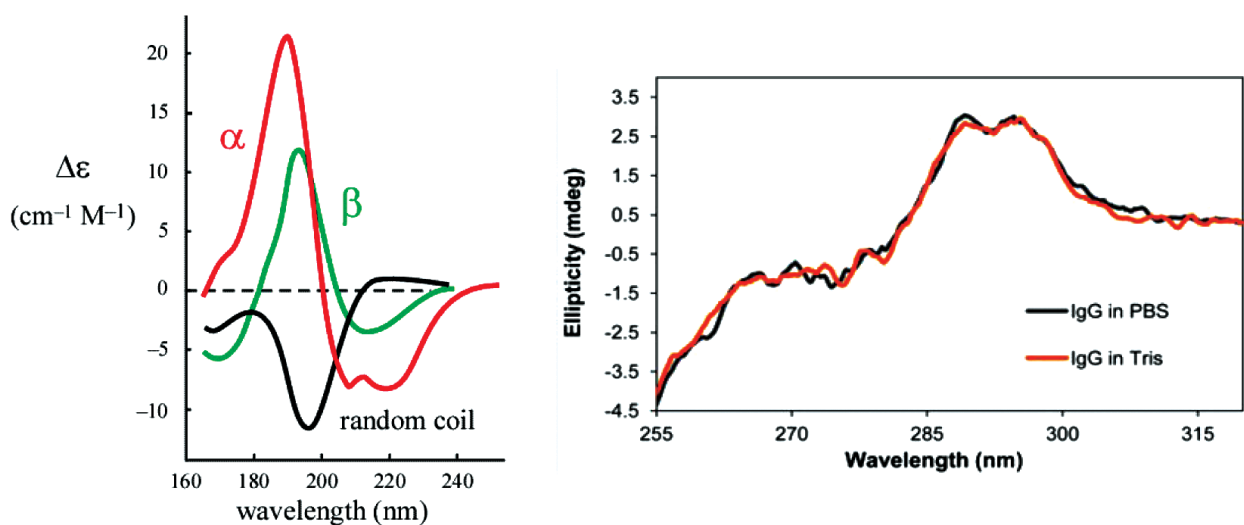
ภาพที่ 1 (ก) โครงสร้างระดับ primary secondary tertiary (ข) โครงสร้าง mAb แสดงส่วน Fab และ Fc และ quaternary ของโปรตีน

ด้วยการผลิตที่ซับซ้อนโดยใช้สารตั้งต้นที่มาจากสิ่งมีชีวิตจึงต้องมีการออกแบบและควบคุมกระบวนการผลิตอย่างเข้มงวดเพื่อให้ได้ยาที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติตามที่ออกแบบไว้ ปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง หรือการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ สามารถทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป^(5, 6, 7, 8, 9) ซึ่งอาจทำให้ยาสูญเสียคุณสมบัติในการรักษาหรือเกิดอันตรายต่อผู้ที่ได้รับยา ผู้ผลิตจึงมีขั้นตอนการตรวจโครงสร้างทั้งระดับปฐมภูมิและระดับสูง (Higher order structure) ในระหว่างขั้นตอนการผลิตตัวยาสำคัญ (drug substances) ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมหลายวิธีตามที่กำหนดในตำรายาสากล และไม่ตรวจซ้ำในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (finished product/drug product)

ในการรักษาโรคด้วยยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพดี ผู้ป่วยต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่อง แต่เนื่องจากยามีราคาแพง ดังนั้นเมื่อยาต้นแบบ (originators) หมดยุติบัตรจึงมีการผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ที่ออกแบบให้ได้โมเลกุลยาที่คล้ายคลึงกับยาต้นแบบ มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันแต่ราคาของยาชีววัตถุคล้ายคลึงถูกกว่า ดังนั้นผู้ผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึงต้องแสดงข้อมูลเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับยาต้นแบบที่นำมาเป็นยาอ้างอิง (reference product) ข้อมูลที่สำคัญคือ ข้อมูลด้านคุณภาพที่ระบุถึงโครงสร้างและคุณสมบัติต่างๆ ทางเคมี-ฟิสิกส์ ที่ต้องเหมือนกับยาต้นแบบจึงจะได้รับการยอมรับและสามารถขึ้นทะเบียนเป็นยาชีววัตถุคล้ายคลึงได้⁽¹⁰⁾ ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงจำเป็นสำหรับหน่วยงานควบคุมกำกับคุณภาพภาครัฐ เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างของยาว่าเป็นไปตามที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้

