

Phát triển quy trình sản xuất Trastuzumab trên dòng tế bào buồng trứng chuột Hamster Trung Quốc (CHO) quy mô phòng thí nghiệm

Process development for Trastuzumab production from Chinese Hamster Ovary (CHO) in laboratory scale

Nguyễn Quang Huy^{1,3*}, Từ Tiểu My², Hứa Hoàng Quốc Huy², Nguyễn Trường An², Hà Tấn Phát², Nguyễn Thị Thuỳ Trang², Đinh Văn Long², Trịnh Thanh Hùng⁴, Đỗ Minh Sĩ²

¹Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

²Công ty CP CNSH Dược Nanogen, Việt Nam

³Công ty CP Thuốc Thú Y TW Navetco, Việt Nam

⁴Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: nguyenquanghuy166@gmail.com

THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.2.2167.2022

Ngày nhận: 20/01/2022

Ngày nhận lại: 08/02/2022

Duyệt đăng: 21/02/2022

Từ khóa:

CHO; môi trường nuôi cấy; Trastuzumab

Keywords:

CHO; culture medium; Trastuzumab

TÓM TẮT

Tế bào CHO đã và đang được sử dụng phổ biến trong sản xuất protein tái tổ hợp. Theo thống kê, khoảng 70% protein tái tổ hợp điều trị cho người được sản xuất trong hệ thống tế bào CHO và doanh thu vượt quá 15 tỷ bảng mỗi năm. Việc khảo sát tối ưu các điều kiện nuôi cấy cho thấy mật độ tế bào cao nhất có thể đạt trên 18 triệu tế bào/ml và nồng độ sản phẩm cuối cùng đạt từ 01 - 05g/L. Vì vậy, việc phát triển tối ưu quy trình sản xuất quy mô PTN đóng vai trò khá quan trọng nhằm tìm ra các nghiệm thức tối ưu, áp dụng cho lên men sản xuất Trastuzumab quy mô công nghiệp. Trong nghiên cứu này, dòng tế bào sản xuất Trastuzumab được khảo sát theo từng bước: môi trường nuôi cấy, tỉ lệ phần trăm chất bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy và tốc độ lắc. Kết quả nghiên cứu đã tìm ra các điều kiện nuôi cấy tối ưu quy mô PTN như sau: tế bào được nuôi cấy lắc 100rpm trong môi trường ActiPro có bổ sung chất dinh dưỡng Cell Boost 7a/7b (tỉ lệ 1:0.1%) hàng ngày từ ngày 03, nhiệt độ tăng sinh ban đầu là 37°C sau đó hạ xuống 32°C vào ngày thứ 05. Sau 14 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào trên 25 triệu tế bào/ml và nồng độ Trastuzumab thu được gần 04g/L.

ABSTRACT

Background: CHO cells have been commonly used in the production of recombinant protein. It is reported that around 70% of recombinant therapeutic proteins are produced in CHO cell systems and the market size exceeds 15£ billion per year. With the optimization of culture, conditions showed that CHO cell density could reach 18 million per cell per milliliter and a final product concentration of 01 - 05 g l⁻¹. Therefore, the production process development on a laboratory scale plays an important role in identifying the optimal conditions suitable, which can be applied

to produce Trastuzumab on a industrial scale. In this study, Trastuzumab-producing cell lines were investigated in step wise: culture medium, percentage of supplements, culture temperature and shaking speed. The result showed that the optimal conditions were as follows: cells were shaken at 100rpm in ActiPro medium supplemented with Cell Boost 7a/7b (ratio 1:0.1%) daily from day 03, the initial growth temperature was 37°C then shifted to 32°C on day 05.

After 14 days, cell density reaches over 25 million per cell per milliliter, and Trastuzumab concentration collects around 04g/L.

