



Review Article

Protein Drug Production

Nguyen Hue Linh¹, Pham Thi Minh Hue^{2,*}, Nguyen Thi Mai Anh²,
Bui Thi Thuong³, Nguyen Van Khanh³, Nguyen Thi Thanh Binh³,
Nguyen Thi Hai Yen³, Dang Kim Thu³, Bui Thanh Tung³,
Tu Minh Koong², Nguyen Thanh Hai³

¹University College Cork School of Pharmacy, College Road, Cork City, Ireland

²Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 16 May 2023

Revised 22 May 2023; Accepted 10 June 2023

Abstract: The group of protein drugs has been developing very strongly, promising great advances in diagnosis, treatment, prevention, and human health improvement. Protein drug production is a large area of research, requiring advanced scientific and technological expertise, and integration of multi-disciplinary technology from fields such as biology, genetics, biotechnology, protein extraction and purification, and pharmaceutical manufacturing.

As protein drug manufacture involves biosynthesis processes using different cell lines, biopharmaceuticals have some distinct characteristics from small-molecule synthetic drugs, such as variability of biological processes, diversity of synthetic proteins, therefore leading to some differences in research and development, approval procedures, bioactivity testing, quality control and quality assurance and the production of “generic” biopharmaceuticals - biosimilars.

This article provides an overview of protein drug production from the initial stage to the finished product process, to identify and promote training activities, research and development, and knowledge transfer, contributing to the development of the biopharmaceutical industry in Vietnam, as well as effectively applying the drugs in clinical practice. Protein drug production is a valuable industrial field, with the goal of not only protecting and taking care of people's health but also developing national research, manufacturing, scientific and technological capacity, and bringing economic value.

Keywords: Protein drug, biopharmaceuticals, formulation, biosimilars.

* Corresponding author.

E-mail address: hueptm@hup.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4526>

Sản xuất thuốc protein

Nguyễn Huệ Linh¹, Phạm Thị Minh Huệ^{2,*}, Nguyễn Thị Mai Anh²,
Bùi Thị Thuong³, Nguyễn Văn Khanh³, Nguyễn Thị Thanh Bình³,
Nguyễn Thị Hải Yến³, Đặng Kim Thu³, Bùi Thanh Tùng³,
Từ Minh Koóng², Nguyễn Thanh Hải³

¹Trường Dược Đại học UCC, Đường College, Thành phố Cork, Ai Len

²Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 5 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 5 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 6 năm 2023

Tóm tắt: Nhóm thuốc protein đã và đang phát triển rất mạnh mẽ, hứa hẹn nhiều tiến bộ vượt bậc trong chẩn đoán, điều trị, phòng tránh bệnh tật và nâng cao sức khỏe con người. Sản xuất thuốc protein là một lĩnh vực lớn, trình độ khoa học công nghệ cao, cần tích hợp khoa học công nghệ đa ngành, đa lĩnh vực như sinh học, di truyền, công nghệ sinh học, công nghệ tách chiết và tinh chế protein, công nghệ bào chế sản xuất thuốc.

Nhóm thuốc protein sử dụng các quá trình sinh tổng hợp bằng các dòng tế bào khác nhau trong sản xuất nên có một số thuộc tính khác các thuốc tổng hợp như: sự biến đổi của các quá trình sinh học, sự đa dạng của các protein tổng hợp được, dẫn tới có một số điểm khác biệt trong nghiên cứu phát triển, trong xét duyệt cấp phép, thử nghiệm tác dụng sinh học, kiểm soát chất lượng và vấn đề sản xuất thuốc protein “generic” - thuốc tương tự sinh học.

Bài này tổng quan về quá trình sản xuất thuốc protein từ giai đoạn khởi đầu đến giai đoạn hoàn chỉnh thành phẩm cuối cùng, nhằm mục tiêu giúp nhận diện đề thúc đẩy các hoạt động đào tạo, nghiên cứu phát triển, tiếp nhận chuyển giao tri thức, góp phần phát triển nền công nghiệp dược phẩm protein ở Việt Nam cũng như ứng dụng nhóm thuốc đó trong thực tiễn lâm sàng một cách hiệu quả. Sản xuất thuốc protein là một lĩnh vực công nghiệp có giá trị lớn, không chỉ cho mục tiêu bảo vệ, chăm sóc sức khỏe nhân dân mà còn phát triển trình độ nghiên cứu, sản xuất; năng lực khoa học công nghệ quốc gia và mang lại giá trị kinh tế.

Từ khóa: Thuốc protein, thuốc sinh học, xây dựng công thức bào chế, thuốc tương tự sinh học.

1. Giới thiệu

Thuốc protein (bao hàm cả thuốc RNA; có thể còn được gọi là dược phẩm sinh học/thuốc sinh học/sinh dược phẩm) là các protein đại phân tử được sản xuất chủ yếu nhờ các tiến bộ của công nghệ sinh học, đặc biệt công nghệ tái tổ

hợp, được bào chế dưới dạng thuốc thuận lợi cho sử dụng. Thuốc protein có phạm vi sử dụng rộng, được ứng dụng trong hầu hết các chỉ định để chẩn đoán, điều trị, phòng tránh bệnh tật và nâng cao sức khỏe con người [1].

Cũng như các quá trình phát triển thuốc khác, thuốc protein cũng qua nhiều giai đoạn, từ

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: hueptm@hup.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4526>

sản xuất nguyên liệu đến bào chế thành phẩm thuốc. Sự thành công của từng giai đoạn là quan trọng, có vai trò quyết định để đưa một thuốc mới vào thực tiễn sản xuất, cung ứng và áp dụng lâm sàng. Để phát triển thành công thuốc protein, việc nắm bắt được đầy đủ các đặc điểm hoá lý, qui trình sản xuất, đường dùng, tác dụng sinh học,... là cần thiết. Ngoài các đặc điểm khác nhau khi so sánh với các thuốc hữu cơ phân tử nhỏ đã nêu trước đây [1], thuốc protein còn có một số đặc điểm như:

- Khối lượng phân tử lớn và phức tạp hơn nhiều so với các thuốc hữu cơ phân tử nhỏ. Cấu trúc có thể gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptid, thường có dạng chùm với hàng ngàn nguyên tử, vì thế rất khó chỉ ra một cấu trúc hoặc đặc tính chức năng rõ ràng [2].

- Thuốc protein có nhiều tiềm ẩn về sự không đồng nhất hơn [1], ngay cả khi chúng được sản xuất bởi cùng một quá trình công nghệ thì trong một đơn vị liều của chúng vẫn có thể chứa hàng chục, hoặc hàng nghìn phiên bản khác nhau của cùng một phân tử [3]. Sự bất định đó do chính sự phức tạp và đa dạng của quá trình sinh tổng hợp protein trong giai đoạn dịch mã (post-translational modifications; ví dụ: glycosyl hóa không hoàn chỉnh hoặc bất thường; sự kết hợp sai acid amin phát sinh từ quá trình khử amid hoặc oxy hóa chuỗi bên acid amin; liên kết disulfid không chính xác hoặc bị thiếu,...).

- Trên thực tế, không thể có quy trình sản xuất chung nào có thể tạo ra các protein thực sự đồng nhất. Trước đây, mục tiêu chính của những nỗ lực phát triển quy trình sản xuất là cho độ lặp lại cao, trong đó chú trọng việc xác nhận và mô tả quy trình một cách chi tiết để được chấp thuận cấp phép theo quy định [4]. Gần đây, đặc biệt trong các trường hợp phát triển và đăng ký thuốc tương tự sinh học, các phương pháp phân tích hiện đại được sử dụng nhiều hơn, để mô tả đầy đủ hơn các cấu hình biến thể, hướng tới đánh giá chính xác hơn các đặc tính của sản phẩm [5].

