

# Nghiên cứu sản xuất chế phẩm Etanercept bằng công nghệ protein tái tổ hợp dùng trong điều trị viêm khớp dạng thấp

Nguyễn Thị Thùy Trang, Đoàn Chính Chung, Nguyễn Mai Khôi, Nguyễn Minh Hòa, Đoàn Ngọc Trung, Đỗ Xuân Hòa, Trần Hữu Huy, Nguyễn Quang Huy, Hồ Nhân, Đỗ Minh Sĩ

Công ty TNHH Công nghệ sinh học dược Nanogen

Viêm khớp dạng thấp là bệnh tự miễn liên quan đến yếu tố TNF. Các nghiên cứu gần đây liên quan đến điều trị bệnh tập trung vào việc khóa con đường truyền tín hiệu liên quan tới TNF, mà một trong số các giải pháp đã được Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp phép là dùng Etanercept (một protein kép gồm thụ thể TNF và chuỗi nặng kháng thể người). Etanercept được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp sử dụng tế bào CHO.

Công ty TNHH Công nghệ sinh học dược Nanogen đã thực hiện thành công Dự án xây dựng ngân hàng giống tế bào CHO có khả năng sản xuất Etanercept; tạo được quy trình nuôi cấy tế bào CHO có khả năng sản xuất khoảng 2 g Etanercept/lít lên men; tinh chế Etanercept với độ tinh khiết  $\geq 94\%$ , có hoạt tính sinh học đạt tiêu chuẩn làm thuốc tiêm và tương đương với thuốc đối chiếu Enbrel.

**Từ khóa:** CHO, Etanercept, protein tái tổ hợp, viêm khớp dạng thấp, yếu tố TNF.

**Chỉ số phân loại 3.4**

## RESEARCHING AND DEVELOPING ETANERCEPT USING RECOMBINANT PROTEIN TECHNOLOGY FOR TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Summary

Rheumatoid Arthritis (RA) is an auto immunity disease that relates to the tumour necrosis factor (TNF). Recent studies concerning how to treat RA have focused on blocking the TNF signaling pathway. One of the TNF blocking agents that have been approved by FDA is Etanercept (a fusion protein containing TNF receptor and the human immunoglobulin). Etanercept has been produced by recombinant protein technology using CHO cell line. This project has been successfully done by establishing the master cell bank of CHO cells and the culturing process that could be able to produce approximately 2 g Etanercept per liter of cell broth, develop and validate the downstream process purify of Etanercept with the purity of over 94%, recovery rate of over 70%. The purified protein has the biological activity and the biosimilarity equal to the control drug (Enbrel).

**Keywords:** CHO, Etanercept, recombinant protein, Rheumatoid Arthritis, TNF.

**Classification number 3.4**

### Đặt vấn đề

Viêm khớp dạng thấp là bệnh viêm mạn tính ở nhiều khớp ngoại biên (khớp tay, chân, gối...). Bệnh xảy ra khắp nơi trên thế giới, tỷ lệ từ 0,5 đến 3% dân số trên 15 tuổi. Số người mới mắc bệnh hàng năm là 25-30 người/100000 dân. Bệnh gặp ở mọi lứa tuổi nhưng thường gặp nhất là tuổi 30-60, là độ tuổi lao động của xã hội [1]. Hiện nay, đã và đang có rất nhiều công trình trên thế giới và ở Việt Nam được công bố liên quan đến việc tìm ra nguyên nhân cũng như đề xuất biện pháp điều trị căn bệnh này. Trong những năm gần đây, các công trình nghiên cứu tập trung vào việc phát triển các liệu pháp nhằm vào các con đường truyền tín hiệu (signaling pathway) của việc hình thành và phát triển bệnh. Một trong số các biện pháp đó là sử dụng các thụ thể (receptor) khóa các yếu tố thể dịch liên quan đến tự miễn như TNF. FDA đã cấp phép lưu hành sản phẩm Etanercept (tên thương mại là Enbrel) từ năm 1998 [2, 6]. Etanercept là dạng protein kép, được tạo thành do quá

