



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031830

(51)⁷ A61K 35/74; A61P 17/00; A23L 1/29

(13) B

(21) 1-2016-04769

(22) 20/04/2015

(86) PCT/KR2015/003914 20/04/2015

(87) WO2015/170839 12/11/2015

(30) 10-2014-0054237 07/05/2014 KR

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/04/2017 349A

(73) IL DONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (KR)

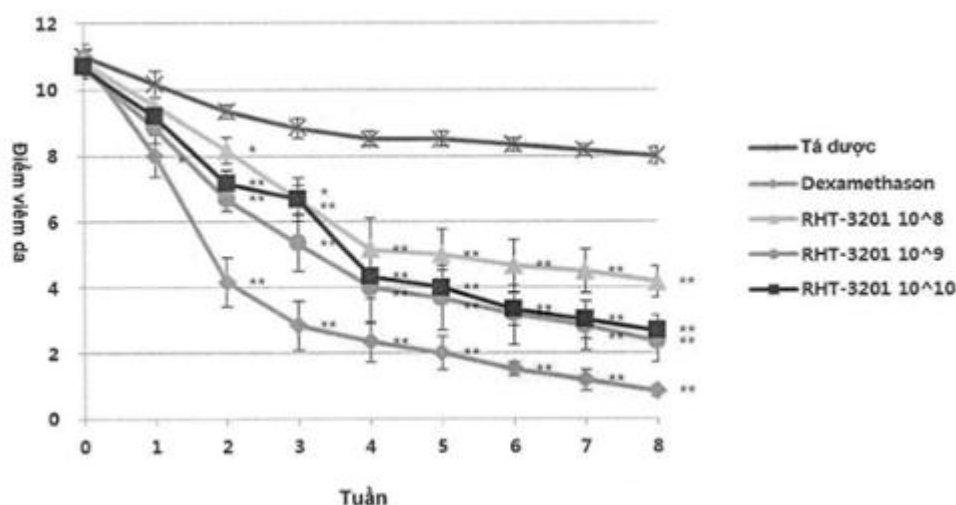
(IL Dong Pharmaceutical Co., Ltd., Yanjiae-dong) 2, Baumoe-ro 27-gil, Seocho-gu, Seoul 06752, Republic of Korea

(72) LEE, Seung-Hun (KR); KANG, Dae-Jung (KR); KANG, Jae-Hoon (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) LACTOBACILLUS RHAMNOSUS ĐƯỢC TIÊU DIỆT BẰNG NHIỆT LIÊN HỢP VỚI CHẤT KẾT DÍNH POLYSACARIT DẠNG POLYME, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM HOẶC THỰC PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme, phương pháp sản xuất và dược phẩm hoặc thực phẩm chứa vi khuẩn này. *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme theo sáng chế có tác dụng trị liệu tuyệt vời đối với các bệnh dị ứng, và đặc biệt là có khả năng ứng dụng trong công nghiệp cao do tính cạnh tranh dính bám vào màng, là ưu điểm của vi khuẩn axit lactic đang có, được cải thiện một cách đáng kể, nhờ đó thể hiện tác dụng ngăn ngừa, làm thuyên giảm và điều trị bệnh viêm da ở mức giống như các thuốc trên cơ sở steroid.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, phương pháp sản xuất và sử dụng nó, và, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme được sản xuất bằng phương pháp này, và được phẩm và thực phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm da cơ địa dị ứng (Atopic Dermatitis: AD) chỉ hiện tượng viêm da mạn tính và tái phát thể hiện triệu chứng ngứa, và chủ yếu thấy ở trẻ nhũ nhi và trẻ em. Chúng dị ứng là bệnh dị ứng tiêu biểu nhất cùng với bệnh viêm mũi dị ứng và bệnh hen phế quản, trong khi đã biết được rằng tỷ lệ hiện hành chứng dị ứng là 10 đến 30% ở trẻ em và 1 đến 3% ở người lớn.

Bệnh viêm da cơ địa dị ứng xảy ra do phản ứng quá mẫn của hệ miễn dịch đối với các kháng nguyên, như các con mạt bụi nhà, xâm lấn vào cơ thể. Các kháng nguyên được phân phát đến các tế bào T qua các đại thực bào, trong khi các tế bào T biệt hóa thành các tế bào Th1 hoặc Th2 theo typ kháng nguyên hoặc thụ thể phản ứng với nó. Các tế bào Th2 hoạt hóa sự miễn dịch thể dịch qua các xytokin, như IL-4, IL-5, và IL-10, và hoạt hóa các tế bào B, dẫn đến sự sản sinh IgE gia tăng và do đó gây ra bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Trong khi đó, các tế bào Th1 lại hoạt hóa sự miễn dịch tế bào qua IL-12 và IFN- γ , và IFN- γ ức chế sự sản sinh IgE. Do đó, sự cân bằng điều hòa miễn dịch của các tế bào Th1 và các tế bào Th2 được duy trì để làm dịu các triệu chứng dị ứng.

Do vẫn chưa có phương pháp điều trị dứt khoát đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng, các thuốc chống dị ứng, các thuốc kháng histamin, các steroid, và các thuốc khác được sử dụng đối với bệnh này. Trong số này, các steroid, là thuốc thường được kê đơn

nhất dưới dạng thuốc mỡ để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng, làm suy giảm các đáp ứng miễn dịch để giảm viêm, nhưng được báo cáo là gây ra nhiều loại tác dụng phụ khi sử dụng trong thời gian dài.

Trong khi đó, nhiều vi khuẩn axit lactic hoặc các sản phẩm sữa chứa vi khuẩn axit lactic đang được bán làm nguyên liệu thực phẩm có tác dụng điều hòa miễn dịch. Các ví dụ về vi khuẩn axit lactic có thể gồm giống *Lactobacillus*, giống *Lactococcus*, giống *Streptococcus*, giống *Pediococcus*, giống *Enterococcus*, và các giống tương tự, và các vi khuẩn axit lactic này được biết là có tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch hoặc chống dị ứng. Các tác giả sáng chế đã được cấp patent cho *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 có chức năng điều hòa miễn dịch cân bằng của các tế bào Th1 và Th2, là vật liệu chủng mới không có tác dụng phụ khi được sử dụng trong thời gian dài và có khả năng điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng về cơ bản (Số đăng ký patent Hàn Quốc 1007429000000).

Tuy nhiên, 100 tỷ tỷ vi khuẩn trong ruột hoặc nhiều hơn thể thuộc khoảng 500 typ khác nhau đang sống trong ruột của người, trong khi các vi khuẩn có hại, như *E. coli*, và các vi khuẩn có lợi, như vi khuẩn axit lactic, được duy trì theo cách thức cân bằng dưới dạng khu hệ vi sinh vật cư trú. Do đó, các probiotic (lợi khuẩn) axit lactic được dùng có khả năng hạn chế trong việc dính bám cạnh tranh vào niêm mạc ruột, và do đó tác dụng của chúng thay đổi tùy thuộc vào tỷ lệ dính bám của chúng. Ngoài ra, một số lượng nhất định vi khuẩn probiotic axit lactic bị tiêu diệt trong quá trình chúng đi đến đường tiêu hóa hoặc bỏ cuộc khỏi sự cạnh tranh dính bám và sau đó bị thải ra ngoài cùng với việc đại tiện. Do đó, vi khuẩn probiotic axit lactic có hạn chế trong việc góp phần vào điều trị chứng dị ứng nặng.

Hơn nữa, các probiotic cần được dùng với cách thức dùng dư nhiều hơn lượng chuẩn của chúng để cải thiện hiệu quả dính bám vào niêm mạc ruột của chúng, trong khi được yêu cầu phải vượt qua nhiều trở ngại trong cơ thể trước khi đi đến ruột. Do đó, lượng hấp thụ vi sinh vật và hiệu quả điều trị chứng dị ứng là khó dự đoán. Vì các vấn đề này nên có rất ít vi khuẩn axit lactic mà biểu hiện mức độ hoặc hiệu quả điều trị giống như các thuốc trên cơ sở steroid. Mặc dù có nhiều nỗ lực để cải thiện hiệu lực của các probiotic bằng chế phẩm composit nhưng vẫn có các vấn đề ở chỗ mức chuẩn hóa đối với tác dụng của các probiotic là không thể thiết lập được vì sự chết của các chủng vi

khuẩn probiotic diễn ra một cách tự nhiên theo thời gian trong suốt quá trình bảo quản chúng.

Vì các nghiên cứu về hệ miễn dịch niêm mạc ruột người gần đây đã được phát triển, đã có các báo cáo về sự tương tác và lực dính bám giữa các tế bào miễn dịch niêm mạc ruột của người là vật chủ và các thành phần thành tế bào của vi khuẩn axit lactic. Trong số này, thụ thể giống toll 2 (toll-like receptor-2: TLR-2) của các tế bào đuôi gai (dendritic cell: DC) liên kết với axit lipoteichoic và peptidoglycan có trong thành tế bào của vi khuẩn này để phân phát các tín hiệu liên quan đến miễn dịch.

Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic có các chức năng điều hòa miễn dịch có khả năng sản sinh ngoại bào axit béo mạch ngắn (short chain fatty acid: SCFA) và các protein miễn dịch khi được lên men trong các môi trường đặc hiệu và riêng biệt, nhờ đó thúc đẩy sự tiết IFN- γ và IL-12 từ các tế bào Th1 và nhờ đó dẫn đến sự thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Tuy vậy, trong khi hầu hết các sản phẩm được lên men bằng vi khuẩn axit lactic không làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, chỉ có một số vi khuẩn axit lactic chọn lọc sản sinh các chất này, và do đó, giá trị khai thác các vi khuẩn này là cao.

Với tình trạng kỹ thuật này, cần phát triển chế phẩm mà hữu dụng để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng một cách cơ bản hơn bằng cách khắc phục các tác dụng phụ của các thuốc dựa trên cơ sở steroid được sử dụng cho bệnh viêm da cơ địa dị ứng và khắc phục hạn chế của các probiotic axit lactic trong việc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng do tỷ lệ dính bám của chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế, trong quá trình nghiên cứu để phát triển thuốc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng không có tác dụng phụ trong khi vẫn duy trì hiệu lực cao ở mức tương đương với các thuốc trên cơ sở steroid, đã xác nhận rằng thể liên hợp của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt và chất kết dính được sản xuất bằng cách trộn polysaccharit dạng polyme với dịch lọc môi trường nuôi cấy có khả năng dính bám tuyệt vời với các tế bào miễn dịch niêm mạc ruột và có hiệu lực trị liệu đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng mà không có các tác dụng phụ, và đã hoàn thành sáng chế.

Do đó, một khía cạnh của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất

Lactobacillus rhamnosus được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) tách môi trường nuôi cấy lên men được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus*, thành vi khuẩn và dịch lọc lên men; (b) trộn dịch lọc lên men thu được ở bước (a) và polysacarit dạng polyme để sản xuất chất kết dính polysacarit dạng polyme; (c) tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn tách được ở bước (a); và (d) liên hợp vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) với chất kết dính được sản xuất ở bước (b).

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, như được sản xuất bằng phương pháp trên.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất được phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng, được phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất tác nhân để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị chứng dị ứng, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc điều trị chứng dị ứng dùng lượng hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, thực phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme

Khía cạnh thêm nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng dùng thực phẩm chứa thành phần hoạt tính là lượng

hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình ảnh hiển vi điện tử thể hiện cấu trúc của axit hyaluronic.

Fig. 2 là hình ảnh hiển vi điện tử thể hiện cấu trúc của chất kết dính đặc axit hyaluronic.

Fig. 3 là hình ảnh hiển vi điện tử thể hiện cấu trúc của *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 trước khi được tiêu diệt bằng nhiệt.

Fig. 4 là hình ảnh hiển vi điện tử thể hiện cấu trúc của *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 sau khi được tiêu diệt bằng nhiệt.

Fig. 5 là hình ảnh hiển vi điện tử thể hiện cấu trúc của RHT-3201.

Fig. 6 minh họa điểm đánh giá chỉ số SCORAD về tác dụng trị liệu của RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 7 minh họa kết quả quan sát vĩ mô về tác dụng điều trị của RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 8 minh họa thay đổi về hành vi gãi khi dùng RHT-3201 theo sáng chế.

Fig. 9 minh họa thay đổi về thể trọng khi dùng RHT-3201 theo sáng chế.

Fig. 10 minh họa thay đổi về mức IgE huyết khi dùng RHT-3201 theo sáng chế.

Fig. 11 minh họa kết quả quan sát vĩ mô về sự thay đổi ở các hạch bạch huyết khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 12 minh họa sự thay đổi kích cỡ của các hạch bạch huyết của chuột khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 13 minh họa sự thay đổi trọng lượng của hạch bạch huyết của chuột khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 14 minh họa sự thay đổi khả năng sản sinh IFN- γ khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 15 minh họa sự thay đổi khả năng sản sinh IL-12 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 16 minh họa sự thay đổi khả năng sản sinh IL-4 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 17 minh họa sự thay đổi khả năng sản sinh IL-10 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 18 minh họa tỷ lệ IL-4/IFN- γ khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 19 minh họa tỷ lệ IFN- γ /IL-10 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 20 minh họa tỷ lệ IL-4/IL-10 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 21 minh họa tỷ lệ IL-12/IL-10 khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 22 minh họa kết quả quan sát vĩ mô về các đặc tính bệnh lý học của mô da lưng khi dùng RHT-3201 theo sáng chế (phần trên) và kết quả quan sát hiển vi quang học về mô da được nhuộm thuốc nhuộm H&E (phần dưới) trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 23 minh họa độ dày biểu bì của mô da lưng khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 24 minh họa độ dày hạ bì của mô da lưng khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 25 minh họa kết quả quan sát tình trạng thâm nhập của các dưỡng bào vào mô da lưng qua việc nhuộm xanh toluidin khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Fig. 26 minh họa sự thay đổi số lượng dưỡng bào trên mô da lưng khi dùng RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) tách môi trường nuôi cấy lên men được sản

xuất bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus*, thành vi khuẩn và dịch lọc lên men; (b) trộn dịch lọc lên men thu được ở bước (a) và polysacarit dạng polyme để sản xuất chất kết dính polysacarit dạng polyme; (c) tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn tách được ở bước (a); và (d) liên hợp vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) với chất kết dính được sản xuất ở bước (b).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, như được sản xuất bằng phương pháp trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng, được phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất tác nhân để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị chứng dị ứng, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc điều trị chứng dị ứng dùng lượng hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thực phẩm để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, thực phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng dùng thực phẩm chứa thành phần hoạt tính là lượng hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, phương pháp này bao gồm các bước sau:

(a) tách môi trường nuôi cấy lên men được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus*, thành vi khuẩn và dịch lọc lên men;

(b) trộn dịch lọc lên men thu được ở bước (a) và polysacarit dạng polyme để sản xuất chất kết dính polysacarit dạng polyme;

(c) tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn tách được ở bước (a); và

(d) liên hợp vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) với chất kết dính được sản xuất ở bước (b).

