

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP.HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

CHIẾN LƯỢC PHÁT TRIỂN DƯỢC SINH HỌC ỨNG DỤNG VÀO NGỪA VÀ CHỮA BỆNH DO VIRUS GÂY RA TRÊN GIA CẦM



Biên soạn: Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM

Với sự cộng tác của: TS. Nguyễn Quốc Bình

Trung tâm Công Nghệ Sinh Học TP.HCM

TP.Hồ Chí Minh, 05/2014

MỤC LỤC

I. TỔNG QUAN VỀ DƯỢC SINH HỌC	3
1. Lịch sử phát triển dược sinh học	3
2. Interferon	4
II. XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG DƯỢC SINH HỌC TRONG PHÒNG NGỪA VÀ CHỮA BỆNH CHO GIA CẦM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ..	6
1. Nghiên cứu và ứng dụng dược sinh học trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm.....	6
2. Nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm.....	8
2.1 Tình hình đăng ký sáng chế theo thời gian.....	8
2.2 Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế ở các quốc gia.....	9
2.3 Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC	10
III. INTERFERON GÀ TRONG CHĂN NUÔI – KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TẠI TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC TP.HỒ CHÍ MINH.....	15
1. Tạo inteferon alpha và gamma gà tái tổ hợp trên hệ thống <i>Pichia pastoris</i>	16
2. Interferon gà tăng tính kháng virus Gumboro trên gà.....	23
3. Interferon gà làm tăng khả năng đề kháng của vịt lên virus viêm gan vịt	25
TÀI LIỆU THAM KHẢO	28

CHIẾN LƯỢC PHÁT TRIỂN DƯỢC SINH HỌC ỨNG DỤNG VÀO NGỪA VÀ CHỮA BỆNH DO VIRUS GÂY RA TRÊN GIA CẦM

I. TỔNG QUAN VỀ DƯỢC SINH HỌC

1. Lịch sử phát triển dược sinh học:

Công nghệ sinh học hiện đại được cho là bắt đầu sau khi phát minh ra cấu trúc DNA và phát minh ra các enzyme cắt DNA (enzyme cắt giới hạn) vào đầu thập niên 50 - 70 của thế kỷ trước. Nhờ vào các công cụ đó mà công nghệ tái tổ hợp gen đã ra đời. Ứng dụng các công nghệ tái tổ hợp DNA vào các lĩnh vực khác nhau trong cuộc sống được cho là phát sinh của Công nghệ Sinh học theo định nghĩa mới. Công nghệ Sinh học mới đó có thể được hiểu như sau: Công nghệ Sinh học là Công nghệ tái tổ hợp gen (DNA, RNA Protein) kèm theo các công nghệ tế bào. Vậy Dược sinh học là gì: Đó là các dược chất sinh học như Protein (bao gồm cả kháng thể), Acid Nucleic (DNA, RNA, Oligonucleotid) sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán và được sản xuất không phải bằng cách ly trích từ nguồn tự nhiên. Hoặc nói một cách khác: các hoạt chất sinh học như Protein (bao gồm cả kháng thể), Acid Nucleic (DNA, RNA, Oligonucleotid) sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán và được sản xuất thông qua con đường Công nghệ sinh học.

Dược sinh học đầu tiên được sản xuất ra vào năm 1972 bởi Peter Lobban và cộng sự (Stanford University Medical School). Tuy nhiên bản quyền sản xuất dược sinh học đầu tiên- insulin được công ty Genentech sáng chế vào năm 1978, sau đó được chuyển giao cho công ty Eli Lilly. Tiếp theo insulin là hormone tăng trưởng dùng cho trẻ em chậm lớn. Chất này trước đây được ly trích từ các xác chết, sau đó vào năm 1981 được công ty Genentech sáng chế bằng con đường tái tổ hợp và thương mại vào năm 1987. Kể từ đó đến nay, số lượng các dược sinh học ngày càng tăng.

Những sản phẩm dược sinh học chính:

- ✓ Blood factors (Factor VIII and Factor IX)
- ✓ Thrombolytic agents (tissue plasminogen activator)
- ✓ Hormones (insulin, glucagon, growth hormone, gonadotrophins)
- ✓ Haematopoietic growth factors (Erythropoietin, colony stimulating factors)
- ✓ Interferons (Interferons- α , - β , - γ)
- ✓ Interleukin-based products (Interleukin-2)

- ✓ Vaccines (Hepatitis B surface antigen)
- ✓ Monoclonal antibodies (Various)
- ✓ Additional products (tumour necrosis factor, therapeutic enzymes)

Thị trường một số chất dược sinh học chính trên thế giới tăng hàng năm:

Insulin	12 Tỷ USD
Interferon alpha 2b	2.5 Tỷ USD
Interleukin	0.5 Tỷ USD
Somatropin	3.0 Tỷ USD
Human Growth Hormone	3.1 Tỷ USD
Tổng trị giá của các protein dược sinh học	ước tính 95 tỷ USD/2010

2. Interferon:

Một trong các dược sinh học đang được sử dụng rộng rãi sau insulin là interferon. Hàng năm, doanh thu của các loại interferon vào khoảng 2,5 tỷ USD. Interferon được xem là cứu cánh cho các bệnh nan y do virus gây ra. Ngày nay interferon còn cho là chất có thể ngăn ngừa một số bệnh ung thư.

Lịch sử phát hiện ra interferon được cho là do Yasu-ichi Nagano và Yasuhiko Kojima vào năm 1954. Hai tác giả này khi đang nghiên cứu sự nhân lên của virus trên thỏ đã tình cờ phát hiện là virus đã bị ức chế ở vùng da của thỏ đã được tiêm một loại virus chết khác trước đó. Giả thuyết là có một chất “interfer” (can thiệp) lên sự nhân lên của virus. Phát minh này đã được đăng trên tạp chí *Journal de la Société de Biologie*. Tuy nhiên nó ít được biết đến vì bài báo đăng trên tạp chí tiếng Pháp. Sau này có hai nhóm nghiên cứu độc lập khác là Alick Isaacs (người Anh), Jean Lindenmann (người Thụy sĩ) và nhóm của Monto Ho, in John Ender's năm 1957 làm trên trứng gà cũng cho kết quả tương tự và đặt tên cho hoạt chất đó là “Interferon” có nghĩa là “Interfering factor”. Từ đó chất gây ức chế nhân lên của virus được gọi là “Interferon”. Tuy nhiên mãi đến năm 1980, gen mã hóa cho interferon mới được nhân dòng và sau đó năm 1987 mới được sản xuất đại trà. Để làm tăng tính bền của interferon trong cơ thể bệnh nhân, năm 2002, PEG-interferon sản xuất bởi F. Hoffmann-La Roche đã được đưa ra thị trường và đã làm giảm đáng kể lần tiêm cho

bệnh nhân. Hiện tại công ty Nanogene của Việt Nam cũng đang sản xuất và thương mại sản phẩm tương tự.

Cơ chế hoạt động của Interferon được cho là tác động lên nhiều loại tế bào. Có thể tóm tắt hoạt động của interferon như sau:

- ✓ Khi tế bào bị chết do virus ly giải tế bào, tế bào đó tiết ra interferon.
- ✓ Những tế bào lân cận khi tiếp nhận interferon sẽ lập tức tiết ra một số lượng lớn enzyme (PKR-protein Kinase R). PKR làm giảm tổng hợp protein, phá hủy ARN của cả virus và của tế bào, giảm tổng hợp protein vì giảm ARN.
- ✓ Interferon sẽ làm tăng hoạt động của các genes (ISGs)—gene kháng viruses.
- ✓ Ngoài ra, interferon còn có thể làm giảm thiểu lây nhiễm của virus bằng cách tăng hoạt tính của protein p53 (mã hóa bởi gene tp53: tumor suppressor gene) protein này làm tăng apoptosis những tế bào bị nhiễm virus.
- ✓ Chức năng khác của interferons là tăng sự hiện diện của protein virus lên tế bào T, làm tăng khả năng miễn dịch toàn cơ thể.
- ✓ Interferons gamma hoạt hóa trực tiếp Immune cells, như Macrophages và Natural killer cells.

Dựa trên cơ chế hoạt động, interferon được chia làm 3 type. Trong đó type 1 được cho là loại ứng dụng nhiều nhất vào sản xuất.

Cấu trúc Interferon người



Interferon alpha 2b



Interferon alpha 2a

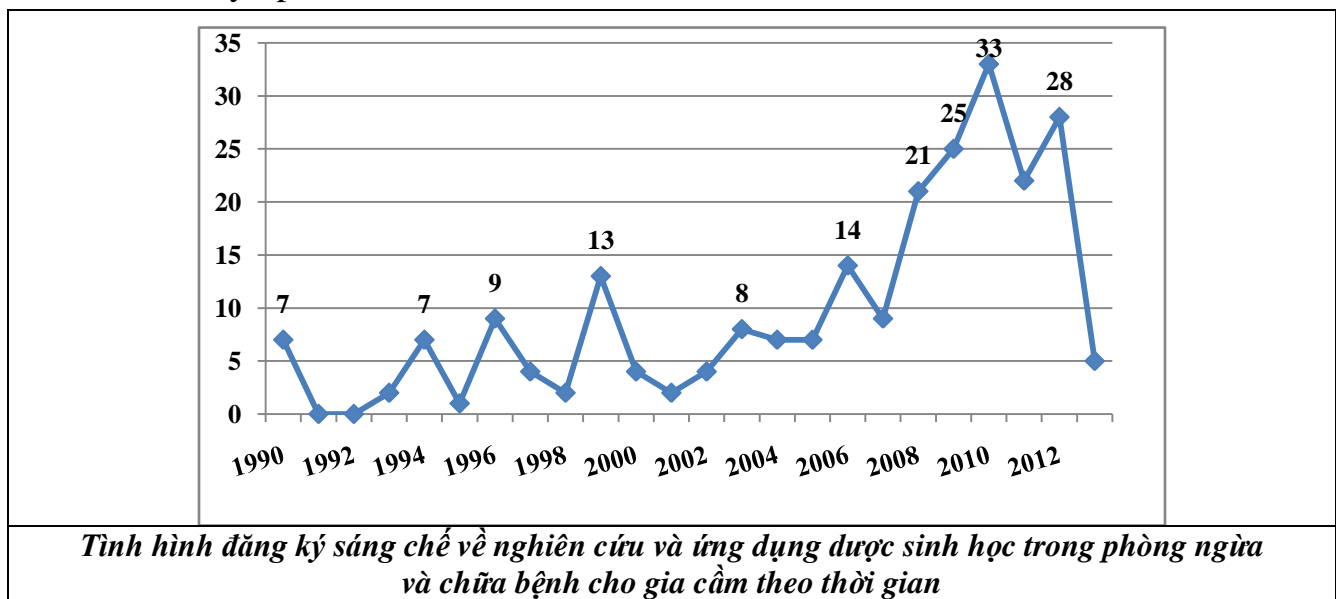


Interferon gamma

II. XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG DƯỢC SINH HỌC TRONG PHÒNG NGỪA VÀ CHỮA BỆNH CHO GIA CẦM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