การตรวจสอบคุณภาพโครงสร้างระดับสูงของยาโปรตีน^(11, 12) จึงมีความสำคัญซึ่งผู้ผลิตต้องทำการวิเคราะห์เพื่อให้เห็นโครงสร้างระดับสูงที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโมเลกุลของยา ซึ่งมีโอกาสเกิดการเบี่ยงเบนจากที่ออกแบบไว้จากหลายสาเหตุ เช่น การควบคุมการผลิตไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงจากการเก็บรักษาหรืออยู่ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการจับตัวกัน รวมทั้งตรวจสอบโครงสร้างที่แตกต่างของยาลคล้ายคลึงเมื่อใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต่างชนิดกัน⁽⁵⁾ เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลด้านคุณภาพที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างระดับสูงของยา mAb มีความสำคัญและจำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบ

วิธี circular dichroism spectroscopy เป็นวิธีที่กำหนดในตำรายาสากล^(13, 14, 15) สำหรับการตรวจเอกลักษณ์โปรตีนด้านคุณภาพของโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ สามารถอ่านเส้นสเปกตรัมได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว มีหลักการ คือ การวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนอาศัยหลักการดูดกลืนแสงช่วง UV ที่ต่างกันของโมเลกุล แสงที่ผ่านโมเลกุลจะมีลักษณะของการบิดของระนาบแสงเป็นรูปวงรี (circular dichroism) ซึ่งโมเลกุลจะมีการดูดกลืนแสงที่หมุนวนซ้าย (left circular polarized light) และหมุนวนขวา (right circular polarized light) ไม่เท่ากัน เมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิในช่วงความยาวคลื่น 190–250 nm (far-UV) เส้นสเปกตรัมจะแสดงค่าสัญญาณทั้งค่าบวกและลบ สามารถแยกความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนได้เป็นแบบอัลฟาเฮลิกซ์ เบตาชีท และแรนดอมคอยล์ และโครงสร้างระดับตติยภูมิในช่วงความยาวคลื่น 250–350 nm (near-UV)⁽¹⁶⁾ ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบพิสูจน์โครงสร้างของยาโปรตีนที่ผลิตแต่ละรุ่น (lot) ว่ามีลักษณะโครงสร้างที่เหมือนกันหรือไม่ เช่น หลังจากการเพิ่มขนาดของกระบวนการผลิตการทำให้บริสุทธิ์ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน ที่อ่านได้โดยเครื่อง circular dichroism spectrophotometer^(17, 18)

ในการขึ้นทะเบียนยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีข้อกำหนด (Specification) ให้ตรวจวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนในยาสำเร็จรูป เนื่องจากผู้ผลิตได้วิเคราะห์โครงสร้างของตัวยาสำคัญและแสดงไว้ในทะเบียนตำรับยาที่ยื่นขอขึ้นทะเบียนแล้ว อย่างไรก็ตามเพื่อความมั่นใจ หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐควรตรวจสอบและมีข้อมูลเพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างของยาว่าเป็นไปตามที่ได้ออกแบบและจดแจ้งไว้ในตำรับ จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างระดับสูงทั้งทุติยภูมิและตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยโดยวิธี Circular Dichroism Spectroscopy และเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของยาดั้งเดิมและยาคัดลอก

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและได้เลือกใช้วิธี CD ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่กำหนดไว้ในตำรายา⁽¹⁰⁾ โดยการตรวจสอบโครงสร้างระดับสูงทั้ง 2 แบบของยาโปรตีน พบว่ามีความสะดวกรวดเร็วและมีความจำเพาะ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างสำหรับการศึกษาเป็นยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2559-2560 จำนวน 5 ชนิด เป็นยาดั้งเดิมจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Ixekizumab, Alirocumab, Emeticumab, Infliximab และยาคัดลอกจำนวน 1 ชนิด คือ Infliximab

