บทความการศึกษาต่อเนื่อง

เคมียา : ชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสมเอฟซี

รองศาสตราจารย์ ดร. ภก. พัฒนา ศรีพลากิจ, ปร.ด.

ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รหัสกิจกรรม 1007-1-000-002-06-2565

จำนวนหน่วยกิต 3.00 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 6 มิถุนายน 2565

วันที่หมดอายุ: 5 มิถุนายน 2566

บทคัดย่อ

โปรตีนลูกผสมเป็นชีวเภสัชภัณฑ์กลุ่มใหม่ที่ใช้สำหรับการรักษาโรคจำเพาะบางชนิด เนื่องจากแนวโน้มของจำนวนยาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนและปริมาณการใช้ยาในกลุ่มนี้มีมากขึ้น ดังนั้นการศึกษายาในกลุ่มดังกล่าวจึงมีความสำคัญ โครงสร้างของโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยอย่างน้อย 2 โดเมนหลัก โดเมนส่วนแรกเป็นเปปไทด์ปฏิบัติการ ในขณะที่โดเมนส่วนที่สองเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ กลไกการออกฤทธิ์ของยาอาศัยการทำงานร่วมกันของโดเมนหลักทั้งสองที่เชื่อมต่อกัน ชีวเภสัชภัณฑ์แต่ละชนิดที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาแล้วมีลักษณะของการออกแบบโครงสร้างที่แตกต่างกันและเฉพาะตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการออกแบบว่าต้องการให้โปรตีนลูกผสมนั้นมีครึ่งชีวิตเพิ่มขึ้น, สามารถนำยาไปสู่เป้าหมาย, เพื่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือข้อที่กล่าวมาทั้งหมด การพัฒนาของยาใหม่บางชนิดอาจใช้วิธีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนบางเรซิดิวจากยาเดิมเพื่อทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ความรู้ด้านเคมียาที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบโครงสร้างของชีวเภสัชภัณฑ์ในกลุ่มโปรตีนลูกผสม อธิบายวิธีการจัดจำแนกกลุ่ม, หน้าที่ของโครงสร้างในแต่ละส่วน, กลไกการออกฤทธิ์ และตัวอย่างที่น่าสนใจของยาในกลุ่มโปรตีนลูกผสมเอฟซี

บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้ชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceutical) กันอย่างแพร่หลาย เริ่มต้นจากการใช้ insulin ที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) ซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนยาในปี ค.ศ. 1982 จากนั้นเป็นต้นมาการพัฒนายาในกลุ่มรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) จึงมีมากขึ้นและเป็นไปอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน โปรตีนเพื่อการรักษา (therapeutic protein) ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนที่พบในธรรมชาติ และใช้เพื่อการทดแทน ซึ่งในอดีตโปรตีนดังกล่าวมักได้มาจากการสกัดจากสัตว์และมนุษย์ ตัวอย่างโปรตีนเหล่านี้ได้แก่ กลุ่มไซโตไคน์ (cytokine) เช่น interferon, กลุ่มโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) เช่น erythropoietin, กลุ่มเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) เช่น human growth hormone, follicle stimulating hormone และกลุ่มโปรตีนในเลือด (blood protein) เช่น tissue

plasminogen activator เนื่องจากเทคโนโลยีที่ใช้ผลิตชีวเภสัชภัณฑ์เหล่านี้ได้พัฒนาไปถึงขั้นที่สูงกว่าการผลิตโปรตีนธรรมชาติทั่วไปแล้ว ดังนั้นจึงมีการออกแบบและผลิตยากลุ่มโมโนโคนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งมีโครงสร้างผสมระหว่างโปรตีนเหมือนธรรมชาติและโปรตีนที่ถูกออกแบบขึ้น นอกจากนี้ยังมีการออกแบบและพัฒนายาอีกกลุ่มนั่นคือ โปรตีนลูกผสม (fusion protein) หรืออาจเรียกว่า hybrid protein หรือ chimeric protein ซึ่งมีโครงสร้างที่ไม่เคยพบหรือปรากฏในธรรมชาติ

โดยทั่วไปโปรตีนลูกผสมเกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างโปรตีนเพื่อการรักษา กับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่กว่า ได้แก่ fragment crystallizable (Fc) ของ immunoglobulin G (IgG), albumin หรือ transferrin โปรตีนลูกผสมสามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มได้ตามชนิดของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างนั้น ได้แก่ โปรตีนลูกผสมเอฟซี (Fc fusion protein), โปรตีนลูกผสมอัลบูมิน (albumin fusion protein) และโปรตีนลูกผสมทรานสเฟอร์ริน (transferrin fusion protein) กลุ่มของโปรตีนลูกผสมที่นิยมมากที่สุดคือโปรตีนลูกผสมเอฟซี ในกรณีของชีวเภสัชภัณฑ์โมโนโคนอลแอนติบอดีอาจถูกจัดจำแนกเป็นโปรตีนลูกผสมได้ โดยอยู่ในกลุ่มของโปรตีนลูกผสมเอฟซี ในขณะที่ยาในกลุ่มคอนจูเกตยา-แอนติบอดี (antibody-drug conjugate) มีลักษณะโครงสร้างแตกต่างจากโปรตีนลูกผสม โดยคอนจูเกตยา-แอนติบอดีมีโครงสร้างเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมต่อสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic agent) โดยใช้ตัวเชื่อมสังเคราะห์ (synthetic linker) ในขณะที่โปรตีนลูกผสมมักมีโครงสร้างเป็นโปรตีนทั้งหมด [1,2]