1. Nghiên cứu và ứng dụng dược sinh học trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm

Dược sinh học có nhiều ứng dụng và sản phẩm trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm. Trong bài phân tích này, Trung tâm đề cập tới nhóm sản phẩm là các protein tổng hợp có khả năng kích thích miễn dịch cho gia cầm: cytokine, interferon, interleukine, lymphokine, chemokine.

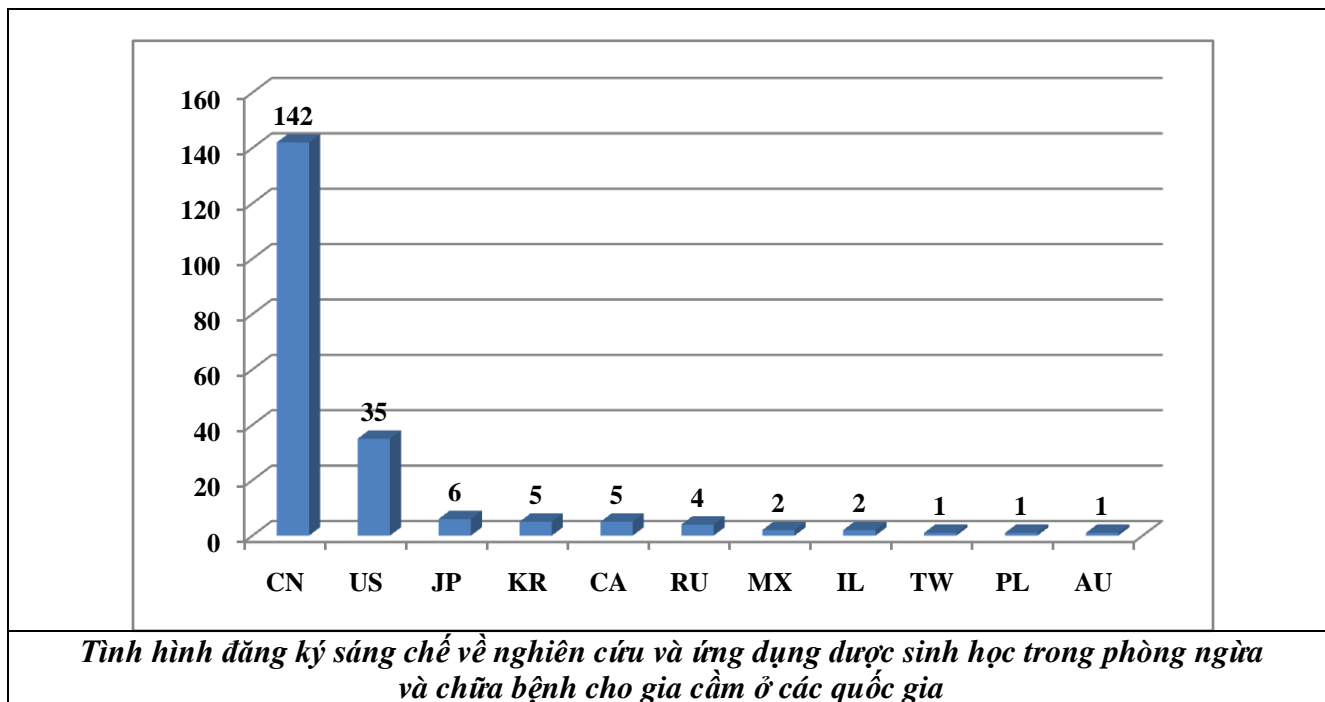


Theo nguồn thông tin tiếp cận được từ cơ sở dữ liệu Wipsglobal, đầu thập niên 90 đã có sáng chế đăng ký bảo hộ về việc nghiên cứu và sử dụng dược sinh học trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm. Các sáng chế này đề cập tới việc sử dụng interleukin để tăng cường sự phát triển cho các loài gia cầm, đặc biệt là gà. Từ năm 1990-2013: có khoảng 233 sáng chế đăng ký.

Theo thời gian, tình hình đăng ký sáng chế có nhiều biến động nhưng nhìn chung tăng dần theo thời gian, tăng mạnh trong giai đoạn 2008-2012.

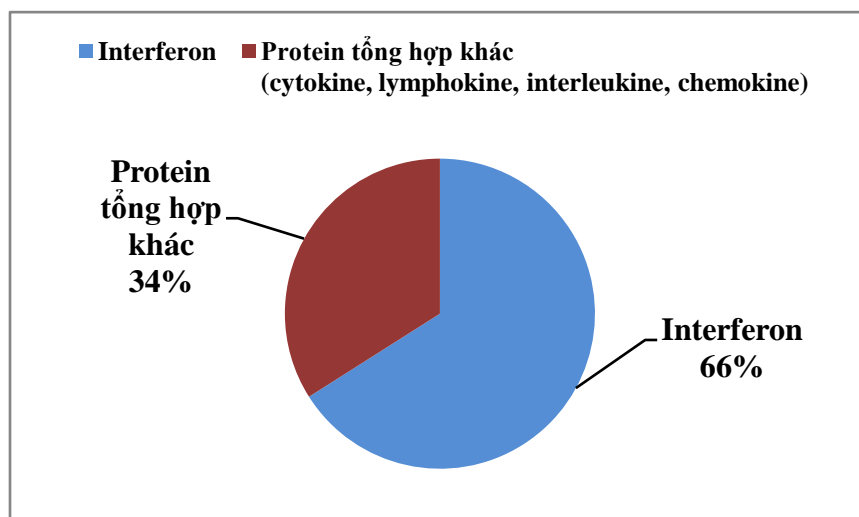
Hiện nay, sáng chế về nghiên cứu và sử dụng dược sinh học trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm được đăng ký bảo hộ ở:

- ✓ Tổ chức châu Âu – EP: 11 SC và tổ chức thế giới – WO: 18 SC
- ✓ 11 quốc gia: Trung Quốc (CN): 142 SC, Mỹ (US): 35 SC, Nhật (JP): 6 SC, Hàn Quốc (KR): 5 SC, Canada (CA): 5 SC, Nga (RU): 4 SC, Mexico (MX): 2 SC, Israel (IL): 2 SC, Đài Loan (TW): 1 SC, Ba Lan (PL): 1 SC và Úc (AU): 1 SC.



Trong nhóm các protein tổng hợp có khả năng kích thích miễn dịch cho gia cầm, như: cytokine, interferon, interleukine, lymphokine, chemokine:

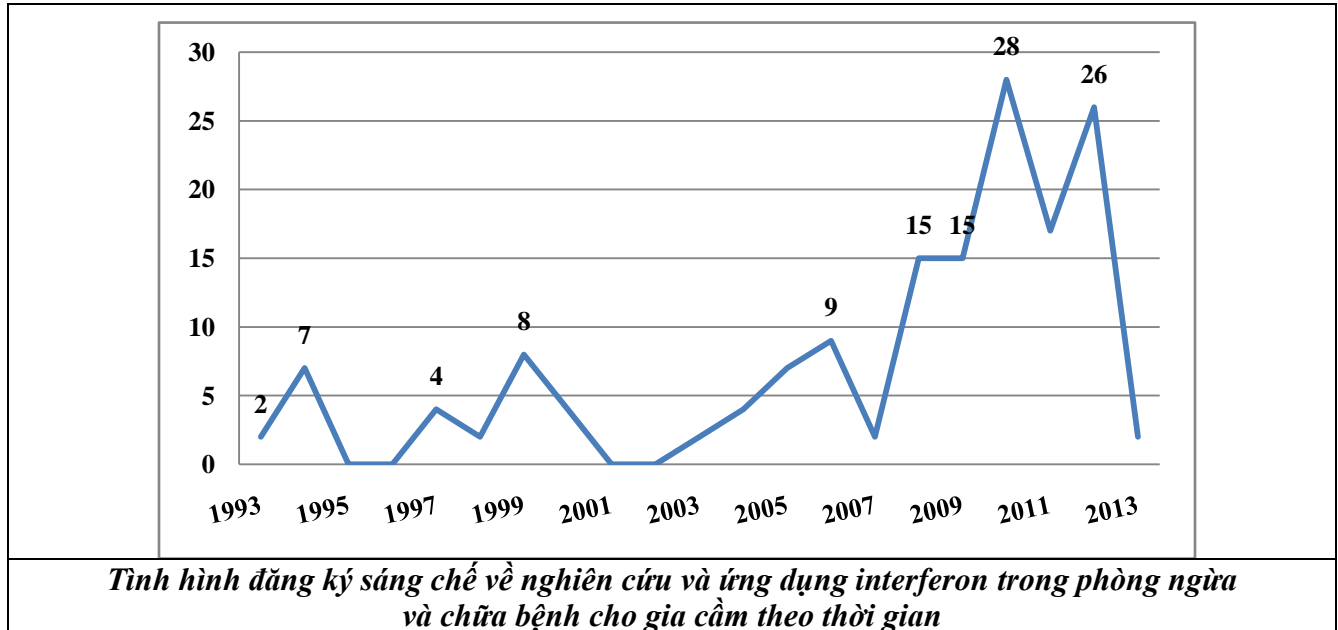
- ✓ Các sáng chế đăng ký về nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm chiếm 66% **trên tổng** lượng sáng chế về dược sinh học mà phía Trung tâm tiếp cận được.
- ✓ Các sáng chế đăng ký về nghiên cứu và ứng dụng các protein tổng hợp khác như: cytokine, interleukine, lymphokine, chemokine trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm chiếm 34% **trên tổng** lượng sáng chế về dược sinh học mà phía Trung tâm tiếp cận được.



2. Nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm

2.1 Tình hình đăng ký sáng chế theo thời gian:

Theo nguồn thông tin tiếp cận được từ cơ sở dữ liệu Wipsglobal, từ năm 1993 đã có sáng chế đăng ký về nghiên cứu interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm. Từ đó đến nay, có khoảng 154 sáng chế đã được đăng ký.

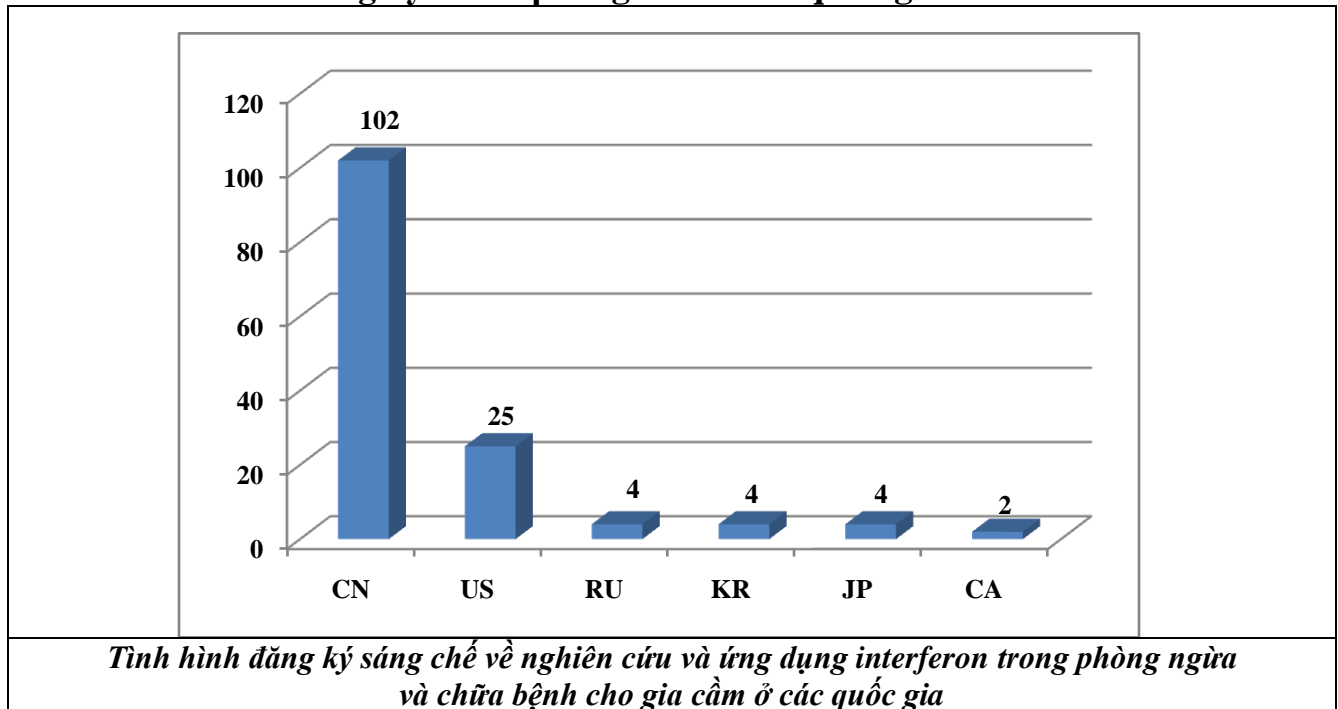


Sáng chế đầu tiên đăng ký bảo hộ ở Mỹ vào ngày 22/10/1993. Sáng chế đề cập tới một đoạn gen mã hóa interferon gà và phương pháp sản xuất chúng.

Theo đồ thị biểu diễn, có thể thấy lượng sáng chế tập trung nhiều từ năm 2008 cho đến nay, cụ thể như sau:

- ✓ Năm 1993-2007: có 51 sáng chế, trung bình mỗi năm có khoảng 3 sáng chế được đăng ký
- ✓ Năm 2008-2013: có 103 sáng chế, trung bình mỗi năm có khoảng 17 sáng chế được đăng ký, nhiều gấp khoảng 5 lần so với lượng sáng chế trung bình trong giai đoạn trước.
- ✓ Lượng sáng chế tập trung nhiều trong 2 năm: năm 2010 (28 SC), năm 2012 (26 SC)

2.2 Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế ở các quốc gia:



Hiện nay, sáng chế về nghiên cứu và sử dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm được đăng ký bảo hộ ở:

- ✓ Tổ chức châu Âu – EP: 4 sáng chế và tổ chức thế giới – WO: 8 sáng chế
- ✓ 6 quốc gia: Trung Quốc (CN): 102 sáng chế, Mỹ (US): 25 sáng chế, Nga (RU): 4 sáng chế, Hàn Quốc (KR): 4 sáng chế, Nhật (JP): 4 sáng chế và Canada (CA): 2 sáng chế

Theo bảng số liệu dưới đây, sáng chế đầu tiên về nghiên cứu và sử dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh gia cầm được đăng ký bảo hộ ở Mỹ (năm 1993). Đến năm 1994 có 2 sáng chế được đăng ký bảo hộ ở Nga và Canada.

Trong 10 năm gần đây, sáng chế về interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh gia cầm mới bắt đầu đăng ký bảo hộ ở các quốc gia khu vực châu Á:

- ✓ Năm 2004: có sáng chế đăng ký bảo hộ đầu tiên ở Trung Quốc
- ✓ Năm 2006: có sáng chế đăng ký bảo hộ đầu tiên ở Nhật
- ✓ Năm 2009: có sáng chế đăng ký bảo hộ đầu tiên ở Hàn Quốc

Nơi đăng ký bảo hộ	Sáng chế đầu tiên đăng ký
Mỹ	1993
Nga	1994
Canada	1994
Trung Quốc	2004
Nhật	2006
Hàn Quốc	2009

Bảng số liệu: tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế ở các quốc gia theo thời gian (1993-2013)

Nhìn chung, lượng sáng chế đăng ký bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm ở các quốc gia có đặc điểm như sau:

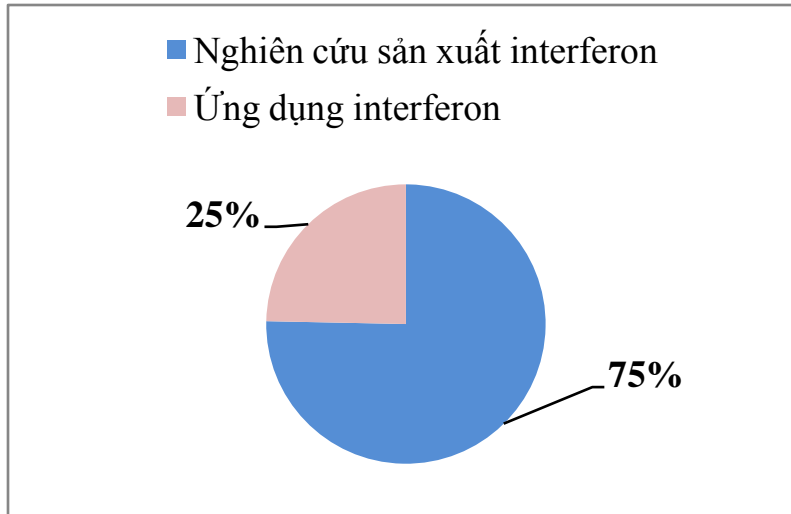
- ✓ Sáng chế đăng ký bảo hộ ở khu vực châu Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật) tập trung nhiều trong giai đoạn 5 năm gần đây (2008-2013)
- ✓ Sáng chế đăng ký bảo hộ ở Canada, Nga và Mỹ tập trung nhiều trong giai đoạn 1993-2002.