1. Giới thiệu

Ung Thư Vú (UTV) hiện là một trong những bệnh ung thư được chẩn đoán phổ biến nhất và là nguyên nhân thứ 05 gây tử vong liên quan đến ung thư với con số ước tính khoảng 2.3 triệu ca mắc mới trên toàn thế giới (Sung & ctg., 2021). Hiện nay, với các tiến bộ về nghiên cứu sinh học phân tử bệnh UTV được chia thành các phân nhóm có tiên lượng khác nhau bao gồm nhóm: Luminal A, Luminal B, biểu hiện vượt mức HER2, dạng đáy (basal), và giống bình thường (normal-like). Trong số các phân nhóm đó, nhóm biểu hiện vượt mức HER2 và nhóm dạng đáy (bộ ba âm tính) có tiên lượng xấu nhất (Dai & ctg., 2015). Sự biểu hiện vượt mức các thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì người - HER2 (chiếm 10 - 15% tổng số ca mắc), dẫn đến mất cân bằng số lượng tế bào tuyến vú sinh ra và chết đi theo chu trình, số lượng tế bào tăng không kiểm soát dẫn đến hình thành các khối u (Owens, Horten, & Da Silva, 2004). Liệu pháp điều trị nhóm UTV biểu hiện vượt mức HER2 thường được sử dụng là liệu pháp nhắm trúng đích sử dụng kháng thể đơn dòng nhân hóa tái tổ hợp Trastuzumab liên kết trực tiếp với HER-2 (Rita, 2020). Sự gắn kết kháng nguyên - kháng thể làm ức chế con đường truyền tín hiệu bên trong tế bào, khiến các tế bào ung thư mất khả năng tăng sinh, đồng thời hoạt hoá quá trình gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể qua đó tiêu diệt các tế bào ung thư (Hudis, 2007). Trastuzumab đầu tiên được FDA cấp phép vào năm 1998 tại Mỹ do công ty Genetech, sau này là Roche sản xuất và phân phối có tên thương mại Herceptin được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Từ năm 2017 đến nay, FDA đã công nhận và cấp phép cho hàng loạt sản phẩm đăng kí là thuốc tương đương sinh học với Herceptin như là: Ogivri (Mylan-Biocon, Mỹ, 12/2017), Herzuma (Celltrion, Mỹ, 12/2018), Ontruzant (Samsung Bioseptic, Hàn Quốc, 01/2019), Trazimera (Pfizer, Mỹ, 03/2019), Kanjinti (Amgen, Mỹ, 06/2019). Đặc điểm chung của các sản phẩm trên đều ứng dụng công nghệ nuôi cấy và sản xuất Trastuzumab trên dòng tế bào CHO. Năm 2018, nhóm Jenkins và cộng sự (2018) đã liệt kê các công trình nghiên cứu liên quan đến bệnh ung thư vú, tuy nhiên, chưa có công bố nào liên quan trực tiếp đến nghiên cứu quy trình sản xuất Trastuzumab trên dòng tế bào CHO. Việc tối ưu quy trình sản xuất quy mô PTN là một nghiệm thức quan trọng luôn được ưu tiên khảo sát do ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất sản xuất Trastuzumab quy mô công nghiệp.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Khảo sát môi trường nuôi cấy

Dòng tế bào CHO sản xuất Trastuzumab đã được tạo dòng bởi nhóm nghiên cứu mang gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ protein Trastuzumab (DB00072, Drugbank) được thử nghiệm nuôi trong hai loại môi trường thương mại Actipro (SH31037, Cytiva) và BalanCD CHO (91128,

Irvine) có bổ sung chất dinh dưỡng tương ứng Feed 7a/7b và Feed3 tại nhiệt độ $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian 10 - 14 ngày. Theo khuyến cáo của nhà sản xuất, quá trình khảo sát được dừng lại khi phần trăm tế bào sống dưới 70%.

2.2. Khảo sát tỉ lệ phần trăm chất bổ sung

Dòng tế bào CHO sản xuất Trastuzumab được thử nghiệm nuôi bổ sung chất dinh dưỡng với các tỉ lệ khác nhau: 1%, 2%, 3%, 4%, 5% tại nhiệt độ $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian 10 - 14 ngày. Theo khuyến cáo của nhà sản xuất, quá trình khảo sát được dừng lại khi phần trăm tế bào sống dưới 70%.

2.3. Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy và tốc độ lắc

Dòng tế bào CHO sản xuất Trastuzumab được thử nghiệm nuôi trong hai điều kiện nhiệt độ 32°C và 34°C với 03 tốc độ lắc khác nhau 80, 100, 120rpm trong khoảng thời gian 10 - 14 ngày. Theo khuyến cáo của nhà sản xuất, quá trình khảo sát được dừng lại khi phần trăm tế bào sống dưới 70%.

2.4. Định lượng nồng độ Trastuzumab

Trastuzumab trong dịch nuôi cấy sau khi kết thúc khảo sát được thu nhận bằng phương pháp ly tâm: 900 vòng/phút trong 05 phút.

Tiến hành xác định diện tích peak mẫu thử bằng phương pháp HPLC.