โครงสร้างทั่วไปของโปรตีนลูกผสม

โปรตีนลูกผสมถูกสร้างขึ้นจากการรวมกันของยีน (gene) สองชนิดหรือมากกว่าด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) โดยที่ยีนดังกล่าวได้มาจากแหล่งที่มาของการสร้างโปรตีนแตกต่างกัน ส่งผลให้ได้โครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีคุณสมบัติและการทำงานที่มาจากโปรตีนทั้งสองชนิด โปรตีนดังกล่าวนี้ประกอบด้วยโดเมน (domain) ที่ไม่เกี่ยวข้องกัน และโครงสร้างมีลักษณะแตกต่างจากโปรตีนที่พบในธรรมชาติ โดเมนทั้งสองที่เชื่อมต่อกันจะทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์เพื่อรักษาโรค โดยทั่วไปโดเมนส่วนแรกซึ่งเป็นเปปไทด์ปฏิบัติการ (effector peptide) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจดจำ (recognition), การจับ (binding) หรือความเป็นพิษ (toxicity) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ความยาวของกรดอะมิโนไม่เกิน 50 เรซิดิว ตัวอย่างโดเมนส่วนแรกได้แก่ ลิแกนด์ (ligand) ที่ใช้จับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ของไซโตไคน์และโกรทเฟกเตอร์, โดเมนภายนอกเซลล์ (extracellular domain หรือ ECD) ของรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ และโปรตีนพิษ (protein toxin) ในขณะที่โดเมนส่วนที่สองซึ่งมาเชื่อมต่อกับโดเมนส่วนแรกมักมีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่กว่า โดยมีหน้าที่ช่วยให้ยาคงตัว (stability), นำส่งยาไปสู่เป้าหมาย (targeting) และทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) การเตรียมชีวเภสัชภัณฑ์ให้อยู่ในรูปโปรตีนลูกผสมมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้ ได้แก่ เพื่อเพิ่มครึ่งชีวิต (half-life หรือ t1/2), เพื่อนำส่งยาไปสู่เป้าหมาย (targeting) หรือเพื่อให้เกิดฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) เป็นต้น เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดเดียวที่มีคุณสมบัติตรงตามวัตถุประสงค์ครบทุกประการ ดังนั้นจึงนิยมนำแอนติบอดีมาใช้เป็นโครงสร้างหลักของโปรตีนลูกผสม โดยใช้ในรูปของอนุพันธ์แอนติบอดี (antibody derivative) ได้แก่ ชิ้นส่วน (fragment) หรือโดเมน (domain) ของแอนติบอดี [1,2] ตัวอย่างของชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสมที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาแล้วอยู่ระหว่างการขึ้นทะเบียนยาแสดงในตารางที่ 1 จากตารางดังกล่าวพบว่าชีวเภสัชภัณฑ์เกือบทั้งหมดอยู่ในรูปโปรตีนลูกผสมเอฟซี

ตารางที่ 1 ชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสมที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาและอยู่ระหว่างการขึ้นทะเบียน

Year approved	Generic name (Trade name)	Domain at N-terminal	Domain at C-terminal	Molecular target	Indication
1998	Etanercept (Enbrel®)	ECD of TNFR2	Human IgG_1 Fc	Binds to TNF-α and TNF-β	Rheumatoid arthritis
1999	Denileukin diftitox (Ontak®)	IL-2	Diphtheria toxin	Binds to IL-2 receptor on B- and T-cells	Cutaneous T-cell lymphoma
2003	Alefacept (Amevive®)	ECD of LFA-3	Human IgG_1 Fc	Binds to CD2 on T-cells	Psoriasis and transplant rejection
2006	Abatacept (Orencia®)	ECD of CTLA-4	Modified human IgG_1 Fc	Binds to CD80/CD86 on APC	Rheumatoid arthritis
2008	Rilonacept (Arcalyst®)	IL-1RAcP and ECD of IL-1R1	Human IgG_1 Fc	Binds to IL-1α, IL-1β and IL-1RA	Cryopyrin-associated periodic syndromes
2008	Romiplostim (Nplate®)	Aglycosylated human IgG_1 Fc	2 TPO receptor-binding domains / 2 glycine linkers	Binds to TPOR	Thrombocytopenia
2011	Belatacept (Nulojix®)	ECD of CTLA-4	Modified human IgG_1 Fc	Binds to CD80/CD86 on APC	Kidney transplantation
2011	Aflibercept (Eylea®)	ECDs of VEGFR-1 (domain 2) and VEGFR-2 (domain 3)	Human IgG_1 Fc	Binds to all isoforms of VEGF-A and VEGF-B as well as PlGF	Wet age-related macular degeneration
2012	Aflibercept (Zaltrap®)	ECDs of VEGFR-1 (domain 2) and VEGFR-2 (domain 3)	Human IgG_1 Fc	Binds to all isoforms of VEGF-A and VEGF-B as well as PlGF	Metastatic colorectal cancer
2013*	Conbercept (Lumitin®)	ECDs of VEGFR-1 (domain 2) and VEGFR-2 (domain 3 and 4)	Human IgG_1 Fc	Binds to all isoforms of VEGF-A and VEGF-B as well as PlGF	Wet age-related macular degeneration
2014	Efmoroctocog alfa (Elocta®)	Single molecule of of B-domain deleted rFVIII	Human IgG_1 Fc	Substitution of FVIII	Hemophilia A
2014	Eftrenonacog alfa (Alprolix®)	Single molecule of fully rFIX	Human IgG_1 Fc	Substitution of FIX	Hemophilia B
2014	Albiglutide (Tanzeum®)	Modified GLP-1 (residue 7-36)	Human albumin	Binds to GLP1R	Type 2 diabetes
2015	Asfotase alfa (Strensiq®)	Catalytic domain of TNSALP	Human IgG_1 Fc and 10 residues of L-aspartate	Substitution of TNSALP	Perinatal/infantile- and juvenile-onset hypophosphatasia
2015	Dulaglutide (Trulicity®)	GLP-1 (residue 7-37)	Human IgG_4 Fc	Binds to GLP1R	Type 2 diabetes
2016	Albutrepenonacog alfa (Idelvion®)	rFIX	Human albumin	Substitution of FIX	Hemophilia B
2019	Luspatercept (Reblozyl®)	Modified ECD of ActRIIB	Human IgG_1 Fc	Binds to TGF-β	Anemia
	Sotatercept	ECD of ActRIIA	Human IgG_1 Fc	Binds to TGF-β	Pulmonary arterial hypertension