2.3 Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC

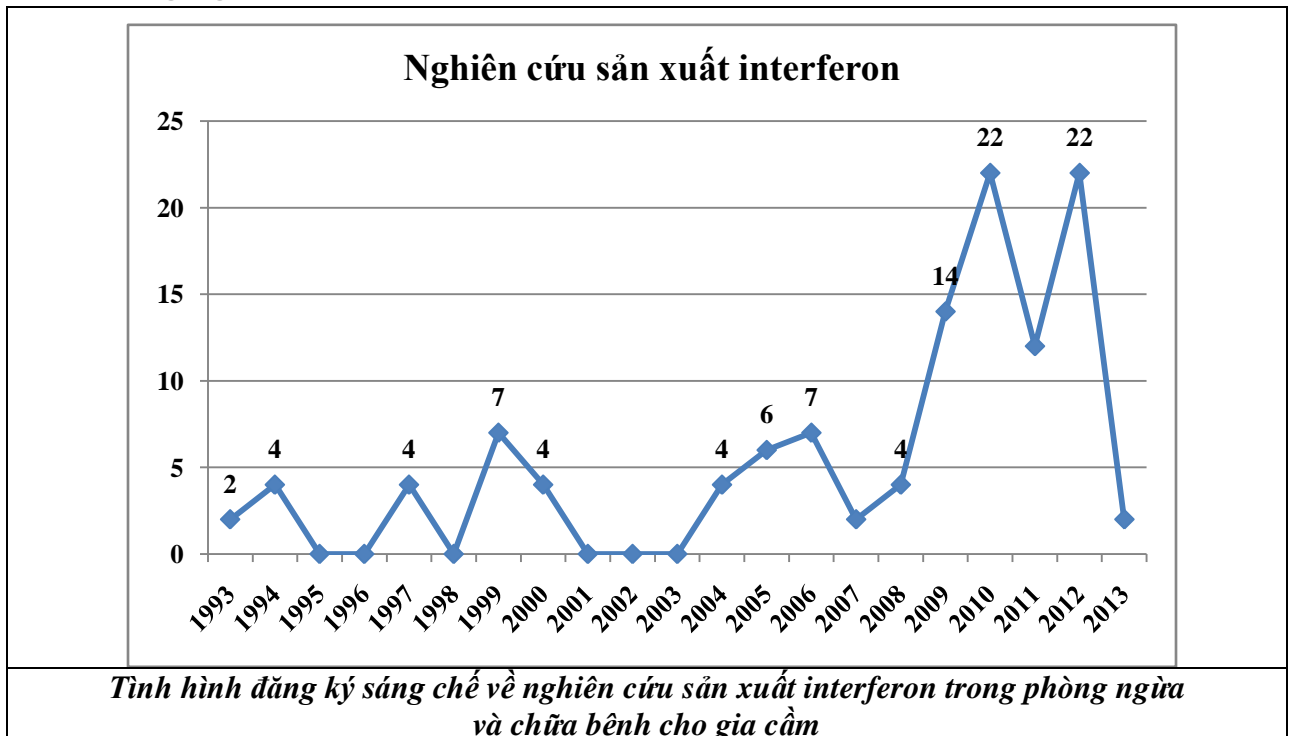
	CA	CN	JP	KR	RU	US
Giai đoạn 1993-1997	50%	0%	0%	0%	25%	32%
Giai đoạn 1998-2002	50%	0%	0%	0%	25%	36%
Giai đoạn 2003-2007	0%	11%	50%	0%	25%	24%
Giai đoạn 2008-2013	0%	89%	50%	100%	25%	8%

Với 154 sáng chế về phía Trung tâm tiếp cận được, khi đưa vào bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC (International Patent Classification), nhận thấy:

- ✓ 25% lượng sáng chế thuộc hướng nghiên cứu ứng dụng interferon
- ✓ 75% lượng sáng chế thuộc hướng nghiên cứu sản xuất interferon



A. Hướng nghiên cứu sản xuất interferon:



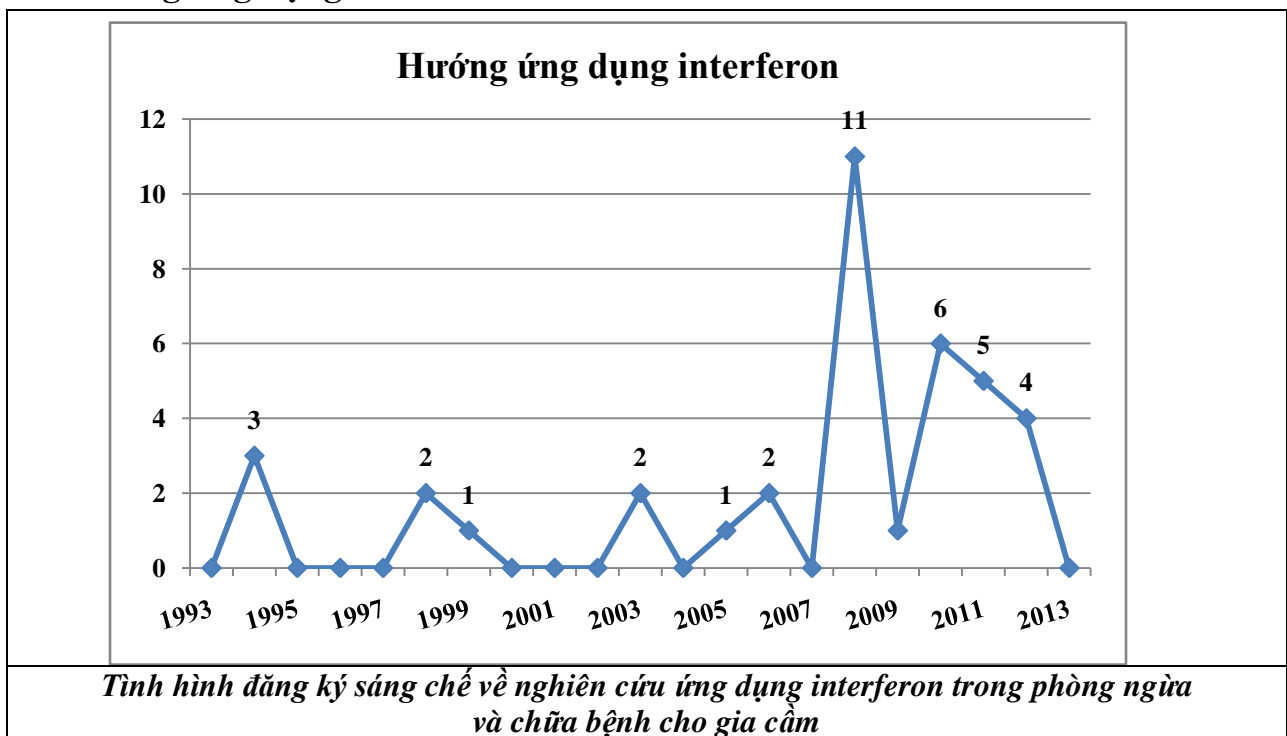
Hướng nghiên cứu sản xuất interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm bắt đầu có sáng chế đăng ký bảo hộ vào năm 1993. Theo thời gian tình hình đăng

ký sáng chế có nhiều biến động, tăng giảm qua các năm, tập trung nhiều trong vòng 5 năm gần đây.

Các sáng chế tập trung nhiều vào:

- ✓ Công nghệ vi sinh tái tổ hợp để sản xuất interferon, quan tâm tới phương pháp nhân giống, tạo đột biến, kỹ thuật di truyền, Sáng chế thuộc hướng nghiên cứu này được đăng ký bảo hộ ở 6 quốc gia: Mỹ, Nga, Canada, Trung Quốc, Nhật, Hàn Quốc.
- ✓ Phương pháp lên men, môi trường lên men để thu sinh khối, tách chiết interferon. Sáng chế thuộc hướng nghiên cứu này được đăng ký bảo hộ ở Trung Quốc và Mỹ.

B. Hướng ứng dụng interferon:



Có 38 sáng chế đăng ký bảo hộ thuộc hướng nghiên cứu ứng dụng interferon trong phòng và chữa bệnh cho gia cầm. Năm 1994 có sáng chế đầu tiên đăng ký bảo hộ, lượng sáng chế tập trung nhiều vào năm 2008 (11 sáng chế).

Lượng sáng chế về nghiên cứu ứng dụng interferon trong phòng và chữa bệnh cho gia cầm được đăng ký bảo hộ ở 5 quốc gia: Mỹ, Nga, Trung Quốc, Nhật, Hàn Quốc.

❖ **Ở Trung Quốc:**

Năm	Sáng chế đăng ký bảo hộ
2005	Interferon bạch cầu điều trị cúm gia cầm, viêm phế quản
2008	Alpha interferon điều trị bệnh tiêu chảy, viêm ruột do rotavirus gà gây ra
2010	Đưa alpha interferon vào thức ăn làm tăng khả năng miễn dịch cho gia cầm

❖ **Ở Hàn Quốc, Nhật, Nga:** các sáng chế đăng ký bảo hộ tập trung về phòng và trị bệnh cúm gia cầm

❖ **Ở Mỹ:**

Năm	Sáng chế đăng ký bảo hộ
1994	Sử dụng interferon để điều trị bệnh nhiễm trùng cho gia cầm. Bên cạnh đó, interferon gà cũng được sử dụng để chủng ngừa bệnh cho bầy chim qua phương pháp phun xịt
1999	Ứng dụng interferon gamma tái tổ hợp để tăng khả năng miễn dịch cho loài chim, thúc đẩy tăng trưởng và điều trị bệnh nhiễm cầu trùng (coccidiosis) ở loài chim

Giới thiệu một số sáng chế nghiên cứu về inteferon trên thế giới

STT	Số sáng chế	Tên sáng chế	Ngày nộp đơn
Sáng chế về nghiên cứu sản xuất interferon vịt			
1	CN001861796	Quá trình chuẩn bị alpha-interferon vịt, biểu hiện gen trên Ecoli và tế bào côn trùng	13/05/2005
2	CN101870976	Tổng hợp gen alpha-interferon và biểu hiện	16/03/2010

		protein	
3	CN102899331	alpha-interferon vịt và vector tái tổ hợp	25/09/2012
4	CN101899446	Phương pháp tái tổ hợp alpha-interferon vịt	08/02/2010
Sáng chế về nghiên cứu sản xuất interferon gamma gà			
1	CN102250919	Gamma interferon gà làm giảm độc dược của Salmonella	31/05/2011
2	CN102978214	Gamma interferon gà, kỹ thuật tái tổ hợp và ứng dụng của chúng	30/08/2011
3	CN102964443	Xây dựng và phương pháp sản xuất của vector tái tổ hợp Gamma interferon gà	13/12/2012
Sáng chế về nghiên cứu sản xuất interferon alpha gà			
1	CN102108096	Phương pháp sản xuất alpha-interferon gà hóa trị II	25/12/2009
2	CN001594568	Phương pháp sản xuất alpha-interferon gà và vector tái tổ hợp	24/06/2004
3	CN102961334	Phương pháp sản xuất alpha-interferon gà ổn định - Ứng dụng đưa vào phun xịt chuồng trại	11/12/2012
4	CN102041263	Alpha interferon/interleukin gà	08/02/2010
Sáng chế về các ứng dụng interferon			
1	CN101785535	Thức ăn gia súc có chứa alpha interferon gà	08/04/2010
2	US5885567	Điều trị bệnh nhiễm trùng cho gia cầm thông qua đường uống bằng protein interferon gia cầm	19/09/1994
3	RU2398596	Phương pháp phòng ngừa và điều trị các bệnh gây ra bởi virus cúm gia cầm H5N1 bằng việc sử dụng interferon và chất ức chế neuraminidase	24/09/2008
4	KR2012-0098351	Interferon, một thành phần để ngăn ngừa cúm gia cầm	28/02/2011
5	CN101417122	Phương pháp điều chế alpha-interferon gà tái tổ hợp và ứng dụng tiêm chủng cho gà	04/12/2008

NHẬN XÉT:

Trong nhóm các sáng chế về protein tổng hợp có khả năng kích thích miễn dịch cho gia cầm mà Trung tâm tiếp cận được, hướng nghiên cứu sản xuất và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm là hướng nghiên cứu có nhiều sáng chế đăng ký bảo hộ.