Bước (a) là quy trình tách môi trường nuôi cấy lên men, là sản phẩm nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus*, thành vi khuẩn và dịch lọc lên men.

Vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* theo sáng chế gồm tất cả các chủng *Lactobacillus rhamnosus*, và có thể tốt hơn là *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 10833 BP.

Lactobacillus rhamnosus KCTC 10833 BP được người nộp đơn sáng chế đặt tên là "*Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201" trong đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc trước đây (số 10-2006-0038066), và ở đây, các tên này có thể được sử dụng thay thế nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nuôi cấy" có nghĩa gồm cả sự lên men. Việc nuôi cấy ở đây có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic. Ví dụ về việc nuôi cấy có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp trong đó vi khuẩn được cấy truyền vào môi trường nuôi cấy hoặc cơ chất nuôi cấy, và sau đó được để trong thời gian định trước trong khi nhiệt độ sinh trưởng định trước được duy trì trong các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "môi trường nuôi cấy" chỉ cơ chất nuôi cấy rắn hoặc lỏng chứa các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng các tế bào động vật, các tế bào thực vật, hoặc các vi sinh vật. Ở đây, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các môi trường nuôi cấy đã biết đối với vi khuẩn axit lactic. Ví dụ về môi trường nuôi

cây có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường lỏng deMan Rogosa Sharpe (MRS), môi trường All Purpose với Tween (APT), và môi trường Brain Heart Infusion (BHI), và có thể tốt hơn là môi trường lỏng MRS. Các môi trường này có thể được sử dụng dưới dạng môi trường cải biến (ví dụ, môi trường MRS được cải biến) bằng cách điều chỉnh một cách chọn lọc thành phần các nguyên liệu và hàm lượng các nguyên liệu cấu thành môi trường này theo mong muốn của chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Môi trường nuôi cấy theo sáng chế chứa các cơ chất của môi trường là các nguồn cacbon, các nguồn nitơ, các khoáng chất, và các yếu tố sinh trưởng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi khuẩn axit lactic. Loại nguồn cacbon, nguồn nitơ, khoáng chất, và yếu tố sinh trưởng không bị giới hạn miễn là các nguyên liệu này kích thích tác dụng hiệp đồng đối với sự sinh trưởng của vi khuẩn axit lactic, trong khi các nguyên liệu này được biết trong các lĩnh vực liên quan. Ví dụ, nhiều hydrat cacbon có thể được sử dụng làm nguồn cacbon. Nguồn cacbon có thể tốt hơn là glucoza, sucroza, maltoza, fructoza, lactoza, xyloza, galactoza, hoặc arabinoza. Ngoài ra, nhiều nguồn nitơ hữu cơ có thể được sử dụng làm nguồn nitơ. Nguồn nitơ có thể tốt hơn là phần chiết nấm men, soyton, pepton, phần chiết thịt bò, trypton, hoặc casiton. Loại nguồn khoáng chất không bị giới hạn miễn là nguồn khoáng chất này được biết trong lĩnh vực này để sinh trưởng vi khuẩn axit lactic. Ví dụ về các nguồn khoáng chất có thể gồm magie sulfat (MgSO_4), mangan sulfat (MnSO_4), dikalo hydro phosphat (K_2HPO_4), amoni clorua (NH_4Cl), canxi cacbonat (CaCO_3), và natri axetat (CH_3COONa). Ngoài ra, nhiều phần chiết hoặc bột nguyên liệu thực phẩm thô có thể tùy ý được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo nhu cầu của chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ về chúng có thể gồm phần chiết hoặc bột ngô, phần chiết hoặc bột whey, phần chiết hoặc bột sữa gầy, phần chiết hoặc bột trà xanh, hoặc phần chiết hoặc bột nấm, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Trong quy trình nuôi cấy, nhiệt độ có thể được chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này thay đổi tùy thuộc vào loại vi khuẩn axit lactic. Ví dụ, nhiệt độ có thể nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C , nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Nhiệt độ có thể tốt hơn là nằm trong khoảng từ 33°C đến 40°C , và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 35°C đến 39°C .

Trong quy trình nuôi cấy, thời gian nuôi cấy có thể được chuyên gia có trình độ

trung bình trong lĩnh vực này thay đổi tùy thuộc vào hiệu quả sản xuất mong muốn. Ví dụ, thời gian có thể nằm trong khoảng từ 12 đến 96 giờ, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “môi trường nuôi cấy lên men” chỉ môi trường nuôi cấy lên men thu được bằng cách cấy và lên men (hoặc nuôi cấy) chủng vào trong môi trường lỏng, trong khi đó thuật ngữ “dịch lọc lên men” chỉ dịch lọc môi trường nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ chủng này ra khỏi dịch lỏng nuôi cấy lên men.

Việc tách vi khuẩn và dịch lọc lên men có thể được thực hiện bằng các phương pháp tách vi khuẩn đã biết (ví dụ, ly tâm hoặc siêu lọc), nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Bước (b) là quy trình trộn dịch lọc lên men tách được ở bước (a) với nguyên liệu polysacarit dạng polyme để sản xuất chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất kết dính polysacarit dạng polyme” chỉ hỗn hợp của dịch lọc lên men và nguyên liệu polysacarit dạng polyme, hoặc phần cô của hỗn hợp này. Tùy thuộc vào thành phần và quy trình sản xuất chất kết dính, khả năng dính bám vào niêm mạc ruột và khả năng sản sinh các xytokin khác nhau trong các tế bào miễn dịch có thể được điều hòa.

Loại nguyên liệu polysacarit dạng polyme trong bước (b) không bị giới hạn miễn là nguyên liệu polysacarit dạng polyme là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về nguyên liệu polysacarit dạng polyme có thể bao gồm axit hyaluronic, alginat, maltodextrin, chitosan, caragenan, galactomanan, glucomanan, dextran, fucoidan, aga, porphyran, chitin, và các chất tương tự. Polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể tốt hơn là axit hyaluronic, alginat, maltodextrin, hoặc chitosan.

Phần trăm nguyên liệu polysacarit dạng polyme được bổ sung có thể được chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này thay đổi một cách chọn lọc tùy thuộc vào độ nhớt hoặc lực dính bám mong muốn. Ví dụ, nguyên liệu polysacarit dạng polyme có thể được bổ sung vào dịch lọc lên men ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% (trọng lượng/thể tích), nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ở đây, phương án được ưu tiên của bước (b) có thể bao gồm việc bổ sung nguyên liệu polysacarit dạng polyme là axit hyaluronic vào dịch lọc lên men ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% (trọng lượng/thể tích), và tốt nhất là việc bổ sung axit hyaluronic vào dịch lọc lên men ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 0,01% (trọng

lượng/thể thích).

Axit hyaluronic là một trong số các polysaccharit phức tạp chứa các axit amin và các axit uronic, và là hợp chất polyme chứa N-axetylglucosamin và axit glucuronic. Trọng lượng phân tử của axit hyaluronic theo sáng chế không bị giới hạn. Ví dụ, axit hyaluronic bao gồm các axit hyaluronic có trọng lượng phân tử là 1.000.000, 2.000.000, 3.000.000, 4.000.000, và 4.500.000, tốt hơn là axit hyaluronic có trọng lượng phân tử là 1.000.000 hoặc 2.000.000, và tốt nhất là axit hyaluronic có trọng lượng phân tử là 1.000.000.

Bước (b) có thể còn bao gồm quy trình cô để thu được chất kết dính polysaccharit dạng polyme khá đặc.

Việc cô như được sử dụng ở đây có thể được thực hiện bằng các phương pháp và thiết bị cô đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về việc cô có thể bao gồm, không chỉ giới hạn ở, cô kết tủa, cô bay hơi, cô trong điều kiện áp suất giảm, siêu lọc, thẩm thấu ngược, và ly tâm, tốt hơn là cô trong điều kiện áp suất giảm.

Bước (c) là quy trình tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn tách được trong bước (a).

Thuật ngữ “tiêu diệt bằng nhiệt” chỉ việc tiêu diệt vi khuẩn probiotic bằng cách xử lý nhiệt trong thời gian định trước, trong đó việc tiêu diệt bằng nhiệt này tác động đến thành phần của các thành phần hoạt tính có trong vi khuẩn, cấu trúc của vi khuẩn, và khả năng dính bám vào ruột tùy thuộc vào điều kiện tiêu diệt bằng nhiệt. Mục đích quan trọng nhất của việc tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn probiotic là để tạo ra cấu trúc mà dính bám một cách thuận lợi vào các tế bào miễn dịch niêm mạc ruột bằng cách cảm ứng axit lipoteichoic và peptidoglycan, là các thành phần tiêu biểu có trong cấu trúc tế bào của *Lactobacillus rhamnosus*. Nghĩa là, axit lipoteichoic và peptidoglycan mà tạo thành cấu trúc tế bào được kết hợp với TRL-2 của các tế bào đuôi gai của niêm mạc ruột để thúc đẩy sự sản sinh các xytokin liên quan đến miễn dịch, và do đó quan trọng là cấu trúc này được sản xuất dưới dạng sao cho có hiệu quả dính bám tốt nhất.

Nhiệt độ để tiêu diệt bằng nhiệt theo sáng chế không bị giới hạn miễn là nó nằm trong khoảng nhiệt độ trong đó các thành phần chức năng của vi khuẩn không bị biến tính. Nhiệt độ này có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 60°C đến 100°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 75°C đến 85°C.

Thời gian để tiêu diệt bằng nhiệt không bị giới hạn miễn là nó nằm trong khoảng thời gian trong đó các thành phần chức năng của vi khuẩn không bị biến tính. Thời gian này có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10 đến 120 phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 90 phút, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 50 đến 70 phút.

Sau quy trình tiêu diệt bằng nhiệt, quy trình làm nguội có thể tùy ý được chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này bổ sung theo nhu cầu. Quy trình làm nguội có thể được thực hiện bằng các phương pháp làm nguội đã biết, và nhiệt độ làm nguội có thể được thay đổi một cách chọn lọc theo mong muốn của chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Quy trình làm nguội có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng, ví dụ, từ 10°C đến 40°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 35°C.

Bước (d) là quy trình liên hợp vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) với chất kết dính được sản xuất ở bước (b).

Thuật ngữ “liên hợp” chỉ sự tạo thành đơn vị đơn bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều vật liệu. Trong bước (d), chất kết dính và vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt được liên hợp bằng chuỗi các phản ứng được cảm ứng bằng cách cho vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) thâm nhập vào chất kết dính được sản xuất ở bước (b) hoặc trộn vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt và chất kết dính.

Phương pháp sản xuất bao gồm các bước (a) đến (d) có thể tùy ý còn gồm quy trình bổ sung tá dược, quy trình làm khô, và quy trình nghiền để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý, bảo quản, và các công đoạn tương tự tại thời điểm sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, theo nhu cầu của chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Loại tá dược không bị giới hạn miễn là nó là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về tá dược có thể bao gồm tinh bột.

Quy trình làm khô có thể được thực hiện bằng các phương pháp làm khô đã biết. Ví dụ về quy trình làm khô có thể bao gồm làm khô lạnh, sấy phun, và sấy bằng không khí nóng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Sáng chế đề xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme được sản xuất bằng phương pháp nêu trên.

Lactobacillus rhamnosus được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính

polysacarit dạng polyme theo sáng chế được đặc trưng bằng việc được sản xuất bằng phương pháp bao gồm các bước (a) đến (d). *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme được các tác giả sáng chế đặt tên là “RHT-3201”, và ở đây, các thuật ngữ có thể được sử dụng thay thế nhau.

Lactobacillus rhamnosus được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế được thể hiện là có tác dụng trị liệu tuyệt vời để điều trị bệnh dị ứng, cùng với tính cạnh tranh dính bám vào niêm mạc ruột được cải thiện một cách đáng kể so với các chế phẩm vi khuẩn axit lactic đang có (xem Ví dụ 6), và có tác dụng ngăn ngừa, làm thuyên giảm, hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng ở mức tương đương với các thuốc trên cơ sở steroid đang có (ví dụ, dexamethason) (xem Ví dụ 9 và 10).

Ngoài ra, liên quan đến tính ổn định của môi trường đường tiêu hóa, mà gặp phải vấn đề khi dùng qua đường miệng các probiotic axit lactic, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế vẫn duy trì các chức năng (tính hiệu lực) của nó ở mức độ cao hơn so với các probiotic axit lactic thông thường. Cụ thể hơn, mặc dù tiếp xúc với dịch dạ dày nhân tạo (các axit dạ dày) và dịch ruột nhân tạo (các axit mật), *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế vẫn duy trì hiệu quả dính bám của nó vào niêm mạc ruột ở mức cao (xem ví dụ 7), trong khi độ ổn định bảo quản của nó ở các nhiệt độ khác nhau cũng được xác nhận (xem ví dụ 8).

Như được sử dụng ở đây, “chứng dị ứng” chỉ chuỗi các triệu chứng dị ứng được thể hiện trên da, niêm mạc hô hấp, niêm mạc mắt, niêm mạc ruột hoặc các loại tương tự ở đối tượng có xu hướng dị ứng, và xu hướng dị ứng này (bẩm chất) qua được để thể hiện các đặc tính gia đình. Các bệnh dị ứng do xu hướng dị ứng có thể bao gồm bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh hen, bệnh viêm màng kết dị ứng, chứng phát ban dị ứng, và các yếu tố tương tự, và các bệnh này có thể diễn ra một mình hoặc vài bệnh có thể diễn ra đồng thời. Bệnh viêm da cơ địa dị ứng, là một trong số các bệnh về da tiêu biểu thể hiện trên những người có chứng dị ứng, là bệnh mạn tính ở da, thường được gọi là sốt bầm sinh. Bệnh viêm da cơ địa dị ứng có các triệu chứng chính là da khô và ngứa, trong khi đó trong một số trường hợp nó còn đi kèm với các bệnh dị ứng khác

(như chứng phát ban, chứng dị ứng kim loại, bệnh hen, và bệnh viêm mũi dị ứng) qua các đặc tính miễn dịch và xu hướng gia đình của nó.

Như được sử dụng ở đây, “bệnh viêm da cơ địa dị ứng (AD)” là tình trạng da bị viêm mạn tính và tái phát với triệu chứng ngứa, và thể hiện phản ứng quá mẫn của hệ miễn dịch đối với các kháng nguyên, như mạt bụi nhà, xâm lấn vào cơ thể. Các kháng nguyên xâm lấn vào cơ thể được phân phát đến các tế bào T qua các đại thực bào, trong khi các tế bào T biệt hóa thành các tế bào Th1 hoặc Th2 tùy thuộc typ kháng nguyên hoặc thụ thể phản ứng với nó. Sau đó, các tế bào Th2 hoạt hóa sự miễn dịch thể dịch qua các xytokin, như IL-4, IL-5, và IL-10, và hoạt hóa các tế bào B, dẫn đến sự sản sinh IgE gia tăng và sau đó gây ra bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Nghĩa là, đối với các bất thường miễn dịch ở bệnh viêm da cơ địa dị ứng, trong khi globulin miễn dịch IgE dính bám vào bề mặt của các dưỡng bào xung quanh các mạch máu trong cơ thể hoặc trong da, các kháng nguyên lại xâm lấn vào cơ thể người để liên kết với các globulin miễn dịch để hoạt hóa các dưỡng bào, do đó cho phép các dưỡng bào tiết các hóa chất như histamin. Các hóa chất này kích thích các mạch máu và da, gây ra các chàm đỏ, chứng phù, và chứng ngứa trên da, do đó gây ra hoặc làm nặng thêm bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Ngược lại, các tế bào Th1 hoạt hóa sự miễn dịch tế bào qua IL-12 và IFN- γ , trong khi IFN- γ lại ức chế sự sản sinh IgE.