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Circular dichroism spectrometer (CD) ยี่ห้อ Jasco รุ่น J-815 (Jasco Corporation, Japan)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนในตัวอย่าง (ยี่ห้อ Sorvall, Germany)
3. เครื่อง NanoDrop™ 2000/2000 (รุ่น NND-1, ND-2000 ยี่ห้อ Thermal Scientific, USA)
4. เครื่อง Ultrasonic Cleaner Sonicator ใช้ cuvette ชนิด quartz ขนาด 0.1 cm และ 1.0 cm path length
5. Amicon® tube ขนาด 30k หรือ 10k (ยี่ห้อ Amicon, Germany)
6. โปรแกรมกรองสัญญาณรบกวน Savitzky-golay ใช้เป็นตัวกรองดิจิทัลในการปรับข้อมูลให้ราบรื่นเพื่อเพิ่มความแม่นยำของข้อมูลโดยไม่บิดเบือนแนวโน้มของสัญญาณ

สารเคมี

น้ำ ultrapure ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonic Cleaner Sonicator

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วยเครื่อง CD

การเตรียมตัวอย่าง

ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ปริมาตรตามที่ระบุของตัวอย่างแต่ละชนิด นำสารละลายตัวอย่าง 100 µl และน้ำ ultrapure ปริมาตร 100 µl ใส่ลงใน Amicon® tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 °C

นาน 30 นาที เก็บสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง Nano Drop™ เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง แล้วเจือจางด้วยน้ำ ultrapure ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 mg/ml สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ และความเข้มข้น 1.0 mg/ml สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CD