Từ năm 1993 đến nay, sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm được đăng ký bảo hộ ở 6 quốc gia và trong 10 năm gần đây mới bắt đầu đăng ký bảo hộ ở khu vực châu Á.

Phần lớn các sáng chế đăng ký bảo hộ tập trung vào hướng nghiên cứu sản xuất interferon, chiếm 75%; hướng nghiên cứu ứng dụng interferon chỉ chiếm 25%. Trong hướng nghiên cứu sản xuất interferon, đa phần các sáng chế đều có nghiên cứu liên quan đến công nghệ vi sinh tái tổ hợp để sản xuất interferon, chiếm khoảng 70% trên tổng lượng sáng chế về nghiên cứu sản xuất interferon trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm.

III. INTERFERON GÀ TRONG CHĂN NUÔI – KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TẠI TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC TP.HỒ CHÍ MINH

Tác dụng ngừa và chữa bệnh do virus gây ra của interferon đã được áp dụng rộng rãi trong chăn nuôi. Interferon gà là một trong những sản phẩm được nghiên cứu và sản xuất nhiều nhất để ứng dụng trong chăn nuôi. Trong thời gian gần đây, hàng loạt sáng chế ứng dụng interferon trong chăn nuôi đã được đăng ký nhiều ở Trung Quốc. Nổi bật trong các ứng dụng interferon gà trong chăn nuôi là sử dụng interferon nhằm kháng bệnh nói chung cho gà và sử dụng interferon gamma làm tăng trọng gà. Đây là hướng mà các nước đang hướng tới nhằm giảm thiểu sử dụng kháng sinh và thuốc tăng trọng trong chăn nuôi. Mặt khác, với sự gia tăng các dòng virus cúm gia cầm mới hàng năm, việc sử dụng kết hợp vaccine và interferon có thể làm giảm thiểu sự bùng phát các đại dịch do cúm gia cầm gây ra.

Việt Nam, trong xu thế hội nhập, cần nhanh chóng phát triển ngành công nghệ này nhằm đưa công nghiệp chăn nuôi lên tầm thế giới. Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã triển khai hướng nghiên cứu này. Chúng tôi tóm lược sau đây các kết quả nghiên cứu về interferon của Trung tâm CNSH TP.HCM đồng thời đưa ra các hướng ứng dụng tiềm năng của dược sinh học này vào trong phát triển ngành chăn nuôi của nước ta.

1. Tạo inteferon alpha và gamma gà tái tổ hợp trên hệ thống *Pichia pastoris*:

Hai loại interferon gà được chúng tôi nhân dòng, chuyển nạp vào nấm men *Pichia pastoris*. Các dòng vi khuẩn chuyển gen đã có thể sản xuất ra một lượng interferon ngoại bào ở mức cao; khoảng 1g inteferon/lit môi trường. Interferon chỉ cần qua sơ chế là có thể sử dụng một cách an toàn, giá thành sản xuất thấp.

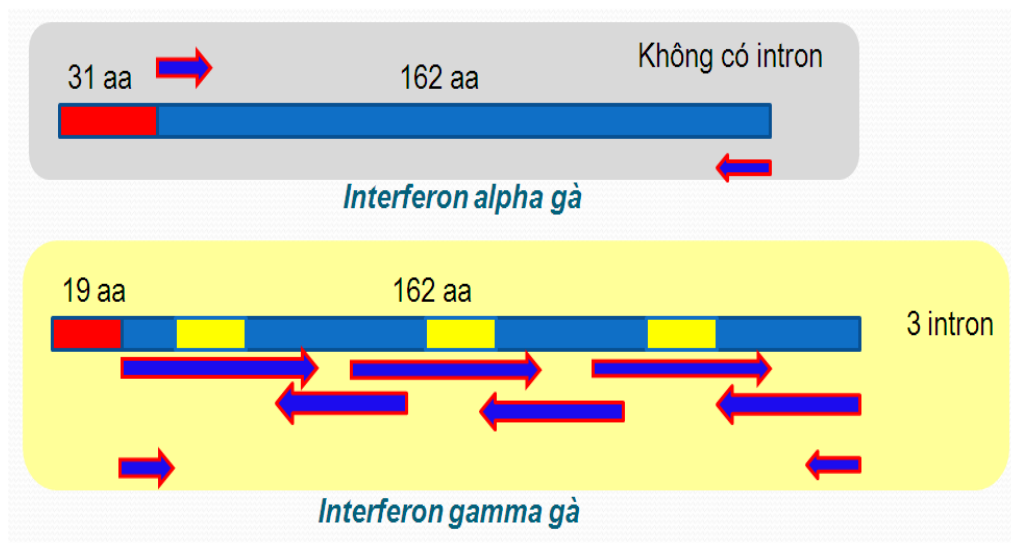
a. Lựa chọn hệ thống biểu hiện recombinant ChIFN: một số hệ thống được đưa ra so sánh và xem xét:

- ✓ **Ecoli:** có khả năng tái cấu trúc, sản xuất lại cấu trúc (refolding) trong ống nghiệm / có nguy cơ nội độc tố.
- ✓ **COS, Baculovirus:** sản xuất protein ở mức thấp / có khả năng nhiễm virus từ động vật
- ✓ **Lettuce:** sản xuất protein ở mức thấp / hoạt tính kháng virus là không rõ ràng trong cơ thể
- ✓ ***Pichia pastoris*:** nấm men không độc, gần với cơ thể người, tỷ lệ lên men với hiệu suất cao

→ Lựa chọn hệ thống nấm men *Pichia pastoris* để tạo inteferon alpha và gamma gà tái tổ hợp

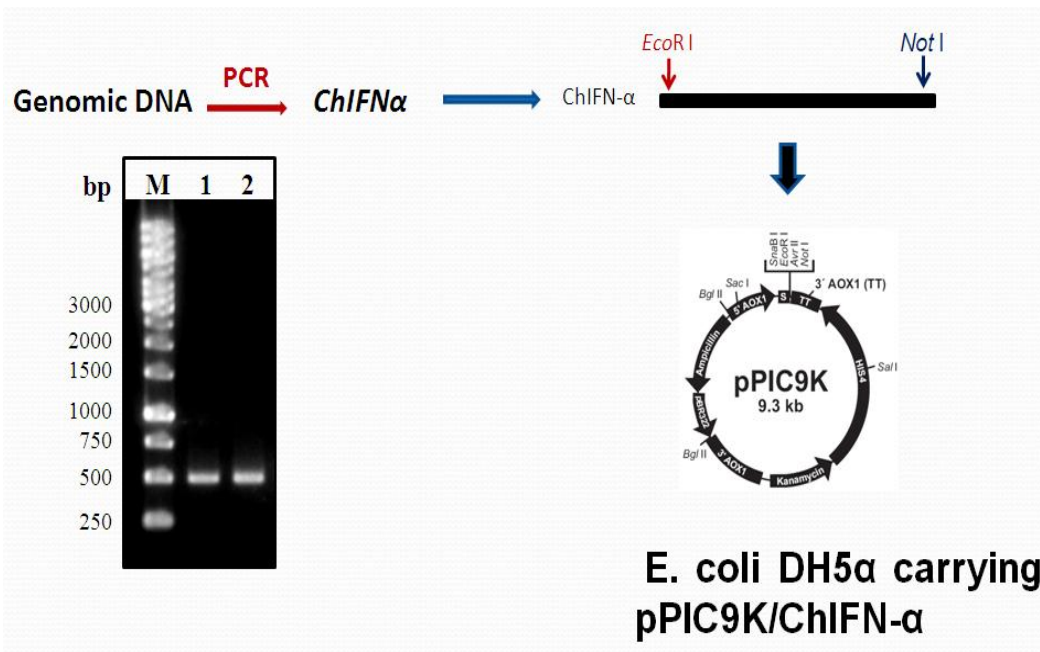
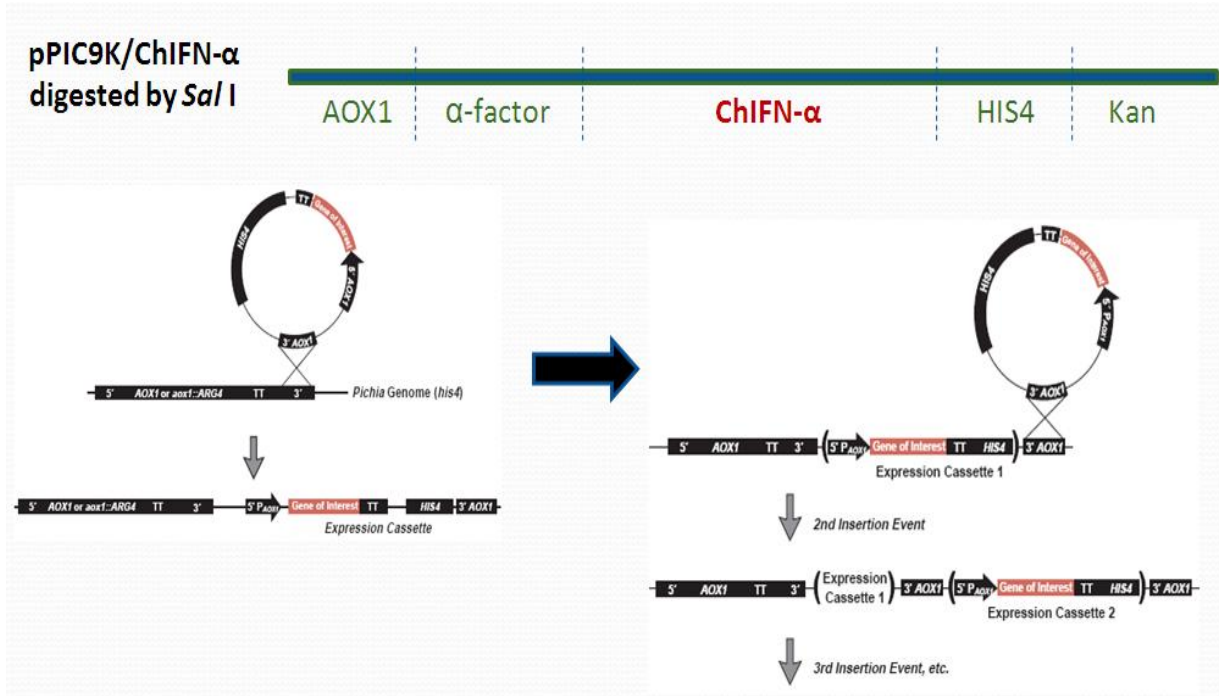
b. Nhân dòng và biểu hiện interferon gà trên hệ thống *pichia pastoris*