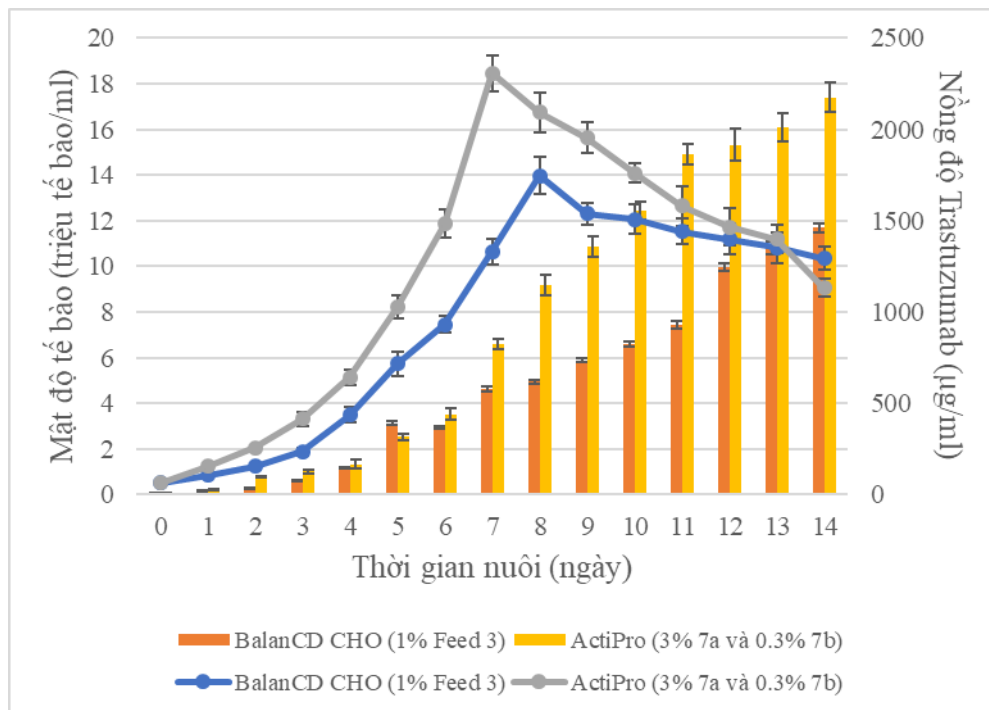
Dựa vào đường chuẩn nồng độ Trastuzumab trong thuốc chuẩn Herceptin (Roche), xác định nồng độ mẫu thử.

3. Kết quả và thảo luận

Năng suất sản xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp nói chung và Trastuzumab trong tế bào CHO nói riêng bị chi phối bởi các yếu tố: môi trường dinh dưỡng và chất bổ sung, nhiệt độ nuôi cấy và lắc/trộn môi trường. Các yếu tố này sẽ được khảo sát lần lượt do có tác động trực tiếp đến sự tăng sinh, tồn tại và biểu hiện protein của tế bào.

3.1. Khảo sát môi trường nuôi cấy

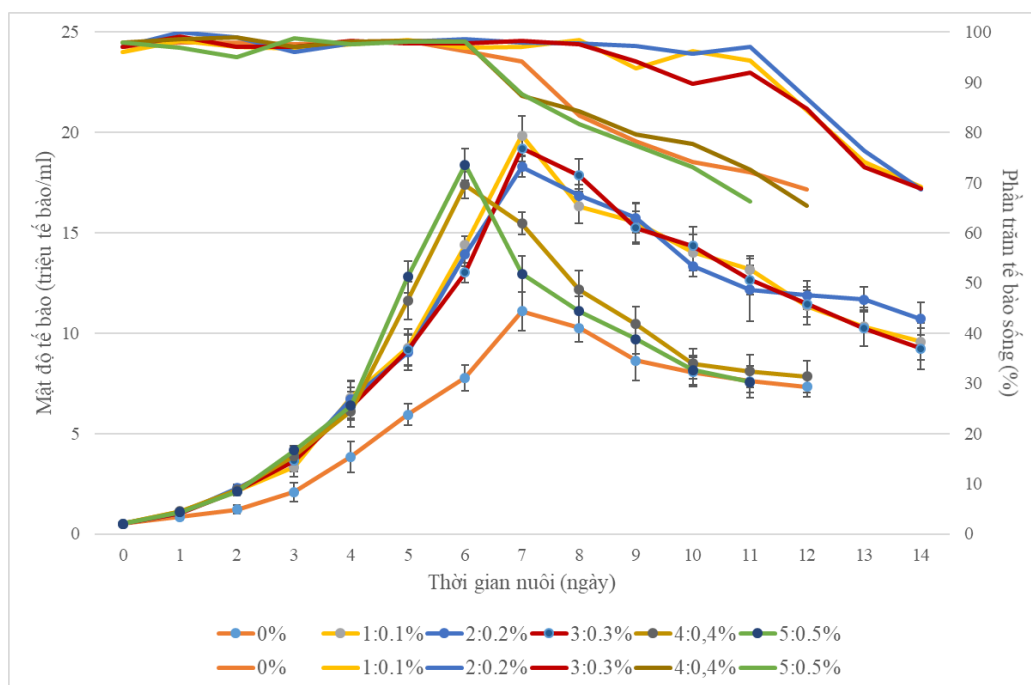
Khi thực hiện thí nghiệm lặp lại, môi trường nuôi cấy ActiPro có bổ sung 3% Cell boost 7a và 0.3% Cell boost 7b vượt trội trong việc hỗ trợ cả về mặt tăng sinh tế bào cũng như tổng hợp Trastuzumab so với BalanCD CHO. Cụ thể, tế bào bắt đầu vào pha tăng trưởng 03 - 05 ngày nuôi cấy và đạt mật độ cao nhất vào ngày 07 (Actipro, 18.5 ± 0.9 triệu tế bào sống/ml) và ngày 08 (BalanCD CHO, 13.9 ± 0.8 triệu tế bào/ml), sau đó tế bào đi vào pha ổn định, mật độ tế bào giảm dần (Hình 1). Sau 06 ngày nuôi cấy, nồng độ kháng thể tích lũy trong cả hai môi trường tăng dần và đạt cực đại cho đến khi kết thúc thí nghiệm, năng suất sản xuất protein trung bình của tế bào được nuôi trong môi trường ActiPro cao hơn BalanCD CHO khoảng 1.5 lần với giá trị nồng độ lần lượt là 2.175 ± 82 và 1.461 ± 26 (mg/ml). Qua kết quả khảo sát, môi trường Actipro có bổ sung chất dinh dưỡng 7a/7b sẽ tiếp tục được khảo sát về tỉ lệ phần trăm bổ sung giữa 7a và 7b.