Do đó, xem xét trên cơ sở sự điều hòa miễn dịch cân bằng của các tế bào Th1 và các tế bào Th2 là yếu tố chính trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các triệu chứng dị ứng, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme theo sáng chế đã được phát hiện là tuyệt vời trong việc điều hòa miễn dịch cân bằng của các tế bào Th1 và Th2, đặc biệt là đạt được việc điều hòa miễn dịch cân bằng giữa các xytokin typ Th1 và các xytokin typ Th2 qua các cơ chế điều hòa miễn dịch khác nhau tùy theo độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng (xem các ví dụ 9 và 10). Nghĩa là, trong trường hợp bệnh viêm da cơ địa dị ứng nhẹ, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme theo sáng chế điều hòa và duy trì sự cân bằng miễn dịch của các tế bào Th1 và Th2, trong khi đó, trong trường hợp bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, nó ức chế các hoạt tính của các tế bào Th1 và Th2 qua việc kích thích các tế bào T điều hòa, nhờ đó điều trị và

làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Do đó, sáng chế là đề xuất được phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng, được phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme. Thêm nữa, sáng chế còn đề xuất: việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất tác nhân để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng; và phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa chứng dị ứng, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần điều trị hoặc ngăn ngừa chứng dị ứng dùng lượng hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Bệnh viêm da cơ địa dị ứng, như được mô tả trong sáng chế, được phân loại thành các loại nhẹ, trung bình, và nặng tùy thuộc vào sự tiến triển của các triệu chứng bệnh. Bệnh viêm da cơ địa dị ứng theo sáng chế có thể tốt hơn là bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” có thể là động vật, tốt hơn là động vật có vú, và đặc biệt là động vật bao gồm người.

Đã có nhiều báo cáo liên quan đến các thang điểm để đánh giá các khóa điều trị lâm sàng và hiệu lực trị liệu của bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Thang điểm tiêu biểu đã biết là Chỉ số độ nặng và vùng eczema (Eczema Area and Severity Index: EASI), Chấm điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng (SCORing Atopic Dermatitis: SCORAD), Đánh giá eczema hướng đến bệnh nhân (Patient Oriented Eczema Measure: POEM), và Độ nặng ba yếu tố (Three Item Severity: TIS). Tốt hơn là, độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng theo sáng chế được phân loại theo cách Chấm điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng (SCORAD).

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa lượng hữu hiệu về mặt dược lý của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme một mình hoặc có thể còn chứa ít nhất một chất mang dược dụng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân dưới dạng liều đơn, hoặc có thể được dùng dưới dạng đa liều bằng phương thức điều trị phân đoạn trong thời gian dài. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu về mặt dược lý” chỉ lượng cần thiết

để biểu hiện đáp ứng cao hơn so với đối chứng âm, và tốt hơn là lượng đủ để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Lượng hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000mg/kg thể trọng/ngày, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,055 đến 16,65mg/kg thể trọng/ngày, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Tuy nhiên, lượng hữu hiệu về mặt dược lý có thể được thay đổi một cách thích hợp tùy thuộc vào nhiều yếu tố, như loại bệnh và độ nặng của bệnh, tuổi tác, thể trọng, tình trạng cơ thể, và giới tính của bệnh nhân, đường dùng, và thời gian điều trị.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối chế theo nhiều cách khác nhau cùng với các chất mang dược dụng, tùy thuộc vào đường dùng, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ thành phần “dược dụng” chỉ thành phần không độc mà chấp nhận được về mặt sinh lý, không ức chế tác dụng của thành phần hoạt tính khi được dùng cho người, và thường không cảm ứng phản ứng dị ứng hoặc các phản ứng tương tự, như các vấn đề về đường tiêu hóa và chứng chóng mặt. Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối chế theo nhiều cách khác nhau cùng với các chất mang dược dụng, tùy thuộc vào đường dùng, bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Đường dùng có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, và tốt hơn là dùng qua đường miệng.

Dược phẩm theo sáng chế, khi được dùng qua đường miệng, có thể được phối chế, cùng với chất mang thích hợp để dùng qua đường miệng, dưới dạng bột, hạt, viên nén, viên tròn, viên nén bọc đường, viên nang, chất lỏng, gel, sirô, hỗn dịch, viên nhện, hoặc các dạng tương tự bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, viên nén hoặc viên nén bọc đường đối với chế phẩm dùng qua đường miệng có thể thu được bằng cách trộn thành phần hoạt tính với tá dược rắn, nghiền hỗn hợp này, bổ sung chất phụ trợ thích hợp vào đó, và sau đó xử lý hỗn hợp này thành hỗn hợp dạng hạt. Ví dụ về tá dược thích hợp có thể bao gồm: các đường gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, và maltitol; các tinh bột gồm tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, và tinh bột khoai tây; các xenluloza gồm xenluloza, metyl xenluloza, natri carboxy metyl xenluloza, và hydroxypropyl metyl xenluloza; và các chất độn, như gelatin hoặc polyvinyl pyrrolidon. Trong một số trường hợp, polyvinyl pyrrolidon liên kết ngang, aga, axit alginate, hoặc natri alginate có thể được bổ sung dưới dạng chất gây rắn.

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất chống đông tụ, chất làm trơn, chất làm ướt, hương liệu, chất nhũ hóa, và chất bảo quản.

Ngoài ra, nếu được dùng ngoài đường tiêu hóa, dược phẩm theo sáng chế, cùng với chất mang thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể được phối chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Đối với các chất mang dược dụng khác, các chất mang được bộc lộ trong tài liệu chuyên ngành sau có thể được đề cập (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA).

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng với các hợp chất đã biết là hữu hiệu trong việc phòng ngừa và điều trị các bệnh dị ứng hoặc bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, thực phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất: việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme để sản xuất thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng; và phương pháp để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng bằng cách cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng dị ứng dùng thực phẩm chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” có thể là động vật, tốt hơn là động vật có vú, và đặc biệt là động vật bao gồm người.

Thực phẩm theo sáng chế bao gồm tất cả các loại gồm thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, các chất phụ gia thực phẩm, sữa chua, và sữa lên men. Các loại thực phẩm nêu trên có thể được sản xuất dưới nhiều dạng khác nhau bằng các phương pháp chung đã biết trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, thực phẩm theo sáng chế có thể là sữa lên men, sữa chua, các đồ uống, các đồ uống có sữa, các chất phụ gia thực phẩm, và thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe.

Ví dụ, đối với thực phẩm bảo vệ sức khỏe, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể

được sản xuất, để uống, thành dạng đồ uống sữa chua, sữa lên men, trà, nước ép quả, và đồ uống, hoặc có thể được tạo hạt, tạo viên nang, hoặc tạo bột, để dùng. Ngoài ra, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể được trộn với nguyên liệu hoặc thành phần hoạt tính đã biết, mà được biết là hữu hiệu trong việc làm thuyên giảm các bệnh dị ứng (đặc biệt là, bệnh viêm da cơ địa dị ứng), để tạo ra dưới dạng chế phẩm.

Tương tự, đối với thực phẩm chức năng, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể được bổ sung vào các đồ uống (gồm các đồ uống có cồn), nước ép quả và các sản phẩm được chế biến của chúng (ví dụ, nước ép quả đóng lon, nước ép quả đóng chai, mứt, mứt đặc), cá, thịt, và các sản phẩm được chế biến của chúng (ví dụ, giăm bông, xúc xích, thịt bò muối), bánh kẹo và mỳ (ví dụ, mỳ u-đông, mỳ kiểu mạch, ramen, mỳ spaghetti, macaroni), nước quả ép, đồ uống, bánh quy, kẹo bơ cứng, các sản phẩm sữa (ví dụ, bơ, pho-mát), các dầu thực vật, bơ thực vật, protein thực vật, các thực phẩm hấp, các thực phẩm đông lạnh, các gia vị (ví dụ, tương đậu nành, nước tương, nước sốt), hoặc các sản phẩm tương tự.

Trong thực phẩm theo sáng chế, lượng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 50% trọng lượng của thực phẩm được sản xuất hoàn thiện, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, để sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme dưới dạng chất phụ gia thực phẩm, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể được sản xuất dưới dạng bột hoặc chất lỏng đặc.

Trong dược phẩm và thực phẩm theo sáng chế, lượng thành phần hoạt tính được trộn có thể được xác định một cách thích hợp theo mục đích sử dụng của chúng (ngăn ngừa, bảo vệ sức khỏe, hoặc làm thuyên giảm triệu chứng), và ví dụ, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme có thể được chứa với nồng độ 10^8 đến 10^{10} CFU/g. Liều hữu hiệu của *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có thể được xác định theo khoảng nồng độ nêu trên, nhưng có thể nhỏ hơn

khoảng nêu trên nhằm mục đích sức khỏe và vệ sinh hoặc để dùng trong thời gian dài để kiểm soát sức khỏe. Thành phần hoạt tính không có vấn đề về tính an toàn, và do đó có thể được sử dụng với lượng dư cao hơn khoảng nêu trên.

Hiệu quả của sáng chế

Lactobacillus rhamnosus được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme theo sáng chế là tuyệt vời trong việc điều trị bệnh dị ứng, cải thiện đáng kể tính cạnh tranh dính bám vào niêm mạc ruột so với các chế phẩm vi khuẩn axit lactic đang có, và thể hiện tác dụng ngăn ngừa, làm thuyên giảm, hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng ở mức tương đương với các thuốc trên cơ sở steroid đang có. Ngoài ra, *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme theo sáng chế là tuyệt vời về sự điều hòa miễn dịch cân bằng của các tế bào Th1 và Th2, và đặc biệt là đạt được sự điều hòa miễn dịch cân bằng giữa các cytokin typ Th1 và các cytokin typ Th2 qua các cơ chế điều hòa miễn dịch khác nhau theo độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả bằng các ví dụ cụ thể dưới đây.

Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không được dự tính là để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Đánh giá tác dụng của các chất kết dính theo loại

<1-1> Sản xuất các loại mẫu chất kết dính khác nhau

Lactobacillus rhamnosus IDCC 3201 (KCTC 10833BP) được nuôi cấy trong môi trường MRS chứa bột whey với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, vi khuẩn và dịch lọc môi trường nuôi cấy được tách bằng cách ly tâm. Sau đó, axit hyaluronic, alginat, maltodextrin, chitosan, và polyetylen glycol được bổ sung với lượng 0,1% (trọng lượng/thể thích) lần lượt vào dịch lọc môi trường nuôi cấy, sau đó khuấy trong 1 giờ và cô, từ đó tạo ra các chất kết dính, các chất này sau đó được làm khô lạnh. Mỗi mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat để sản xuất mẫu cuối cùng có nồng độ 1 µg/ml. Bột sữa gầy được sử dụng làm đối chứng.

<1-2> Sản xuất các tế bào lách

Các con chuột cái BALB/c 5 tuần tuổi được nhận liều cao 2mg nhôm hydroxit và 1mg albumin trứng bằng cách tiêm trong phúc mạc, và được nhận liều cao lần thứ hai theo cách tương tự sau sáu ngày. Vào ngày thứ 13, lách chuột được lấy ra khỏi mỗi con chuột và các tế bào lách được chiết, từ đó tạo ra dịch tế bào lách. Tốt hơn là, các tế bào lách được tạo ra bằng phương pháp dưới đây.

Lách chuột được thu hoạch một cách vô trùng, và 10ml dung dịch muối cân bằng Hanks (Hanks' balanced salt solution: HBSS) được bổ sung từng giọt vào đó. Lách được phá vỡ bằng cách sử dụng các nhíp trên lưới cỡ lỗ 60 để thu gom huyền phù tế bào, và sau đó được để lắng 2,5ml huyết thanh thai bò, sau đó để yên trong 10 phút, từ đó kết tủa các khối lớn. Các khối lớn này được tạo huyền phù trong dung dịch NH_4Cl (độ pH bằng 7,0) trong thời gian 3 đến 4 phút để làm tiêu máu các tế bào hồng cầu. Sau đó, huyền phù được trộn với 2,5ml huyết thanh thai bò, sau đó ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút. Kết tủa được rửa hai lần bằng HBSS, và sau đó được pha chế trong môi trường DMEM chứa huyết thanh thai bò 10% và albumin trứng 1mg/ml ở mật độ 5×10^6 tế bào/ml, từ đó tạo ra các tế bào lách.

<1-3> Nuôi cấy các tế bào lách và xác định lượng xytokin

200 μl huyền phù tế bào lách (5×10^6 tế bào/ml) và 10 μl (1 $\mu\text{g/ml}$) của mỗi dịch mẫu được sản xuất trong phần <1-1> được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ, sau đó nuôi cấy trong máy ấp 5% CO_2 trong 7 ngày. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, các mức IL-4 và IL-12 trong dịch nuôi cấy được đo bằng cách sử dụng kit Cytoset (Biosource). Các mức sản sinh IL-4 và IL-12 bởi mỗi mẫu được biểu thị dưới dạng tỷ lệ gia tăng so với đối chứng như được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1

Xác định các chất kết dính

Loại chất kết dính	Mức tăng (%) so với đối chứng		Tỷ lệ IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	
Axit hyaluronic	5	52	0,09

Alginat	15	29	0,51
Maltodextrin	9	36	0,25
Chitosan	17	38	0,44
Polyetylen glycol	13	22	0,59

Kết quả thử nghiệm là, chất kết dính axit hyaluronic thể hiện mức tăng sản sinh IL-4 là 5% và mức tăng sản sinh IL-12 là 52%. Chất kết dính alginat thể hiện mức tăng sản sinh IL-4 là 15% và mức tăng sản sinh IL-12 là 29%. Chất kết dính maltodextrin thể hiện mức tăng sản sinh IL-4 là 9% và mức tăng sản sinh IL-12 là 36%. Chất kết dính chitosan thể hiện mức tăng sản sinh IL-4 là 17% và mức tăng sản sinh IL-12 là 38%. Chất kết dính polyetylen glycol thể hiện mức tăng sản sinh IL-4 là 13% và mức tăng sản sinh IL-12 là 22%. Do đó, nếu chất kết dính được sản xuất sử dụng polysacarit dạng polyme thì tỷ lệ tăng IL-12 là tương đối cao, trong khi tỷ lệ tăng IL-4 lại tương đối thấp. Trong số này, axit hyaluronic thể hiện tỷ lệ tăng IL-12 cao nhất và tỷ lệ tăng IL-4 tương đối thấp. Sau axit hyaluronic lần lượt là maltodextrin, chitosan, và alginat thể hiện kết quả thuận lợi.