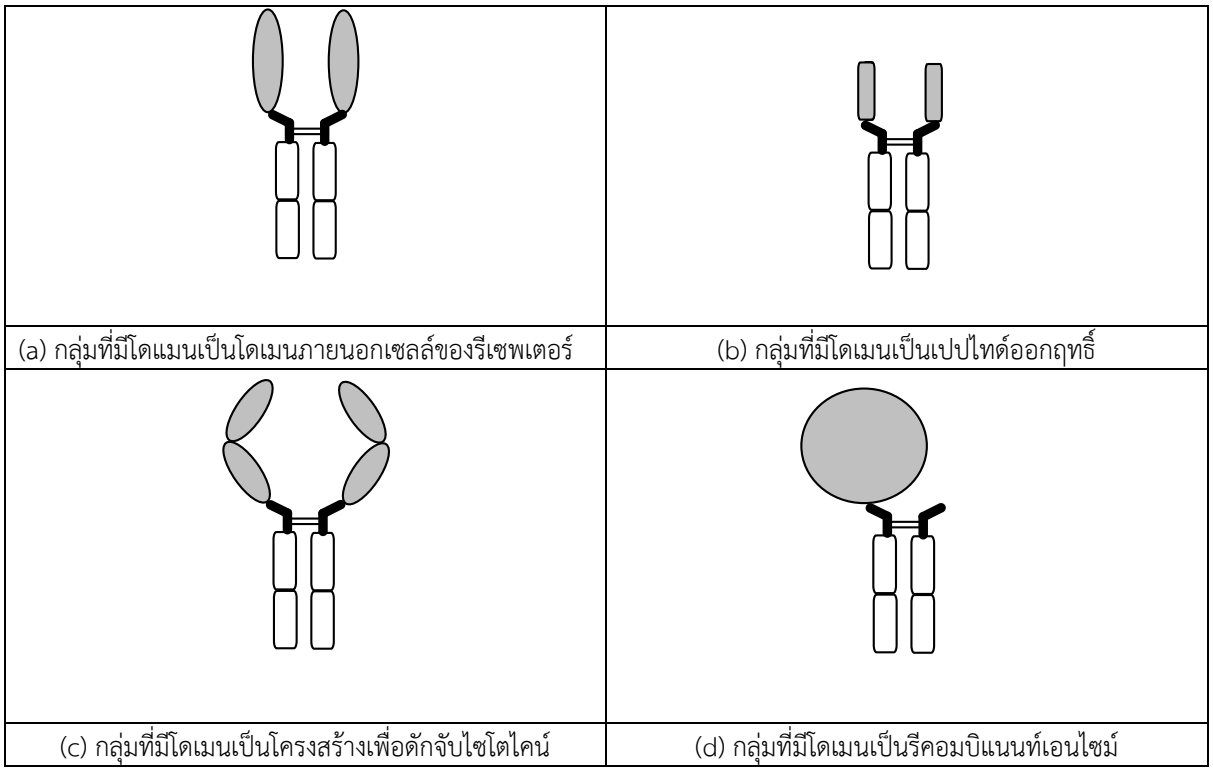
* Approved by China FDA

ActRII=activin receptor type II; APC=antigen-presenting cells; CD=cluster of differentiation; CTLA-4=cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4; ECD=extracellular domain; F=clotting factor; Fc=crystallizable fragment; GLP-1=glucagon-like peptide-1; GLP1R= glucagon-like peptide-1 receptor; IL-2=interleukin-2; IL-1R=interleukin-1 receptor; IL-1RA=interleukin-1 receptor antagonist; IL-1RAcP=interleukin-1 receptor accessory protein; LFA-3=leukocyte function-associated antigen-3; PlGF=placental growth factor; TPO=thrombopoietin; TGF=transforming growth factor; TNF= tissue necrosis factor; TNFR2=tissue necrosis factor receptor-2; TNSALP= tissue-nonspecific alkaline phosphatase; rF=recombinant clotting factor; VEGF=vascular endothelial growth factor; VEGFR=vascular endothelial growth factor receptor

โครงสร้างของโปรตีนลูกผสมเอฟซี

โครงสร้างของโปรตีนลูกผสมเอฟซีประกอบด้วยโดเมน Fc ของ IgG ชิ้นส่วน Fc ของแอนติบอดีประกอบด้วยบริเวณบานพับ (hinge region), โดเมน C_H2 และ โดเมน C_H3 ของสายหนัก (heavy chain หรือ H chain) จำนวน 2 สาย ซึ่งจัดเรียงตัวจาก N-terminal ไปยัง C-terminal สายหนักทั้งสองยึดเกาะกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสาย (inter-chain disulfide bond) ที่บริเวณบานพับ โครงสร้างของโปรตีนลูกผสมเอฟซีส่วนใหญ่จะมี C-terminal ของเปปไทด์ปฏิบัติการมาเชื่อมต่อที่ N-terminal ของบริเวณบานพับของชิ้นส่วน Fc โดยที่เปปไทด์ดังกล่าวอาจเชื่อมต่อกับสายหนักเพียงสายเดียวหรือทั้งคู่สาย ซึ่งเรียกโปรตีนลูกผสมดังกล่าวว่า monomeric fusion protein หรือ dimeric fusion protein ตามลำดับ [1,2]

โปรตีนลูกผสมเอฟซีจัดจำแนกเป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 1) ตามชนิดของโดเมนที่มาเชื่อมต่อกับ Fc ดังนี้ (1) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นโดเมนส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ของรีเซพเตอร์ได้แก่ etanercept, alefacept, abatacept, rilonacept, belatacept, luspatercept และ sotatercept (2) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นเปปไทด์ออกฤทธิ์ (active peptide) ได้แก่ romiplostim และ dulaglutide (3) กลุ่มที่มีโดเมนที่ออกแบบมาเพื่อดักจับไซโตไคน์ (cytokine trap) ได้แก่ aflibercept และ conbercept (4) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ (recombinant enzyme) ได้แก่ efmoroctocog alfa, eftrenonacog alfa และ asfotase alfa [3]



รูปที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของโปรตีนลูกผสมเอฟซีกลุ่มต่างๆ (a) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นรีเซพเตอร์ (b) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นเปปไทด์ออกฤทธิ์ (c) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นโครงสร้างเพื่อดักจับไซโตไคน์ (d) กลุ่มที่มีโดเมนเป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์

ส่วนประกอบของโครงสร้างโปรตีนลูกผสมเอฟซีมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติ, หน้าที่ และประโยชน์ของชีวเภสัชภัณฑ์นั้น ซึ่งมีรายละเอียดต่อไปนี้

ชิ้นส่วน Fc กับครึ่งชีวิต

เปปไทด์ทั่วไปที่อยู่แบบโมเลกุลเดี่ยวมีครึ่งชีวิตสั้นเพราะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และถูกกำจัดที่บริเวณไตอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเปปไทด์ดังกล่าวเชื่อมต่อกับชิ้นส่วน Fc ทำให้ครึ่งชีวิตยาวนานหลายชั่วโมงจนถึงหลายวัน (ตารางที่ 2) ยกเว้น denileukin diftitox ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตน้อย เพราะเป็นโปรตีนลูกผสมที่ไม่ใช้ชิ้นส่วน Fc กลไกที่ทำให้โปรตีนลูกผสมเอฟซีมีครึ่งชีวิตยาวเกิดขึ้นที่เซลล์เอ็นโดทีเลียม (endothelial cell) ในสภาวะกรดด่างที่เหมาะสม รีเซพเตอร์ชนิด FcRn (neonatal Fc receptor) ในเอ็นโดโซม (endosome) สามารถจับที่บริเวณระหว่างโดเมน C_H2 กับโดเมน C_H3 ของชิ้นส่วน Fc ในโปรตีนลูกผสม ซึ่งช่วยป้องกันโปรตีนลูกผสมถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในไลโซโซม (lysosome) และช่วยนำโปรตีนลูกผสมนี้กลับมาใช้ใหม่ได้ (recycle) การเลือกใช้โครงสร้าง Fc ของโปรตีนลูกผสมที่มีแม่แบบมาจาก IgG_1 เป็นที่นิยมมากที่สุด เพราะทำให้ครึ่งชีวิตยาวนานกว่า IgG ชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมักมีครึ่งชีวิตน้อยกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกรณีของโปรตีนลูกผสมที่โครงสร้างมีส่วนประกอบของอัลบูมิน อัลบูมินอาศัยกลไกของ FcRn ดังกล่าวคล้ายกับ Fc ซึ่งทำให้โปรตีนลูกผสมอัลบูมินมีครึ่งชีวิตยาวนานเช่นกัน นอกจากนี้การเพิ่มขนาดโครงสร้าง โดยให้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60-70 kDa ซึ่งเป็นระดับกั้นของไต (renal threshold) ส่งผลให้โปรตีนถูกกำจัดด้วยการกรองที่บริเวณไตได้น้อยลง ทำให้โปรตีนดังกล่าวอยู่ในระบบไหลเวียนได้นานขึ้น [1-5]