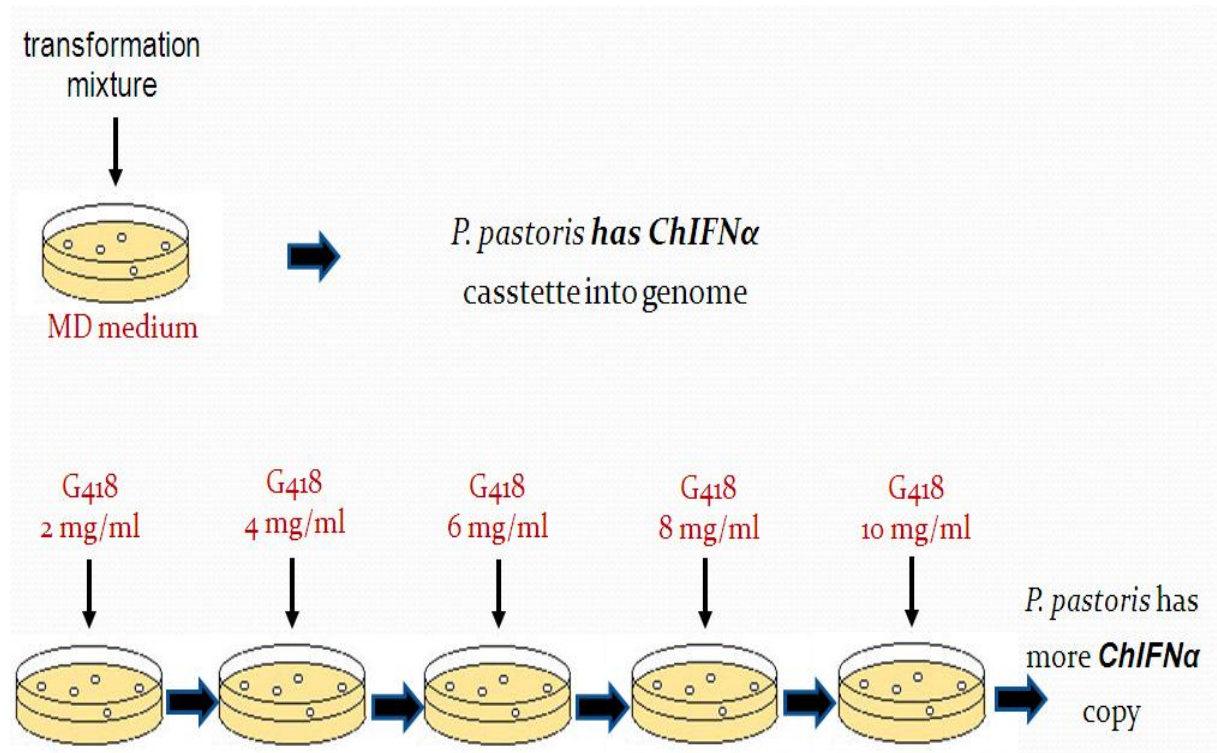
Nhân dòng interferon gà:



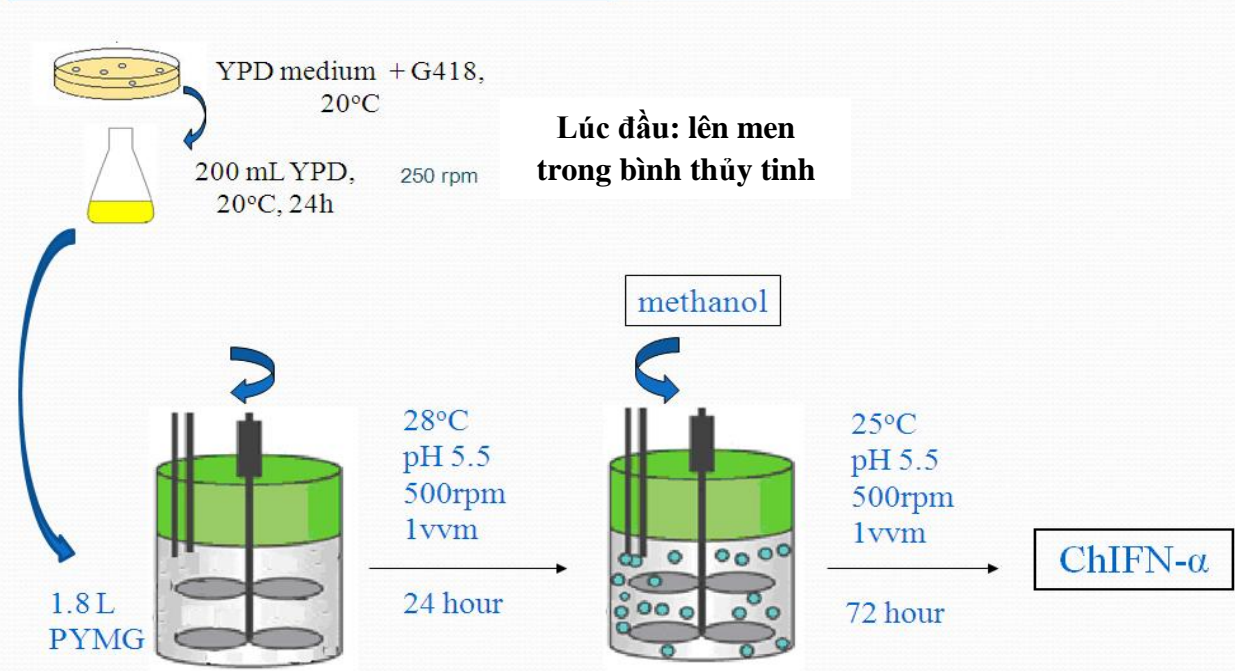
Gen Interferon alpha được nhân lên từ DNA genomic, còn gamma được tổng hợp từ các cặp môi overlap

Biểu hiện interferon gà trên hệ thống *pichia pastoris*:



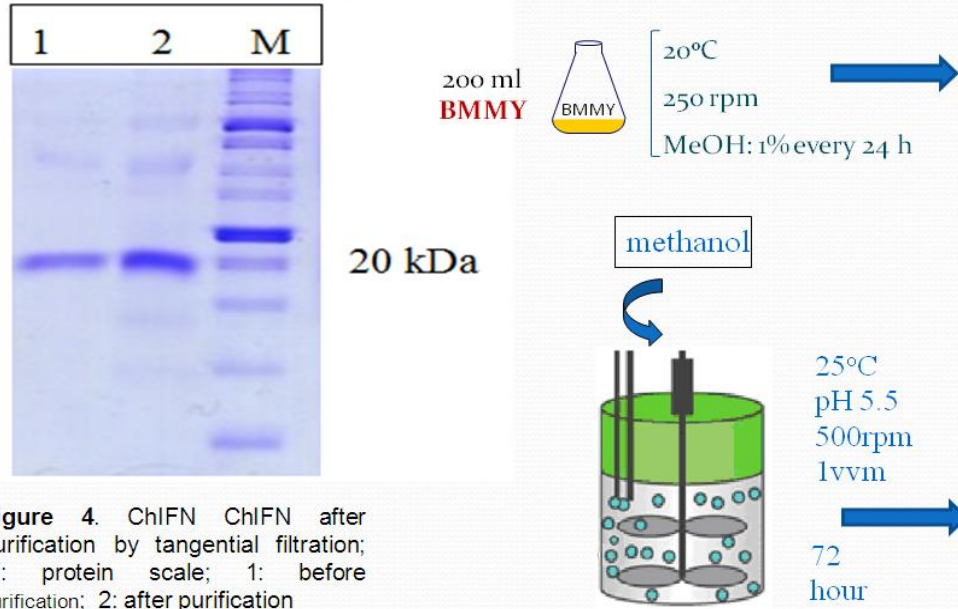


❖ rChIFN- α expression by *Pichia pastoris*



Sau đó: chuyển sang hệ thống lên men

❖ rChIFN- α and γ expression by *Pichia pastoris*



c. Quy trình sản xuất interferon đơn giản:

Sản xuất Interferon cho gia cầm yêu cầu phải có quy trình đơn giản, giá thành rẻ mới đáp ứng được nhu cầu của thực tiễn và đưa vào sản xuất ở quy mô công nghiệp. Chính vì lý do đó, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM đã thiết lập một quy trình sản xuất Interferon gồm 3 bước đơn giản nhưng vẫn đảm bảo chất lượng sản phẩm