การเตรียมเครื่อง CD

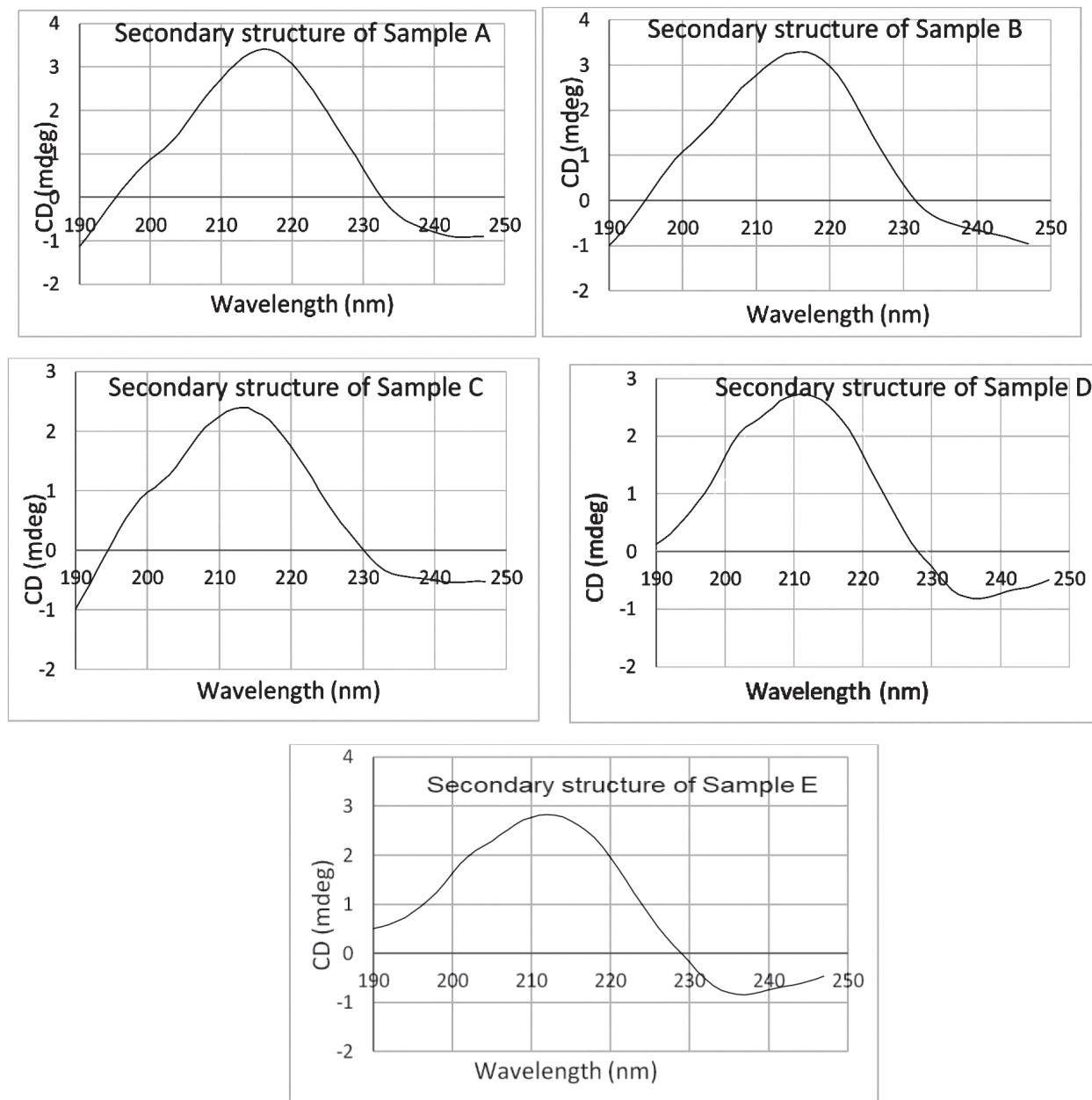
เติมแก๊สไนโตรเจนเข้าในระบบก่อนเปิดหลอดไฟโดยให้เครื่องวัดอัตราไหลของแก๊สได้ 5 ลิตรต่อนาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 10-20 นาที ตรวจสอบแรงดันของแก๊สไนโตรเจนในถังไม่ต่ำกว่า 200 psi ตั้งค่าเครื่อง CD ดังนี้ Sensitivity = Standard 100 mdeg, Start Wavelength = 250 nm, End Wavelength = 190 nm, Data Pitch = 1 nm, Scanning mode = Continuous, Scanning speed = 50 nm/min, Response = 1 sec, Bandwidth = 1 nm, Accumulation = 1 สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ ให้ตั้งค่า Start Wavelength = 350 nm และ End Wavelength = 250 nm

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

หาค่า base line correction โดยเติมน้ำ ultrapure ปริมาตร 800 µl ลงใน cuvette และใส่ลงในเครื่อง CD วิเคราะห์ผลโดยสแกนค่าความยาวคลื่น 190-250 nm สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิและความยาวคลื่น 250-350 nm สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เตรียมแล้วปริมาตร 800 µl ลงใน cuvette แล้ววิเคราะห์เช่นเดิม จากนั้นประมวลผลโดยปรับเส้นกราฟให้เหมาะสมด้วยโปรแกรมกรองสัญญาณ Savistky-Golay เลือกกระดุมความละเอียดสูงสุด