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลและค่าครึ่งชีวิตของชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสม

Generic name	Molecular weight (kDa)	Half-life
Etanercept	150	102 hours
Denileukin diftitox	58	70-80 minutes
Alefacept	92	270 hours
Abatacept	92	13.1-16.7 days
Rilonacept	251	7 days
Romiplostim	60	1-34 days
Belatacept	90	8.2-9.8 days
Aflibercept	115	5-6 days
Conbercept	143	4.2 days (rabbit)
Efmoroctocog alfa	220	12.7-19.7 hours
Eftrenonacog alfa	98	86-97 hours
Albiglutide	73	5 days
Asfotase alfa	161	5 days
Dulaglutide	63	5 days
Albutrepenonacog	125	92 hours
Luspatercept	76	11-13 days

ชนิดของอิมมูโนโกลบูลินกับการเกิดพิษต่อเซลล์

อัลบูมินในโปรตีนลูกผสมมีหน้าที่ช่วยให้มีครึ่งชีวิตยาวนานเท่านั้น แต่ถ้าต้องการให้โปรตีนลูกผสมมีฤทธิ์อื่นๆ ด้วยนั้น จำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วน Fc อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ของมนุษย์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม IgG แบ่งออกเป็น 4 ชนิดตามลักษณะโครงสร้าง ได้แก่ IgG_1, IgG_2, IgG_3 และ IgG_4 ชนิดของ IgG มีผลต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของชีวเภสัชภัณฑ์ โดยทั่วไปนิยมเลือก IgG_1, IgG_2 และ IgG_4 มากกว่า IgG_3 เนื่องจากมีครึ่งชีวิตที่มากกว่า นอกจากนี้ IgG แต่ละชนิดยังมีฤทธิ์และประสิทธิภาพแตกต่างกัน เนื่องจากมีความสามารถ

ในการจับกับรีเซพเตอร์ชนิด FcγR (Fc gamma receptor) ชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกัน โดยที่ IgG_1 และ IgG_3 มีความสามารถในการจับกับ FcγR ทุกชนิด ดังนั้นจึงส่งผลต่อฤทธิ์ของการเกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ที่สูงกว่า ในขณะที่ IgG_2 จับได้เฉพาะ FcγRIIA และ FcγRIIIA ส่วนในกรณีของ IgG_4 จับได้เฉพาะ FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, และ FcγRIIIA ดังนั้นชนิดของ IgG ที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนลูกผสมเอฟซีมีความสัมพันธ์กับระดับของค่าครึ่งชีวิตและการเกิดพิษต่อเซลล์ ในกรณีที่ต้องการออกแบบชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสมที่มีฤทธิ์รักษาโรคมะเร็ง (cancer) หรือโรคภูมิต้านทางต่อตนเอง (autoimmune disease) นิยมเลือกชนิด IgG_1 ให้เป็นส่วนประกอบของโปรตีนลูกผสม เนื่องจากมีความเหมาะสมมากกว่า แต่สำหรับ IgG_2 และ IgG_4 เหมาะสำหรับชีวเภสัชภัณฑ์ที่ไม่ต้องการให้เกิดพิษต่อเซลล์ [1,4]

ไกลโคซิเลชันกับประสิทธิภาพ

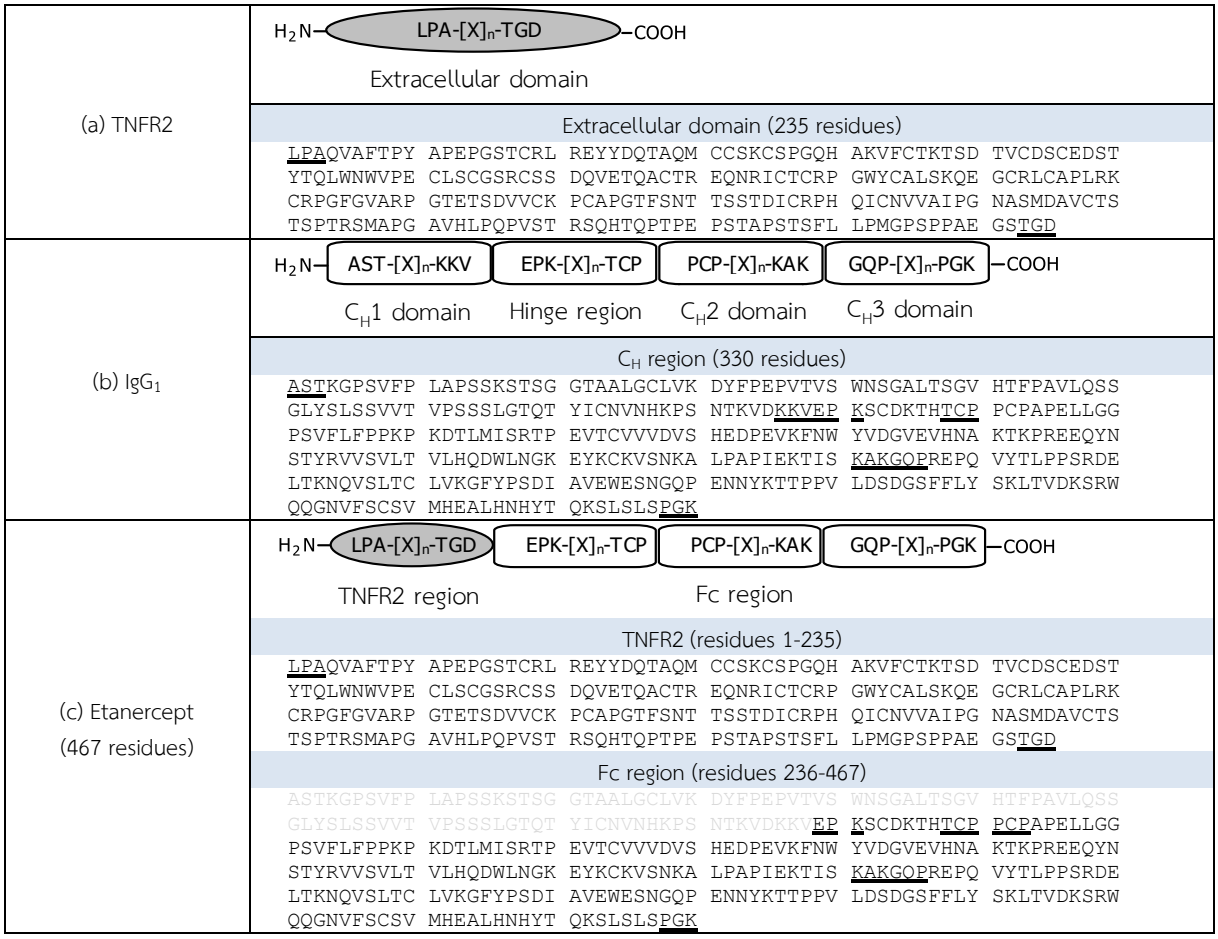
ชีวเภสัชภัณฑ์มากกว่าครึ่งอยู่ในรูปไกลโคโปรตีน (glycoprotein) โดยมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของชนิดน้ำตาลในหมู่คาร์โบไฮเดรทของโปรตีนแตกต่างจากของมนุษย์ ทั้งนี้รูปแบบดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่ใช้ผลิตโปรตีนนั้น เช่น เซลล์ไลน์ Chinese Hamster Ovary (CHO), Human Embryonic Kidney (HEK) เป็นต้น ไกลโคซิเลชัน (glycosylation) มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติของชีวเภสัชภัณฑ์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การละลาย (solubility), ความคงตัว (stability), ครึ่งชีวิต, ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) และความจำเพาะต่อการจับกับรีเซพเตอร์ ในกรณีของโปรตีนลูกผสมเอฟซี น้ำตาลที่บริเวณส่วนปลายของหมู่คาร์โบไฮเดรทที่เกาะอยู่กับโดเมน C_H2 ของชิ้นส่วน Fc ช่วยให้เกิดกลไกการเกิดพิษต่อเซลล์อาศัยแอนติบอดี (antibody-dependent cellular cytotoxicity หรือ ADCC) และกลไกการเกิดพิษต่อเซลล์อาศัยคอมพลีเมนต์ (complement-dependent cytotoxicity หรือ CDC) [1,2]