Hình 1. Mật số và nồng độ Trastuzumab khi nuôi tế bào trong môi trường BalanCD CHO và Actipro

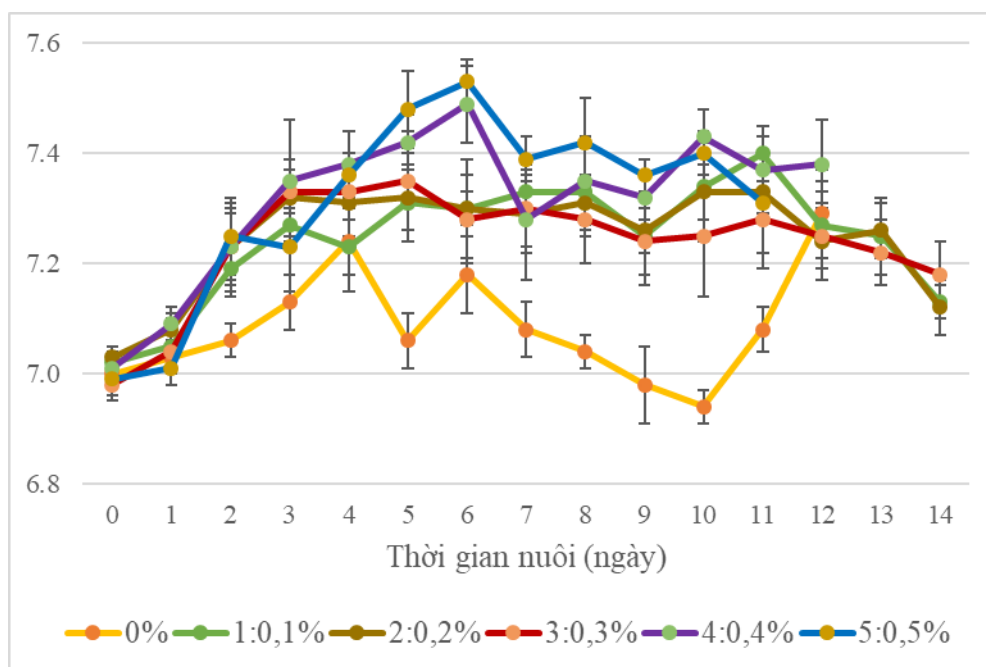
3.2. Khảo sát tỉ lệ phần trăm chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy Actipro

Tỉ lệ phần trăm Cell boost 7a và 7b bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào Actipro đã được nhà sản xuất khảo sát lần lượt là 2: 0.2; 3:0.3; 4:0.4. Trong đó, tỉ lệ 2: 0.2 và 3: 0.3 giúp tế bào CHO tăng trưởng và năng suất tổng hợp protein đạt trên 01g/L. Tuy nhiên, sự khác biệt về dòng tế bào sản xuất, điều kiện môi trường và thiết bị làm việc thực tế có thể khiến năng suất sản xuất cao hơn hay thấp hơn so với kết quả của nhà sản xuất đưa ra. Do đó, dòng tế bào CHO sản xuất Trastuzumab của nhóm sẽ được khảo sát với các tỉ lệ phần trăm khác nhau nhằm tìm ra thông số tối ưu cho năng suất biểu hiện Trastuzumab tốt nhất. Dòng tế bào được nuôi trong 06 điều kiện khác nhau, một nhóm không bổ sung chất dinh dưỡng và năm nhóm bổ sung với các tỉ lệ phần trăm lần lượt là 1:0.1; 2:0.2; 3:0.3; 4:0.4; 5:0.5. Kết quả khảo sát cho thấy mức độ tăng sinh và tổng hợp protein Trastuzumab khác nhau rõ rệt giữa các nhóm thí nghiệm. Đồ thị mô tả đường cong tăng trưởng cho thấy, thời điểm tế bào đạt mật độ cao nhất là sau 07 - 08 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức. Mật số cao nhất giữa nhóm không bổ sung và có bổ sung chất dinh dưỡng chênh lệch khoảng 1.5 lần, có giá trị lần lượt là 11.08; 19.84; 18.28; 19.22; 17.40; 18.40. Trong nhóm có bổ sung, mật số tế bào cao nhất không tương ứng với nồng độ chất bổ sung, nhóm bổ sung 4:0.4%; 5:0.5% có mật số thấp hơn nhóm bổ sung 1:0.1%; 2:0.2%; 3:0.3% (Hình 2).