Ví dụ 2

Đánh giá tác dụng của các chất kết dính theo nồng độ

<2-1> Sản xuất các mẫu theo nồng độ

Tác dụng của các chất kết dính theo nồng độ được đánh giá trong khi, trong số các nguyên liệu polysacarit dạng polyme, axit hyaluronic thể hiện tác dụng tốt nhất trong ví dụ 1 được sử dụng làm vật liệu đại diện. Axit hyaluronic được bổ sung với lượng 0,0001 đến 1% (trọng lượng/thể thích) vào dịch lọc môi trường nuôi cấy, sau đó khuấy trong 1 giờ, và sau đó hỗn hợp này được cô trong điều kiện áp suất giảm, từ đó sản xuất được các chất kết dính axit hyaluronic với các nồng độ khác nhau, và các chất kết dính này được làm khô lạnh. Mỗi mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphate để sản xuất mẫu cuối cùng có nồng độ 1 µg/ml. Bột sữa gầy được sử dụng làm đối chứng.

<2-2> Thử nghiệm khả năng sản sinh xytokin

Tỷ lệ sản sinh xytokin trong các tế bào lách được nghiên cứu đối với các mẫu

chất kết dính được sản xuất trong ví dụ <2-1> bằng phương pháp giống như trong ví dụ <1-3>. Kết quả được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Xác định nồng độ axit hyaluronic được bổ sung

Nồng độ axit hyaluronic (trọng lượng/thể tích)	Mức tăng (%) so với đối chứng		Tỷ lệ IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	
0,0001	9	46	0,19
0,001	7	52	0,13
0,01	10	37	0,27
0,1	12	33	0,36
1	15	25	0,60

Kết quả thử nghiệm là, như được thể hiện trên bảng 2 trên đây, nồng độ tối ưu của axit hyaluronic để sản xuất chất kết dính axit hyaluronic là 0,001% (trọng lượng/thể tích), và ở nồng độ này, mức sản sinh IL-4 được giảm đi so với mức sản sinh IL-4 của mẫu đối chứng, và mức sản sinh IL-12 được tăng lên so với mức sản sinh IL-12 của mẫu đối chứng.

Ví dụ 3

Đánh giá tác dụng của vi khuẩn theo điều kiện tiêu diệt bằng nhiệt

Để xác định các điều kiện tiêu diệt vi khuẩn bằng nhiệt tối ưu, các điều kiện tiêu diệt bằng nhiệt theo nhiệt độ và thời gian được tối ưu hóa và khả năng dính bám vào các tế bào Caco-2 được đánh giá, từ đó chọn lựa được các điều kiện tối ưu. Chi tiết hơn về thử nghiệm này là như sau.

<3-1> Sản xuất các mẫu vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt

Vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 120°C trong thời gian 10, 20, 30, 40, 50, và 60 phút (Heater, EYELA OSB-2100, China), và được làm nguội ở nhiệt độ 30°C trước khi được sử dụng làm các mẫu thử nghiệm. Mỗi mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch đệm phosphat, tái tạo huyền phù trong 1ml dung dịch đệm tương tự, và pha loãng đến mật độ 1×10^8 tế bào/ml trong DMEM không chứa huyết thanh, trước khi được sử dụng để thử nghiệm.

<3-2> Đánh giá khả năng dính bám vào niêm mạc ruột

Đơn lớp tế bào Caco-2 được sản xuất bằng cách cấy các tế bào Caco-2 (Ngân hàng dòng tế bào Hàn Quốc (Korean Cell Line Bank)) ở mật độ $1,2 \times 10^5$ tế bào/ml vào trong môi trường Eagle được cải biến Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, Hyclone, USA) được bổ sung huyết thanh thai bò 10% (thể tích/thể tích) và gentamixin 20µl/ml, phân phát 1ml môi trường thu được vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy mô 6 lỗ, nuôi cấy tế bào trong 7 ngày, và rửa hai lần bằng dung dịch đệm phosphat.

Cho 1ml dịch mẫu sản xuất được trong ví dụ <3-1> vào mỗi lỗ trong đó đơn lớp Caco-2 được tạo thành, sau đó để phản ứng trong 90 phút. 1ml DMEM, thay cho vi khuẩn axit lactic được tiêu diệt bằng nhiệt, được sử dụng làm đối chứng. Sau phản ứng, dịch nổi được loại bỏ, và 1ml Tween 80 0,04 % (trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào để thu hồi vi khuẩn axit lactic được tiêu diệt bằng nhiệt dính bám vào các tế bào Caco-2, và số lượng tế bào được đếm bằng cách sử dụng huyết cầu kế. Hiệu quả dính bám được tính dưới dạng tỷ lệ của số tế bào dính bám so với số tế bào ban đầu (xem bảng 3).

Bảng 3

Tỷ lệ dính bám theo điều kiện tiêu diệt vi khuẩn bằng nhiệt

		Tỷ lệ dính bám (%) vào các tế bào Caco-2			
		60°C	70°C	80°C	90°C
Thời gian tiêu diệt bằng nhiệt (phút)	10	44	50	56	45
	20	48	53	68	49
	30	56	63	71	54
	40	60	66	76	42
	50	62	71	80	35
	60	63	72	85	32

Như được thể hiện trên bảng 3, hiệu quả dính bám là tốt nhất khi áp dụng điều kiện tiêu diệt bằng nhiệt là 80°C và 60 phút. Các thành phần cấu tạo, như axit lipoteichoic, tồn tại trên thành tế bào của vi khuẩn axit lactic, làm ức chế sự dính bám của các vi khuẩn có hại, như *E. coli* và *Salmonella*, vào bề mặt niêm mạc ruột, và liên kết với TLR-2, là một trong các thụ thể của các tế bào đuôi gai trong số các tế bào niêm mạc ruột, có liên quan trong việc hoạt hóa sự miễn dịch đường ruột của người. Do đó, các điều kiện tiêu diệt vi khuẩn bằng nhiệt tối ưu được thiết lập để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát tiết ra các yếu tố liên quan tồn tại trên thành tế bào, nhờ đó vi khuẩn axit lactic được tiêu diệt bằng nhiệt được dính bám lên đường ruột trong khi cạnh tranh với khu hệ vi sinh vật cư trú của đường ruột, và do đó, cuối cùng là, sự hoạt hóa miễn dịch đường ruột có thể được kỳ vọng.

Ví dụ 4

Sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme

Vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở 80°C trong 60 phút trong ví dụ 3 được trộn với 0,001% chất kết dính axit hyaluronic được sản xuất trong ví dụ 2 trong đó dịch lọc

môi trường nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* được cô, sau đó để phản ứng. Chất mang, như tinh bột, làm tá được, được trộn với vật liệu phản ứng thu được, sau đó tiến hành làm khô, từ đó tạo ra *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysaccharit dạng polyme (dưới đây được biểu thị là “RHT-3201”). Tác dụng thúc đẩy miễn dịch được so sánh một cách tương đối giữa RHT-3201 được sản xuất như trên và *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 làm probiotic, bằng phương pháp giống như trong ví dụ <1-3> (xem bảng 4).

Bảng 4

So sánh tác dụng thúc đẩy miễn dịch giữa vi khuẩn probiotic thông thường và RHT-3201 theo sáng chế

	RHT-3201	Chế phẩm probiotic
Mức tăng IL-4 (%) so với đối chứng	3	20
Mức tăng IL-12 (%) so với đối chứng	67	29
Tỷ lệ IL-4/IL-12	0,04	0,68

Như được thể hiện trên bảng 4, đã xác nhận rằng tác dụng điều hòa các xytokin liên quan đến Th1/Th2 của vi khuẩn axit lactic RHT-3201 theo sáng chế là cao hơn gấp 17 lần so probiotic đang có. Gợi ý rằng RHT-3201 sản xuất được dưới dạng mà liên kết một cách thuận lợi với thụ thể tương ứng của niêm mạc ruột, như TLR-2 trong quy trình sản xuất.

Ví dụ 5

Phân tích cấu trúc qua kính hiển vi điện tử (FE-SEM)

Việc phân tích cấu trúc đối với pha RHT-3201 sản xuất được trong ví dụ 4 được thực hiện bằng cách chụp ảnh sử dụng kính hiển vi điện tử (FE-SEM, Model: LEO SUPRA 55, GENESIS 2000 (Carl Zeiss, EDAX)) theo mỗi quy trình sản xuất. Kết quả phân tích cấu trúc sử dụng kính hiển vi điện tử theo các bước sản xuất RHT-3201 được thể hiện trên các FIG. 1 đến 5.

Như được thể hiện trên các FIG. 1 và 2, thấy rằng, trong quy trình sản xuất chất

kết dính, dịch lọc môi trường nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 được trộn với axit hyaluronic, sau đó là cô, nhờ đó các hạt axit hyaluronic trở nên đặc hơn để tạo ra cấu trúc chất kết dính (xem FIG. 2). Như được thể hiện trên các FIG. 3 và 4, thấy rằng các thành tế bào của vi khuẩn axit lactic không bị vỡ ra thành mảnh bằng sự tiêu diệt tế bào bằng nhiệt trong các điều kiện cụ thể này, nhưng có cấu trúc được bóc trần có khả năng dính bám dễ dàng vào niêm mạc ruột (xem FIG. 4). Cuối cùng, vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt được trộn với chất kết dính axit hyaluronic để tạo điều kiện thuận lợi cho việc dính bám vào niêm mạc ruột (xem FIG. 5).

Ví dụ 6

Sản xuất quy mô lớn RHT-3201

Để nghiên cứu khả năng tái tạo khi RHT-3201 được sản xuất trên quy mô lớn bằng phương pháp sản xuất trong ví dụ 4 nêu trên, tỷ lệ dính bám vào ruột được so sánh giữa probiotic và RHT-3201 được sản xuất trên quy mô lớn (xem bảng 5).

Cụ thể là, *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 được nuôi cấy ở 37°C qua đêm trong thùng lên men với quy mô sản xuất 1 tấn. Dịch lọc môi trường nuôi cấy và vi khuẩn được phân tách bằng cách ly tâm, và bổ sung axit hyaluronic với lượng 0,001% (trọng lượng/thể tích) tính trên thể tích dịch nuôi cấy vào dịch lọc môi trường nuôi cấy, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm ở 50°C, từ đó tạo ra chất kết dính, chất kết dính này được để liên hợp với bề mặt của vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt. Vi khuẩn được xử lý nhiệt ở 80°C trong 60 phút, từ đó tạo ra vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt. Thêm nữa, chất kết dính và vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt được trộn, làm đồng nhất, và làm khô, từ đó tạo ra RHT-3201. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 được sử dụng làm đối chứng được sản xuất theo quy trình bình thường để sản xuất vật liệu probiotic thô. Cụ thể là, vi khuẩn được thu từ dịch môi trường nuôi cấy giống nhau, được tạo huyền phù trong 20ml dung dịch đệm phosphat, và được làm khô lạnh, từ đó tạo ra bột vi khuẩn.

Bảng 5

So sánh tỷ lệ dính bám giữa chế phẩm probiotic thông thường và RHT-3201 theo sáng chế

	RHT-3201	Chế phẩm probiotic
Tỷ lệ dính bám (%)	85	54

Như được thể hiện trên bảng 5, đã xác nhận rằng tỷ lệ dính bám của RHT-3201 thể hiện mức cải thiện 57% so với chế phẩm probiotic *Lactobacillus rhamnosus*.

Ví dụ 7

Đánh giá độ ổn định khi dùng

<7-1> Độ ổn định đối với axit

Chế phẩm vi khuẩn axit lactic được tiếp xúc với các axit dạ dày khi đi qua dạ dày ở đường tiêu hóa. Trong khi môi trường này là các điều kiện được sao chép *in vitro*, việc so sánh độ ổn định đối với axit giữa vi khuẩn probiotic và RHT-3201 theo sáng chế được thực hiện. Cụ thể hơn là, dung dịch HCl 10% được nhỏ giọt vào môi trường MRS để điều chỉnh độ pH đến 2,3 và 2,5, và sau đó MRS được khử trùng để sử dụng. Lần lượt cho 1g mẫu probiotic và 1g mẫu RHT-3201 vào môi trường MRS được điều chỉnh độ pH, sau đó để phản ứng trong 0, 1, và 2 giờ. Tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2 bằng phương pháp giống như nêu trong ví dụ <3-2>. Ở đây, vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong thử nghiệm là *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201. RHT-3201 được sản xuất bằng quy trình sản xuất nêu trong ví dụ 6 và probiotic được sử dụng cho thử nghiệm.

Bảng 6

Kết quả đo độ ổn định đối với axit của RHT-3201 theo sáng chế

Mẫu thử nghiệm	Độ pH bằng 2,3($\times 10^8$ CFU/ml)			Tỷ lệ đính bám (%)	Độ pH bằng 2,5($\times 10^8$ CFU/ml)			Tỷ lệ đính bám (%)
	0	1 giờ	2 giờ		0	1 giờ	2 giờ	
Vi khuẩn probiotic	1	0,1	0,04	4	1	0,19	0,07	7
RHT- 3201	1	0,7	0,34	34	1	0,83	0,48	48

Như được thể hiện trên bảng 6, đã xác nhận rằng, so với vi khuẩn probiotic, hiệu quả dính bám của RHT-3201 theo sáng chế được duy trì ổn định ngay cả khi được tiếp xúc với axit trong 2 giờ.

<7-2> Độ ổn định đối với mật

Sự tuần hoàn ruột gan của các axit mật đạt được sao cho các axit mật được tạo ra từ gan, rỉ qua đường mật, chảy vào ruột non, sau đó được hấp thụ 95% vào ruột hồi, đây là phần cuối của ruột non, và lại đi vào gan. Các axit mật tác động đến khả năng dính bám của vi khuẩn axit lactic nằm trên ruột non. Do đó, sự chênh lệch về tỷ lệ dính bám giữa vi khuẩn probiotic và RHT-3201 theo sáng chế khi được tiếp xúc với các axit mật được so sánh. Cụ thể hơn là, môi trường MRS chứa hoặc không chứa các axit mật với lượng 0,3% được sử dụng sau khi được khử trùng. Sau đó, 1g vi khuẩn probiotic và RHT-3201 theo sáng chế lần lượt được cấy vào các môi trường này, sau đó để phản ứng trong 2 giờ. Tiếp theo, tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2 bằng phương pháp giống như nêu trong ví dụ <3-2>.

Ở đây, vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong thử nghiệm là *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201. RHT-3201 được sản xuất bằng quy trình sản xuất nêu trong ví dụ 6 và probiotic được sử dụng cho thử nghiệm.

Bảng 7

Kết quả độ ổn định đối với mật của RHT-3201 theo sáng chế

Mẫu thử nghiệm	MRS ($\times 10^8$ CFU/ml)	MRS+0,3% mật($\times 10^8$ CFU/ml)	Tỷ lệ dính bám (%)
Vi khuẩn probiotic	1	0,23	23
RHT-3201	1	0,57	57

Như được thể hiện trên bảng 7, đã xác nhận rằng, khi được tiếp xúc với các axit mật trong 2 giờ, hiệu quả dính bám của RHT-3201 được duy trì ở mức 57%, hiệu suất này cao hơn gấp khoảng 2,5 lần so với hiệu suất dính bám của vi khuẩn probiotic.