ตัวอย่างการออกแบบโครงสร้างของโปรตีนลูกผสม

ปัจจุบันมีชีวเภสัชภัณฑ์โปรตีนลูกผสมหลายชนิดที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยา ตัวอย่างการออกแบบโครงสร้างของโปรตีนลูกผสมที่น่าสนใจมีรายละเอียดดังนี้

Etanercept

โครงสร้างของ etanercept เป็นโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยโดเมนภายนอกเซลล์ของรีเซพเตอร์ TNFR2 และชิ้นส่วน Fc ของ IgG_1 ได้แก่ บริเวณบานพับ, โดเมน C_H2 และโดเมน C_H3 โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน โมเลกุลมีจำนวนกรดอะมิโน 467 เรซิดิว (รูปที่ 2) รวมทั้งโมเลกุลอยู่ในรูปไดเมอร์และมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 75 kDa ชีวเภสัชภัณฑ์ดังกล่าวมีกลไกต้านทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ (tumor necrosis factor) โดยที่บริเวณ N-terminal ของโมเลกุลมีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับรีเซพเตอร์ TNFR2 จึงสามารถจับได้ทั้ง TNF-α และ TNF-β ดังนั้นจึงส่งผลให้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์ที่แท้จริงบริเวณผิวเซลล์ได้ ส่วนในกรณีของชิ้นส่วน Fc ของโปรตีนลูกผสมนี้มีหน้าที่ช่วยให้ค่าครึ่งชีวิตของยาเพิ่มขึ้น 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลที่ปราศจากชิ้นส่วน Fc แต่ไม่กระตุ้นกลไกการเกิดพิษต่อเซลล์อาศัยคอมพลีเมนต์ ในปี 1998 etanercept เป็นโปรตีนลูกผสมต้านทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์ชนิดแรกที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาสำหรับรักษาโรคข้ออักเสบรูมาทอยด์ [6]