trình nối giữa thụ thể TNF và chuỗi nặng của kháng thể người. Etanercept kim hãm hoạt động của TNF $\alpha$  bằng cách liên kết cạnh tranh với TNF $\alpha$ , ngăn chặn TNF $\alpha$  liên kết với thụ thể nội sinh trên bề mặt tế bào bằng cách bắt hoạt TNF $\alpha$  về mặt sinh học [4]. Etanercept được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp sử dụng tế bào CHO. Dù đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới hơn 10 năm nay, nhưng cho đến thời điểm hiện nay, Etanercept vẫn chưa hiện diện ở nước ta, chủ yếu là do rào cản về giá cả. Đây là một thiệt thòi cho ngành y tế nước ta, đặc biệt là cho các bệnh nhân viêm khớp dạng thấp đang có nguy cơ bị tàn phế, không thể tiếp cận với tiến bộ khoa học trên thế giới.

### Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### Tạo dòng tế bào CHO DG-44 mang gen sản xuất Etanercept

Gen mã hóa cho Etanercept (gồm phần 3' mã hóa cho vùng CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người và phần 5' mã hóa cho phần p75 của thụ thể TNF $\alpha$  người) được thiết kế dựa trên trình tự của Etanercept được công bố tại Drugbank và gửi đi tổng hợp bởi Công ty Genscript (Mỹ). Gen Etanercept được tạo dòng vào vector pZIC (là vector được thiết kế bởi Công ty TNHH Công nghệ sinh học Nanogen chuyên dùng cho biểu hiện protein ở tế bào CHO) tạo thành vector pZIC-ETA và được chuyển vào tế bào CHO DG44 (Invitrogen). Sau quá trình chọn lọc bằng kháng sinh, quá trình khuếch đại gen bằng MTX, quá trình tạo dòng đơn bằng phương pháp pha loãng tối hạn và quá trình chọn dòng tế bào đơn. Dòng tế bào DG44-pZIC-ETA được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào giống và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### Nghiên cứu quy trình nuôi cấy tế bào DG44 sản xuất Etanercept

Quá trình nghiên cứu quy trình tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept được thực hiện qua 2 giai đoạn: nuôi cấy nhỏ (chai 1 l) để tối ưu hóa các thông số cần thiết và lên men bồn 50 l [7]. Các nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy tế bào sản xuất Etanercept gồm môi trường nuôi cấy, quy trình bổ sung các chất dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy, vận tốc lắc... Quá trình lên men lớn sản xuất Etanercept được tiến hành bằng hệ thống bồn lên men 50 l (Kuhner).

#### Nghiên cứu quy trình tinh chế Etanercept [4, 1]

Quy trình tinh chế Etanercept gồm các bước tiến hành như sau: sơ chế (clarification), tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch (immune affinity chromatography), sắc ký trao đổi ion (anion exchange chromatography), sắc ký lọc gel (gel filtration) và cô mẫu (protein concentration) [3].