Ví dụ 8

Đánh giá độ ổn định theo thời gian bởi nhiệt độ

<8-1> Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 4°C giữa RHT-3201 và vi khuẩn probiotic

RHT-3201 theo sáng chế được sản xuất theo ví dụ 6 nêu trên và vi khuẩn probiotic được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C trong 365 ngày, và sau đó số lượng vi khuẩn dính bám trên 1g vật liệu thô được đo theo thời gian. Kết quả được thể hiện trên bảng 8. Số lượng vi khuẩn dính bám được đo bằng phương pháp giống như trong ví dụ <3-2>. Tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2.

Bảng 8

Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 4°C giữa RHT-3201 theo sáng chế và vi khuẩn probiotic

Mẫu thử nghiệm	Độ ổn định theo thời gian ở 4°C				Tỷ lệ dính bám còn lại (%)
	0 ngày	60 ngày	180 ngày	365 ngày	
Vi khuẩn probiotic	65%	52%	34%	19%	29,2
RHT-3201	82%	71%	52%	45%	54,8

<8-2> Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 15°C giữa RHT-3201 và probiotic

RHT-3201 theo sáng chế được sản xuất theo ví dụ 6 nêu trên và probiotic được bảo quản trong tủ lạnh ở 15°C trong 365 ngày, và sau đó số lượng vi khuẩn dính bám trên 1g vật liệu thô được đo theo thời gian. Kết quả được thể hiện trên bảng 9. Số lượng vi khuẩn dính bám được đo bằng phương pháp giống như trong ví dụ <3-2>. Tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2.

Bảng 9

Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 15°C giữa RHT-3201 theo sáng chế và vi khuẩn probiotic

Mẫu thử nghiệm	Độ ổn định theo thời gian ở 15°C				Tỷ lệ dính bám còn lại (%)
	0 ngày	60 ngày	180 ngày	365 ngày	
Vi khuẩn probiotic	65%	46%	29%	15%	23,1
RHT-3201	82%	66%	59%	38%	46,3

<8-3> Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 25°C giữa RHT-3201 và vi khuẩn probiotic

RHT-3201 theo sáng chế được sản xuất theo ví dụ 6 nêu trên và vi khuẩn probiotic được bảo quản trong tủ lạnh ở 25°C trong 365 ngày, và sau đó số lượng vi khuẩn dính bám trên 1g vật liệu thô được đo theo thời gian. Kết quả được thể hiện trên bảng 10. Số lượng vi khuẩn dính bám được đo bằng phương pháp giống như trong ví dụ <3-2>. Tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2.

Bảng 10

Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 25°C giữa RHT-3201 theo sáng chế và vi khuẩn probiotic

Mẫu thử nghiệm	Độ ổn định theo thời gian ở 25°C				Tỷ lệ dính bám còn lại (%)
	0 ngày	60 ngày	180 ngày	365 ngày	
Vi khuẩn probiotic	65%	39%	25%	12%	18,4
RHT-3201	82%	56%	49%	35%	42,6

<8-4> Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 37°C giữa RHT-3201 và vi khuẩn probiotic

RHT-3201 theo sáng chế được sản xuất theo ví dụ 6 nêu trên và probiotic được bảo quản trong tủ lạnh ở 37°C trong 365 ngày, và sau đó số lượng vi khuẩn dính bám trên 1g vật liệu thô được đo theo thời gian. Kết quả được thể hiện trên bảng 11. Số lượng vi khuẩn dính bám được đo bằng phương pháp giống như trong ví dụ <3-2>. Tỷ lệ dính bám được phân tích bằng cách đo số lượng vi khuẩn dính bám vào các tế bào Caco-2.

Bảng 11

Thử nghiệm so sánh độ ổn định theo thời gian ở 37°C giữa RHT-3201 theo sáng chế và vi khuẩn probiotic

Mẫu thử nghiệm	Độ ổn định theo thời gian ở 37°C				Tỷ lệ dính bám còn lại (%)
	0 ngày	60 ngày	180 ngày	365 ngày	
Vi khuẩn probiotic	65%	29%	15%	8%	12,3
RHT-3201	82%	46%	44%	32%	39,0

Ví dụ 9

Điều hòa sự sản sinh xytokin bằng RHT-3201 trên các mô hình gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng *in vitro*

Trên các mô hình chuột được gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nhẹ, tác dụng của RHT-3201 theo sáng chế, probiotic, và chế phẩm vi khuẩn đã được tiêu diệt mà được sản xuất từ cùng loại vi khuẩn axit lactic, được đánh giá, trong đó phương pháp thử nghiệm cụ thể là như sau.

<9-1> Sản xuất các mẫu

RHT-3201 theo sáng chế và chế phẩm probiotic được sản xuất bằng phương pháp giống như nêu trong ví dụ 6 trên đây, sử dụng dịch nuôi cấy được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 trong môi trường MRS chứa bột whey với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% ở 37°C trong 24 giờ.

Đối với vi khuẩn đã được tiêu diệt, vi khuẩn thu được từ dịch nuôi cấy, được tạo huyền phù trong 500µl dung dịch đệm phosphat, và làm khô bằng cách làm khô lạnh. Vi khuẩn đã được làm khô được xác định trọng lượng, và tạo huyền phù trong dung dịch đệm phosphat vô trùng đến nồng độ 300mg/ml. Huyền phù được xử lý nhiệt ở 100°C trong 30 phút, sao cho vi khuẩn được tiêu diệt. Ba loại mẫu này được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat để lần lượt tạo ra các mẫu cuối cùng có nồng độ 1µg/ml. Bột sữa gầy được sử dụng làm đối chứng.

<9-2> Nuôi cấy các tế bào lách và xác định lượng xytokin

Các tế bào lách được sản xuất bằng phương pháp giống như trong ví dụ <1-2>. 200µl huyền phù tế bào lách (5×10^6 tế bào/ml) và 10µl (1µg/ml) của mỗi dịch mẫu được sản xuất trong ví dụ <9-1> được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ, sau đó nuôi cấy trong máy áp 5% CO₂ trong 7 ngày. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, các mức IL-4 và IL-12 trong dịch nuôi cấy được đo bằng cách sử dụng kit Cytoset (Biosource). Các mức sản sinh IL-4 và IL-12 bởi mỗi mẫu được biểu thị dưới dạng tỷ lệ gia tăng so với đối chứng như được thể hiện trên bảng 12.

Bảng 12

Tỷ lệ gia tăng các xytokin từ các tế bào lách khi bổ sung mẫu vi khuẩn axit lactic

Mẫu	Mức tăng (%) so với đối chứng		IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	tỉ lệ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201 (vi khuẩn probiotic)	20	29	0,68
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201 (vi khuẩn đã được tiêu diệt)	12	34	0,35
RHT-3201	3	67	0,04

Kết quả thử nghiệm là, mức tăng sản sinh IL-4 là 20% và mức tăng sản sinh IL-12 là 29% được thể hiện trên vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201. Mức tăng sản sinh IL-4 là 12% và mức tăng sản sinh IL-12 là 34% được thấy trên vi khuẩn đã được tiêu diệt. Mức tăng sản sinh IL-4 là 3% và mức tăng sản sinh IL-12 là 67% được thấy trên RHT-3201. Do đó, đã xác nhận rằng RHT-3201 theo sáng chế, mà đã thể hiện sự gia tăng đáng kể khả năng sản sinh IL-12 và sự gia tăng tương đối nhẹ khả năng sản sinh IL-4, có tác dụng tuyệt vời nhất trong việc điều hòa sự sản sinh xytokin.

Ví dụ 10

Tác dụng trị liệu của RHT-3201 theo sáng chế trên các mô hình được cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng *in vivo*

<10-1> Sản xuất vật liệu thử nghiệm và kháng nguyên cảm ứng

RHT-3201 theo sáng chế được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm, trong khi đó dexamethason trên cơ sở steroid (Sigma Co. Ltd), mà được sử dụng làm dược chất trị liệu chính đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, được sử dụng làm đối chứng dương. Phần chiết của *Dermatophagoides farina*, là loài chính của mạt bụi nhà, được sử dụng làm vật liệu gây cảm ứng chứng dị ứng. Phần chiết này được mua dưới dạng thuốc mỡ từ Central Lab. Animal Inc.

Dexamethason được sản xuất bằng cách được hòa tan trong etanol đến nồng độ 0,1% (trọng lượng/thể thích), và RHT-3201 theo sáng chế được sản xuất bằng cách được

hòa tan trong nước cất lần lượt đến các liều 1×10^8 CFU/0,5ml/con chuột, 1×10^9 CFU/0,5ml/con chuột, và 1×10^{10} CFU/0,5ml/con chuột. Tất cả các mẫu để dùng được sản xuất vào ngày thử nghiệm. Dexamethason được bôi lên da của đối tượng thử nghiệm ở mức 100 μ l trên mỗi đối tượng hai lần mỗi tuần, trong khi RHT-3201 theo sáng chế được cho mỗi đối tượng dùng qua đường miệng ở mức 0,5ml một lần mỗi ngày bằng cách dùng ống thông. Nước cất được dùng cho nhóm bình thường và nhóm đối chứng chứng dị ứng. Việc dùng các loại chất thử nghiệm được thực hiện trong 8 tuần ở tất cả các nhóm.

<10-2> Chuẩn bị và nuôi dưỡng các con vật thử nghiệm

Chuột cái NC/Nga (6 tuần tuổi) được mua từ Central Lab. Animal Inc., và được làm thích nghi với môi trường trong 1 tuần trước khi sử dụng. Môi trường nuôi dưỡng là như sau: nhiệt độ không đổi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) và độ ẩm không đổi (50-60%) được duy trì, trong khi đó các chu kỳ sáng (08giờ00 đến khoảng 20giờ00) và tối (20giờ00 đến khoảng 08giờ00) được kiểm soát ở khoảng thời gian 12 giờ. Ba con chuột được phân chia và nuôi dưỡng vào mỗi lồng polysulfon, được cho ăn tự do khẩu phần ăn thử nghiệm và nước trong 24 giờ.

<10-3> Gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng

Vùng lưng cho đến phần phía trên của tai của các con chuột NC/Nga 7 tuần tuổi được cạo sạch lông hoàn toàn, và sau đó phun 150 μ l dung dịch nước 4% natri dodecyl sulfat (SDS) lên các phần được cạo lông này. Sau khi hoàn thành việc làm khô, 100mg thuốc mỡ của mạt bụi nhà (phần chiết của mạt) được bôi đều lên các phần được cạo lông. Thuốc mỡ của mạt bụi nhà (phần chiết của mạt) được bôi hai lần mỗi tuần trong ba tuần, tổng cộng sáu lần, để gây cảm ứng bệnh viêm da vừa phải hoặc nặng hơn. Sau đó, thuốc mỡ này được bôi một lần mỗi tuần trong suốt thời gian dùng các loại chất thử nghiệm đối với các nhóm thử nghiệm (8 tuần), từ đó duy trì bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Bảng 13

Điểm cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng trên mỗi mô hình trước khi điều trị bằng các chất thử nghiệm

		Điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng Trung bình $\pm$ SE (n = 6)
Nhóm bình thường		0
Đối chứng chứng dị ứng (tá dược)		11,0 $\pm$ 0,4
Dexamethason (đối chứng dương)		10,8 $\pm$ 0,4
RHT-3201	1 x 10 ⁸ CFU/con chuột	10,8 $\pm$ 0,4
	1 x 10 ⁹ CFU/con chuột	10,7 $\pm$ 0,3
	1 x 10 ¹⁰ CFU/con chuột	10,7 $\pm$ 0,3

Như được thể hiện trên bảng 13, là kết quả của việc gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng bằng việc bôi thuốc mỡ của mặt bụi nhà (phần chiết của mặt) lên các con chuột NC/Nga trong ba tuần, điểm trung bình đối với mỗi nhóm là 10 hoặc cao hơn, nhờ đó các con chuột NC/Nga bị bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng được chuẩn bị.

<10-4> Đánh giá bệnh viêm da cơ địa dị ứng

Trong việc đánh giá này, độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng được biểu thị dưới dạng tổng điểm đánh giá của năm yếu tố, sử dụng SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), là phương pháp thường dùng để đánh giá vĩ mô trên lâm sàng. Các yếu tố này là ban đỏ, da khô, phù, tróc da, và liken hóa. Các điểm đối với năm yếu tố này (không có triệu chứng (điểm 0), triệu chứng nhẹ (điểm 1), triệu chứng vừa (điểm 2), triệu chứng nặng (điểm 3) đối với mỗi yếu tố) được cộng lại, trong đó điểm đánh giá được xác định giữa điểm thấp nhất 0 (trạng thái mà không có triệu chứng) và điểm cao nhất là 15 (trạng thái mà các triệu chứng đối với tất cả các yếu tố đều là nặng). Độ nặng của các tổn thương trên da chuột được đánh giá hàng tuần (xem FIG. 6).

Trên Fig. 6, tá dược thể hiện kết quả đối với nhóm chuột bị bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng cảm ứng bởi mặt bụi nhà, và dexamethason thể hiện kết quả đối với nhóm chuột có da được bôi thuốc dexamethason làm đối chứng dương trong 8 tuần. RHT-

3201 10^8 , RHT-3201 10^9 , và RHT-3201 10^{10} thể hiện kết quả đối với các nhóm chuột bị bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng cảm ứng bởi mật bụi nhà được dùng RHT-3201 theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau: RHT-3201 10^8 thể hiện kết quả đối với nhóm chuột điều trị được dùng qua đường miệng ở liều 1×10^8 CFU/con chuột trong 8 tuần; RHT-3201 10^9 thể hiện kết quả đối với nhóm chuột điều trị được dùng qua đường miệng ở liều 1×10^9 CFU/con chuột trong 8 tuần; và RHT-3201 10^{10} thể hiện kết quả đối với nhóm chuột điều trị được dùng qua đường miệng ở liều 1×10^{10} CFU/con chuột trong 8 tuần.

Kết quả của việc nghiên cứu tác dụng làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng sau khóa điều trị 8 tuần là, đã xác nhận từ các kết quả trên FIG. 6 rằng điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng trên nhóm tá dược không có sự điều trị bằng thuốc bất kỳ dưới dạng trị số trung bình là 8,0, điều này chỉ ra rằng trạng thái nặng ban đầu được duy trì. Khi so với nhóm chuột bị bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng cảm ứng bởi mật bụi nhà (nhóm tá dược), đánh giá về độ nặng của các tổn thương trên da chuột được giảm đi đáng kể trên tất cả các nhóm lần lượt được điều trị bằng RHT-3201 10^8 , RHT-3201 10^9 , và RHT-3201 10^{10} . Cụ thể hơn là, nhóm dùng RHT-3201 10^8 thể hiện điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 4,2, dẫn đến hiệu quả làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 47,5%. Nhóm dùng RHT-3201 10^9 thể hiện điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 2,3, dẫn đến hiệu quả làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 71,25%. Nhóm dùng RHT-3201 10^{10} thể hiện điểm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 2,7, dẫn đến hiệu quả làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng là 66,25%.