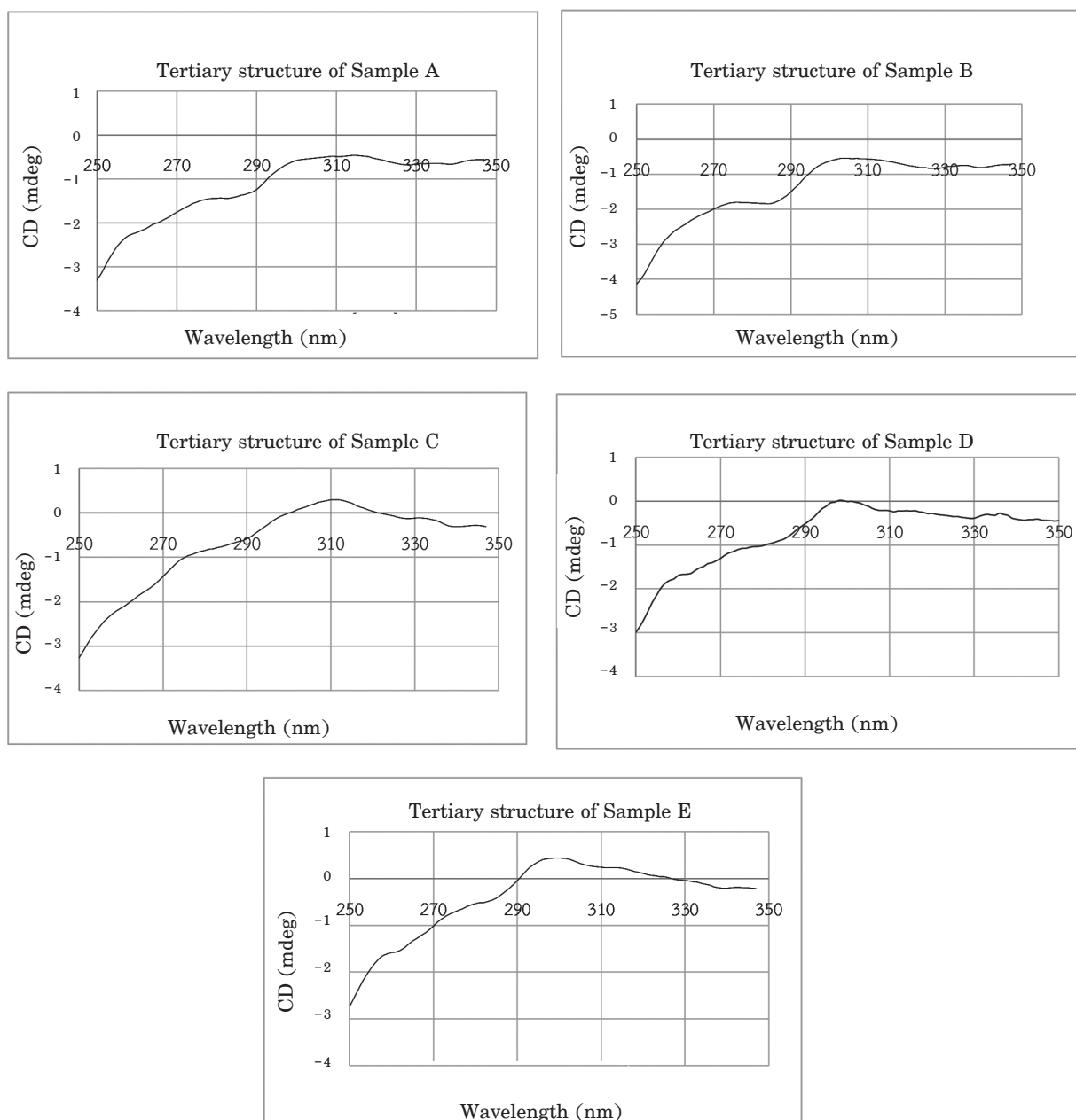
ผล

การตรวจวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของผลิตภัณฑ์ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 5 ชนิด เป็นยาต้นแบบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ยาต้นแบบ ตัวอย่าง A : Ixekizumab, ตัวอย่าง B : Alirocumab, ตัวอย่าง C : Emicizumab, ตัวอย่าง D : Infliximab และยาคลายคลิง จำนวน 1 ชนิด คือ ตัวอย่าง E : Infliximab การศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิโดย far-UV ที่ความยาวคลื่น 190-250 nm พบว่าสเปกตรัมของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีของยาชนิดต่างๆ ที่ศึกษา แสดงลักษณะของโครงสร้างหลักเฉพาะของแอนติบอดีที่ขึ้นอยู่กับชนิดของยา ซึ่งตัวอย่างยาต้นแบบ 4 ชนิด ที่ศึกษาแสดงลักษณะของโครงสร้างหลักเฉพาะของแอนติบอดีเป็นแบบ β -sheet structure มีตำแหน่งสูงสุด (positive band) และต่ำสุด (negative band) ของสเปกตรัม ดังแสดงในภาพที่ 3