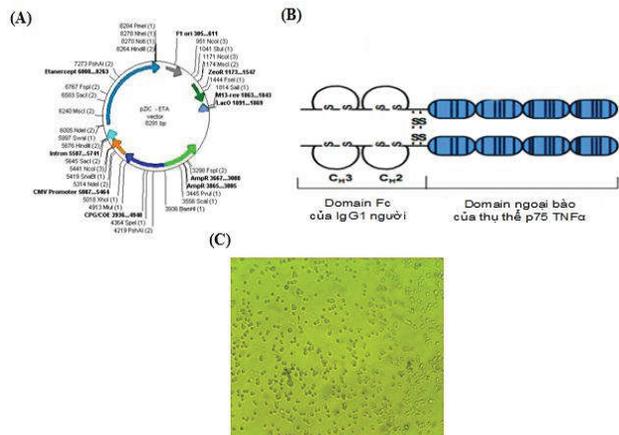
Quá trình sơ chế được thực hiện bằng hệ thống Akta Flux 6 (GE healthcare) sử dụng màng lọc 30KDa để loại bỏ các tạp dưới 30KDa và trao đổi dung dịch đệm. Quá trình tinh chế Etanercept được tiến hành trên hệ thống Akta Pilot và Akta Purifier của GE healthcare bắt đầu bằng sắc ký ái lực miễn dịch sử dụng gel Mabselect (GE healthcare) [5]. Gel Mabselect có liên kết với Protein A (là receptor cho phân đoạn Fc của kháng thể) sẽ tinh sạch >90% Etanercept. Dịch sau tinh chế sẽ được tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion (gel SP của GE healthcare) để loại bỏ tạp, endotoxin, DNA và peptid của tế bào chủ... Đồng thời, loại bỏ dimer và các Etanercept bị thủy phân bằng phương pháp lọc gel. Quá trình cô mẫu được tiến hành bằng hệ thống TFF của Satorius.

#### Nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm Etanercept

Quá trình nghiên cứu tương đương sinh học (Biosimilar) của chế phẩm Etanercept so với thuốc đối chứng Enbrel (Amgen) được tiến hành theo các quy định của ICH và WHO. Các nghiên cứu gồm có nghiên cứu tương đương về công thức, về nguồn gốc, chất lượng, tiền lâm sàng và lâm sàng.

### Kết quả và bàn luận

#### Tạo dòng tế bào CHO DG-44 (hay DG44) mang gen mã hóa protein Etanercept



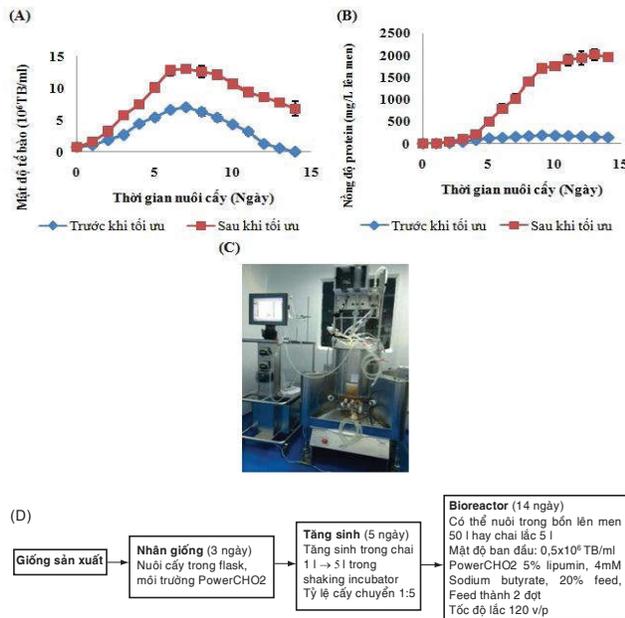
Hình 1: vector biểu hiện pZIC-ETA mang gen mã hóa cho Etanercept (A) và cấu trúc phân tử Etanercept (dimer với đầu C là domain CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người, đầu N là Domain ngoại bào p75 của thụ thể TNF $\alpha$ ). (B). Tế bào DG44-pZIC-ETA nuôi cấy trong môi trường tăng sinh (C)

Etanercept có trình tự protein như sau:

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQM  
CCSKCSPGQHAVKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYT  
QLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQN  
RICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGF

GVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTSSTDICR  
 PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPG  
 AVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPM  
 GPSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 EDPQVKFNWYVDGTVQVHNAKTKPREQQYNST  
 YRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAP  
 IEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS  
 LTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
 EALHNYHTQKSLSLSPG