- Nghiên cứu và phát triển thuốc protein, về cơ bản cũng giống quá trình nghiên cứu phát

minh thuốc mới nói chung. Nhưng do có một số đặc điểm khác nên việc cấp phép sản xuất thuốc protein cũng có một số điểm riêng như: các yêu cầu chặt chẽ hơn về quy trình sản xuất và các đặc tính của sản phẩm, các dữ liệu tiền lâm sàng, lâm sàng cũng như việc ghi nhãn hướng dẫn sử dụng. Quá trình nghiên cứu phát triển thuốc generic sau giai đoạn hết bản quyền với thuốc phát minh cũng có những điểm khác. Với các thuốc hữu cơ phân tử nhỏ có thể cần nghiên cứu chứng minh tương đương sinh học với thuốc phát minh. Khi tương đương sinh học thì thuốc generic đó có thể được cấp phép sản xuất và sử dụng thay thế cho thuốc phát minh. Trong khi đó, với thuốc protein (thường là các hỗn hợp phức tạp của các biến thể), gần như không thể sao chép chính xác bằng cách sử dụng một quy trình mới (hoặc thậm chí cùng một quy trình trong một nhà máy khác), do đó các thuốc protein generic được gọi là “thuốc tương tự sinh học- biosimilars” và không được coi là bản sao hoàn hảo của thuốc phát minh [6]. Và vì vậy, thuốc tương tự sinh học phải được kê đơn; không được coi là có thể sử dụng hoán đổi với thuốc phát minh.

2. Sản xuất thuốc protein

Thuốc protein được sản xuất bằng các kỹ thuật khác nhau, trong đó các kỹ thuật của công nghệ sinh học đóng vai trò quan trọng, thường qua hai giai đoạn chính:

- Giai đoạn sinh tổng hợp dược chất protein (quá trình sinh học ngược dòng/khởi đầu/thượng nguồn - upstream bioprocessing) bao gồm các công đoạn như: i) Lựa chọn và phát triển dòng tế bào có khả năng sinh tổng hợp protein mong muốn (thường ứng dụng các tiến bộ mới của công nghệ sinh học trong đó có tái tổ hợp); ii) Phát triển môi trường tối ưu và nuôi cấy tế bào; và iii) Thu hoạch.

- Giai đoạn phát triển thành phẩm thuốc sinh học (quá trình sinh học xuôi dòng/thu nhận/thu hồi - downstream bioprocessing) bao gồm các công đoạn như: i) Phân lập, tinh chế; và ii) Bào chế thuốc thành phẩm.

2.1. Giai đoạn sinh tổng hợp dược chất protein (upstream bioprocessing)

Điểm khởi đầu của mỗi quy trình sản xuất thuốc sinh học được quyết định chủ yếu bởi loại protein cần có và các đặc tính sinh học của nó, từ đó phát triển các dòng tế bào phù hợp để sản xuất và các quá trình phù hợp để thu hoạch. Các protein phức tạp, cần nhiều biến đổi sau dịch mã, thường sử dụng các dòng tế bào động vật có vú (các tế bào nấm men đôi khi cũng được sử dụng), trong khi các protein đơn giản hơn, ít hoặc không cần biến đổi sau dịch mã, thường lựa chọn *E. coli* để sản xuất (ví dụ reteplase, insulin lispro/ glargine, somatropin,...).

Khi đã phát triển thành công dòng tế bào thích hợp, tiếp theo trong giai đoạn này cần lựa chọn được môi trường nuôi cấy tối ưu cho quá trình phát triển và sinh tổng hợp của tế bào đó trong hệ thống nuôi cấy (chủ yếu quá trình lên men vi sinh vật (tế bào vi khuẩn hoặc nấm men) hoặc nuôi cấy tế bào (các dòng tế bào của người hoặc động vật có vú khác)).

Điều quan trọng là bất kỳ dòng tế bào nào được sử dụng để sản xuất thuốc sinh học đều phải được coi là an toàn (“generally regarded as safe - GRAS”) theo hướng dẫn của FDA, quy định này đặt ra một số giới hạn đối với các loại tế bào được chấp thuận sử dụng.

2.1.1. Lựa chọn và phát triển các dòng tế bào sản xuất (sử dụng sinh tổng hợp protein)

Yếu tố chính trong việc quyết định lựa chọn loại tế bào để sinh tổng hợp dược chất protein là có cần tạo các dẫn chất sau dịch mã để có hoạt tính sinh học và đặc tính dược động học (PK) tốt hơn hay không? Những dẫn chất đó thường là glycosyl hóa, phosphoryl hóa và methyl hóa các nhóm xác định. Việc này thường đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng sinh học và/hoặc PK của protein thu được [7]. Khi cấu trúc protein cần có đã được xác định, các dòng tế bào có khả năng sinh tổng hợp cấu trúc đó sẽ được phát triển nhờ ứng dụng các phương pháp của công nghệ sinh học, như tái tổ hợp DNA. Tế bào đã được phát triển, có biểu hiện protein tối ưu, sẽ được nhân lên và lưu trữ trong ngân hàng gốc tế bào (master

cell bank - MCB). Các tế bào trong ngân hàng gốc sẽ được sử dụng để nhân lên làm dòng tế bào sản xuất (working cell bank – WCB). Mỗi dòng tế bào cần sử dụng các kỹ thuật khác nhau, với tế bào vi khuẩn, quá trình này khá đơn giản, nhưng với tế bào nấm men và động vật có vú thường phức tạp hơn.

Quy trình nuôi cấy và sinh tổng hợp protein tái tổ hợp ở các dòng tế bào đó có các đặc điểm riêng.

i) Các dòng tế bào động vật có vú: có khả năng kích hoạt quá trình vận chuyển tế bào và tạo ra các biến đổi với protein sau dịch mã giống ở người, do đó có thể tạo ra các cấu trúc giống với protein của người [8]. Cho đến nay, nuôi cấy tế bào động vật có vú được sử dụng phổ biến nhất trong ngành công nghiệp thuốc protein, do có nhiều thuận lợi khi dùng các dòng tế bào đó để sản xuất kháng thể đơn dòng (mAbs). Đặc biệt, các tế bào động vật có vú có khả năng cung cấp quá trình glycosyl hóa giống người và có thể tạo các protein phức tạp, có cấu trúc không gian và trình tự acid amin tương tự. Ngoài ra các tế bào động vật có vú còn có đặc điểm là tiết hoàn toàn protein tổng hợp được vào môi trường nuôi cấy. Điều này giúp thuận lợi hơn nhiều cho quá trình phân lập sau đó, do không cần phá vỡ tế bào;

Nuôi cấy tế bào động vật có vú cũng có khó khăn, đó là nhu cầu dinh dưỡng phức tạp, có thể bao gồm nhiều yếu tố tăng trưởng, hormon và các chất chuyển hóa đặc hiệu. Các yếu tố này thường được tìm thấy trong máu và các mô sống của các tế bào đó [9]. Các dòng gốc tế bào động vật có vú cũng chỉ có thể phát triển khi được gắn vào các bề mặt rắn (nuôi cấy bề mặt), vì thế hiệu suất không cao so với nuôi cấy toàn khối. Ngoài ra, quá trình nuôi cấy dòng tế bào đó cũng cần các chất phụ gia môi trường phức tạp, như huyết thanh bào thai bò và các sản phẩm máu khác để duy trì quá trình hiệu quả và cũng cần sử dụng hệ thống nuôi cấy tế bào có diện tích bề mặt lớn hơn (cần để tế bào gắn vào). Chính vì một số khó khăn đó, nên các dòng tế bào động vật có vú thường là phương án lựa chọn thứ hai khi mà các protein cần có không thể sinh tổng hợp tốt ở *E. coli* hoặc nấm men;