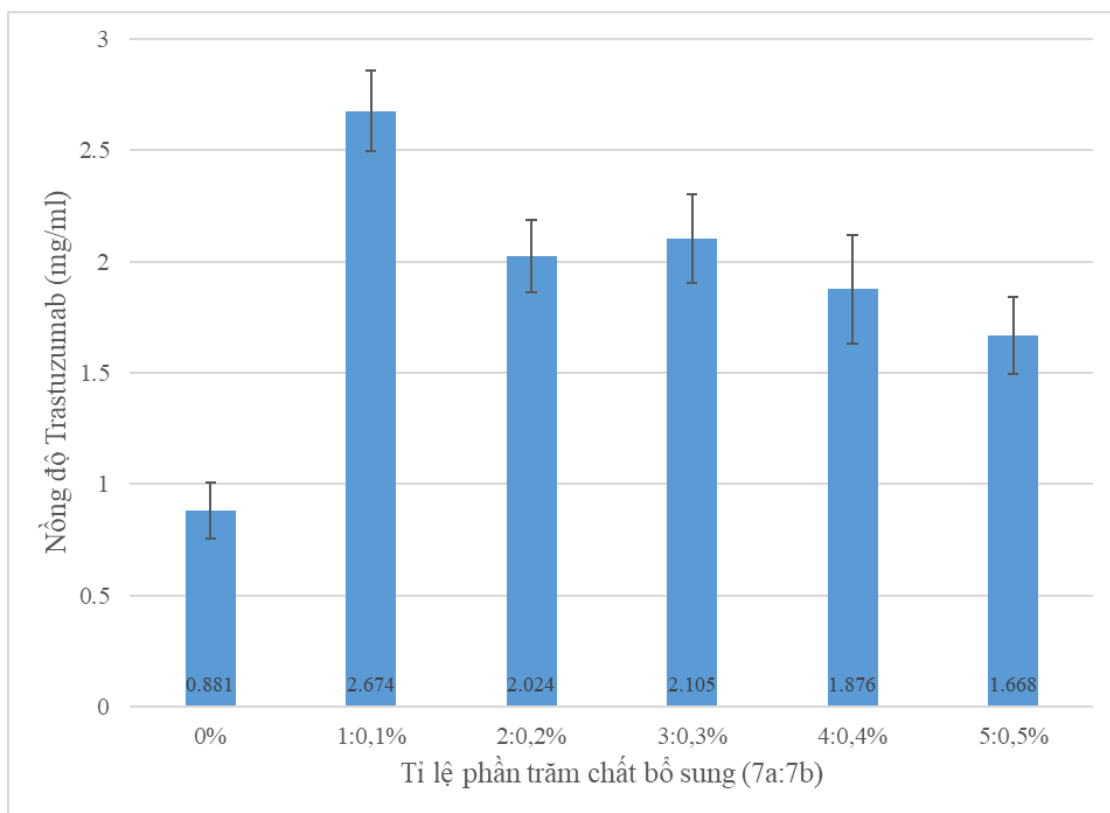
Hình 2. Đường cong tăng trưởng của tế bào trong môi trường nuôi cấy với các tỉ lệ phần trăm chất bổ sung khác nhau

Đồng thời, phần trăm tế bào sống dưới 70% của môi trường có bổ sung 4:0.4%; 5:0.5% xuất hiện sớm vào ngày 12, 03 nghiệm thức còn lại kéo dài đến hết ngày 14. Nguyên nhân chính có thể do sự tăng pH sau khi bổ sung feed vào ngày thứ 03. Đồ thị pH cho thấy, giá trị pH ở 02 nghiệm thức này biến động và luôn ở ngưỡng trên 7.3 từ ngày thứ 04 trở đi. Trong khi 03 nghiệm thức còn lại, giá trị pH duy trì trong khoảng 7.1 đến 7.3. Đây là khoảng pH được cho là tối ưu, hoạt động ion H^+ trong môi trường nuôi cấy không ảnh hưởng đến sự trao đổi chất, tế bào phát triển ổn định và chậm đi vào pha suy tàn (Hình 3).



Hình 3. Sự biến động pH trong môi trường nuôi cấy tế bào với các tỉ lệ phần trăm chất bổ sung khác nhau