Gen mã hóa protein Etanercept được tạo dòng vào vector pZIC-ETA gồm phần 3' mã hóa cho vùng CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người và phần 5' mã hóa cho vùng p75 của thụ thể TNF $\alpha$  người. Mỗi chuỗi polypeptid có trọng lượng phân tử 75Kda, dạng dimer sẽ có trọng lượng phân tử 150Kda. Việc sử dụng vùng Fc globulin miễn dịch như là yếu tố hợp nhất trong cấu trúc của một thụ thể nhị phân làm cho thụ thể TNF có hoạt tính sinh học và tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh dài hơn (hình 1A, 1B). Tế bào DG44-pZIC-ETA sau khi tạo dòng (hình 1C) được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào chủng gốc và chủng sản xuất. Chủng gốc và chủng sản xuất được bảo quản trong nitơ lỏng. Tế bào DG44-pZIC-ETA được kiểm tra theo quy định của WHO, có ít nhất 10 copy của gen Etanercept được chèn vào bộ gen của tế bào chủ, không nhiễm Mycoplasma và virus động vật, ổn định về di truyền, có khả năng sản xuất khoảng 150-180 mg Etanercept/l.



Hình 2: nghiên cứu quy trình nuôi cấy sản xuất Etanercept. Đường cong tăng trưởng của tế bào DG44-pZIC-ETA (A) và đường biểu diễn nồng độ protein Etanercept (B) trước và sau khi tối ưu hóa, giá trị = Trung bình  $\pm$  SD. Quy trình nuôi cấy Etanercept trong bốn lên men 50 l được đề xuất (C, D)

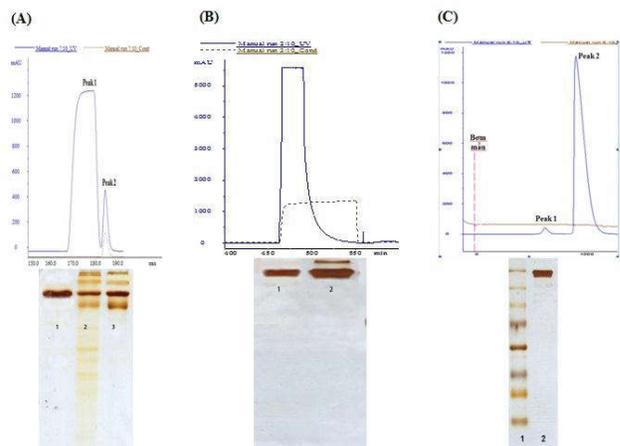
### Kết quả nghiên cứu quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA nhằm sản xuất Etanercept

Các thông số của quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept đã được tối ưu hóa gồm: môi trường PowerCHO-2 (Lonza) cho hiệu suất nuôi cấy cao nhất, Lipumin 5% Sodium butyrate 4 mM. Kết quả nghiên cứu cho thấy: hàm lượng Etanercept biểu hiện tốt nhất đồng thời đảm bảo duy trì mật độ tế bào cao nhất. CHO Xtreme Feed (Lonza) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (20%) đảm bảo mật độ tế bào ở mức cao với thời gian lên men kéo dài và tiết kiệm chi phí nhất. Vận tốc lắc là 100 vòng/phút vào ngày thứ 3 (sau khi bổ sung môi trường), 110 vòng/phút vào ngày thứ 5 (sau khi bổ sung môi trường) và 120 vòng/phút vào các ngày tiếp theo sẽ cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất.

Quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept được đề xuất theo hình 2D. Sau khi áp dụng quy trình này để sản xuất Etanercept trong bốn lên men 50 l (hình 2C), mật độ tế bào đạt được cao nhất là  $12 \times 10^6$  tế bào/ml, nồng độ protein Etanercept trước tinh chế là 1,8-2 g/l lên men (hình 2A, 2B).

### Kết quả nghiên cứu quy trình tinh sạch Etanercept

Kết quả quá trình tinh chế Etanercept qua các bước tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch (hình 3A), sắc ký trao đổi ion (hình 3B), sắc ký lọc gel (hình 3C) được xây dựng và thẩm định. Quá trình này có khả năng tinh chế Etanercept với độ tinh sạch  $\geq 94\%$ , tỷ lệ thu hồi  $>70\%$ .