Gần đây, đã có những cải tiến đáng kể trong nuôi cấy tế bào động vật có vú dựa trên một số dòng tế bào khác nhau (nhưng chủ yếu là tế bào CHO – dòng tế bào buồng trứng của chuột hamster Trung Quốc - Chinese hamster ovary). Các dòng tế bào CHO còn có khả năng phát triển trong nuôi cấy toàn khối, hiệu suất cao hơn so với nuôi cấy bề mặt. Đây là một lợi thế lớn vì có thể sử dụng hệ thống nuôi cấy có khuấy trộn, thể tích lớn và có thể sử dụng môi trường không cần huyết thanh. Khả năng sử dụng môi trường không chứa huyết thanh rất quan trọng, vì các nhà khoa học lo ngại huyết thanh lấy từ động vật có thể mang mầm bệnh. Các dòng tế bào động vật có vú khác thường được sử dụng bao gồm HEK 293 (tế bào thận phôi người), BHK (tế bào thận chuột hamster), NS0 và SP2/0 (tế bào u tủy chuột không tiết) và một vài dòng tế bào chuyên biệt khác [10];

Mặc dù có những cải tiến đáng kể trong nuôi cấy tế bào động vật có vú trong những năm gần đây, nhưng vẫn còn một số thách thức do các dòng tế bào đó phát triển chậm, với thời gian nhân đôi trên 14 giờ đối với hầu hết các dòng, dẫn đến thời gian nuôi cấy kéo dài từ hàng tuần đến hàng tháng tùy thuộc vào qui mô. Các tế bào của động vật có vú cũng rất dễ bị phá hủy, môi trường tăng trưởng phức tạp và đắt tiền để có hiệu suất tối ưu [9];

ii) *Tế bào vi sinh vật*: các tế bào vi khuẩn thiếu nhân, mạng lưới nội chất và bộ máy Golgi (thể lưới), dẫn đến các polypeptid sản xuất được khá đơn giản với ít hoặc không có các biến đổi sau dịch mã. Nếu cần các dẫn chất protein khác nhau, cần phải thực hiện các quá trình xử lý tiếp theo sau khi thu hoạch [11]. Các tế bào nấm men là loại nhân chuẩn nên có thể thực hiện một số biến đổi sau dịch mã, nhưng các protein thu được thường có sự khác biệt nhiều so với các mẫu protein người [12]. Do các tế bào vi sinh vật phát triển độc lập với nhau trong tự nhiên nên chúng đã tiến hóa để sử dụng nhiều loại dưỡng chất đơn giản và phân chia nhanh chóng trong các điều kiện tối ưu. Tế bào vi khuẩn sử dụng trong sản xuất thuốc sinh học thường là chủng *E. coli*, các tế bào nấm men nhân chuẩn như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Pichia pastoris*;

Các tế bào *E. coli* có thời gian nhân đôi ngắn, 20 phút, sinh tổng hợp protein nhanh và các yêu cầu về môi trường không quá phức tạp và tốn kém, rất thuận lợi trong việc sản xuất các protein tái tổ hợp đơn giản. Không giống như hầu hết các dòng tế bào khác, các tế bào *E. coli* giữ các protein đã được tổng hợp trong tế bào chất mà không tiết ra môi trường ngoài. Điều này cho phép thu các tế bào và bảo quản đông lạnh trước khi thu hoạch ở bước tiếp theo. Khả năng này mang lại sự linh hoạt hơn trong thiết kế quy trình và thời gian xử lý (mặc dù điều này có thể làm khó khăn hơn cho giai đoạn thu hoạch protein). Một thuận lợi nữa khi sử dụng *E. coli* là chúng đã được nghiên cứu trong các phòng thí nghiệm trên khắp thế giới trong nhiều thập kỷ, nên có sẵn nhiều kỹ thuật có thể tối ưu hoá các protein biểu hiện. Chúng được sử dụng phổ biến nhất để sản xuất thuốc protein là chủng BL21 do chúng không có khả năng gây bệnh;

Tuy nhiên dòng tế bào *E. coli* cũng có nhược điểm là không có khả năng thực hiện các biến đổi sau dịch mã trên các protein đã được tổng hợp. Do đó, nếu một protein cần được tạo dẫn chất (như glycosyl hóa) để có hoạt tính sinh học, tính ổn định hoặc đặc tính PK/dược lực học (PD) mong muốn, thì không thể sử dụng các dòng tế bào đó. Hơn nữa, nhiều protein hoạt tính có chứa các liên kết disulfid, khi được biểu hiện ở *E. coli* không hình thành cấu trúc không gian đúng cách do môi trường khử bên trong tế bào [13]. Một vấn đề khác là dòng tế bào *E. coli* tạo ra nội độc tố lipopolysaccharid, các chất gây sốt này phải được loại bỏ triệt để trong quá trình lọc để tạo ra sản phẩm an toàn, đây là một khó khăn không nhỏ. Vì những lý do trên, các tế bào *E. coli* thường được sử dụng để tạo ra các protein như: cytokin, interferon, hormon và các protein chuỗi đơn đơn giản. Hầu hết các sản phẩm này có cấu trúc tương đối nhỏ và chứa một hoặc hai liên kết disulfua, cho phép chúng được tái cấu trúc không gian lại một cách dễ dàng trong trường hợp cần thiết;

Nấm men *Saccharomyces* và *Pichia* có thời gian nhân đôi tương đối ngắn (90 phút) và khả năng phát triển tốt trong môi trường chi phí thấp. Hơn nữa, nấm men được sử dụng trong sản xuất

bánh mì, bia và rượu trong nhiều thế kỷ và đã chứng tỏ được tính an toàn. Đặc điểm di truyền, các quá trình trao đổi chất của chúng cũng đã được hiểu rõ. Trái ngược với dòng tế bào *E. coli*, các tế bào nấm men có thể tiết các protein vào môi trường nuôi cấy, hoặc giữ chúng trong tế bào chất và có thể phát triển đến mật độ tế bào đặc biệt cao do có khả năng tăng trưởng kỵ khí. Các tế bào nấm men cũng có bộ máy sinh tổng hợp protein phức tạp hơn so với *E. coli* và do đó có thể tạo các protein có cấu trúc không gian ổn định hơn và có thể tạo nhiều biến thể sau dịch mã, bao gồm cả quá trình glycosyl hóa. Những đặc điểm này làm cho các tế bào nấm men trở thành các dòng tế bào được lựa chọn nhiều trong giai đoạn đầu sản xuất thuốc protein. Chúng là một trong những dòng tế bào đầu tiên được sử dụng để sản xuất insulin người tái tổ hợp và nhiều sản phẩm khác;

Nhược điểm của tế bào nấm men là mặc dù có khả năng glycosyl hóa protein sau dịch mã, nhưng cũng tạo dẫn chất glycoforms không giống với protein người. Những khác biệt này có thể dẫn đến những thay đổi về hoạt tính và sinh khả dụng, và nhiều trường hợp còn dẫn đến phản ứng miễn dịch,... làm cho hạn chế đáng kể các ứng dụng. Hiện nay nấm men được sử dụng chủ yếu để sản xuất insulin người tái tổ hợp, albumin huyết thanh người, trypsin và vaccin viêm gan B [14].

2.1.2. Phát triển môi trường tối ưu và nuôi cấy tế bào

Quá trình nuôi cấy tế bào vi sinh vật và tế bào động vật có vú đều có những điểm tương đồng, đều dựa vào một số dạng môi trường tăng trưởng được tối ưu hóa và diễn ra trong các hệ thống lên men/nuôi cấy có khuấy trộn, được kiểm soát về điều kiện môi trường, nhiệt độ, độ pH, oxy hòa tan, nồng độ CO₂ và mức độ sinh bọt. Các quy trình thường thiết kế theo lô, môi trường nuôi cấy mới được thêm vào hệ thống nuôi cấy trong suốt quá trình sản xuất (fed-batch). Cách này cho phép kiểm soát tốt hơn quá trình phát triển tế bào và sinh tổng hợp protein [9].