Do mật độ tế bào thấp và phần trăm tế bào sống khác nhau nên hàm lượng Trastuzumab ở các nghiệm thức có sự khác biệt rõ ràng. Kết quả định lượng nồng độ Trastuzumab tích lũy sau khi kết thúc thí nghiệm cho thấy, các nhóm có bổ sung 7a/7b cho sản lượng Trastuzumab cao gấp 02 - 03 lần so với không bổ sung. Điều này khẳng định sự tương tác lẫn nhau giữa môi trường và hàm lượng chất bổ sung 7a/7b ảnh hưởng lớn đến năng suất sản xuất protein mục tiêu. Nồng độ kháng thể của nghiệm thức ActiPro (1% 7a và 0.1% 7b) thu được cao nhất so với các nghiệm thức còn lại, đạt 2.674 ± 0.181 mg/ml. Trong khi đó, môi trường chứa tỉ lệ phần trăm chất bổ sung cao nhất (5% 7a và 0.5% 7b), nồng độ Trastuzumab chỉ đạt khoảng 1.668 ± 0.173 mg/ml, thấp hơn gần một nửa so với nồng độ cao nhất (Hình 4). Nguyên nhân có thể do nồng độ các chất dinh dưỡng được bổ sung vào ngày thứ 03 quá nhiều, tế bào hấp thụ và tăng sinh liên tục khi bắt đầu vào pha log, protein mục tiêu không được ưu tiên sản xuất và tích lũy, sau đó tế bào cũng nhanh đi vào pha suy tàn, một lượng lớn các chất giải phóng từ các tế bào chết cũng tác động và phân cắt protein mục tiêu trong dịch nuôi cấy.



Hình 4. Nồng độ trung bình Trastuzumab trong môi trường nuôi cấy

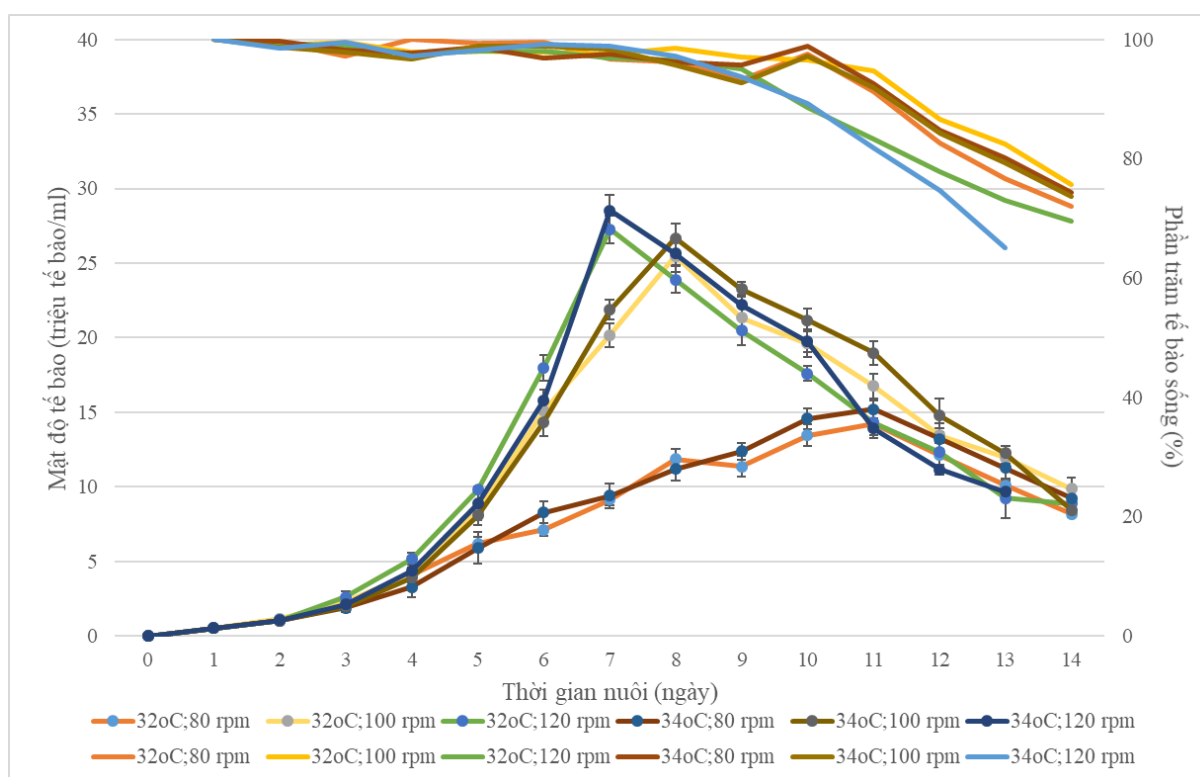
3.3. Khảo sát nhiệt độ cảm ứng biểu hiện protein và tốc độ lắng chai nuôi cấy

Sau khi tối ưu phần trăm chất bổ sung trong môi trường dinh dưỡng Actipro (1% Feed 7a và 0.1% Feed 7b), nhiệt độ và sự lắng/trộn trong nuôi cấy tiếp tục được khảo sát. Do tế bào CHO có nguồn gốc từ tế bào động vật hữu nhũ nên nhiệt độ dùng trong khảo sát thường nằm trong khoảng $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Tuy nhiên, ngoài nhiệm vụ tăng trưởng tốt, tế bào CHO còn phải thực hiện chức năng tổng hợp protein ngoại lai. Do đó, dựa vào đường cong tăng trưởng của tế bào, ta có thể chia thời gian nuôi cấy thành hai giai đoạn: tăng sinh và tổng hợp protein. Mật số cao nhất khi nuôi tế bào có bổ sung 1% Feed 7a và 0.1% Feed 7b đạt sau khi thêm chất bổ sung 03 ngày, sau đó tế bào đi vào pha ổn định từ ngày 08 đến ngày 12, sau đó tế bào đi vào pha suy tàn ngày 13 và 14. Một số nghiên cứu đã cho thấy việc giảm nhiệt độ nuôi cấy làm giảm sự phát triển của tế bào, kéo dài sự tồn tại và tăng kích thước tế bào, đồng thời nồng độ mRNA, hiệu giá protein tăng lên

(Mason, Sweeney, Cain, Stephens, & Sharfstein, 2014).