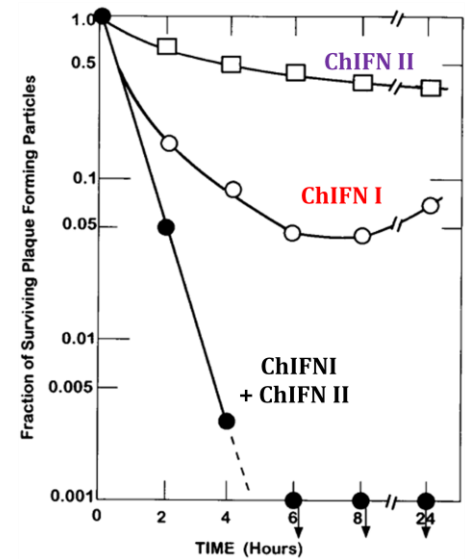
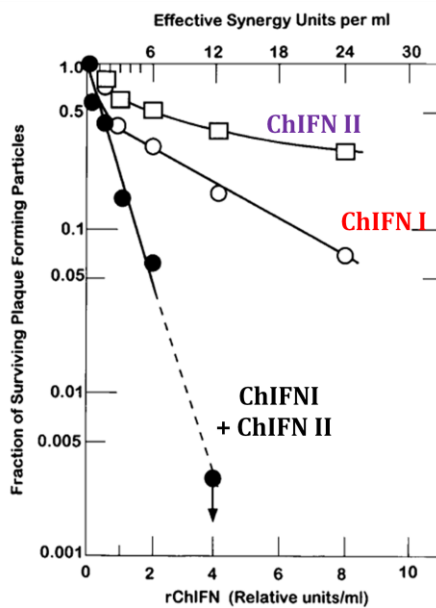
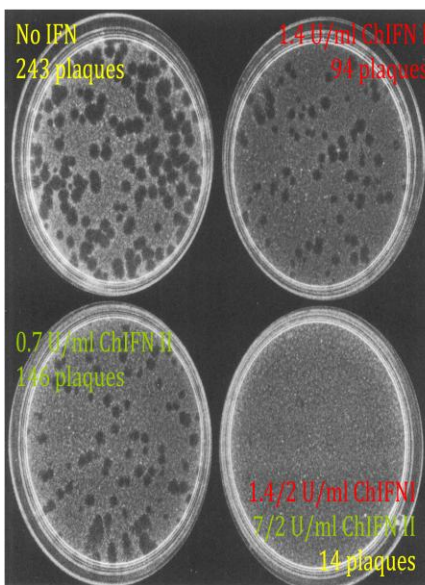
- ✓ Bước 1: lên men trong hệ thống
- ✓ Bước 2: Ly tâm thu dịch nổi
- ✓ Bước 3: Lọc tiếp tuyến: loại bỏ tạp chất. Lúc này, interferon đã đủ điều kiện để sử dụng cho gia súc, gia cầm.



d. Thử nghiệm trên tế bào – Điều trị bệnh cúm gia cầm bằng ChIFN:

Sau khi đã có interferon thực nghiệm, bước tiếp theo phải đem đi kiểm tra hiệu quả của interferon với các tế bào nhiễm virus.

Sử dụng các đĩa petri nuôi tế bào nhiễm virus, sau đó giữ lại 1 đĩa petri làm mẫu đối chứng, các đĩa còn lại cho thử nghiệm với 2 interferon ở các nồng độ khác nhau (ChIFN type I + ChIFN type II để tăng cường hoạt tính kháng virus). Kết quả nhận thấy: các đĩa petri có sử dụng interferon thì số lượng tế bào chết giảm hơn so với đĩa petri đối chứng (không sử dụng interferon) → đây được xem là bước thử nghiệm sơ bộ.



e. Thử nghiệm độc tố sản phẩm của rChIFN- α trên tế bào sơ phôi gà:

Sau khi thử nghiệm sơ bộ, sẽ tiến hành tiếp tục thử nghiệm interferon trên tế bào sơ phôi gà. Pha loãng dịch interferon ở các nồng độ khác nhau: 2.09 $\mu\text{g/ml}$, 4.19 $\mu\text{g/ml}$, 8.38 $\mu\text{g/ml}$, 16.75 $\mu\text{g/ml}$, 33.5 $\mu\text{g/ml}$, 67 $\mu\text{g/ml}$.

Điều trị interferon trên tế bào sơ phôi gà, sau 72h nhận thấy:

- ✓ Ở nồng độ 67 $\mu\text{g/ml}$ rChIFN- α , các tế bào tách ra khỏi bề mặt bình và hầu như tất cả các tế bào đã chết, OD620 được ghi nhận là 0.114, tương ứng với 15% tế bào sống.
- ✓ Khi xử lý với nồng độ thấp hơn: 33,5 $\mu\text{g/ml}$ rChIFN- α , nhận thấy số lượng các tế bào chết giảm và số lượng tế bào sống tăng lên.

✓ Kết quả cho thấy rChIFN- α không biểu hiện bất kỳ tác dụng gây độc tế bào nào với một liều sử dụng thấp hơn 16,75 $\mu\text{g/ml}$, không có một sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng.

rChIFN- α ($\mu\text{g/ml}$)	OD ₆₂₀ (\pm SD)	Living cells (%)
67 (134/2)	0.114 \pm 0.015	15
33.5 (134/4)	0.242 \pm 0.004	32
16.75 (134/8)	0.723 \pm 0.027	96
8.38 (134/16)	0.725 \pm 0.13	98
4.19 (134/32)	0.732 \pm 0.018	96
2.09 (134/64)	0,731 \pm 0.08	96
Control	0,745 \pm 0,004	100

f. Thử nghiệm hiệu ứng kháng virus của rChIFN- α trên nguyên bào sợi phôi gà:

Sau khi xác định được dịch interferon từ nồng độ 16,75 $\mu\text{g/ml}$ trở xuống không gây độc tế bào, nhóm nghiên cứu tiếp tục thử nghiệm với các nồng độ thấp hơn 16,75 $\mu\text{g/ml}$ trên tế bào nhiễm 2 loại virus: virus cúm (Newcastle disease virus) và virus gây bệnh tiêu chảy (Infectious bursal disease virus).

Kết quả nhận thấy: ở nồng độ 1.34 $\mu\text{g/ml}$ và 13.4 $\mu\text{g/ml}$ có hiệu quả tốt, tỷ lệ tế bào sống cao:

- ✓ Ở nồng độ 1.34 $\mu\text{g/ml}$: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là 90 \pm 4.9 %, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là 88 \pm 1.7 %
- ✓ Ở nồng độ 13.4 $\mu\text{g/ml}$: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là 90 \pm 5.0 %, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là 85 \pm 4.8 %

Groups	Newcatle disease virus			Infectious bursal disease virus		
	OD ₆₂₀	Living cell (%)	RPS (%)	OD ₆₂₀	Living cell (%)	RPS (%)
0.0134 µg	0.268 ± 0.012	34 ± 2.6	10	0.252 ± 0.005	31 ± 0.6	- 5
rChIFN-α 0.134 µg	0.414 ± 0.014	52 ± 2.8	35	0.413 ± 0.025	50 ± 3.2	24
1.34 µg	0.710 ± 0.018	90 ± 4.9	86	0.717 ± 0.012	88 ± 1.7	81
13.4 µg	0.709 ± 0.016	90 ± 5.0	86	0.695 ± 0.041	85 ± 4.8	77
virus control	0.212 ± 0.035	27 ± 3.0		0.278 ± 0.009	34 ± 1.1	
cell control	0.791 ± 0.016	100 ± 0.0		0.818 ± 0.008	100 ± 0.0	

Sau 2h nhiễm virus, xử lý interferon để điều trị, tỷ lệ tế bào sống vẫn ở mức cao :

✓ Ở nồng độ 1.34 µg/ml: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là 81 ± 8.0 %, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là 82 ± 3.1 %

✓ Ở nồng độ 13.4 µg/ml: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là 69 ± 7.6 %, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là 81 ± 2.1 %

2h

Groups	Newcatle disease virus			Infectious bursal disease virus		
	OD ₆₂₀	Living cells (%)	RPS (%)	OD ₆₂₀	Living cells (%)	RPS (%)
0.0134 µg	0.281 ± 0.060	36 ± 10.5	6	0.233 ± 0.013	32 ± 2.3	- 2.6
rChIFN-α 0.134 µg	0.407 ± 0.031	51 ± 5.4	28	0.324 ± 0.013	44 ± 1.9	16
1.34 µg	0.642 ± 0.035	81 ± 8.0	72	0.603 ± 0.013	82 ± 3.1	73
13.4 µg	0.546 ± 0.059	69 ± 7.6	54	0.593 ± 0.013	81 ± 2.1	71
virus control	0.255 ± 0.024	32 ± 3.4		0.246 ± 0.008	34 ± 1.5	
cell control	0.794 ± 0.060	100 ± 0.0		0.734 ± 0.017	100 ± 0.0	

Sau 24h nhiễm virus, xử lý interferon để điều trị, nhận thấy vẫn có hiệu quả:

✓ Ở nồng độ 1.34 $\mu\text{g/ml}$: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là $90 \pm 14.7 \%$, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là $79 \pm 7.8 \%$

✓ Ở nồng độ 13.4 $\mu\text{g/ml}$: tỷ lệ tế bào nhiễm virus cúm sống sót là $86 \pm 3.2 \%$, tỷ lệ tế bào nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy sống sót là $83 \pm 7.2 \%$

24h

Groups	Newcatle disease virus			Infectious Bursal Disease Virus			
	OD ₆₂₀	Living cells (%)	RPS (%)	OD ₆₂₀	Living cells (%)	RPS (%)	
rChIFN- α	0.0134 μg	0.315 \pm 0.019	39 \pm 2.9	13	0.302 \pm 0.011	38 \pm 1.5	7
	0.134 μg	0.358 \pm 0.045	45 \pm 5.4	20	0.321 \pm 0.016	40 \pm 1.7	11
	1.34 μg	0.719 \pm 0.112	90 \pm 14.7	85	0.632 \pm 0.054	79 \pm 7.8	69
	13.4 μg	0.690 \pm 0.016	86 \pm 3.2	80	0.664 \pm 0.050	83 \pm 7.2	75
virus control	0.242 \pm 0.023	30 \pm 2.9		0.262 \pm 0.014	33 \pm 2.3		
cell control	0.801 \pm 0.018	100 \pm 0.0		0.800 \pm 0.019	100 \pm 0.0		

2. Interferon gà tăng tính kháng virus Gumboro của trên gà:

Thử nghiệm hoạt tính kháng virus Gumboro trên tế bào invitro và trên gà con đều cho thấy kết quả rất tốt. Khi kết hợp 2 loại interferon (alpha và gamma), nhỏ mũi cho gà con trước hay sau khi nhiễm virus đều cho kết quả tốt. Hệ số sống sót tương đối (RPS: Relative Percent Survival) của gà bị bệnh lên tới 80%. Điều đặc biệt là sử dụng interferon để ngừa bệnh hay chữa trị cho đàn gà thì đều có kết quả tốt. Đây là điểm nổi bật của interferon so với các sản phẩm vaccine thông thường.