Một kiểu quy trình khác là thực hiện nuôi cấy trong thể tích nhỏ, không khuấy trộn. Trong quá trình này, một mặt môi trường mới được thêm

vào liên tục trong khi môi trường cũ được lấy ra. Phương pháp này cho hiệu quả cao do mật độ tế bào khá cao, dẫn đến tăng năng suất. Tuy nhiên, các yêu cầu kỹ thuật của quá trình cấp môi trường liên tục có những thách thức nhất định, vì các tế bào phải được giữ lại hoặc đưa trở lại buồng nuôi cấy trong khi vẫn duy trì khả năng sống cao và tránh tạp nhiễm [15].

Mỗi quy trình lên men/nuôi cấy tế bào đều sử dụng một lọ tế bào đông lạnh được lưu trữ trong ngân hàng tế bào sản xuất (working cell bank- WCB). Bản thân WCB được tạo ra bằng cách sử dụng một lọ tế bào từ MCB, đã được kiểm tra và xác nhận cẩn thận về độ tinh khiết và ổn định. Các tế bào ban đầu được nuôi cấy trong một thể tích nhỏ môi trường tăng trưởng trong một bình nuôi cấy nhỏ, sau đó được cấy chuyển sang nuôi cấy trong các thể tích ngày càng lớn trước khi được đưa vào ngân hàng tế bào sản xuất.

Trong trường hợp lên men vi sinh vật, mục tiêu là tăng trưởng tế bào nhanh chóng đến mật độ tối đa trước khi gây ra biểu hiện protein từ plasmid. Sự sinh tổng hợp protein được khởi mào nhờ sử dụng một chất khởi động cảm ứng mạnh, quá trình sản xuất protein sẽ diễn ra rất nhanh sau đó. Sự sinh tổng hợp protein tái tổ hợp ở mức độ cao có thể gây độc cho tế bào, do đó cần phát triển tế bào tới mật độ cao trước khi kích hoạt biểu hiện protein trong vài giờ cuối của quy trình. Ngược lại, trong trường hợp tế bào động vật có vú, tổng hợp protein thường là liên tục, nghĩa là nó gần như không đổi trong mỗi tế bào trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển. Trong những trường hợp này, mục tiêu đơn giản là duy trì khả năng sống của tế bào cao để đạt được mật độ tế bào cao nhất ở giai đoạn cuối. Để đạt được những mục tiêu này, các chất chuyển hóa được đánh giá kỹ lưỡng trong giai đoạn phát triển quy trình, trong đó môi trường tăng trưởng, lịch trình bổ sung chất dinh dưỡng và các chất phụ gia khác, được thiết kế cẩn thận để ngăn chặn sự hình thành các chất chuyển hóa độc hại. Dựa trên những thiết kế này, quy trình nuôi cấy vi sinh vật thường hoàn thành trong vài ngày, trong khi quy trình sản xuất bằng tế bào động vật có vú thường mất 3 tuần hoặc lâu hơn. Với quy trình trong đó môi trường được bổ sung liên tục

và các tế bào gần như ở trạng thái ổn định, có thể được thực hiện trong nhiều tháng hoặc lâu hơn miễn là không bị tạp nhiễm [16].

2.1.3. Thu hoạch

Khi sinh tổng hợp protein hoàn thành (trường hợp tế bào vi sinh vật) hoặc khi khả năng sống của tế bào bắt đầu suy giảm đáng kể (trường hợp tế bào động vật có vú) thì sẽ kết thúc giai đoạn sản xuất dược chất protein. Tại thời điểm này, bắt đầu thực hiện các hoạt động thu hoạch. Giai đoạn thu hoạch nhằm mục tiêu tách protein sinh tổng hợp được từ hệ thống nuôi cấy và chuẩn bị cho quá trình tinh chế tiếp theo. Có sự khác biệt quan trọng khi sử dụng tế bào động vật có vú hoặc tế bào vi sinh vật trong bước thu hoạch.

- Khi sử dụng các dòng tế bào động vật có vú, do protein được tiết ra môi trường nuôi cấy, do đó được thu hoạch bằng cách ly tâm liên tục để loại bỏ các tế bào không bị phá vỡ, tiếp sau đó lọc thô và lọc tinh để loại bỏ các tiểu phân.

- Trong trường hợp sử dụng tế bào vi sinh vật, và đặc biệt là *E. coli*, protein sinh tổng hợp vẫn nằm bên trong tế bào, vì vậy cần diệt các tế bào (thường thực hiện bằng cách thêm benzyl alcohol) và tách chúng ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách lọc và ly tâm. Các tế bào sau đó được rửa sạch môi trường nuôi cấy và alcohol bằng nước hoặc dung dịch đệm. Các tế bào sau khi rửa được đóng gói và bảo quản ở -80 °C cho công đoạn tiếp theo.

Quy trình sản xuất cần được kiểm soát và đảm bảo chất lượng đồng bộ. Các mẫu nguyên liệu đầu vào, các thông số của quá trình cần được lưu; việc lấy mẫu trong quá trình và sản phẩm cuối cùng cần được phân tích, các dữ liệu đó giúp hình thành bộ hồ sơ đảm bảo chất lượng.

2.2. Giai đoạn phát triển thành phẩm thuốc protein (downstream bioprocessing)

Giai đoạn này gồm các công đoạn như: phân lập, tinh chế và bào chế thuốc thành phẩm.

2.2.1. Phân lập, tinh chế dược chất protein

Để sử dụng làm nguyên liệu sản xuất thuốc, protein thô đã thu hoạch ở giai đoạn trên cần được tinh chế để loại bỏ các tạp chất. Thường có

hai nhóm tạp chất cần được loại bỏ gồm: các tạp liên quan đến quy trình sản xuất và các tạp chất liên quan đến sản phẩm hoặc tạp nhiễm.

- *Tạp chất liên quan đến quy trình sản xuất:* là các loại tạp đồng hành tự nhiên của quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp như các chất do dòng tế bào bài tiết ra và các thành phần của môi trường nuôi cấy. Một trong những tạp chất phổ biến nhất liên quan đến quy trình sản xuất là DNA của dòng tế bào. Mặc dù bản thân DNA thường trở về khả năng sinh miễn dịch, nhưng tạp DNA có thể được truyền vào các tế bào của người bệnh và có khả năng trở thành chất gây ung thư. Một tạp chất phổ biến khác là các protein cấu thành của dòng tế bào đó, do chính các tế bào tạo ra trong quá trình phát triển, thường được gọi là HCP (host cell protein - protein tế bào chủ) hoặc CHOP (protein trong các quá trình CHO). Những protein tạp này có thể gây ra phản ứng miễn dịch, gây ra dị ứng hoặc các phản ứng nghiêm trọng hơn theo thời gian. Một vấn đề đáng lo ngại hơn là chính các tạp HCP cũng có thể có các tác dụng sinh học riêng, dẫn đến các tác dụng phụ không lường trước được hoặc có khả năng tạo ra một epitope phản ứng chéo với dược chất protein, dẫn đến phản ứng tự miễn dịch chống lại dược chất protein. Các tạp chất khác liên quan đến quy trình bao gồm mảnh vụn tế bào, nội độc tố (trong trường hợp lên men *E. coli*) và các thành phần môi trường tăng trưởng, thường được loại bỏ cùng với DNA của tế bào chủ và tạp HCP trong quá trình tinh chế [17].