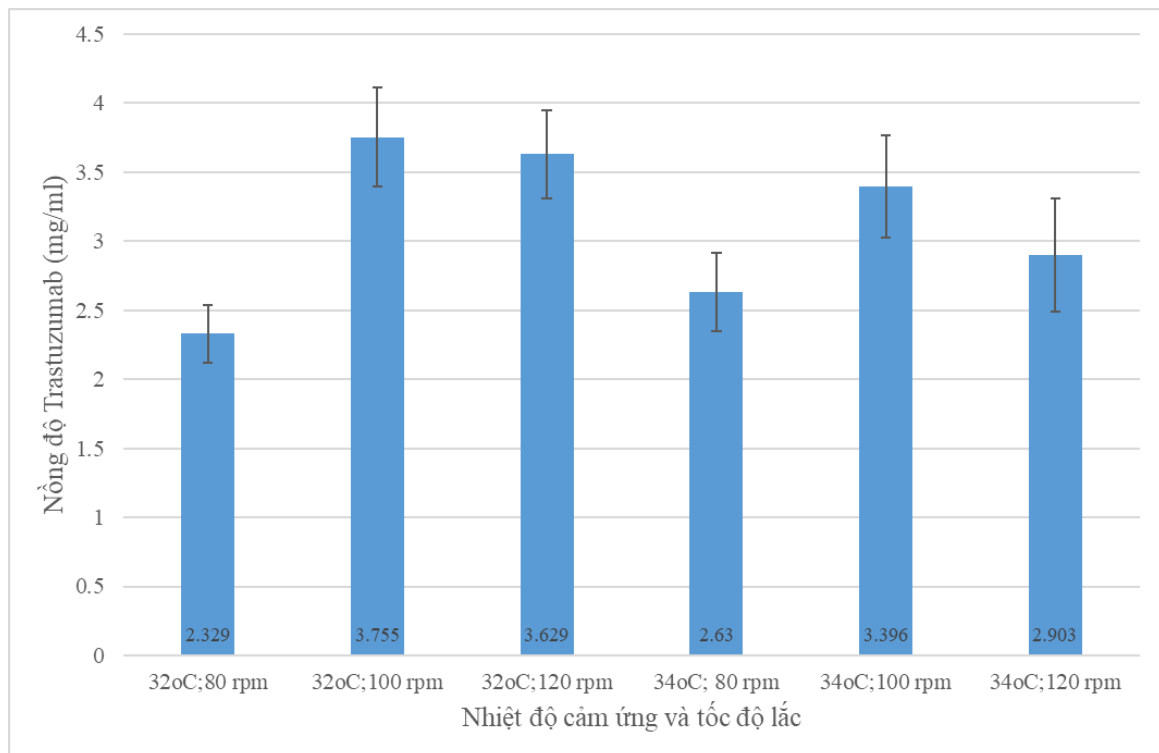
Khi lắc/trộn, dịch nuôi cấy sẽ được hòa trộn và khuếch tán oxy từ mặt thoáng vào chất lỏng, đảm bảo sự phân bố chất dinh dưỡng và tránh hiện tượng lắng/kết cặn tế bào. Trên lý thuyết, nếu tốc độ lắc quá thấp sẽ khiến lượng oxy hòa tan thấp (Dissolved Oxygen: DO) và không gian sống của tế bào giảm do tế bào phần lớn bị lắng xuống đáy chai nuôi cấy, từ đó tác động xấu đến khả năng sống của tế bào. Ngược lại, nếu tốc độ lắc quá cao, hiện tượng áp lực mặt phân cắt chất lỏng (shear sensitivity) xuất hiện và gây chết tế bào do biến dạng hay neurosis (Platas, Sandig, Pörtner, & Zeng, 2013).