Hình 3: phổ đồ và bản điện di các giai đoạn tinh chế Etanercept. (3A) Cột 1: Etanercept chuẩn, cột 2: dịch nuôi cấy, cột 3: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột ái lực; (3B) Cột 1: Etanercept chuẩn, cột 2: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột anion; (3C) Cột 1: thang chuẩn protein, cột 2: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột lọc gel

## Kết quả nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm Etanercept

Bảng 1: kết quả tổng kết nghiên cứu tương đương sinh học của Etanercept

Thử nghiệm	Nội dung thực hiện	Etanercept của Nanogen	Etanercept đối chứng (Enbrel)
Đặc tính lý hóa	Nhận diện	Dương tính với kháng thể kháng Etanercept người.	Tương tự
	Trọng lượng phân tử	Khoảng 150Kda (dạng không khử) và 75Kda (dạng khử) sử dụng phương pháp SDS-PAGE, tương đương với thuốc đối chiếu Etanercept (Enbrel).	Tương tự
	Giải trình tự đầu N và đầu C	Amino acid đầu N có trình tự như sau: L-D-R-Q-V-A-F-T-P-Y, giống 100% so với đầu N của Etanercept người trong Drugbank. Amino acid đầu C có trình tự như sau: S-L-S-L-S-D-G, giống 100% so với đầu C của Etanercept người trong Drugbank.	Tương tự
Hoạt tính sinh học	Phương pháp tăng sinh tế bào A375	Thành phẩm Etanercept có hoạt tính 1,3-1,94 MIU/mg.	1,62 MIU/mg
Thử nghiệm bám thụ thể TNF $\alpha$	ELISA	70-150 BU/20ng protein.	70-150 BU/20ng protein
Độ tinh khiết, tạp liên quan	Độ tinh sạch	$\geq 94\%$ .	$\geq 94\%$
	Nội độc tố	$\leq 2$ EU/mg.	$\leq 2$ EU/mg
Lão hóa cấp tốc	Nhiệt độ 25°C, độ ẩm 65%	Etanercept ổn định trong 3 tháng ở điều kiện nhiệt độ 25°C, độ ẩm 65%.	Không tiến hành
Thử nghiệm tiền lâm sàng	Dược động học, dược lực học tiền lâm sàng	Dược lực học tiền lâm sàng: quá trình nghiên cứu dược lực học tiền lâm sàng của sản phẩm Etanercept được thiết kế dựa trên khả năng trung hòa yếu tố TNF $\alpha$ trung gian gây ức chế tăng trưởng tế bào A375. Kết quả cho thấy, Etanercept của Công ty Nanogen có hoạt tính làm trung hòa yếu tố TNF $\alpha$ trung gian gây ức chế tăng trưởng tế bào A375 với hoạt tính nằm trong khoảng 1,3-1,94 MIU/mg tương đương với mẫu chuẩn. Dược động học tiền lâm sàng: sau các liều tiêm nhắc lại, Etanercept chủ yếu lưu hành trong máu, không tích tụ tại các cơ quan gan, thận, lách. Trong nghiên cứu này, Etanercept lưu hành trong máu và một phần bị bài tiết theo con đường nước tiểu, phần khác sẽ bị phân hủy theo cơ chế tự nhiên bên trong cơ thể (enzym protease phân giải). Etanercept có thời gian bán rã (half life) trong máu chuột khoảng 15,1 h.	
	An toàn tiền lâm sàng	Độc tính cấp: kết quả thử nghiệm độc tính cấp của Etanercept (với 3 liều khảo sát: liều thấp 1 mg/kg thể trọng, liều trung bình 5 mg/kg thể trọng và liều cao 15 mg/kg thể trọng) trên chuột với các đường tiêm tĩnh mạch, tiêm cơ và đường uống không cho thấy các dấu hiệu sinh lý bất thường như xù lông, chán ăn, ủ rũ... Các kết quả phân tích đại phẫu và mô học của chuột cũng không thể hiện dấu hiệu bất thường, xung huyết hay hoại tử của các cơ quan gan, thận, lách. Độc tính trường diễn: thử nghiệm được tiến hành với 3 liều khảo sát: liều thấp 1 mg/kg thể trọng, liều trung bình 5 mg/kg thể trọng và liều cao 15 mg/kg thể trọng, động vật thí nghiệm được tiêm 2 lần/tuần, trong vòng 8 tuần, không có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào được ghi nhận ở các chỉ số sinh hóa máu, nước tiểu, huyết học của động vật thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Các kết quả phân tích đại phẫu và mô học của chuột cũng không thể hiện dấu hiệu bất thường, xung huyết hay hoại tử của các cơ quan gan, thận, lách. Tính quá mẫn miễn dịch: thử nghiệm phản ứng quá mẫn miễn dịch được thực hiện trên chuột lang để khảo sát độc tính miễn dịch của sản phẩm Etanercept của Nanogen. Khảo sát ở 2 mức độ liều: liều cao (15 mg/kg thể trọng) và liều thấp (1 mg/kg thể trọng). Sau giai đoạn 2 tuần gây nhạy cảm với thuốc, chuột được tiêm 1 lần nữa với 1 liều cao (15 mg/kg thể trọng) vào tĩnh mạch ở tuần thứ 3 và kiểm tra tính quá mẫn của chuột. Tính kích ứng tại chỗ: kết quả thử nghiệm tiêm dưới da trên thỏ cho thấy Etanercept không gây tính kích ứng tại chỗ tiêm trên mô hình động vật thí nghiệm với liều khảo sát 15 mg /kg thể trọng. Độc tính di truyền ( <i>in vitro</i> ): dưới các điều kiện thử nghiệm, Etanercept do Nanogen sản xuất không gây độc tính di truyền.	Không có số liệu