Các tạp chất liên quan đến protein sinh tổng hợp gồm các biến thể của chính protein đó như các biến đổi về điện tích bề mặt, sự kết tụ hoặc do quá trình glycosyl hóa không hoàn toàn, những tạp này có xu hướng khó tách hơn. Ngoài ra còn có các tạp chất do liên kết disulfid nội phân tử không chính xác hoặc tương tác sơ nước giữa các protein được cuộn một phần [18]. Các tạp chất biến đổi điện tích bề mặt thường phát sinh từ quá trình biến đổi hóa học tự phát của một số chuỗi bên acid amin và các phân tử đơn lẻ có quá trình glycosyl hóa không hoàn toàn hoặc không chính xác. Những thay đổi này có thể ảnh hưởng đến tác dụng, khả năng sinh miễn dịch

hoặc thời gian bán hủy trong máu. Có một thực tế là những tạp chất thường rất giống nhau về mặt hóa học và rất khó tách trong quá trình sản xuất quy mô lớn. Vì vậy, loại và lượng tạp chất liên quan đến dược chất protein trong một loại thuốc, cần được phát hiện bằng các phương pháp phân tích có độ phân giải cao, thông qua việc xác định các chỉ dấu đặc hiệu. Các phương pháp phân tích này hiện được sử dụng phổ biến để phát triển các thuốc tương tự sinh học của các thuốc protein phát minh.

- *Tạp nhiễm*: là các tạp chất có thể vô tình được đưa vào sản phẩm, bao gồm các tế bào vi khuẩn, bào tử hoặc hạt virus ngẫu nhiên nếu thiết bị lên men hoặc các thành phần môi trường không được tiệt khuẩn đúng cách hoặc hệ thống nuôi cấy không được bảo vệ chống tái nhiễm khuẩn tốt. Ngoài ra còn có các tạp chất từ bao bì hoặc bất kỳ tạp chất nào khác có nguồn gốc trong các nguyên liệu không tinh khiết.

i) Bước tinh chế đầu tiên

Các protein sau thu hoạch được tinh chế bước đầu tiên để loại bỏ phần lớn tạp thường sử dụng các phương pháp sắc ký đã được tối ưu hóa. Cột sắc ký được lựa chọn để có ái lực liên kết cao với dược chất protein, đồng thời ái lực liên kết thấp với hầu hết các tạp chất. Sau khi hoàn thành bước tinh chế đầu tiên nguyên liệu sẽ được chuyển sang quá trình tinh chế tiếp theo;

Trong trường hợp dược chất protein dung hợp như mAbs, bước tinh chế đầu tiên thường dùng nhựa ái lực Protein A (dựa vào Protein A của tụ cầu khuẩn được gắn kết đồng hóa trị để liên kết chọn lọc với miền Fc của kháng thể). Sau khi dược chất protein được gắn vào cột, hầu hết các tạp chất được rửa giải ở pH thấp (thường là 2-4), thu được sản phẩm có độ tinh khiết cao (thường là trên 95%). Sau khi hoàn thành bước tinh chế đầu tiên, mAbs có thể cần được tinh chế tiếp qua một loạt các bước sắc ký khác nhau tương tự như các protein khác;

Đối với các protein không phải là mAbs, bước tinh chế đầu tiên bao gồm các quá trình sắc ký được thiết kế tối ưu cho từng dược chất protein cụ thể. Quá trình này sử dụng các cột sắc ký lớn với một trong các loại nhựa như: nhựa

trao đổi ion, nhựa sắc ký tương tác sơ nước, nhựa hydroxyapatit, nhựa ái lực đặc hiệu,... Mặc dù các nguyên tắc cơ bản là giống nhau giữa sắc ký quy mô lớn và phòng thí nghiệm, nhưng cũng có một số điểm khác biệt quan trọng. Trong khi sắc ký phòng thí nghiệm thường dựa vào cách rửa giải đẳng tốc hoặc gradient để tách protein thành các phân đoạn, thì việc sản xuất quy mô lớn thường không sử dụng gradient và sản phẩm thường được thu thập trong một phân đoạn duy nhất, được xác định bởi các điều kiện đệm được tối ưu hóa cho từng protein. Một sự khác biệt quan trọng khác là để mở rộng qui mô (scale – up) còn liên quan tới kích thước các cột, cột công nghiệp có thể có đường kính lên tới 2 mét và sâu 0,5 mét. Các cột này yêu cầu thiết bị đặc biệt để nhồi và vận hành, không có độ phân giải cao như các cột phân tích thông thường. Vì thế, hoạt động của các cột này phụ thuộc nhiều hơn vào các điều kiện rửa giải [19];

ii) Tinh chế hoàn chỉnh

Trong mọi trường hợp, quy trình tinh chế hoàn chỉnh sẽ được thiết kế để thu được sản phẩm đạt tiêu chuẩn được dụng, có độ tinh khiết cao hơn 99%. Trên thực tế, quá trình này sử dụng các loại cột hấp phụ và các điều kiện sắc ký riêng cho mỗi loại protein và là những bí quyết của các công ty sản xuất. Những bí quyết này, mặc dù cần phải mô tả chi tiết cho cơ quan quản lý và cấp phép, nhưng không được công khai và chỉ một số thông số chính được công bố;

Áp dụng các phương pháp bất hoạt và loại bỏ virus là bắt buộc đối với bất kỳ loại thuốc protein nào, đặc biệt được sản xuất từ dòng tế bào của người hoặc động vật có vú khác hoặc có các thành phần có nguồn gốc từ động vật trong nguyên liệu sản xuất. Với các quy trình sản xuất mAbs, việc diệt virus liên quan tới quá trình rửa giải khỏi cột thu giữ Protein A, tinh chế sắc ký và lọc [20]. Điều quan trọng là các quy trình bất hoạt và loại virus được kiểm soát liên tục trong quá trình sản xuất và theo các nguyên tắc tương tự như kiểm soát quá trình tiệt khuẩn. Trên thực tế, không có quy trình nào có thể khẳng định thu được sản phẩm hoàn toàn không có virus (vì điều này không thể chứng minh mà không phá hủy sản phẩm), nhưng xác suất tìm thấy virus trong

một lọ sản phẩm sẽ rất nhỏ khi qua nhiều bước tinh chế loại bỏ;

Trong hầu hết các quy trình, các hệ thống lọc đều được sử dụng để làm trong, cô đặc và loại vi khuẩn cho các dung dịch protein và các loại môi trường đệm. Thường dùng màng lọc thô với lỗ xốp khoảng 10 μm để loại các tế bào lớn, các mảnh vụn tế bào. Màng lọc có kích thước lỗ xốp 0,1-10 μm để loại các tế bào nhỏ (màng lọc 0,2 μm dùng để loại khuẩn). Màng siêu lọc có kích thước lỗ xốp 10-100 nm có thể giữ lại các protein lớn, trong khi màng lọc nano kích thước lỗ xốp 1-10 nm có thể giữ lại protein và các tế bào, vì thế có thể dùng để đổi hệ đệm hoặc các thành phần để bào chế thuốc, thường được gọi là siêu lọc/thẩm tách (ultrafiltration/diafiltration-UF/DF) [21].