Thường đã biết rằng các chế phẩm vi khuẩn axit lactic cần được dùng với lượng lớn mà không có báo cáo bất kỳ về nồng độ tối ưu của các chế phẩm này để đạt được tác dụng làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng. Lý do là ở chỗ, đối với các probiotic axit lactic, vi khuẩn axit lactic bị tiêu diệt với lượng lớn bởi các axit dạ dày và mật trong khi đi qua đường tiêu hóa, gây ra sự giảm hiệu quả dính bám vào niêm mạc ruột mà có thể biểu hiện tác dụng miễn dịch, và do đó bị bài tiết ra khỏi cơ thể. Không giống như vậy, RHT-3201 theo sáng chế được thấy là rõ ràng có tác dụng trị liệu ở các nồng độ khác nhau. Các đơn vị dùng $\times 10^9$ và $\times 10^{10}$ thể hiện sự tương đồng trong khoảng sai số liên quan đến hiệu lực làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng. Lý do

là ở chỗ số lượng kết hợp với thụ thể giống toll được phân bố trong các tế bào đuôi gai của niêm mạc ruột đã bão hòa đến ngưỡng.

Fig. 7 minh họa kết quả quan sát vĩ mô về tác dụng trị liệu của *Lactobacillus* RHT-3201 đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng khi dùng qua đường miệng. Trên các tổn thương trên da của nhóm tá dược, thấy được một cách rõ rệt sự khô da, ban đỏ, phù, liken hóa, và các vết xước do sự gãi liên tục do ngứa. Kết quả nghiên cứu về mặt vĩ mô là độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng được cải thiện ở các nhóm dùng RHT-3201 với tất cả các nồng độ.

<10-5> Xác định hành vi gãi và thể trọng

Số lượng hành vi gãi trong 15 phút được đếm một lần mỗi tuần từ tuần 1 bắt đầu dùng thuốc thử nghiệm. Chỉ những lần có hành vi gãi sử dụng đuôi sau mới được đếm để tránh việc đếm các hành vi gãi do các nguyên nhân khác ngoài các hành vi gãi do ngứa. Trong khi đó, sự giảm thể trọng có xu hướng xảy ra do các tác dụng phụ của thuốc và sự căng thẳng tại thời điểm gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng. Để nghiên cứu xem liệu tác dụng phụ của việc giảm thể trọng có xảy ra do các chất thử nghiệm theo sáng chế hay không, các con vật thử nghiệm được xác định trọng lượng trong thời gian dùng các chất thử nghiệm.

Như được thể hiện trên Fig. 8, số lượng hành vi gãi được đo là 100/giờ hoặc ít hơn ở tất cả các nhóm dùng chất thử nghiệm trong tám tuần, trong khi số lượng hành vi gãi thể hiện xu hướng giảm hàng tuần, so với nhóm tá dược. Các tuần 3, 6, và 8 có ý nghĩa ở các nhóm được dùng RHT-3201 với tất cả nồng độ so với nhóm tá dược.

Ngoài ra, như được thể hiện trên FIG. 9, việc dùng qua da dexamethason là đối chứng dương trong suốt tám tuần gây ra sự giảm thể trọng trong 4 tuần, trong khi đó việc dùng RHT-3201 theo sáng chế thể hiện sự tăng thể trọng giống như ở nhóm bình thường, tức là không có tác dụng phụ làm giảm thể trọng, và do đó RHT-3201 theo sáng chế được xác nhận là an toàn.

<10-6> Xác định mức IgE huyết thanh

Sau khi dùng các thuốc thử nghiệm trong tám tuần, máu được lấy qua đám rối tĩnh mạch sau hốc mắt, và được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút để tách huyết thanh. Mức IgE huyết thanh được đo bằng cách sử dụng kit ELISA (SHIBAYAGI,

Japan).

Như được thể hiện trên Fig. 10, liên quan đến IgE mà được biết là đặc biệt gia tăng tại thời điểm gây cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, các nhóm dùng RHT-3201 theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế đáng kể, trong đó, đặc biệt là, trong việc đánh giá so sánh giữa các nồng độ khác nhau, đơn vị dùng $\times 10^9$ thể hiện tác dụng ức chế cao nhất.

<10-7> Khả năng sản sinh xytokin của các tế bào hạch bạch huyết

Sau khi kết thúc việc dùng các chất thử nghiệm, mỗi con chuột NC/Nga bị cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng được làm chết. Kích cỡ và trọng lượng của các hạch bạch huyết dưới nách được đo. Ngoài ra, các huyền phù tế bào thu được từ các hạch bạch huyết dưới nách được phân phối vào trong môi trường RPMI-1640 (chứa 10% FBS, 1% penixilin, và 1% streptomycin) đến nồng độ 5×10^6 tế bào/ml. Phần chiết mật bụi nhà (*D. farina*) được bổ sung vào để thu được nồng độ cuối cùng là $10\mu\text{g/ml}$, và được nuôi cấy trong 48 giờ trong máy áp 5% CO_2 ở 37°C . Dịch nổi được lấy để đo mức sản sinh IFN- γ , IL-4, IL-10, và IL-12 sử dụng kit ELISA (đo IFN- γ & IL-4, nhà sản xuất: R&D SYSTEMS, USA; và đo IL-10 & IL-12, nhà sản xuất: SIGMA ALDRICH, USA).

Như được thể hiện trên Fig. 11, các hạch bạch huyết dưới nách có liên quan đến đáp ứng miễn dịch của da lưng của các con chuột NC/Nga, trong khi đó các hạch bạch huyết của nhóm tá được bị to ra do sự tiếp xúc với kháng nguyên mật bụi nhà (phần chiết mật bụi nhà). Như được thể hiện trên các FIG. 12 và 13, các trị số đo thể tích và trọng lượng của các hạch bạch huyết lần lượt là 70mm^3 và 35mg , cao hơn lần lượt gấp 5 lần và 7 lần so với nhóm bình thường. Trong khi đó, kích cỡ của các hạch bạch huyết dưới nách của các con chuột NC/Nga cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng được giảm một cách đáng kể ở các nhóm dùng RHT-3201.

Để xác nhận khả năng sản sinh xytokin khi dùng RHT-3201, hạch bạch huyết dưới nách của các con chuột NC/Nga cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng được tiếp xúc với kháng nguyên mật bụi nhà, và sau đó các mức xytokin liên quan đến đáp ứng miễn dịch được đo. Kết quả được thể hiện trên các FIG. 14 đến 21. Đã xác nhận rằng việc dùng RHT-3201 theo sáng chế làm giảm đáng kể xytokin typ Th1 IFN- γ (xem

FIG. 14) và tác nhân cảm ứng của nó, IL-12 (xem FIG. 15), so với tá dược. Đã xác nhận rằng việc dùng RHT-3201 theo sáng chế làm giảm đáng kể xytokin typ Th2 IL-4 (xem FIG. 16), so với tá dược. Các tế bào tiết IL-10 chính trong các hạch bạch huyết, tức là, các tế bào T điều hòa, thực hiện hoạt động ức chế miễn dịch là ức chế phản ứng Th1 và Th2. Cũng đã xác nhận rằng việc dùng RHT-3201 làm giảm đáng kể IL-10 (xem FIG. 17), so với tá dược.

Để so sánh cơ chế tác dụng của RHT-3201 đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, tỷ lệ xytokin typ Th1/xytokin typ Th2 được thể hiện đối với các mức xytokin được biểu hiện trong mỗi nhóm dùng chất thử nghiệm. Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 18, tỷ lệ IL-4/IFN- γ không khác nhau giữa các nhóm dùng RHT-3201 so với nhóm tá dược. Các kết quả này là khác với phản ứng điều hòa xytokin typ Th1/xytokin typ Th2 của RHT-3201 theo sáng chế trên bệnh viêm da cơ địa dị ứng nhẹ trong ví dụ 9, điều này thể hiện rằng RHT-3201 theo sáng chế có cơ chế tác dụng khác đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng. Nghĩa là, đã xác nhận rằng cơ chế tác dụng của RHT-3201 theo sáng chế được thay đổi theo độ nặng của bệnh viêm da cơ địa dị ứng.

Để xác nhận rằng yếu tố tác dụng mà liên quan đến sự ức chế các tế bào T điều hòa (Treg) như là cơ chế tác dụng khác của RHT-3201 theo sáng chế đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, là xytokin IL-10, tỷ lệ IFN- γ /IL-10 (xem FIG. 19), tỷ lệ IL-4/IL-10 (xem FIG. 20), và tỷ lệ IL-12/IL-10 (xem FIG. 21) được so sánh và phân tích. Kết quả là, đã xác nhận rằng, các trị số tỷ lệ này được giảm một cách đáng kể ở các nhóm dùng RHT-3201 theo sáng chế. Do đó, thấy rằng IL-10 là yếu tố tác dụng có liên quan đến việc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, và xytokin này làm tăng hoạt tính của Treg, do đó biểu hiện tác dụng điều trị đối với bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

<10-8> Quan sát mô bệnh học

Da lưng của chuột NC/Nga được thu hoạch, cố định trong formalin 10%, và được bọc bằng parafin, và cắt mỏng đến độ dày 4 μ m, từ đó tạo ra lát. Sau đó, thay đổi về độ dày của biểu bì và hạ bì được quan sát bằng cách nhuộm hematoxylin & eosin (H&E), trong khi các dưỡng bào được xác nhận bằng cách nhuộm xanh toluidin. Độ dày của da và số lượng dưỡng bào được tính qua việc quan sát sử dụng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100 và 400 lần.

Kết quả của việc quan sát các mô da lưng của chuột NC/Nga qua việc nhuộm H&E là, như được thể hiện trên FIG. 22, nhóm tá được với bệnh viêm da cơ địa dị ứng được cảm ứng bằng sự tiếp xúc với mặt bụi nhà thể hiện các phát hiện mô bệnh học là mở rộng sự dày đặc do sự dày đặc của lớp biểu bì hướng đến lớp hạ bì so với nhóm bình thường và sự thâm nhập gia tăng của các tế bào viêm. Qua quan sát bằng kính hiển vi, các nhóm dùng RHT-3201 theo sáng chế thể hiện giảm sự thâm nhập của các tế bào viêm; ức chế một cách đáng kể khả năng mở rộng độ dày biểu bì (xem FIG. 23) và khả năng mở rộng độ dày hạ bì (xem FIG. 24), mà quan sát được đối với sự cảm ứng bệnh viêm da cơ địa dị ứng, so với nhóm tá được.

Kết quả quan sát các mô da lưng của chuột NC/Nga qua việc nhuộm xanh toluidin là, đã xác nhận rằng các dưỡng bào thâm nhập thêm vào các mô da ở nhóm tá được bị bệnh viêm da cơ địa dị ứng cảm ứng bởi sự tiếp xúc với mặt bụi nhà, là bệnh viêm da cơ địa dị ứng cảm ứng bởi kháng nguyên, so với nhóm bình thường (xem FIG. 25). Ở bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng, số lượng dưỡng bào thường gia tăng theo thời gian bị bệnh. Như được thể hiện trên Fig. 26, đã xác nhận rằng số lượng dưỡng bào tăng lên ở các mô da của chuột (tá được) bị tiếp xúc với mặt bụi nhà trong 11 tuần, trong khi đó số lượng dưỡng bào ở chuột cảm ứng bởi bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng được giảm đi một cách đáng kể ở các nhóm được dùng RHT-3201 trong tám tuần. Do đó, RHT-3201 theo sáng chế được xem như là có tác dụng đáng kể trong việc làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng nặng.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Như nêu trên, sáng chế đề cập đến thể liên hợp *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt với chất kết dính polysacarit dạng polyme, phương pháp sản xuất và sử dụng nó. Thể liên hợp *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo sáng chế có tác dụng trị liệu tuyệt vời đối với các bệnh dị ứng, đặc biệt là, cải thiện đáng kể tính cạnh tranh dính bám vào niêm mạc ruột so với các chế phẩm vi khuẩn axit lactic thông thường, và thể hiện tác dụng ngăn ngừa, làm thuyên giảm, hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng ở mức tương đương với các thuốc trên cơ sở steroid. Do đó, sáng chế có khả năng áp dụng công nghiệp cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, phương pháp này bao gồm các bước sau:

(a) tách môi trường nuôi cấy lên men được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus*, thành vi khuẩn và dịch lọc lên men;

(b) trộn dịch lọc lên men thu được ở bước (a) và polysacarit dạng polyme để sản xuất chất kết dính polysacarit dạng polyme;

(c) tiêu diệt bằng nhiệt vi khuẩn tách được ở bước (a); và

(d) liên hợp vi khuẩn được tiêu diệt bằng nhiệt ở bước (c) với chất kết dính được sản xuất ở bước (b).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó *Lactobacillus rhamnosus* là *Lactobacillus rhamnosus* RHT-3201 (*Lactobacillus rhamnosus* KCTC 10833BP).

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polysacarit dạng polyme trong bước (b) là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm axit hyaluronic, alginat, maltodextrin, và chitosan.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polysacarit dạng polyme trong bước (b) là axit hyaluronic.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó axit hyaluronic được trộn với dịch lọc lên men ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 1% (trọng lượng/thể thích).

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sự tiêu diệt bằng nhiệt trong bước (c) được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 100°C.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sự tiêu diệt bằng nhiệt trong bước (c) được thực hiện trong thời gian từ 10 đến 120 phút.

8. *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme, được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 1.

9. Dược phẩm để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng, trong đó dược phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo điểm 8.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này chứa *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{10} CFU/g.
11. Thực phẩm để ngăn ngừa và làm thuyên giảm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, trong đó thực phẩm này chứa thành phần hoạt tính là *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme theo điểm 8.
12. Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm sữa lên men, sữa chua, các đồ uống, các đồ uống có sữa, các chất phụ gia thực phẩm, và thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe.
13. Thực phẩm theo điểm 11, trong đó thực phẩm này chứa *Lactobacillus rhamnosus* được tiêu diệt bằng nhiệt liên hợp với chất kết dính polysacarit dạng polyme ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{10} CFU/g.