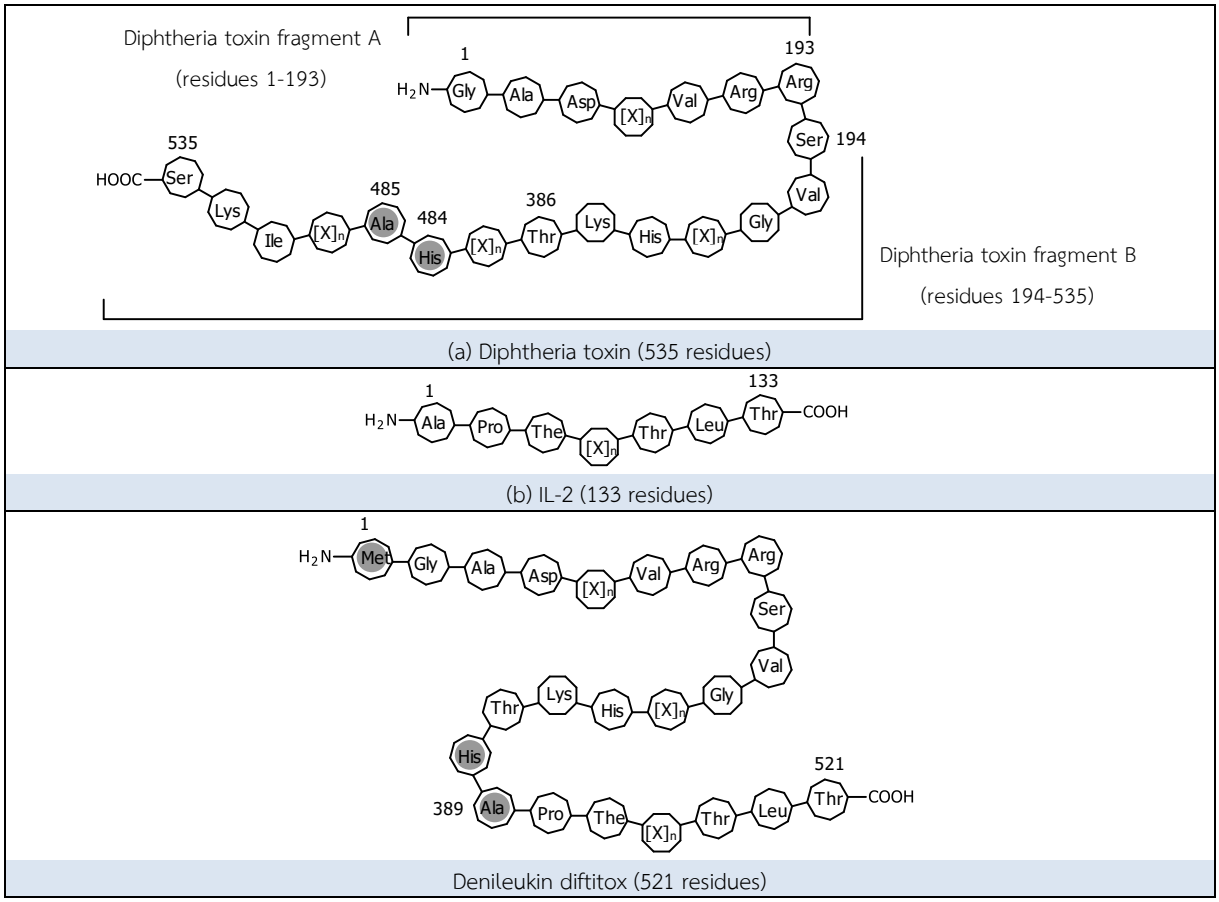


รูปที่ 2 การออกแบบโครงสร้างของ etanercept (a) โดเมนภายนอกเซลล์ของ TNFR2 (b) บริเวณ C_H ของ IgG_1 (c) etanercept ซึ่งประกอบด้วยโดเมนภายนอกเซลล์ของ TNFR2 (เรซิดิวลำดับ 1-235) และชิ้นส่วน Fc ของ IgG_1 โดยใช้บริเวณบานพับ (เรซิดิวลำดับ 99-110) โดเมน C_H2 (เรซิดิวลำดับ 111-223) และโดเมน C_H3 (เรซิดิวลำดับ 224-330) (ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้=เรซิดิวเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโดเมน)

Denileukin diftitox

โปรตีนพิษของเชื้อคอตีบ (diphtheria toxin) เป็นโพลีเปปไทด์มีจำนวนกรดอะมิโน 535 เรซิดิว ถูกปรับปรุงโครงสร้างด้วยการตัดบางส่วนของสายออก 147 เรซิดิว โดยเฉพาะการตัดที่ C-terminal ซึ่งเป็นโดเมนที่ใช้สำหรับจับกับรีเซพเตอร์ (receptor binding domain) ของเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นจึงเหลือเฉพาะส่วนของโดเมนเร่งปฏิกิริยา (catalytic domain) และโดเมนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) ซึ่งโดเมนทั้งสองมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนพิษ denileukin diftitox เป็นโปรตีนลูกผสมที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างโปรตีนพิษของเชื้อคอตีบกับ IL-2 ของมนุษย์ โดยใช้ชิ้นส่วน A ทั้งหมด และชิ้นส่วน B บางส่วน ของสารชีวพิษของเชื้อคอตีบ เลือกเฉพาะเรซิดิวลำดับ 1-386 รวมทั้งเรซิดิวลำดับ 484 และ 485 ของ His และ Ala ตามลำดับ แล้วนำนำเรซิดิว Met ต่อที่ N-terminal ส่วนในกรณีของ IL-2 ใช้เฉพาะเรซิดิวลำดับ 2-132 โดยให้ชิ้นส่วนของสารชีวพิษอยู่ที่ N-terminal และชิ้นส่วน IL-2 อยู่ที่ C-terminal (รูปที่ 3) ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa ชีวเภสัชภัณฑ์ดังกล่าวผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอจากเซลล์ *E. coli* การแทนที่โดเมนที่ใช้สำหรับจับกับรีเซพเตอร์ด้วยชิ้นส่วนของ IL-2 ทำให้โปรตีนพิษดังกล่าวออกฤทธิ์ที่เซลล์เป้าหมาย เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีรีเซพเตอร์ IL-2R จำนวนมากจึงเป็น

เป้าหมายสำคัญของการเข้าจับของยา หลังจาก IL-2 จับกับ IL-2R จะเหนี่ยวนำให้สารชีวพิษเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์มะเร็ง และส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์มะเร็ง denileukin diftitox ได้รับการขึ้นทะเบียนยาในปี ค.ศ. 2008 สำหรับรักษาโรค cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) [6]