2.2.2. Bào chế thành phẩm thuốc protein

i) Xây dựng công thức bào chế

Thuốc protein thường được bào chế dưới dạng thuốc tiêm cho các đường dùng như: tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Ngoài ra còn có thể dùng qua một số đường dùng khác như mắt, mũi. Nhóm thuốc này rất khó được sử dụng qua đường tiêu hoá do không ổn định dưới tác động của môi trường, quá trình vận chuyển phức tạp và rất khó hấp thu do khối lượng phân tử lớn. Do đó, việc xây dựng công thức thuốc phải phù hợp với đường dùng, có nồng độ/hàm lượng thích hợp và đảm bảo độ ổn định về tác dụng của protein. Các thành phần công thức của thuốc protein có thể gồm các chất điều chỉnh pH, độ thẩm thấu, độ dẫn điện; đệm và các tá dược khác như chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa phù hợp. Xây dựng các công thức bào chế loại thuốc này gặp nhiều khó khăn do protein rất nhạy cảm với nhiệt, pH, dung môi hữu cơ, tác động khuấy trộn, ứng suất cắt. Hơn nữa, nồng độ protein cao có thể dẫn đến sự kết tụ theo thời gian, điều này phải được kiểm soát và thử nghiệm kỹ lưỡng trong quá trình nghiên cứu phát triển. Một điểm đặc biệt khác của thuốc protein là độ nhớt cao và sự thay đổi độ nhớt của thuốc có thể ảnh hưởng đến khả năng tiêm, thời gian tiêm, ảnh hưởng đến khả năng hấp thu, và mức độ đau của bệnh nhân;

Các khía cạnh cần được phân tích đánh giá trong quá trình nghiên cứu phát triển thành phẩm gồm: các phản ứng phân hủy, oxy hóa, khử amin, kết tụ và mất hoạt tính, đặc biệt là với dạng lỏng. Để hạn chế những vấn đề đó, một số sản phẩm thuốc được bào chế ở dạng đông khô hoặc tạo cốt với polyme sơ nước như acid polylactic-co-glycolic [22]. Ngoài ra, các tá dược đóng một vai trò quan trọng để ổn định thuốc protein. Một số tá dược thường được sử dụng như sau (Bảng 1):

- Acid amin: thường được bổ sung dưới dạng tự do với vai trò tăng độ tan (alanin), tăng độ ổn định protein (arginin, glycin, L-methionin, L-prolin, L-histidin), giảm quá trình isome hoá (acid aspartic), tăng ổn định nhiệt (acid glutamic), giảm kết tụ (leucin, L-prolin), chống oxy hoá (L-methionin);

- Các chất chống oxy hoá, tăng độ ổn định cấu trúc protein: acid ascorbic, cystein hydroclorid, glutathion, methionin, natri edetat, thioglycerin, acid thioglycolic, thiosorbitol;

- Chất bảo quản, chống vi sinh vật: Benzyl alcohol, metacresol, phenol, 2-phenoxyethanol;

- Tá dược đệm: ổn định pH, đẳng trương như hệ đệm acetat, phosphat, succinat, glutamat, aspartat; acid citric; glycin; L-histidin hydroclorid; natri phosphat,...

- Đường: sử dụng như chất tạo khung trong quá trình đông khô, giảm kết tụ, tăng độ ổn định, ví dụ: manitol, sorbitol, sucrose, trehalose,...

- Chất diện hoạt: tăng khả năng phân tán, chống kết tụ: polysorbat 20, 80;

- Một số tá dược khác: các ion kim loại (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2}) để ổn định protein; propylen glycol để ngăn sự kết tụ; PEG để tăng độ hoà tan; poloxamer để giảm sự biến tính và ổn định độ nhớt [23];

ii) Pha chế, đóng lọ, đóng gói, hoàn chỉnh sản phẩm

Giai đoạn tiếp theo của quy trình sản xuất bao gồm bước lọc dung dịch protein và dung dịch đệm, bổ sung tá dược, kiểm soát các thông số và lọc vô khuẩn dung dịch thuốc. Có thể áp dụng qui trình đông khô để tăng độ ổn định cho sản phẩm;

Bảng 1. Thành phần, dạng bào chế của một số thuốc protein

Tên thuốc	Hoạt chất	KLPT (kDa)	Tá dược	pH	Dạng bào chế	Loại thuốc	Công ty SX
Aimovig	Erenumab-aooe (70 mg, 140/ ml)	150	Đệm acetat; polysorbat 80; sucrose, nước để pha tiêm.	5,2	Dung dịch tiêm dưới da đóng sẵn trong bơm tiêm/bút tiêm	Kháng thể đơn dòng (mAb)	Amgen/ Novartis
Ajovy	Fremanezumab-vfrm (225 mg/1,5 ml)	148	Dinatri EDTA, L-Histidin, L-histidin mono hydrochlorid, polysorbat 80, sucrose, nước để pha tiêm.	5,5	Dung dịch tiêm dưới da đóng sẵn trong bút tiêm	mAb	Teva Pharmaceuticals USA, Inc.
Altuviiiio	250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000 IU/lọ	312	Arginin hydroclorid, calci clorid dihydrat, histidin, polysorbat 80 sucrose.		Thuốc bột (đông khô) pha dung dịch tiêm tĩnh mạch	Protein tái tổ hợp	Bioerativ Therapeutics Inc.
Elzonris	Tagraxofusp-erzs (1000 µg/ml)	58	Natri clorid, sorbitol, tromethamin, nước để pha tiêm.	7,5	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền tĩnh mạch	Protein tái tổ hợp	Stemline Therapeutics, Inc.
Emgality	Galcanezumab-gnlm (120 mg/mL; 100 mg/ml)	147	L-Histidin, L-histidin mono hydrochlorid, polysorbat 80, natri clorid, nước để pha tiêm.	5,3-6,3	Dung dịch tiêm dưới da đóng sẵn trong bơm tiêm/ bút tiêm	mAb	Eli Lilly
Keytruda	Pembrolizumab 25 mg/ml (lọ 4 ml)	149	L-Histidin, L-histidin mono hydrochlorid, sucrose, polysorbat 80, nước để pha tiêm.	5,2-5,8	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền tĩnh mạch	mAb	AstraZeneca Pharmaceuticals LP
Libtayo	Cemiplimab-rwlc (50 mg/ml)	146	L-Histidin, L-histidin mono hydrochlorid, sucrose, polysorbat 80, nước để pha tiêm.	6	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền tĩnh mạch	mAb	Regeneron Pharmaceuticals, Inc. and Sanofi-Aventis U.S. LLC
Lumoxiti	Moxetumomab pasudotox-tdf 1 mg/lọ (pha lại với nước để pha)	63	Glycin, polysorbat 80, natri phosphat monobasic monohydrat, sucrose, natri hydroxid.	7,4 (sau khi pha)	Thuốc bột (đông khô) pha dung dịch đậm đặc để	mAb	Astra Zeneca Pharmaceuticals LP and Astra

	tiêm để cho dung dịch 1 mg/ml trước khi pha loãng)		Túi dung môi pha loãng: 50 ml dung dịch natri clorid 0,9% và ống dung dịch ổn định 1 ml chứa citric acid monohydrate (0,7 mg), polysorbat 80 (6,5 mg), natri citrat dihydrat (6,4 mg), nước để pha tiêm (pH 6.0).		pha tiêm truyền tĩnh mạch		Zeneca AB
Lunsumio	Mosunetuzumab-axgb 1 mg/ml (lọ 1 ml; 30 ml)	146	Acid acetic, histidin, methionin, polysorbat 20, sucrose, nước để pha tiêm.	5,8	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền tĩnh mạch	Protein tái tổ hợp	Genentech, Inc., Roche Group
Oxervate	Cenegermin-bkbj (20 µg/ml)	13	Dinatri hydrogen phosphat anhydrous, HPMC, L-methionin, manitol, polyethylene glycol 6000, natri dihydrogen phosphat dihydrat, trehalose dihydrat, acid hydrochloric acid/natri hydroxid vđ 7,0-7,4, nước để pha tiêm vđ 1 ml. Độ thẩm thấu 280- 320 mOsm/kg.	7,0-7,4	Dung dịch nhỏ mắt	Dạng tái tổ hợp của yếu tố tăng trưởng thần kinh người	Dompe' Farmaceutici S.p. A.
Poteligeo	Mogamulizumab-kpkc (4 mg/ml)	149	Acid citric monohydrat, glycin, polysorbat 80, acid hydrochloric acid/natri hydroxid vđ 5,5, nước để pha tiêm.	5,5	Dung dịch đậm đặc để pha tiêm truyền tĩnh mạch	mAb	Kyowa Kirin, Inc.
Revcovi	Elapegamase-lvlr 2,4 mg/1,5 ml/lọ (1,6 mg/ml)	113	Natri clorid, natri phosphat dibasic heptahydrat, natri phosphat monobasic monohydrat, nước để pha tiêm.	6,9	Dung dịch tiêm bắp	Protein tái tổ hợp	Leadiant Biosciences, Inc.