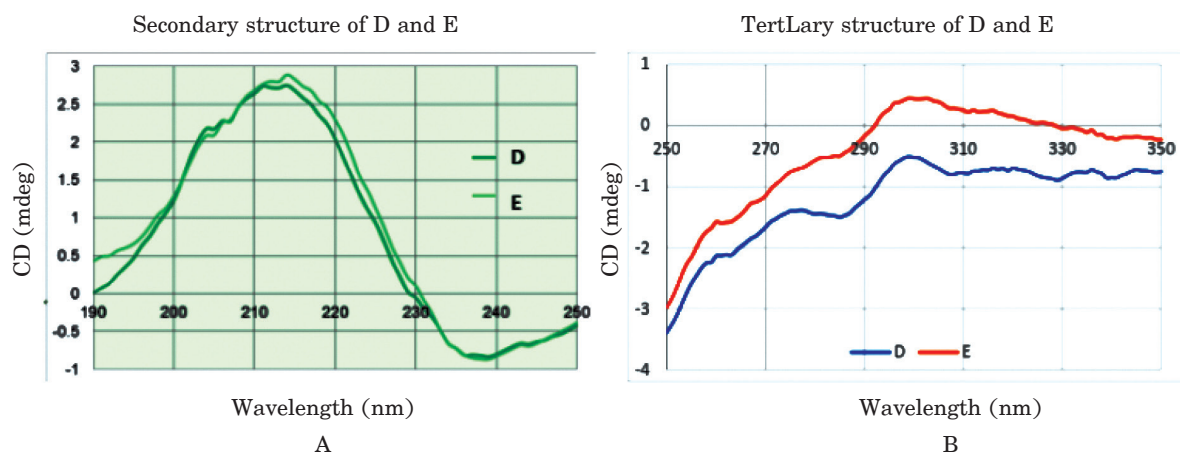
ภาพที่ 3 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด

ผลการศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิ near-UV ที่ความยาวคลื่น 250–350 nm แสดงเส้นสเปกตรัมของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ศึกษาของยาชนิดต่างๆ มีลักษณะเฉพาะของแต่ละชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโครงสร้างโปรตีนตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของยาต้นแบบและยาคัดลอก พบว่าโครงสร้างโปรตีนของยา Infliximab ที่เป็นยาต้นแบบและยาคัดลอก เมื่อวิเคราะห์ที่ far-UV และ near-UV ยาทั้งสองชนิดมีรูปแบบของเส้นสเปกตรัมโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิลักษณะใกล้เคียงกัน สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (190–250 nm) และตติยภูมิ (250–350 nm) ของยา Infliximab ที่เป็นยาต้นแบบ (D) และยาคัดลอก (E)

วิจารณ์

โครงสร้างระดับสูงของยา mAb ทุกชนิดที่นำมาศึกษาแสดงสเปกตรัมที่มีรูปแบบเดียวกันในช่วงคลื่นการทดสอบทั้ง far-UV และ near-UV ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิแสดงให้เห็นรูปร่างของเส้นสเปกตรัมที่เป็นลักษณะเฉพาะของ mAb ที่มีค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดที่เฉพาะตัวของแต่ละชนิด และสอดคล้องกับลักษณะสเปกตรัมจากตำรา ดังแสดงในภาพที่ 2 การเปรียบเทียบเส้นสเปกตรัมของยาชีววัตถุต้นแบบและชีววัตถุคัดลอก พบว่าไม่แสดงความแตกต่างของค่าความยาวคลื่นสูงสุดและต่ำสุด ซึ่งเป็นผลจากการศึกษาเดียวกันของยาชีววัตถุต้นแบบและชนิดคัดลอกตามหลักเกณฑ์การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของโครงสร้างโปรตีนตามหลักเกณฑ์สากล^(19, 20, 21)