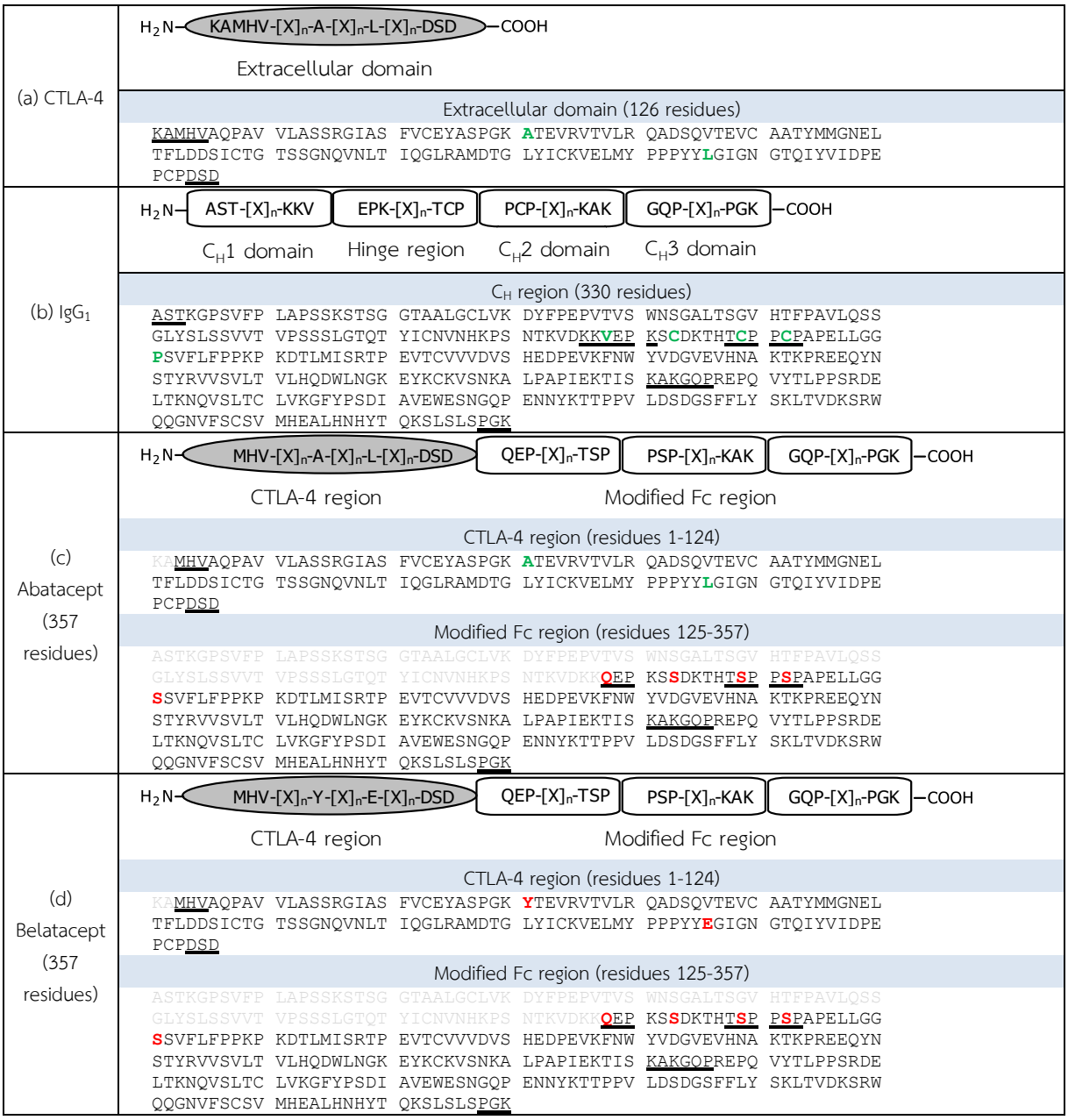


รูปที่ 3 การออบแบบโครงสร้างของ denileukin diftitox (a) Diphtheria toxin (b) IL-2 (c) denileukin diftitox ซึ่งประกอบด้วย Met-Diphtheria toxin fragment A (เรซิดิวลำดับ 1-193)-fragment B (เรซิดิวลำดับ 194-386, 484 และ 485)-IL-2 (เรซิดิวลำดับ 2-132)

Abatacept และ Belatacept

Abatacept และ belatacept เป็นชีวเภสัชภัณฑ์ต่อโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD80/CD86 ของเซลล์นำเสนอแอนติเจน โครงสร้างโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยโดเมนภายนอกเซลล์ของรีเซพเตอร์ CTLA-4 ต่อกับชิ้นส่วน Fc ของ IgG_1 ได้แก่ บริเวณบานพับ และโดเมน C_H2 ที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน 5 เรซิดิว รวมทั้งโดเมน C_H3 (รูปที่ 4) โมเลกุลอยู่ในรูปไดเมอร์ abatacept สามารถจับกับโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD80 และ CD86 ของเซลล์นำเสนอแอนติเจนได้ดีกว่า 2,500 และ 500 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD28 ของที-เซลล์ ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของที-เซลล์ อย่างไรก็ตาม abatacept มีความสามารถในการจับกับโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD80/CD86 น้อยเกินไปจึงไม่สามารถใช้ป้องกันการปฏิเสธอวัยวะได้ แต่อาจใช้รักษาโรค graft-versus-host disease (GVHD) ที่เกิดขึ้นหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ abatacept ได้รับการขึ้นทะเบียนยาในปี ค.ศ. 2005 สำหรับรักษาโรคข้ออักเสบรูมาทอยด์ ส่วนในกรณีของ belatacept พัฒนามาจาก abatacept โดยที่โดเมนของ CTLA-4 มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนเป็น

A29Y และ L104E หรือเปลี่ยน Ala (A) และ Leu (L) เป็น Tyr (Y) และ Glu (E) ที่เรซิดิวตำแหน่ง 29 และ 104 ตามลำดับ ซึ่งทำให้มีความสามารถจับโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD80 และ CD86 ได้ดีขึ้น 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ abatacept ดังนั้น belatacept จึงยับยั้งที-เซลล์ได้ดีกว่า abatacept ในปี ค.ศ. 2011 belatacept ได้รับการขึ้นทะเบียนยาสำหรับป้องกันการปฏิเสธอวัยวะในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่าย [6]



รูปที่ 4 การออกแบบโครงสร้างของ abatacept และ belatacept (a) โดเมนภายนอกเซลล์ของ CTLA-4 (b) บริเวณ C_H ของ IgG_1 (c) abatacept (d) belatacept ซึ่งประกอบด้วยโดเมนภายนอกเซลล์ของ CTLA-4 (เรซิดิวลำดับ 3-126) และบริเวณ Fc ของ IgG_1 โดยใช้บริเวณบานพับ (เรซิดิวลำดับ 99-110), โดเมน C_H2 (เรซิดิวลำดับ 111-223) และโดเมน C_H3 (เรซิดิวลำดับ 224-330) (ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้=เรซิดิวเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโดเมน; ตัวอักษรสีเขียวและแดง=เรซิดิวที่มีการปรับปรุง)

Rilonacept

Rilonacept เป็นชีวเภสัชภัณฑ์ต้าน IL-1 โครงสร้างโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยโดเมนภายนอกเซลล์ของทั้ง IL-1RAP และ IL-1R1 ต่อกับชิ้นส่วน Fc ของ IgG_1 (รูปที่ 5) โดยอยู่ในรูปไดเมอร์ แต่ละโมเลกุลมีจำนวนกรดอะมิโน 880 เรซิดิว และมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 251 kDa ชีวเภสัชภัณฑ์นี้ผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์ CHO เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของ IL-1 เกิดจาก IL-1 เข้าจับกับรีเซพเตอร์ IL-1R1 และ IL-1RAP ที่บริเวณผิวเซลล์ ดังนั้นการออกแบบยาจึงใช้หลักการของการดักจับอินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1 trap) หรือการใช้รีเซพเตอร์หลอก โดยการใช้โดเมนภายนอกเซลล์ของทั้ง IL-1RAP และ IL-1R1 ดังนั้น IL-1A และ IL-1B จึงไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์ที่แท้จริงบนผิวเซลล์ได้ ส่วนในกรณีของชิ้นส่วน Fc ซึ่งเป็นบริเวณที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ มีหน้าที่ช่วยทำให้ยามีค่าครึ่งชีวิตมาก rilonacept ได้รับการขึ้นทะเบียนยาในปี ค.ศ. 2008 สำหรับรักษาโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ กลุ่มโรค cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) ประกอบด้วยโรคต่างๆ เช่น familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS), โรค Muckle-Wells syndrome (MWS) เป็นต้น [6]

