**TÓM TẮT THÔNG TIN VỀ LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu biểu hiện kháng thể đơn dòng kháng thụ thể HER-2 (Trastuzumab) trên dòng tế bào CHO hướng đến ứng dụng điều trị bệnh ung thư vú

Ngành: Sinh lý học người và động vật

Mã số ngành: 62420104

Họ tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Quang Huy

Khóa đào tạo: 2016 - 2020

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Đỗ Minh Sĩ

2. TS. BS Trịnh Thanh Hùng

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên- ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN:**

Ung thư vú là bệnh ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ Việt Nam với số ca mắc mới và tử vong ngày càng tăng. Tỷ lệ bệnh nhân dương tính HER2 (HER2 - enriched) chiếm khoảng 20 – 30% tổng số ca ung thư vú, loại này thường có tiên lượng bệnh xấu nhất trong bốn loại vì khối u phát triển và di căn nhanh, cũng như dễ tái phát. Herceptin (Trastuzumab) là kháng thể đơn dòng nhân hoá tái tổ hợp được ứng dụng trong liệu pháp nhắm trúng đích điều trị bệnh nhân giai đoạn II hoặc III, liệu pháp này đã giúp tăng thời gian sống thêm không bệnh bằng cách ngăn chặn hoạt động quá mức của thụ thể HER-2. Mặc dù tính ứng dụng của chúng trong thực tiễn lâm sàng rất cao khi góp phần cải thiện tiên lượng cho bệnh nhân UTV dương tính HER-2, tuy nhiên hiện tại vẫn chưa có một quy trình tổng thể về nghiên cứu sản xuất các sản phẩm thuốc sinh học tương tự Trastuzumab được công bố trong nước. Do đó, luận án đã được thực hiện với mục đích cung cấp cái nhìn tổng quan về vai trò và tính hiệu quả ứng dụng của Trastuzumab, cũng như cung cấp các thông tin khoa học về quy trình phát triển dòng tế bào, quy trình sản xuất thu nhận và đánh giá chất lượng sản phẩm. Các kết quả nghiên cứu của luận án góp phần xây dựng quy trình tổng thể về nghiên cứu phát triển thuốc sinh học tại Việt Nam.

Luận án đã sản xuất thành công Trastuzumab trên tế bào CHO bằng hệ thống nuôi cấy tế bào động vật (bioreactor) quy mô 50 lít có tính sinh học tương tự Herceptin, các kết quả cụ thể như sau:

- Phát triển thành công dòng tế bào CHO tái tổ hợp (H06LD68) biểu hiện thành công Trastuzumab. Qua thử nghiệm hoạt tính dựa trên tế bào cho thấy kháng thể tạo ra có khả năng ngăn chặn sự tăng sinh của dòng tế bào UTV BT-474.

- Khảo sát thành công quy trình nuôi cấy quy mô PTN (50 ml) phù hợp với điều kiện thực tế tại labo khi giúp tế bào tăng trưởng và biểu hiện Trastuzumab gấp 6,7 lần so với trước khi tối ưu, cụ thể, nồng độ Trastuzumab đã tăng từ 0,561 lên 3,755 mg/mL.

- Thử nghiệm thành công quy trình sản xuất và tinh sạch Trastuzumab quy mô pilot (50 L). Sau nuôi cấy và tinh sạch, nồng độ kháng thể, độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi đều đạt (so với mục tiêu đề ra) với các giá trị lần lượt là 4,215 (2 g/L); 99,46 (>98%) và 70,56 (>65%).