ปัจจุบันมีการแสดงข้อมูลโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของตัวยาสำคัญที่วิเคราะห์โดยผู้ผลิตไว้ในตำรับยาที่ขอขึ้นทะเบียนและไม่มีข้อกำหนดการวิเคราะห์หัวข้อนี้ในยาสำเร็จรูป จึงไม่มีการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการของภาครัฐ อย่างไรก็ตามหากหน่วยงานควบคุมกำกับคุณภาพยาของประเทศทำการตรวจวิเคราะห์โครงสร้างระดับสูงของยา mAb ในระหว่างการขึ้นทะเบียน จะทำให้มีข้อมูลที่เป็นประโยชน์เก็บไว้เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับโครงสร้างของยาเหล่านั้น หากเกิดข้อสงสัยในคุณภาพหลังจำหน่ายแล้ว ไม่ว่าจะเป็นในเรื่อง cold chain หรือความคงตัวของยาเมื่อระยะเวลาผ่านไป หรือกรณีเกิดการแพ้หลังได้รับยา สามารถพิสูจน์ได้ว่าโครงสร้างโปรตีนของยาเปลี่ยนแปลงไปแล้วหรือไม่ อีกทั้งการวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิจะมีความไวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิ pH ส่วนผสม หรือโปรตีนถูกทำลายลง ในส่วนของการวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิจะทำให้ทราบข้อมูล เช่น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสูตรยา อุณหภูมิ หรือสภาวะการเก็บรักษาของยา^(22, 23) รวมทั้งใช้เปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ความเหมือนของยาคัดลอกกับยาต้นแบบนั้นๆ

เนื่องจากยา mAb ที่นำมาศึกษาเป็นยาใหม่จึงไม่มีสารมาตรฐานจำหน่าย ต้องได้รับจากผู้ผลิตเท่านั้น ซึ่งโดยปกติจะจัดหาให้เพียงพอสำหรับการทดสอบยาสำเร็จรูปประกอบการขึ้นทะเบียนเท่านั้น แต่การศึกษาโครงสร้างระดับสูงนี้เป็นการทดสอบนอกเหนือจากข้อกำหนดของยาสำเร็จรูป ทำให้ไม่มีสารมาตรฐานของยา mAb ที่จะทดสอบควบคู่กันไป อย่างไรก็ตามสเปกตรัมของยาทุกชนิดที่ได้มีความสอดคล้องกันและตรงตามตำราทฤษฎีเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีน

สรุป

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี CD ทั้งโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของยา มีลักษณะตามโครงสร้างของยาดังกล่าวซึ่งมีความแตกต่างกันจากการดูดกลืนแสง far-UV และ near-UV รวมทั้งโครงสร้างของยาดันแบบและยาค่ายคลึงที่นำมาศึกษามีลักษณะของสเปกตรัมของโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิที่สอดคล้องกัน แสดงถึงความคล้ายคลึงกันระหว่างยา Infliximab ที่เป็นยาดันแบบและยาค่ายคลึง สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างยาที่เกิดหลังจำหน่ายได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวเกศรา ธีรวิชพันธุ์ นายเฉลิมชัย อาจประดิษฐ์ และ ดร.มยุรี เฟื่องทอง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในความร่วมมือ สนับสนุนสถานที่ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย และนางวิชุดา จริยะพันธุ์ อดีตผู้ทรงคุณวุฒิ ด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยา) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับคำแนะนำในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. วิชุดา จริยะพันธุ์, จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์. คุณลักษณะของไกลแคนในยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศไทย. ว กรมวิทย พ 2560; 59(2) : 104-14.
2. Parr MK, Montacir O, Montacir H. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal 2016; 130: 366-89.
3. Wei Y, Thyparambil AA, Latour RA. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190-230 nm. Biochim Biophys Acta 2014; 1844(12): 2331-7.
4. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิธิยา รัตนปนนท์. โครงสร้างของโปรตีน (Protein structure). [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 27 เม.ย. 2562]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://sites.google.com/site/sarchiwmolekul/home/portin-laea-krd-xa-mi-no-proteins/khorngrang-khxng-portin-protein-structure>.
5. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, et al. Biosimilarity under stress: a forced degradation study of Remicade® and Remsima™. MAbs 2017; 9(7): 1197-209.
6. Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kim YJ, et al. Physicochemical characterization of Remsima. MAbs 2014; 6(5): 1163-77.
7. Hong J, Lee Y, Lee C, Eo S, Kim S, Lee N, et al. Physicochemical and biological characterization of SB2, a biosimilar of Remicade® (infliximab). MAbs 2017; 9(2): 365-83.
8. Magnenat L, Palmese A, Fremaux C, D'Amici F, Terlizze M, Rossi M, et al. Demonstration of physicochemical and functional similarity between the proposed biosimilar adalimumab MSB11022 and Humira®. MAbs. 2017; 9(1): 127-39.
9. Cho IH, Lee N, Song D, Jung SY, Bou-Assaf G, Sosic Z, et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. MAbs. 2016; 8(6): 1136-55.
10. Weise M. From bioequivalence to biosimilars: How much do regulators dare? Z Evid Fortbild Qual Gesundh wesen (ZEFQ) 2019; 140: 58-62.

11. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2876–90.
12. Li CH, Nguyen X, Narhi L, Chemmalil L, Towers E, Muzammil S, et al. Applications of circular dichroism (CD) for structural analysis of proteins: qualification of near- and far-UV CD for protein higher order structural analysis. *J Pharm Sci* 2011; 100(11): 4642–54.
13. Nupur N, Chhabra N, Dash R, Rathore AS. Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: rituximab as a case study. *MAbs*. 2018; 10(1): 143–58.
14. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1751(2): 119–39.
15. do Monte ZS, Ramos CS. Development and validation of a method for the analysis of paroxetine HCl by circular dichroism. *Chirality* 2013; 25(4): 211–4.
16. Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des* 2009; 74(2): 101–20.
17. Gonzaga University. Circular dichroism (CD) spectroscopy. [online]. 2018; [cited 2021 Mar 10]; [2 screens]. Available from: URL: <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM245pub/CD.html>.
18. Sanderson T. Orthogonal approaches in elucidating protein conformation increases confidence in formulation design. [online]. 2013; [cited 2021 Mar 10]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.sgs.com/en/news/2013/07/orthogonal-approaches-in-elucidating-protein-conformation-increases-confidence-in-formulation-design>.
19. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(24): E3095–E103.
20. Cox MG, Ravi J, Rakowska PD, Knight AE. Uncertainty in measurement of protein circular dichroism spectra. *Metrologia* 2014; 51(1): 67–79.
21. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 2000; 1(4): 349–84.
22. Joshi V, Shivach T, Yadav N, Rathore AS. Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. *Anal Chem* 2014; 86(23): 11606–13.
23. Alliance Protein Laboratories. Circular dichroism (CD). [online]. 2021; [cited 2 Jan 2021]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.ap-lab.com/circular-dichroism#CD_secondary.

Higher Order Analysis of Protein Structure of Therapeutic Monoclonal Antibody by Circular Dichroism Spectroscopy

Puntawit Natakul¹ and Anurak Muangsaguan²

¹*Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000*

²*Chulabhorn Research Institute, Kamphaeng Phet Road, Bangkok 10210, Thailand*

ABSTRACT Therapeutic monoclonal antibodies (mAb) are protein drugs that have a unique amino acid structure. When there are any changes in the structure due to environmental condition; pH, temperature or increasing production. Their safety, quality and efficacy may be affected. The determination of their higher order protein structure is performed in the in-process control and drug substances but not in the finished products. The purpose of this study was to analyze the protein structure of 5 mAb drugs (4 reference drugs and 1 biosimilar drug) registered in Thailand, using the circular dichroism spectroscopy technique in two ranges of wavelengths: 190–250 nm (far-UV) and 250–350 nm (near-UV). The study demonstrated that the protein structures of all samples showed the specific pattern depending on the product type and the results were conformed to those as their registrations. In addition, we found that the protein structure of the biosimilar mAb drug was similar to its reference drug.

Keywords: Monoclonal antibody products, Biosimilars, Secondary protein structure, Tertiary protein structure