(a) IL-1RAP	H_2N—SER-[X]$_n$-GAT—COOH Extracellular domain Extracellular domain (347 residues) SERCDDWGLD TMRQIQVFED EPARIKCPLF EHFLKFNYST AHSAGLTLIW YWTRQDRDLE EPINFRLPEN RISKEKDVLW FRPTLLNDTG NYTCMLRNTT YCSKVAFPLE VVQKDSCFNS PMKLPVHKLY IEYGIQRITC PNVDGYFPSS VKPTITWYMG CYKIQNFNNV IPEGMNLSFL IALISNNGNY TCVVTYPENG RTFHLTRTLT VKVVGSPKNA VPPVIHSPND HVVYEKEPGE ELLIPCTVYF SFLMDSRNEV WWTIDGKKPD DITIDVTINE SISHSRTEDE TRTQILSIKK VTSEDLKRSY VCHARSAKGE VAKAAKVKQK VPAPRYTVEL ACGFGAT
(b) IL-1R1	H_2N—LEA-[X]$_n$-FQK—COOH Extracellular domain Extracellular domain (319 residues) LEADKCKERE EKIILVSSAN EIDVRPCPLN PNEHKGTITW YKDDSKTPVS TEQASRIHQH KEKLWFVPAK VEDSGHYYCV VRNSSYCLRI KISAKFVENE PNLCYNAQAI FKQKLPVAGD GGLVCPYMEF FKNENNELPK LQWYKDCKPL LLDNIHFSGV KDRLIVMNVA EKHRGNYTCH ASYTYLGKQY PITRVIEFIT LEENKPTRPV IVSPANETME VDLGSQIQLI CNVTGQLSDI AYWKWNGSVI DEDDPVLGED YYSVENPANK RRSTLITVLN ISEIESRFYK HPFTCFAKNT HGIDAAYIQL IYPVTNFQK
(c) IgG_1	H_2N—AST-[X]$_n$-KKV / EPK-[X]$_n$-TCP / PCP-[X]$_n$-KAK / GQP-[X]$_n$-PGK—COOH C_H1 domain Hinge region C_H2 domain C_H3 domain C_H region (330 residues) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
(d) Rilonacept (880 residues)	H_2N—SER-[X]$_n$-TVE / KCK-[X]$_n$-VTN / SGD-[X]$_n$-TCP / PCP-[X]$_n$-KAK / GQP-[X]$_n$-PGK—COOH IL-1RAP region IL-1R1 region Modified Fc region IL-1RAP region (residues 1-339) SERCDDWGLD TMRQIQVFED EPARIKCPLF EHFLKFNYST AHSAGLTLIW YWTRQDRDLE EPINFRLPEN RISKEKDVLW FRPTLLNDTG NYTCMLRNTT YCSKVAFPLE VVQKDSCFNS PMKLPVHKLY IEYGIQRITC PNVDGYFPSS VKPTITWYMG CYKIQNFNNV IPEGMNLSFL IALISNNGNY TCVVTYPENG RTFHLTRTLT VKVVGSPKNA VPPVIHSPND HVVYEKEPGE ELLIPCTVYF SFLMDSRNEV WWTIDGKKPD DITIDVTINE SISHSRTEDE TRTQILSIKK VTSEDLKRSY VCHARSAKGE VAKAAKVKQK VPAPRYTVEL ACGFGAT IL-1R1 region (residues 340-651) LEADKCKERE EKIILVSSAN EIDVRPCPLN PNEHKGTITW YKDDSKTPVS TEQASRIHQH KEKLWFVPAK VEDSGHYYCV VRNSSYCLRI KISAKFVENE PNLCYNAQAI FKQKLPVAGD GGLVCPYMEF FKNENNELPK LQWYKDCKPL LLDNIHFSGV KDRLIVMNVA EKHRGNYTCH ASYTYLGKQY PITRVIEFIT LEENKPTRPV IVSPANETME VDLGSQIQLI CNVTGQLSDI AYWKWNGSVI DEDDPVLGED YYSVENPANK RRSTLITVLN ISEIESRFYK HPFTCFAKNT HGIDAAYIQL IYPVTNFQK Modified Fc region (residues 652-880) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSGDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

รูปที่ 5 การออกแบบโครงสร้างโพลีเปปไทด์ของ rilonacept (a) โดเมนภายนอกเซลล์ IL-1RAP (b) โดเมนภายนอกเซลล์ IL-1R1 (c) บริเวณ C_H ของ IgG_1 (d) rilonacept ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ IL-1RAP (เรซิดิวลำดับ 1-339), บริเวณ IL-1R1 (เรซิดิวลำดับ 5-316) และบริเวณ Fc ของ IgG_1 โดใช้บริเวณบานพับ (เรซิดิวลำดับ 102-110) โดเมน C_H2 (เรซิดิวลำดับ 111-223) และโดเมน C_H3 (เรซิดิวลำดับ 224-330) (ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้=เรซิดิวเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโดเมน; ตัวอักษรสีเขียวและแดง=เรซิดิวที่มีการปรับปรุง)

สรุป

การขึ้นทะเบียนยาตัวแรกในกลุ่มโปรตีนลูกผสมในปีทศวรรษที่ 1990 ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา มีการพัฒนายาในกลุ่มนี้อีกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้สำหรับรักษาโรคจำเพาะบางชนิด ชีวเภสัชภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ผลิตขึ้นในปัจจุบันจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนลูกผสมเอฟซี ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอิมมูโนโกลบูลิน โดยการใช้ชิ้นส่วน Fc เป็นโครงสร้างหลัก เชื่อมต่อกับเปปไทด์หลากหลายชนิด ซึ่งเป็นได้ทั้งโดเมนภายนอกเซลล์ของรีเซพเตอร์, เปปไทด์ออกฤทธิ์, โดเมนสำหรับดักจับไซโตไคน์ หรือรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบการใช้อัลบูมินเป็นโครงสร้างหลักด้วย ชีวเภสัชภัณฑ์ดังกล่าวผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีโครงสร้างไม่เหมือนกันโปรตีนในธรรมชาติ โครงสร้างแต่ละส่วนที่ถูกออกแบบมาให้มีหน้าที่แตกต่างกันและเฉพาะตัว การเชื่อมต่อกันของโปรตีนลูกผสมดังกล่าวช่วยเพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ ในอนาคตคาดว่าจะมีชีวเภสัชภัณฑ์ในกลุ่มโปรตีนลูกผสมนี้ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคที่สำคัญอื่นๆ ได้เพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Baldo BA. Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety. Drug Saf. 2015;38(5):455-79.
2. Schmidt SR. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013. Chapter 1, Fusion proteins: applications and challenges; p. 3-24.
3. Duivelshof BL, Murisier A, Camperi J, Fekete S, Beck A, Guillarme D, D'Atri V. Therapeutic Fc-fusion proteins: current analytical strategies. J Sep Sci. 2021;44(1):35-62.
4. Pechtner V, Karanikas CA, García-Pérez LE, Glaesner W. A New approach to drug therapy: Fc-fusion technology. Prim Health Care. 2017;7(1): 1000255.
5. Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, Pleass RJ. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. EMBO Mol Med. 2012;4(10):1015-28.
6. พัฒนา ศรีพลากิจ. ชีวเภสัชภัณฑ์: การออกแบบและพัฒนา (Biopharmaceuticals: design & development). พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2558