[<https://www.accessdata.fda.gov>; <https://www.medicines.org.uk/emc/product>].

Dịch sản phẩm được khuấy trộn ở nhiệt độ, tốc độ, thể tích và hình dạng thùng pha chế phù hợp. Ngoài ra, dịch chứa sản phẩm còn trải qua các bước lọc vô khuẩn và/hoặc UF/DF, sau đó được đóng lọ (thể tích đóng được khuyến nghị nằm trong khoảng 30% dung tích của lọ) hoặc ống tiêm/dụng cụ tiêm đóng sẵn. Các thiết bị chiết rót và hoàn chỉnh thành phẩm được thiết kế sao cho đảm bảo dịch đồng nhất, đồng thời bảo vệ độ vô khuẩn và độ tinh khiết của sản phẩm. Để tránh khử amin và oxy hóa thành phẩm thuốc, cần thực hiện quá trình pha chế và đóng gói trong khí nitơ. Các bước phòng ngừa khác bao gồm hạn chế tiếp xúc với ánh sáng có thể gây phân hủy, đặc biệt cystein, tryptophan, tyrosin và phenylalanin, đồng thời loại bỏ mọi khả năng tạo bọt [24].

Điều quan trọng cần lưu ý là bao bì tiếp xúc trực tiếp với thuốc có thể tương tác với sản phẩm dẫn đến những thay đổi về hóa lý (giảm độ ổn định của thuốc, kết tụ protein do tương tác với nút silicon, kết tủa,...) [24]. Các vấn đề khác liên quan đến bao bì cấp 1 như độ ẩm còn sót lại, khả năng thấm ẩm đều ảnh hưởng đến chất lượng thuốc.

Các bước hoàn thiện bao gồm kiểm tra độ trong (với dung dịch), ghi nhãn, đóng gói và bảo quản sản phẩm. Cuối cùng, sau khi đã được rà soát toàn bộ các yếu tố đảm bảo chất lượng, thành phẩm thuốc đã sẵn sàng để được vận chuyển (trong điều kiện nhiệt độ được kiểm soát) đến kho và nơi cấp phát cho người bệnh.

3. Thuốc tương tự sinh học (Biosimilars)

Thuốc tương tự sinh học là bản sao hóa học của thuốc protein đã được phê duyệt mà “không có sự khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực” theo hướng dẫn của FDA. Do đó, khi phân tích so sánh giữa phân tử tương tự sinh học và phân tử phát minh (thường được gọi là “phân tử tham chiếu - reference molecule”) cần chỉ ra tính tương tự sinh học, tương đương về chất lượng, hiệu quả và độ an toàn. Phát triển thuốc tương tự sinh học có thể tiết kiệm chi phí do thời gian đưa ra thị trường ngắn hơn, các thử nghiệm lâm sàng được

rút gọn, nguy cơ sản phẩm bị lỗi thấp và cải tiến phương pháp phân tích và sản xuất [25]. Khi các thuốc phát minh hết bản quyền, các thuốc tương tự sinh học có cơ hội phát triển, làm phong phú thị trường thuốc. Ví dụ các thuốc như filgrastim, pegfilgrastim, infliximab, rituximab và adalimumab đã trở thành mục tiêu chính cho việc phát triển thuốc tương tự sinh học trong giai đoạn vừa qua.

Vấn đề thách thức với sản xuất thuốc tương tự sinh học là bản thân các quá trình sinh học luôn biến đổi, vì thế việc sử dụng chính quy trình sản xuất đã tạo ra thuốc phát minh cũng không thể tạo ra sản phẩm giống tuyệt đối [26]. Do đó không thể lặp lại quy trình sản xuất thuốc tham chiếu để sản xuất thuốc tương tự sinh học, vì vậy chỉ có thể dùng các thử nghiệm để so sánh chúng với phân tử tham chiếu bằng cách phân tích các đặc tính hóa lý và sinh học. Ví dụ, mAbs được phân tích các vùng biến đổi (khử amin, oxy hóa, pyroglutamate đầu N, glycosyl hóa); vùng không đổi (khử amin, oxy hóa, glycosyl hóa, acetyl hóa, ly giải đầu C, xáo trộn liên kết disulfid, phân mảnh, cắt); phân tích liên kết (ái lực của sản phẩm với mục tiêu, hoạt tính, phản ứng miễn dịch, liên kết chéo,...); phân tích chức năng; đánh giá PK/PD của sản phẩm trên động vật; và khả năng sinh miễn dịch/đánh giá tính kháng nguyên [25]. Theo hướng dẫn của Cơ quan Dược phẩm Châu Âu (EMA), các nghiên cứu tương đương PK/PD của thuốc tương tự sinh học với thuốc tham chiếu, có thể đủ để công bố tương đương lâm sàng. Chính vì thế, các cơ quan quản lý dược phẩm có qui trình phê duyệt riêng với thuốc tương tự sinh học và Tổ chức y tế thế giới (WHO) đã phát triển các tiêu chuẩn được chấp nhận trên toàn cầu để đảm bảo tính an toàn, hiệu quả và chất lượng của các loại thuốc tương tự sinh học vào năm 2009 [27]. FDA đã thiết lập quy trình cấp phép đối với thuốc tương tự sinh học năm 2010, cấp phép phê duyệt thuốc filgrastim vào năm 2015 (Zarxio, một thuốc tương tự sinh học với Neupogen của Amgen, đã được EMA phê duyệt ở Châu Âu vào năm 2009).

Sản xuất thuốc protein ngày càng phát triển, sẽ có nhiều sản phẩm thuốc tương tự sinh học và thuốc cải tiến sinh học (biobetters) (còn được gọi

là thuốc sinh học vượt trội - biosuperiors) được phát triển với công nghệ ngày càng tiến bộ. Trong 10 năm đầu tiên phát triển thuốc tương tự sinh học ở EU, 19 loại thuốc đã được EMA phê duyệt (gồm sáu loại: hormon tăng trưởng, follitropin, insulin, mAbs, filgrastims và epoetin). Chỉ riêng năm 2019, có tới 78 loại thuốc protein tương tự sinh học đã được FDA và EMA phê duyệt.

Sự phát triển các thuốc tương tự sinh học sẽ mang lại nhiều khả năng tiếp cận hơn với chỉ định điều trị của nhiều nhóm bệnh nhân, mặc dù giá thuốc tương tự sinh học thường chỉ thấp hơn từ 20-30% so với giá thuốc phát minh.

4. Kết luận

Việc nghiên cứu phát triển và ứng dụng nhóm thuốc protein vào thực tiễn điều trị có ý nghĩa quan trọng, ngày càng có nhiều tiến bộ mới. Sự phát triển mạnh mẽ của nhóm thuốc này hứa hẹn nhiều tiến bộ vượt bậc trong chẩn đoán, điều trị, phòng bệnh và nâng cao sức khỏe con người. Nhu cầu cao của nhóm thuốc đó cũng có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của các lĩnh vực khoa học chuyên ngành như sinh học cơ bản, di truyền, công nghệ sinh học, công nghệ tách chiết và tinh chế protein, công nghệ bào chế sản xuất thuốc.