- Sản phẩm tạo ra đạt chất lượng tương tự thuốc gốc về:

* Độ tinh sạch: thành phần các tạp chất có khối lượng phân tử khác Trastuzumab, dư lượng DNA tế bào chủ, dư lượng protein tế bào chủ, dư lượng protein A, nội độc tố vi khuẩn gram âm đều thấp hơn ngưỡng quy định, đồng thời không ghi nhận sự xuất hiện các khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn hoặc nấm sau 14 ngày bổ sung mẫu thử nghiệm.
* Cấu trúc và chức năng sinh học: mẫu có khả năng liên kết chuyên biệt thụ thể HER-2 trên dòng tế bào UTV BT-474 và thụ thể FcγR trên tế bào miễn dịch, đồng thời kích hoạt con đường ADCC ngăn chặn sự tăng sinh cũng như giết chết dòng tế bào UTV có biểu hiện vượt mức HER-2.
* Phi lâm sàng: không ghi nhận bất kỳ trường hợp nào chết hoặc phản ứng quá mẫn với các liều thử nghiệm của mẫu và Herceptin.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN:**

- Đây là công trình nghiên cứu về sản xuất Trastuzumab có hoạt tính sinh học tương tự với Herceptin tại Việt Nam ở quy mô 50 lít.

- Thiết lập được quy trình sản xuất thành công kháng thể đơn dòng nhân hoá tái tổ hợp với các điều kiện về nuôi cấy, thu nhận và tinh sạch Trastuzumab phù hợp với điều kiện tại labo ở quy mô nhỏ (50-mL) lẫn quy mô pilot (50-L), góp phần cho việc sản xuất thương mại thuốc tương tự sinh học Herceptin nói riêng và các thuốc sinh học nói chung ở Việt Nam, giúp giảm giá thành so với các thuốc nhập khẩu.

**3. CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU:**

Hiện nay, nhu cầu sử dụng kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đang phát triển nhanh chóng trong thị trường dược phẩm khi mỗi năm có khoảng 40 phân tử kháng thể mới được đưa vào thử nghiệm lâm sàng, trong đó hầu hết được sản xuất từ ​​tế bào CHO. Với sự gia nhập thị trường cung ứng của sáu sản phẩm SBP kháng thụ thể HER-2 trong những năm gần đây đã giúp giá thành sản phẩm giảm liên tục, trong đó có thời điểm giá một số sản phẩm thấp hơn 50% so với giá thuốc gốc. Kết quả nghiên cứu là tiền đề khoa học cho việc ứng dụng triển khai sản xuất Trastuzumab quy mô công nghiệp, xa hơn là thương mại hoá Trastuzumab “Made in Vietnam” có tính an toàn và hiệu quả tương đương thuốc gốc. Sự tự chủ trong sản xuất và cung cấp thuốc nội địa với giá thành cạnh tranh sẽ mang lại nhiều cơ hội cho người dân Việt Nam có thể tiếp cận phương pháp điều trị hiệu quả với chi phí hợp lý trong tương lai.

Vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu:

- Tối ưu từng bước trong quy trình tinh sạch quy mô lớn nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi sản phẩm.

- Đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* của Trastuzumab trên các dòng tế bào ung thư biểu hiện vượt mức HER-2 khác ngoài hai dòng tế bào BT-474, SK-BR3.

- Đánh giá hoạt tính sinh học *in vivo* trên mô hình chuột mang khối u (xenograft model) biểu hiện vượt mức HER-2 bằng cách tiêm kháng thể theo dõi, đánh giá kích thước khối u trước và sau khi tiêm.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN** | **NGHIÊN CỨU SINH** |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: Study on the expression of anti-HER2 monoclonal antibody (Trastuzumab) on a CHO cell line towards application in breast cancer treatment

Specialty: Human and animal physiology

Code: 62420104

Name of PhD Student: Nguyen Quang Huy

Academic year: 2016 - 2020

Supervisor: 1. Ph.D. Do Minh Si

2. Ph.D. Dr. Trinh Thanh Hung

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY:**

Breast cancer is becoming more common among Vietnamese women, with an increasing number of cases and deaths. HER2-positive patients (HER2-enriched) make up over 20% of all cases, this type often has the worst prognosis of the four types because the tumor grows and spreads fast, as well as easily recurs. Herceptin, a recombinant humanized monoclonal antibody, is a targeted therapy that effectively treats stage II or III patients, this treatment has increased disease-free longevity by inhibiting HER-2 receptor overactivity. Even though its applications greatly improve the outlook for HER-2 positive breast cancer patients, however, there is currently no published procedure for producing Trastuzumab domestically. We conducted this study not only to explain Trastuzumab's role and how well it works, but also to provide information on developing cell lines, producing the product, and testing its quality. Our findings facilitate the overall process of researching and developing biological drugs in Vietnam.