FIG.1

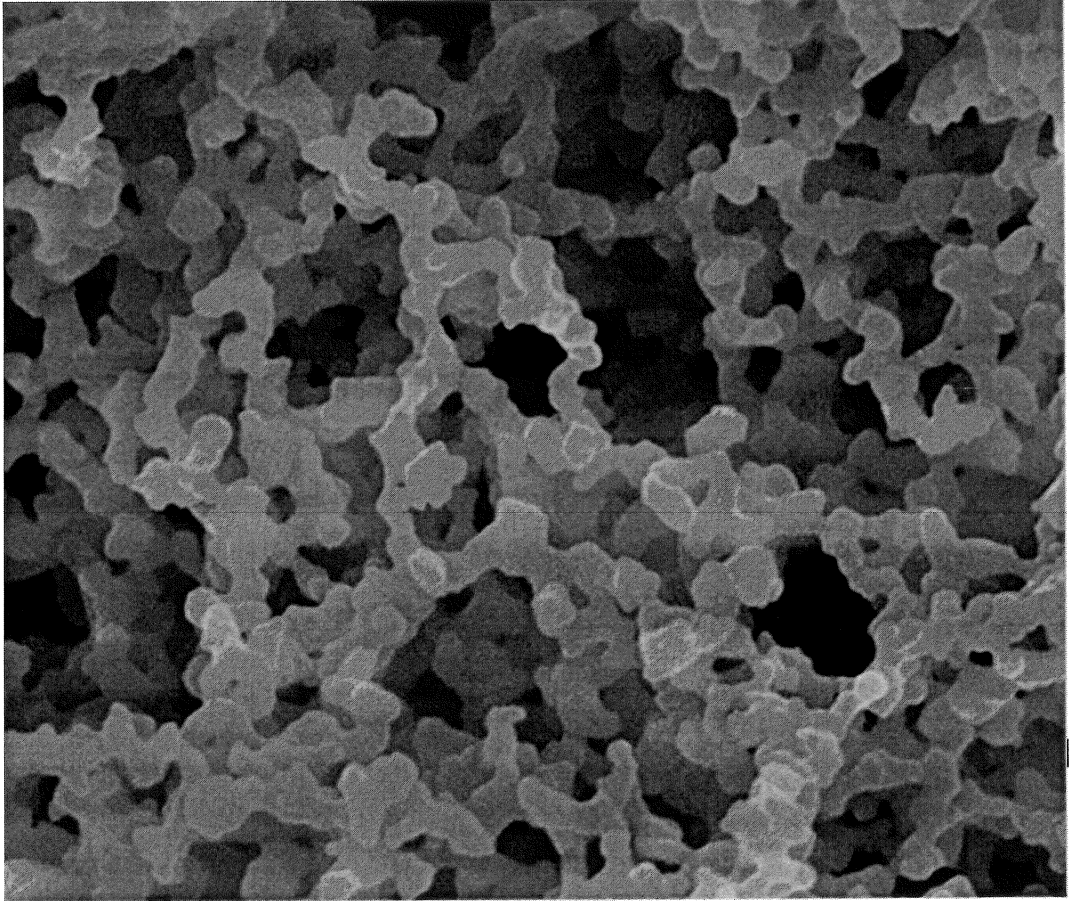


FIG.2

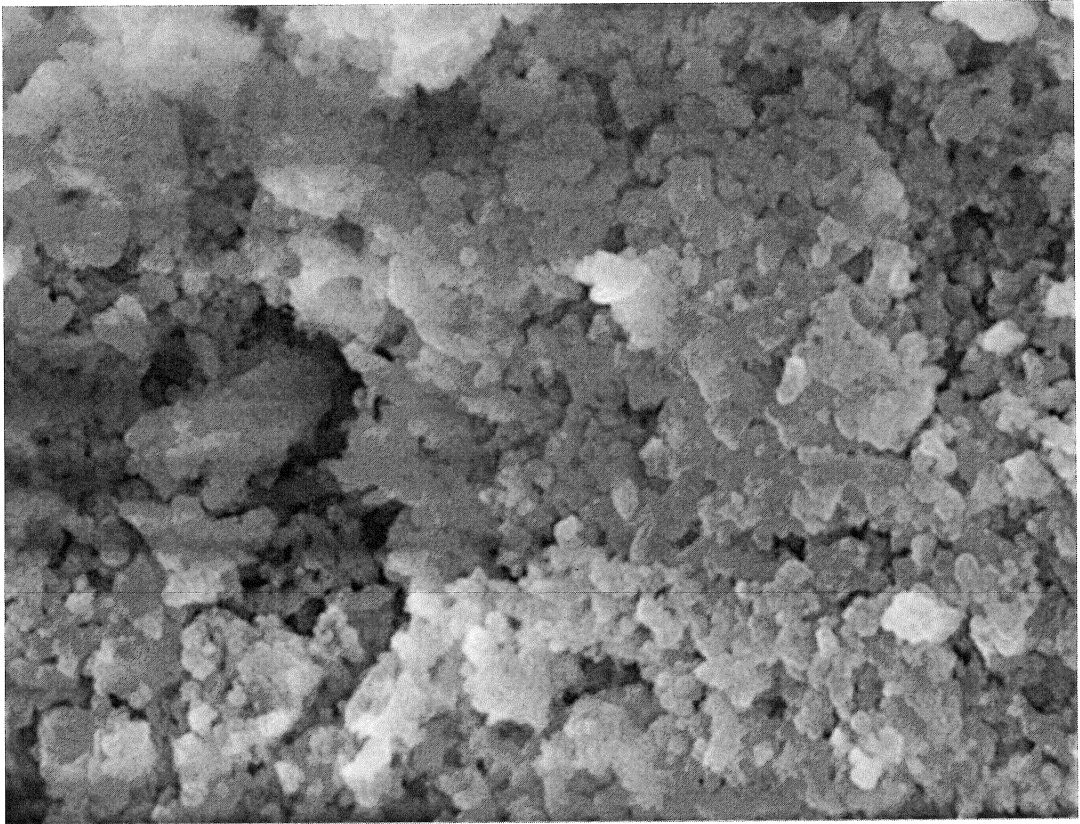


FIG.3

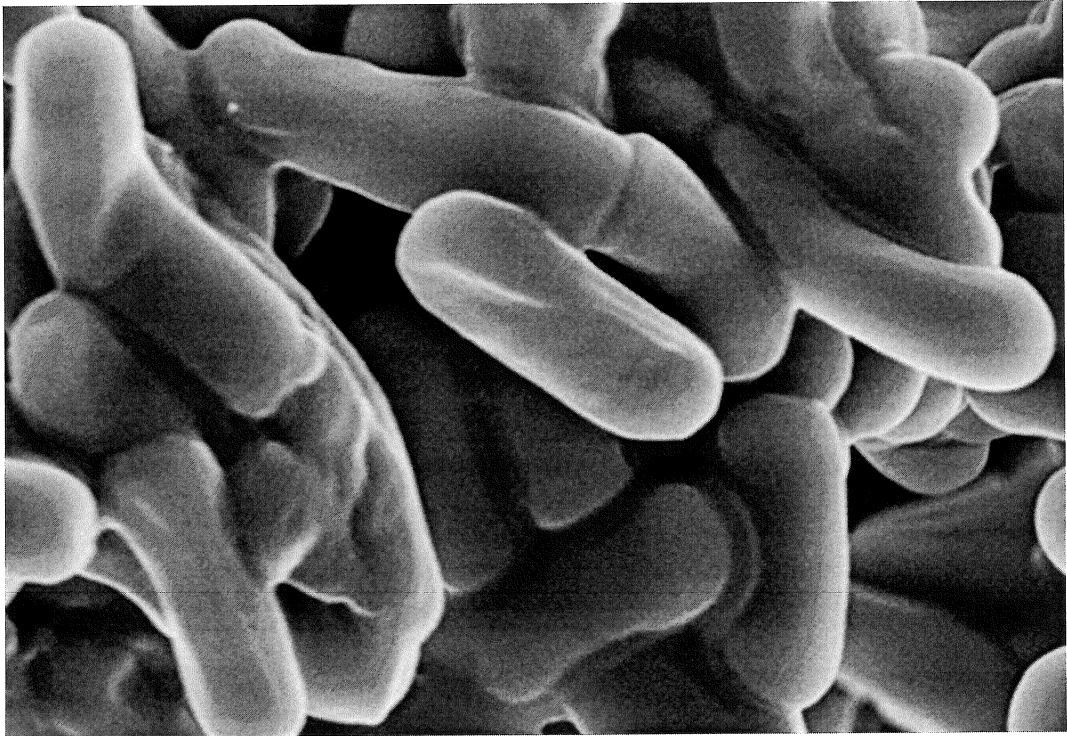


FIG.4

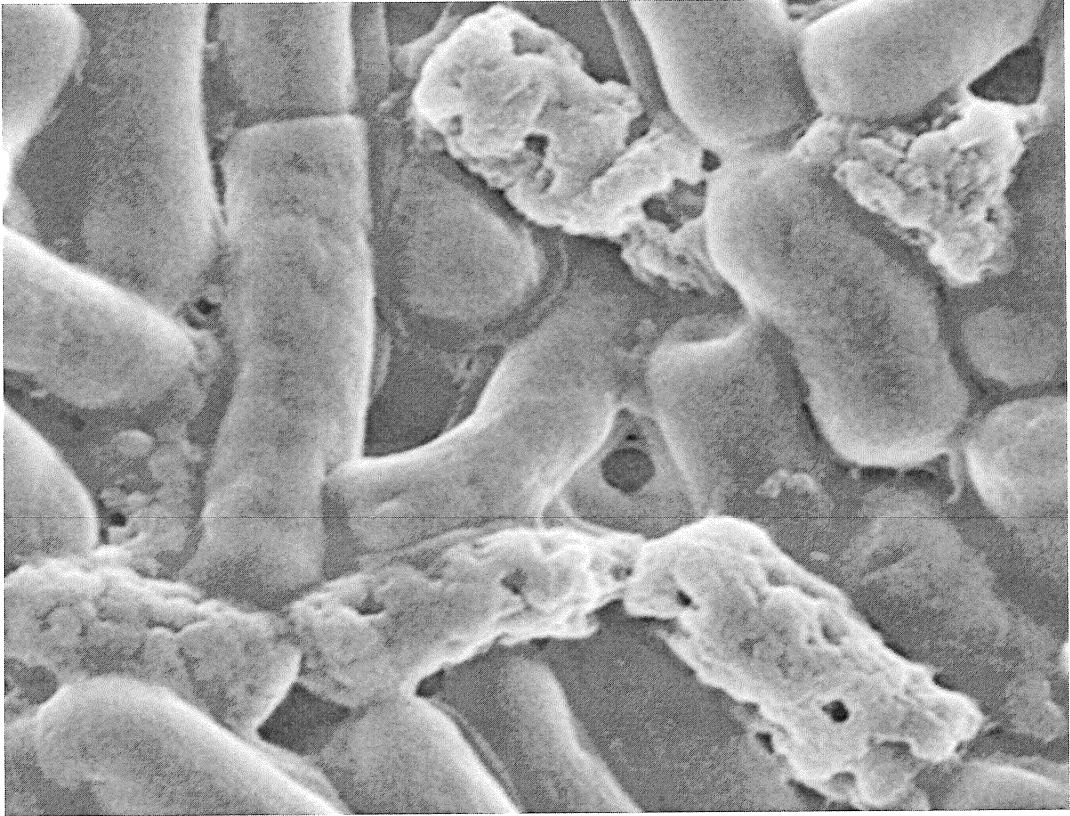


FIG.5

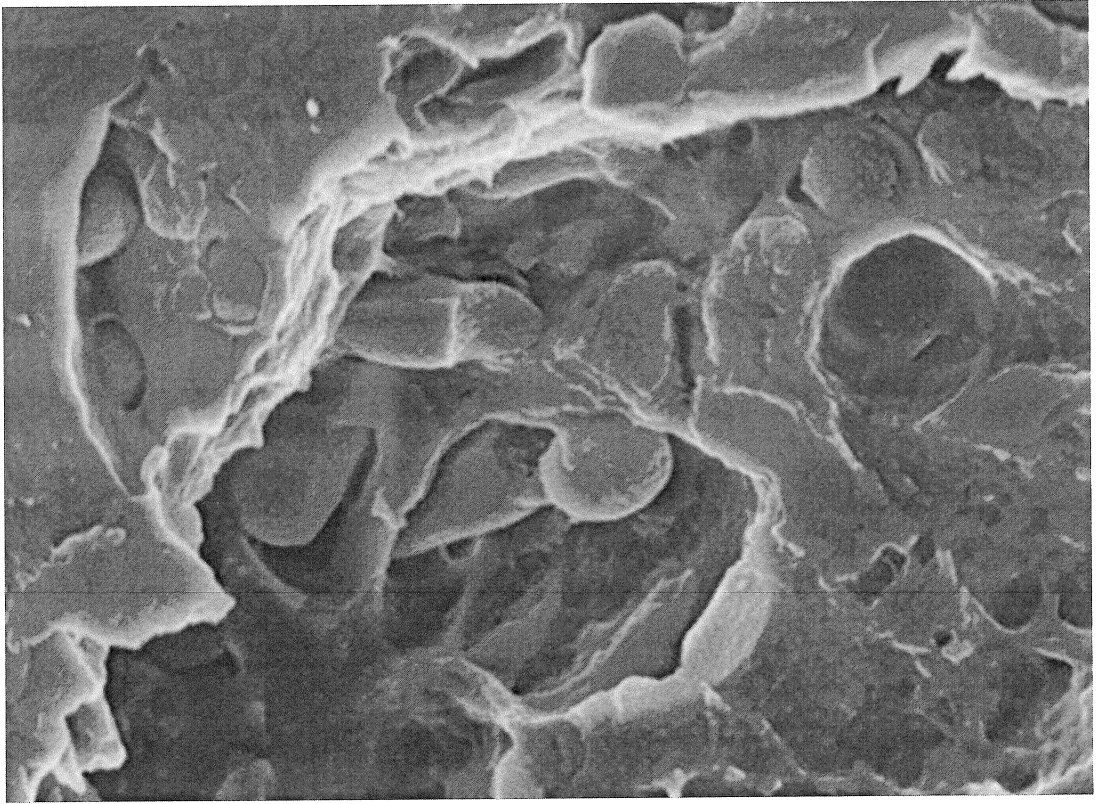


FIG.6

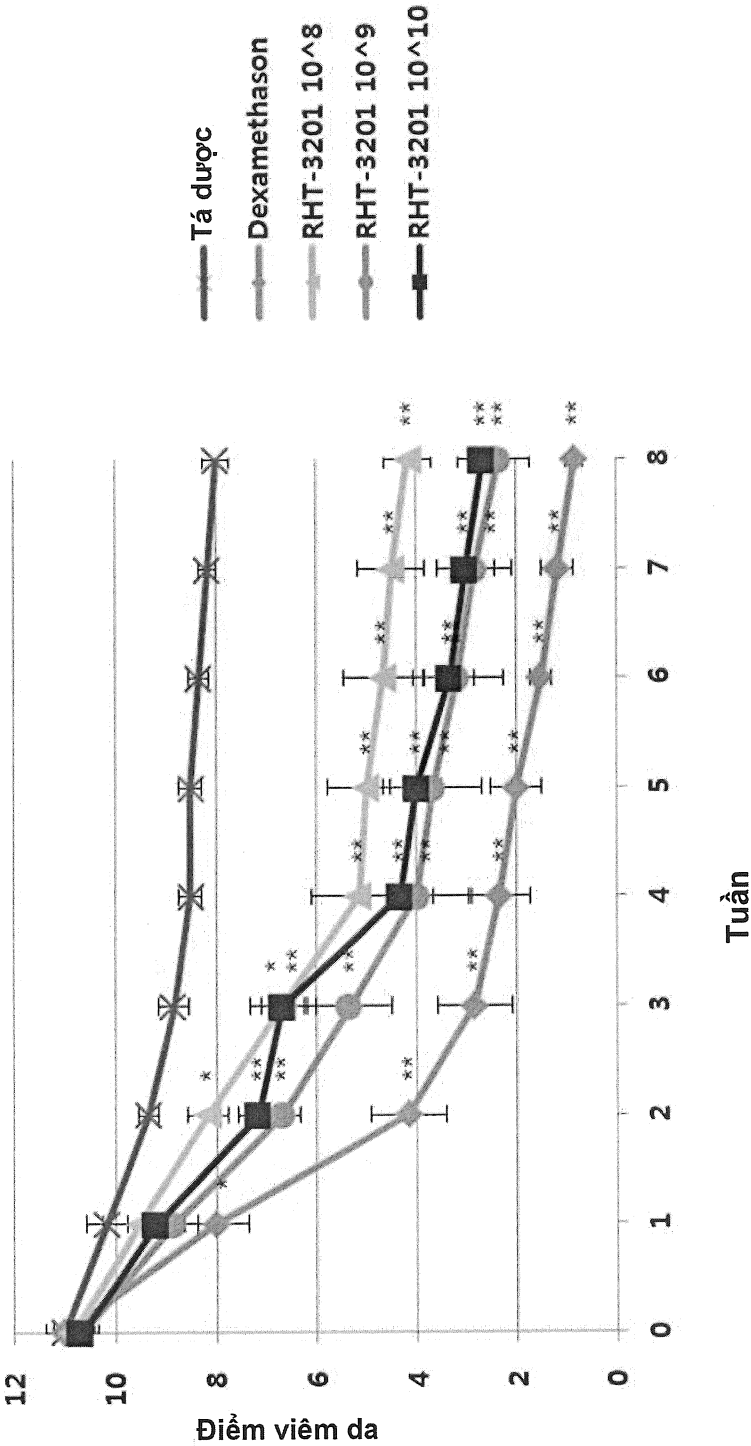