Sản xuất thuốc protein là một lĩnh vực lớn, trình độ khoa học công nghệ cao, cần tích hợp khoa học công nghệ đa ngành, cần có nguồn nhân lực trình độ cao và chuyên cần, cần đầu tư các nhà máy đồng bộ và hoàn chỉnh. Để phát triển được lĩnh vực công nghiệp đầy tiềm năng này bên cạnh các yếu tố trên còn cần được sự ủng hộ vĩ mô của các chính sách khuyến khích.

Xây dựng nguồn nhân lực có nền tảng kiến thức vững chắc, khả năng nghiên cứu phát triển và tiếp nhận chuyển giao tri thức sẽ giúp hình thành nên nền công nghiệp dược phẩm protein cho đất nước trong tương lai. Đây là một lĩnh vực công nghiệp có giá trị lớn, cả cho mục tiêu bảo vệ, chăm sóc sức khỏe, cho sự phát triển trình độ và năng lực khoa học công nghệ quốc gia và cả về giá trị kinh tế mà nó mang lại.

Tài liệu tham khảo

- [1] N. H. Linh, P. T. M. Hue, N. T. T. Binh, B. T. Tung, N. T. H. Yen, N. T. Hai, Protein Drugs, VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, Vol. 38, No. 3, 2022, pp. 1-10, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4436>.
- [2] I. Gierach, J. M. Galiardi, B. Marshall, D. W. Wood, Chapter 26, Protein Drug Production and Formulation, Remington (Twentythree Edition)-The Science and Practice of Pharmacy, Elsevier Inc., 2020, pp. 489-547, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00026-X>.
- [3] H. E. Wong, C. J. Huang, Z. Zhang, Amino Acid Misincorporation in Recombinant Proteins, Biotechnol. Adv, Vol. 36, No 1, 2018, pp. 168-181, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.006>.
- [4] R. A. Preti, Process Validation, Cytotherapy, Vol. 1, No. 6, 1999, pp. 481-483, <https://doi.org/10.1080/0032472031000141308>.
- [5] C. F. Kirchhoff, X. M. Wang, H. D. Conlon, S. Anderson, A. M. Ryan, A. Bose, Biosimilars: Key Regulatory Considerations and Similarity Assessment Tools, Biotechnol. Bioeng, Vol. 114, No. 12, 2017, pp. 2696-2705, <https://doi.org/10.1002/bit.26438>.
- [6] US Food & Drug Administration, Biosimilar Product Regulatory Review and Approval, <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Biosimilar-Product-Regulatory-Review-and-Approval.pdf> (accessed on: May 5th, 2023).
- [7] T. Nadeem, M. A. Khan, B. Ijaz, N. Ahmed, Z. U. Rahman, M. S. Latif, Q. Ali, M. A. Rana, Glycosylation of Recombinant Anticancer Therapeutics in Different Expression Systems with Emerging Technologies, Cancer Res., Vol. 78, No. 11, 2018, pp. 2787-2798, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0032>.
- [8] K. Swiech, M. C. De Freitas, D. T. Covas, V. Picanco-Castro, Recombinant Glycoprotein Production in Human Cell Lines, Methods Mol. Biol, Vol. 1258, 2015, pp. 223-240, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_12.
- [9] F. V. Ritacco, Y. Wu, A. Khetan, Cell Culture Media for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells: History, Key Components, and Optimization Strategies, Biotechnol. Prog, Vol. 34, No. 6, 2018, pp. 1407-1426, <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>.
- [10] A. Mizukami, A. L. Caron, V. P. Castro, K. Swiech, Platforms for Recombinant Therapeutic Glycoprotein Production, Methods Mol. Biol,

- Vol. 1674, 2018, pp. 1-14,
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_1.
- [11] M. N. Baeshen, A. M. A. Hejin, R. S Bora, M. M. Ahmed, H. A. Ramadan, K. S. Saini, N. A. Baeshen, E. M. Redwan, Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives, *J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 25, No. 7, 2015, pp. 953-962,
<https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>.
- [12] M. A. Meehl, T. A. Stadheim, Biopharmaceutical Discovery and Production in Yeast, *Curr. Opin. Biotechnol*, Vol. 30, 2014, pp. 120-127,
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.007>.
- [13] K. Terpe, Overview of Bacterial Expression Systems for Heterologous Protein Production: from Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 72, No. 2, 2006, pp. 211-222,
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>.
- [14] E. J. Thak, S. J. Yoo, H. Y. Moon, H. A. Kang, Yeast Synthetic Biology for Designed Cell Factories Producing Secretory Recombinant Proteins, *FEMS Yeast Research*, Vol. 20, No. 2, 2020, pp. 1-48,
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa009>.
- [15] B. Somasundaram, K. Pleitt, E. Shave, K. Baker, L. H. L. Lua, Progression of Continuous Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: Current Trends and Challenges, *Biotechnol. Bioeng*, Vol. 115, No. 12, 2018, pp. 2893-2907, <https://doi.org/10.1002/bit.26812>.
- [16] I. Jyothilekshmi, N. S. Jayaprakash, Trends in Monoclonal Antibody Production Using Various Bioreactor Systems, *J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 31, No. 3, 2021, pp. 349-357,
<https://doi.org/10.4014/jmb.1911.11066>.
- [17] M. Vanderlaan, J. Z. Shimoni, S. Lin, F. Gunawan, T. Waerner, K. E. V. Cott, Experience with Host Cell Protein Impurities in Biopharmaceuticals, *Biotechnol. Prog*, Vol. 34, No. 4, 2018, pp. 828-837, <https://doi.org/10.1002/btpr.2640>.
- [18] S. Chung, J. Tian, Z. Tan, J. Chen, J. Lee, M. Borys, Z. J. Li, Industrial Bioprocessing Perspectives on Managing Therapeutic Protein Charge Variant Profiles, *Biotechnol. Bioeng*, Vol. 115, No. 7, 2018, pp. 1646-1665,
<https://doi.org/10.1002/bit.26587>.
- [19] K. N. Tripathi, A. Shrivastava, Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development, *Front. Bioeng. Biotechnol*, Vol. 7, 2019, pp. 1-35,
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>.
- [20] J. Zhou, Methods for Removing Viral Contaminants During Protein Purification, Google Patents, 2008.
- [21] M. W. Jornitz, Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry, Third Edition, Taylor & Francis Groups, 2019,
<https://doi.org/10.1201/9781315164953>.
- [22] N. W. Warne, H. C. Mahler, Challenges in Protein Product Development, Springer International Publishing, 2018.
- [23] L. Hovgaard, S. Frokjaer, M. V. D. Weert, Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Taylor & Francis Groups, 2013, <https://doi.org/10.1201/b12951>.
- [24] N. Rathore, R. S. Rajan, Current Perspectives on Stability of Protein Drug Products during Formulation, Fill and Finish Operations. *Biotechnol. Prog*, Vol. 24, No. 3, 2008, pp. 504-514,
<https://doi.org/10.1021/bp070462h>.
- [25] A. G. Vulto, O. A. Jaquez, The Process Defines the Product: What Really Matters in Biosimilar Design and Production?, *Rheumatology*, Vol. 56, No. 4, 2017, pp. 14-29,
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex278>.
- [26] J. Isaacs, J. G. Alves, R. Strohal, G. Castañeda-Hernández, V. Azevedo, T. Doñner, I. McInnes, The Biosimilar Approval Process: How Different is it?, *Consid. Med*, Vol. 1, 2017, pp. 3-6,
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01610-1>.
- [27] H. N. Kang, M. Wadhwa, I. Knezevic, C. Ondari, M. Simao, WHO Guidelines on Biosimilars: Toward Improved Access to Safe and Effective Products, *Ann NY Acad Sci*, Vol. 1521, No. 1, 2023, pp. 96-103,
<https://doi.org/10.1111/nyas.14965>.