The thesis has successfully produced Trastuzumab on a recombinant CHO cell line using a 50-liter animal cell culture system (bioreactor). The purified product has similar biological properties to Herceptin, with the following specific results:

- We successfully developed a CHO cell line (H06LD68) that produced Trastuzumab. Cell-based assay demonstrated that manufactured Trastuzumab could prevent the growth of the BT-474 cell line.

- In our laboratory, we improved the small-scale culture process (50-mL), cells grew well and produced 6.7 times more Trastuzumab than before optimization, especially increasing Trastuzumab concentrations from 0.561 to 3.755 mg/mL.

- The Trastuzumab production and purification method was successfully conducted on a 50-L scale. After culturing and purifying, the antibody was tested and met our goals for concentration, purity, and recovery. The values were 4.215 g/L for concentration, 99.46% for purity, and 70.56% for recovery efficiency, which exceeded the minimum requirements of 2g/L, 98%, and 65% respectively.

- The manufactured product is of the same quality as the innovator in these areas:

• Purity: impurities with different molecular weights than Trastuzumab, host cell DNA residues, host cell protein residues, protein A residues, and gram-negative bacterial endotoxins have all been below a certain level. Additionally, no bacteria or fungi colonies were found after 14 days.

• Structure and biological function: the sample can specifically bind to the HER-2 receptor on the BT-474 cell line, as well as the FcR receptor on immune cells, while alse activating the ADCC pathway to inhibit the proliferation and killing of breast cancer tumor-derived cell lines with HER-2 overexpression.

• Non-clinical: no incidents of mortality or hypersensitive responses were observed when evaluating sample and Herceptin at various doses.

**2. NOVELTY OF THESIS:**

- This is a research project on the production of Trastuzumab with biological activity similar to Herceptin in Vietnam on the pilot scale (50-liter).

- Established a successful recombinant humanized monoclonal antibody production process with conditions for culturing, harvesting, and purifying Trastuzumab compatible with laboratory conditions at both the small scale (50-mL) and the pilot scale (50-L), contributing to the commercial production of biosimilar Herceptin in particular and biological drugs in general in Vietnam, thereby lowering costs by comparison with imported medications.

**3. APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE:**

The pharmaceutical industry's demand for recombinant monoclonal antibodies is rapidly expanding, with more than 40 novel antibody molecules entering clinical trials each year, the vast majority of which are produced from CHO cells. The introduction of six anti-HER-2 receptor SBP medications onto the market in recent years has aided in the continuous reduction of product pricing, with some versions selling for 50% less than the original drugs. The findings provide a theoretical basis for the implementation and operation of industrial-scale Trastuzumab production, as well as the marketplace of "Made in Vietnam" Trastuzumab with safety and efficacy comparable to the innovator. In the future, autonomy in making and supplying indigenous pharmaceuticals at competitive pricing will provide many options for Vietnamese people to acquire effective therapies at reasonable costs.

Further research is required in the following segments:

- Optimize each step in the large-scale purifying process to increase product recovery efficiency.

- Assess Trastuzumab's *in vitro* biological activity on cancer cell lines overexpressing HER-2 other than BT-474 and SK-BR3.

- Assess Trastuzumab's *in vivo* biological activity on a tumor-bearing mice model (xenograft model) overexpressing HER-2 by administering antibodies and then recording and evaluating tumor size before and after injection.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISOR** | **Ph.D. STUDENT** |

**CONFIRMATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**