Hiệu quả của rChIFN- α trong điều trị bệnh Gumboro trên gà 3 tuần tuổi

Nghiệm thức	SL	Tỷ lệ gà bệnh (%)	Tỷ lệ gà chết (%)	RPS
ChIFN α (134 μg)	15	33,33 ^b (5/15)	6,67 ^b (1/15)	83,3%
ChIFN α/γ (13,4)	15	33,33 ^b (5/15)	6,67 ^b (1/15)	83,3%

ChIFN α (1,34 μ g)	15	46,67 ^b (5/15)	13,33 ^{ab} (2/15)	66,7%
ChIFN α (0,134 μ g)	15	53,33 ^b (5/15)	20,00 ^{ab} (3/15)	50%
ĐC (+)	15	100,00 ^a	40,00 ^a (6/15)	
ĐC (-)	15	0,00	0	

Hiệu quả phòng và điều trị bệnh Gumboro của ChIFN α / γ trên gà 3 tuần tuổi

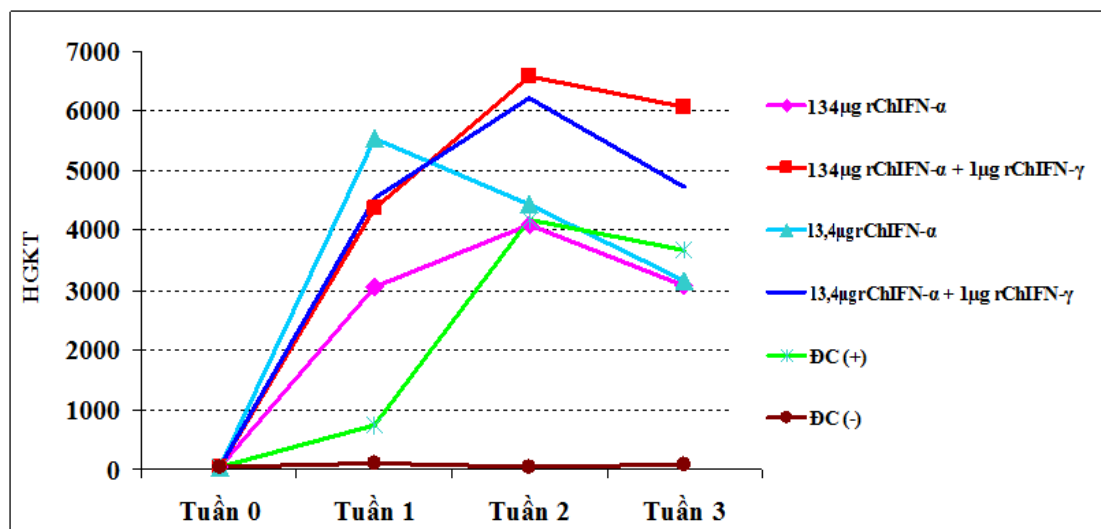
Khảo sát hiệu quả phòng bệnh: nhỏ mũi gà con bằng interferon trước, sau đó cho đàn gà nhiễm virus.

Khảo sát hiệu quả trị bệnh: cho đàn gà nhiễm virus trước, sau đó xử lý bằng interferon

Nhóm	Số liều IFN	Virus	Tỉ lệ bệnh (%)	Tỉ lệ chết (%)	RPS
Phòng bệnh: ChIFN α / γ (100:1 μ g)	3	+	16,7 ^b (5/30)	6,7 ^b (2/30)	80 %
Phòng bệnh: ChIFN α / γ (10:1 μ g)	3	+	13,3 ^b (4/30)	6,7 ^b (2/30)	80%
Trị bệnh: ChIFN α / γ (100:1 μ g)	5	+	26,7 ^b (8/30)	10 ^b (3/10)	70%
Chứng dương virus	0	+	100 ^a (30/30)	33,3 ^a (10/30)	
Chứng âm virus	0	-	0 (0/30)	0 (0/30)	

Hiệu giá kháng thể của gà ở các nghiệm thức trước và sau khi gây nhiễm virus Gumboro

HKGT: hiệu giá kháng thể



Hiệu giá kháng thể cho thấy những đàn gà được sử dụng interferon thì khả năng đáp ứng miễn dịch tăng cao ngay trong tuần lễ đầu tiên

3. Interferon gà làm tăng khả năng đề kháng của vịt lên virus viêm gan vịt:

Đối với interferon, đặc hiệu loài thường gây cản trở trên hiệu quả kháng virus khi sử dụng interferon của loài này ứng dụng cho loài khác. Tuy nhiên đối với gia cầm, sự tương đồng cấu trúc của cùng một loại interferon trên các loài khác nhau là rất cao. Do vậy, việc sử dụng interferon của loài này trên loài khác cho gia cầm được cho là có hiệu quả.

Ở nước ta, vịt là loại được nuôi nhiều thứ hai sau gà. Hiện tại vịt con ở đồng bằng sông Cửu Long đang có dịch viêm gan siêu vi. Nhóm nghiên cứu đã sơ bộ tiến hành thử nghiệm và có kết quả rất khả quan trên việc sử dụng interferon gà kháng virus viêm gan cho vịt. Ngoài ra, kết quả về tăng trọng vịt sau 7 ngày thử nghiệm cho thấy sự tăng trọng rõ nét (38%) ở vịt cho uống interferon so với đối chứng. Kết quả này trùng với một số kết quả mà thế giới đã công bố.

Hiệu quả của ChIFNs trong điều trị viêm gan vịt trên vịt con 7 ngày tuổi

Nhóm	Số vịt	Virus	Tỉ lệ vịt bệnh (%)	Tỉ lệ vịt chết (%)	RPS (%)
ChIFN α (10 μ g)	30	+	100 (30/30)	26.7	71.4
ChIFN α (50 μ g)	30	+	100 (30/30)	23.3	75.0
ChIFN α (100 μ g)	30	+	100 (30/30)	20.0	78.7
ChIFN γ (10 μ g)	30	+	100 (30/30)	30.0	67.9
ChIFN γ (50 μ g)	30	+	100 (30/30)	33.3	64.3
ChIFN γ (100 μ g)	30	+	100 (30/30)	33.3	64.3
ĐC(+)	30	+	100 (30/30)	93.3	0
ĐC(-)	30	-	0 (0/30)	0	100

Vịt được cho uống dịch virus DHV-1 với liều gây nhiễm $10^3 LD_{50}$ (0,2ml/con). Sau 12 giờ, vịt được xử lí với ChIFNs (nhỏ mắt/mũi). Theo dõi 7 ngày.

Kết quả khảo sát hoạt tính CHIFNS trên sự tăng trọng của vịt con

Nghiệm thức	Số vịt	Cân nặng trung bình (g/con)				% tăng
		Ngày 1	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7	
ChIFN γ (100 μ g/con)	30	40 ^a	58 ^a	88 ^a	117 ^a	38%
ChIFN α (100 μ g/con)	30	42 ^a	55 ^a	82 ^b	100 ^b	4%
Đối chứng	30	41 ^a	48 ^b	74 ^c	97 ^b	

Sử dụng Interferon giúp gia cầm ngăn ngừa một số bệnh, hấp thụ thức ăn tốt hơn nên giúp gia cầm tăng trọng

Kết luận:

- Chế phẩm interferon alpha+gamma gà được biểu hiện trên hệ thống *pichia pastoris* có thể sử dụng trực tiếp hoặc sơ chế trên gia cầm.
- rChIFN- α +Y Có thể sử dụng để phòng và điều trị gà kháng lại virus gumboro và new catsle gây bệnh trên gà
- rChIFN- α + Y có tác dụng ngừa và chữa trị bệnh viêm gan siêu vi trên vịt
- rChIFN- α + Y có khả năng là tăng trọng gia cầm.
- Interferon gà có thể sử dụng để ngăn ngừa, khu trú cúm gia cầm trên các loài gia cầm và trên diện rộng vì:
 - o Khả năng ngừa và chữa trị bệnh virus
 - o Tác dụng rộng trên các loại virus khác nhau
 - o Tác dụng rộng trên các loài gia cầm khác nhau

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. TS. Nguyễn Quốc Bình; *Tổng quan về dược sinh học*; 2014
2. Trung tâm Thông tin Khoa học & Công nghệ; *Xu hướng nghiên cứu và ứng dụng dược sinh học trong phòng ngừa và chữa bệnh cho gia cầm trên cơ sở số liệu sáng chế quốc tế*; 2014
3. TS. Nguyễn Quốc Bình; *Interferon gà trong chăn nuôi – kết quả nghiên cứu tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.Hồ Chí Minh*; 2014
4. <http://www.wipsglobal.com>