Dòng tế bào CHO sản xuất Trastuzumab được nuôi cấy trong môi trường ActiPro bổ sung Cell Boost 7a/7b với nồng độ 1%/0.1% chia thành các nghiệm thức ma trận kết hợp giữa tốc độ lắc lần lượt là 80, 100, 120rpm với hai giá trị nhiệt độ cảm ứng biểu hiện protein là 32°C và 34°C. Kết quả khảo sát cho thấy, ở cả hai nhiệt độ cảm ứng với tốc độ lắc 80rpm, mật độ cao nhất của tế bào vào khoảng ngày 10 và có giá trị thấp nhất trong các nghiệm thức (32°C - 14.24 ± 0.73 triệu tế bào/mL và 34°C - 15.20 ± 0.70 triệu tế bào/mL). Tốc độ 80rpm có thể là giới hạn dưới đối với thể tích môi trường nuôi cấy 50mL khi nuôi trong chai thủy tinh 250mL. Trong các nghiệm thức còn lại, mật độ tế bào đều đạt trên 20 triệu tế bào/mL vào ngày 06 - 07, cụ thể ở nhiệt độ 32°C, mật độ cao nhất khi lắc 100rpm và 120rpm lần lượt là 25.49 ± 0.79 và 26.67 ± 0.67 triệu tế bào/mL sau 07 ngày nuôi cấy, trong khi đó, mật độ tế bào đạt cao nhất sau 06 ngày nuôi cấy với điều kiện nhiệt độ cảm ứng 34°C lần lượt là 27.25 ± 0.88 và 28.53 ± 0.76 triệu tế bào/mL. Mặc dù, tế bào đạt mật số cao nhất ở điều kiện nhiệt độ 34°C và lắc 120rpm so với các nghiệm thức còn lại, nhưng tỉ lệ sống chết giảm nhanh và dưới 70% vào ngày 12, trong khi các nghiệm thức còn lại đều kéo dài đến ngày 14. Do đó, tốc độ lắc 120rpm có thể là giới hạn trên của điều kiện nuôi cấy với nhiệt độ cảm ứng 34°C.



Hình 5. Đường cong tăng trưởng của tế bào trong môi trường nuôi cấy với các điều kiện nhiệt độ và tốc độ lắc khác nhau

Kết quả định lượng nồng độ Trastuzumab cho thấy, các nghiệm thức nuôi tế bào chuyển nhiệt độ từ 37°C sang 32°C vào ngày 05 cao hơn so với 34°C. Trong đó, hai nghiệm thức lắc ở 100 và 120rpm có nồng độ trastuzumab tích lũy trong dịch nuôi cấy cao hơn so với các nghiệm thức còn lại có giá trị lần lượt là 3.755 ± 0.36 và 3.629 ± 0.32 mg/ml. Đồng thời, do tốc độ tăng sinh và tỉ lệ phần trăm sống chết giữa hai nghiệm thức tương đương nhau, nên nhiệt độ cảm ứng 32°C và tốc độ lắc 100rpm được lựa chọn.



Hình 6. Nồng độ trung bình Trastuzumab trong môi trường nuôi cấy với các điều kiện nhiệt độ và tốc độ lắc khác nhau

4. Kết luận

Quy trình sản xuất Trastuzumab trên dòng tế bào CHO đã được khảo sát thành công và tìm ra được các nghiệm thức tối ưu cho việc tổng hợp kháng thể như sau: tế bào được nuôi cấy lắc 100rpm trong môi trường ActiPro có bổ sung chất dinh dưỡng Cell Boost 7a/7b (tỉ lệ 1:0.1%) hàng ngày từ ngày 03, nhiệt độ tăng sinh ban đầu là 37°C sau đó hạ xuống 32°C vào ngày thứ 05. Sau 14 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào đạt trên 25 triệu tế bào/ml và nồng độ Trastuzumab tích lũy gần 04g/L.

Tài liệu tham khảo

- Cytiva. (2017). *Scale-up of CHO cell fed-batch cultures in HyClone ActiPro medium supplemented with Cell Boost 7a and 7b*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-18209-original>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *The American Journal of Cancer Research*, 5(10), 2929-2943.
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *The New England Journal of Medicine*, 357(1), 39-51.

- Jenkins, C., Luu, M. N., Tran, A. T., Tran, N. T., Ngo, T. T., Kim, G. B., ... Murray, L. (2018). Breast cancer services in Vietnam: A scoping review. *Global Health Action*, 11(1), Article 1435344
- Lukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanislawek, A. (2021). Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-An updated review. *Cancers (Basel)*, 13(17), 4287-4307.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., & Sharfstein, S. T. (2014) Reduced culture temperature differentially affects expression and biophysical properties of monoclonal antibody variants. *Antibodies*, 3(3), 253-271.
- Masterton, R. J., & Smales, M. C. (2014). The impact of process temperature on mammalian cell lines and the implications for the production of recombinant proteins in CHO cell. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(1), 49-61.
- Owens, M. A., Horten, B. C., & Da Silva, M. M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clinical Breast Cancer*, 5(1), 63-69.
- Platas, O. B., Sandig, V., Pörtner, R., & Zeng, A.-P. (2013). Evaluation of process parameters in shake flasks for mammalian cell culture. *BMC Proceedings*, 7(Suppl 6), 1-3.
- Rita, D. S. (2020). Anti-ErbB2 immunotherapeutics: Struggling to make better antibodies for cancer therapy. *mAbs*, 12(1), Article 1725346.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A cancer Journal of Clinicians*, 71(3), 209-249.
- U.S. Food & Drug. (n.d.). *Biosimilar product information*. Truy cập ngày 10/10/2021 tại <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-product-information>