## Kết luận

Dòng tế bào DG44-pZIC-ETA sau khi tạo ra được sử dụng trong nghiên cứu quy trình sản xuất Etanercept. Quy trình nuôi cấy tế bào được tối ưu hóa với môi trường và các chất dinh dưỡng được bổ sung phù hợp. Quy trình này có khả năng sản xuất ra Etanercept với hàm lượng khoảng 2 g/l lên men. Quy trình tinh chế đã được hoàn thiện để tạo ra protein Etanercept với độ tinh khiết >94%, trọng lượng phân tử đạt 150Kda (dạng không khử, phân tử tồn tại dạng dimer), 75Kda (dạng khử, phân tử dạng monomer). Sản phẩm protein sau tinh chế đạt tiêu chuẩn nội độc tố (theo EP 7.0), có hoạt lực (được thử nghiệm trên dòng tế bào A375) đạt khoảng 1,62 MIU/mg protein. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã chứng minh tính tương đương sinh học với sản phẩm với thuốc đối chứng Enbrel.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Đặng Dũng, Phạm Mạnh Hùng, Lê Văn Đông (2011), "Miễn dịch học trong điều trị viêm khớp dạng thấp", *Tạp chí thông tin Y Dược*, **10**, 47-54.
- [2] Emery P (2006), "Treatment of rheumatoid arthritis", *BMJ*, **332(7534)**, 152-155.
- [3] Farhner R.L, Knudsen H, Basey C.D, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, Blank G.S (2001), "Industrial purification of pharmaceutical antibodies: Development, operation and validation of chromatography processes", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **18**, 301-327.
- [4] Feldmann M (2002), "Development of anti- TNF therapy for rheumatoid arthritis", *Nature Reviews Immunology*, **2(5)**, 364-371.
- [5] General Electric Co. (GE) (2002), *Antibody Purification Handbook*, chapter 3, 27-45.
- [6] Roy F, Dave S.H (2003), "Developing a new generation of TNF $\alpha$  Antagonists for treatment of Rheumatoid Arthritis", *Molecular interventions*, **3(6)**, 310-317.
- [7] Wurm F (2004), "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", *Nature Biotechnology*, **22(11)**, 1393-1398.