FIG.7

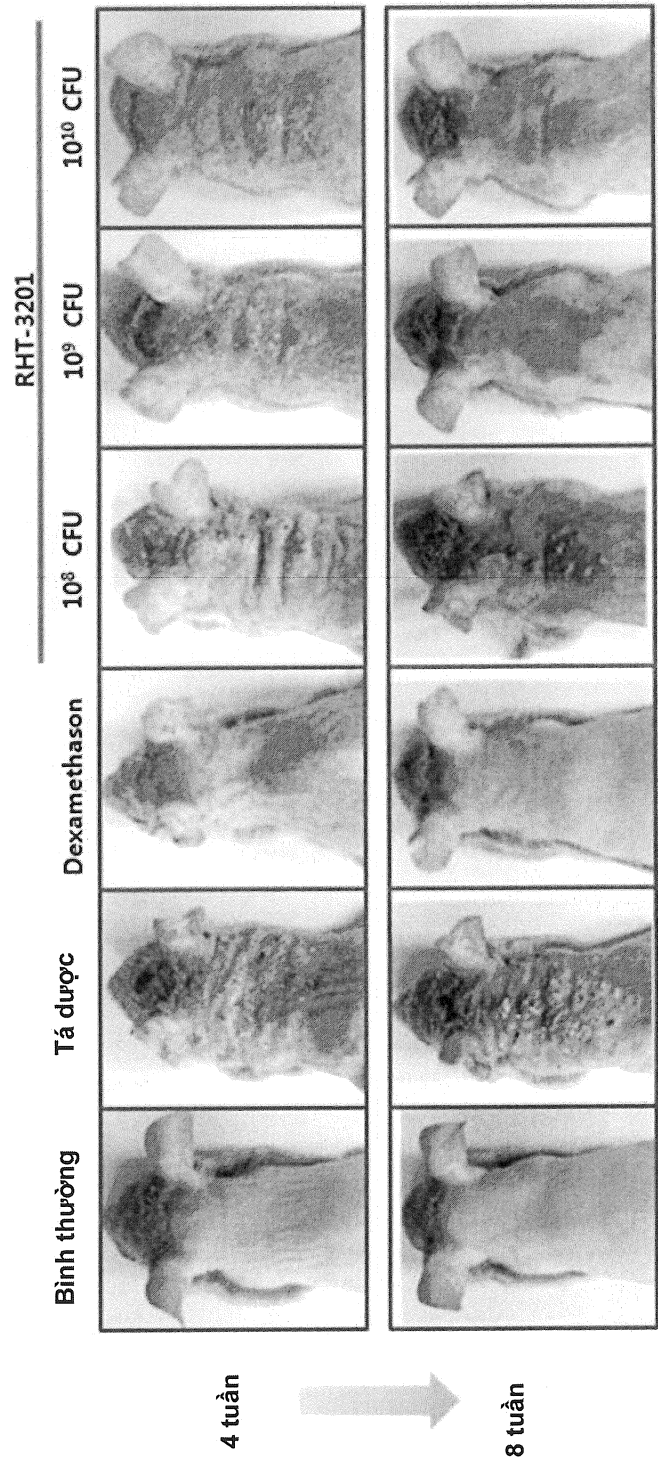


FIG.8

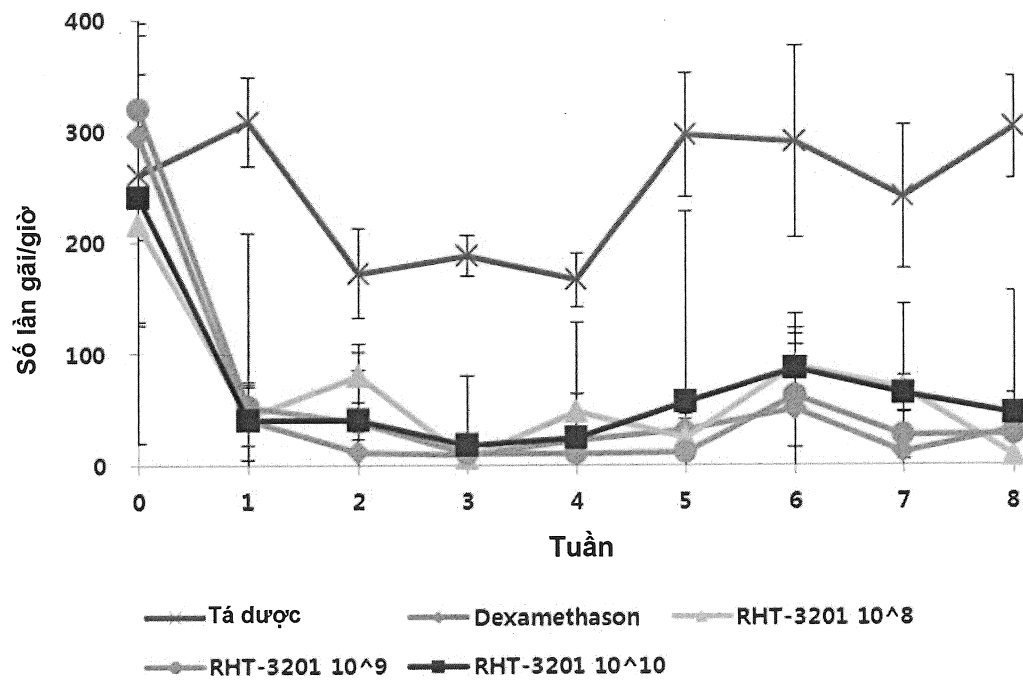


FIG.9

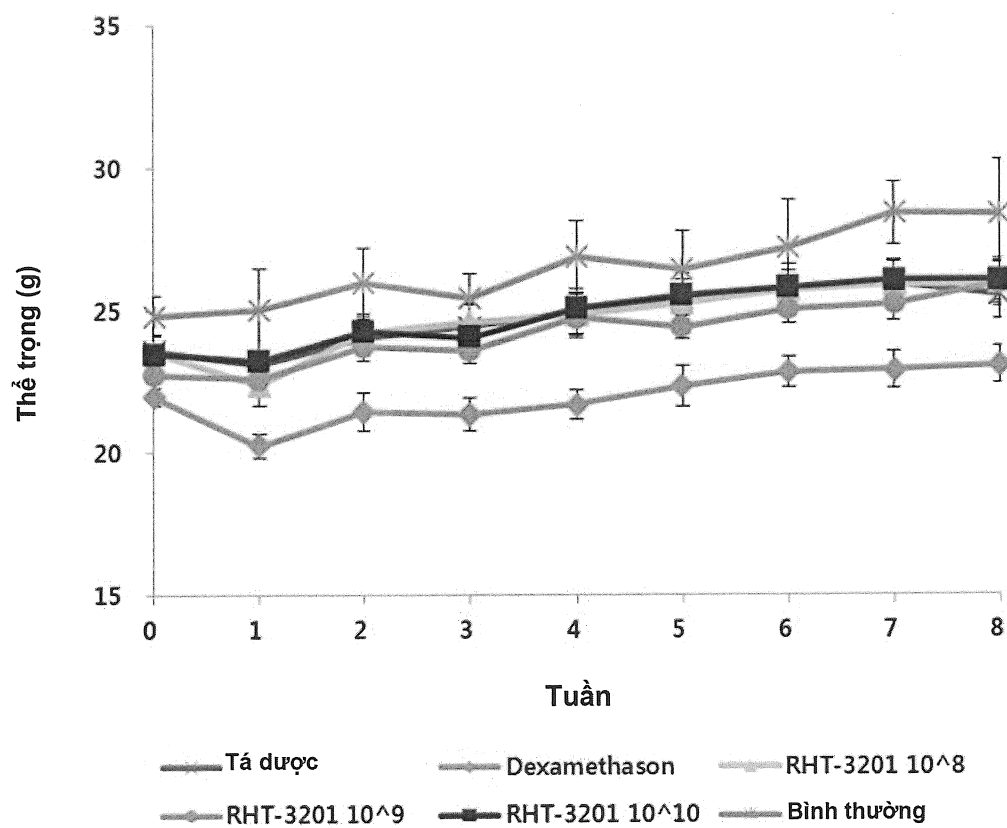


FIG.10

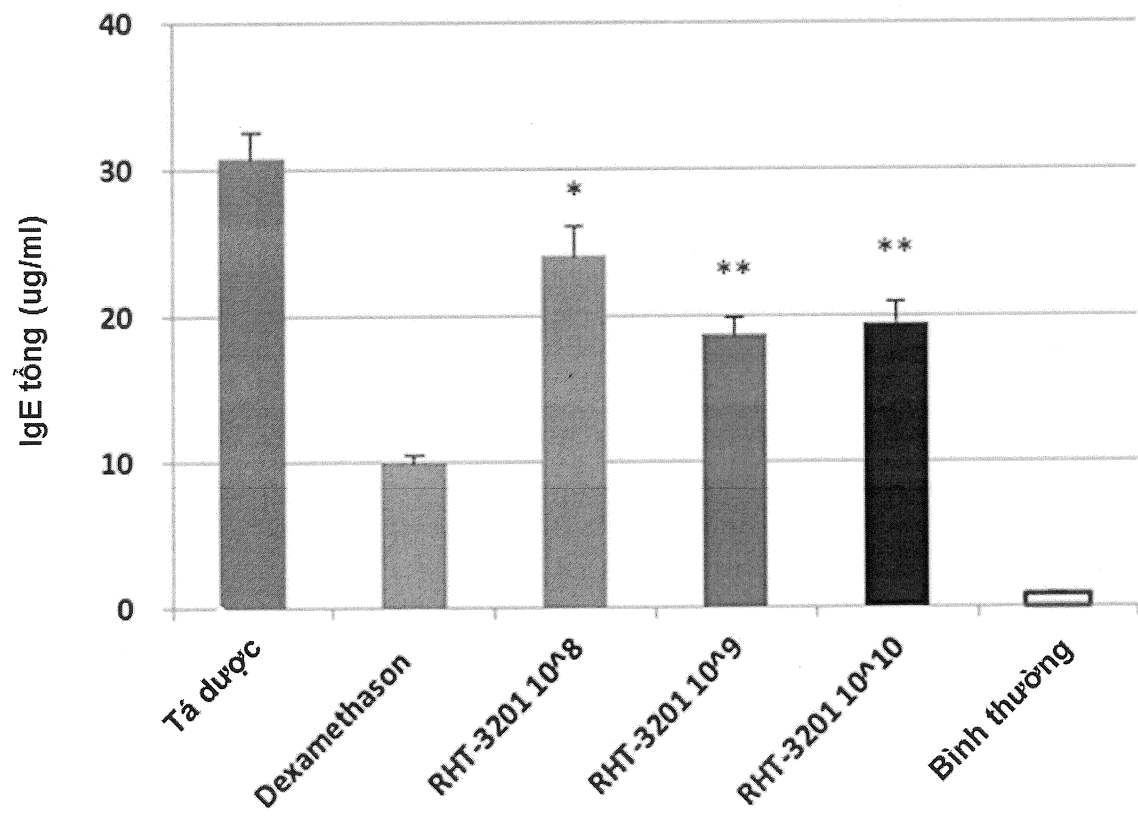


FIG.11

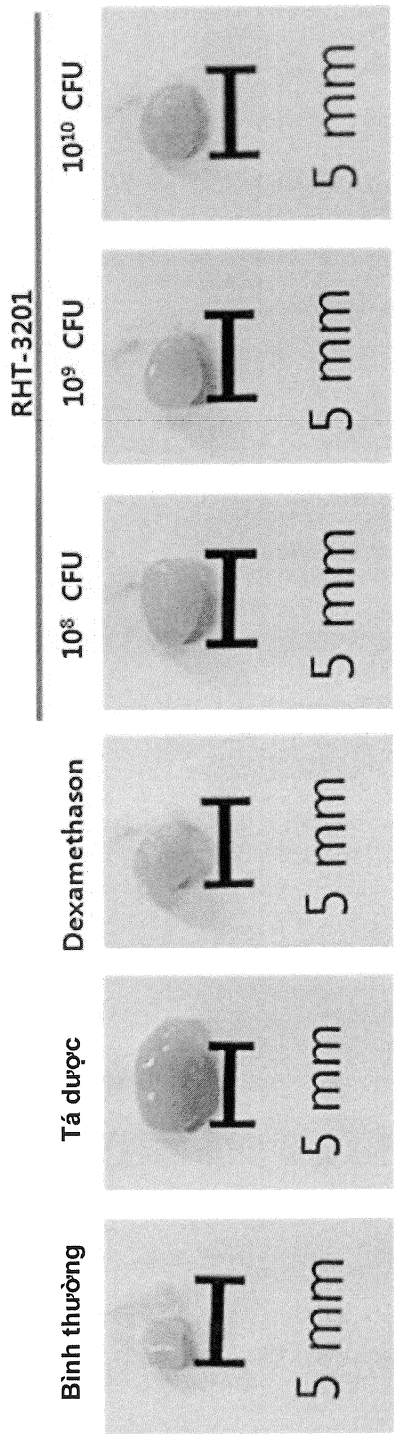


FIG.12

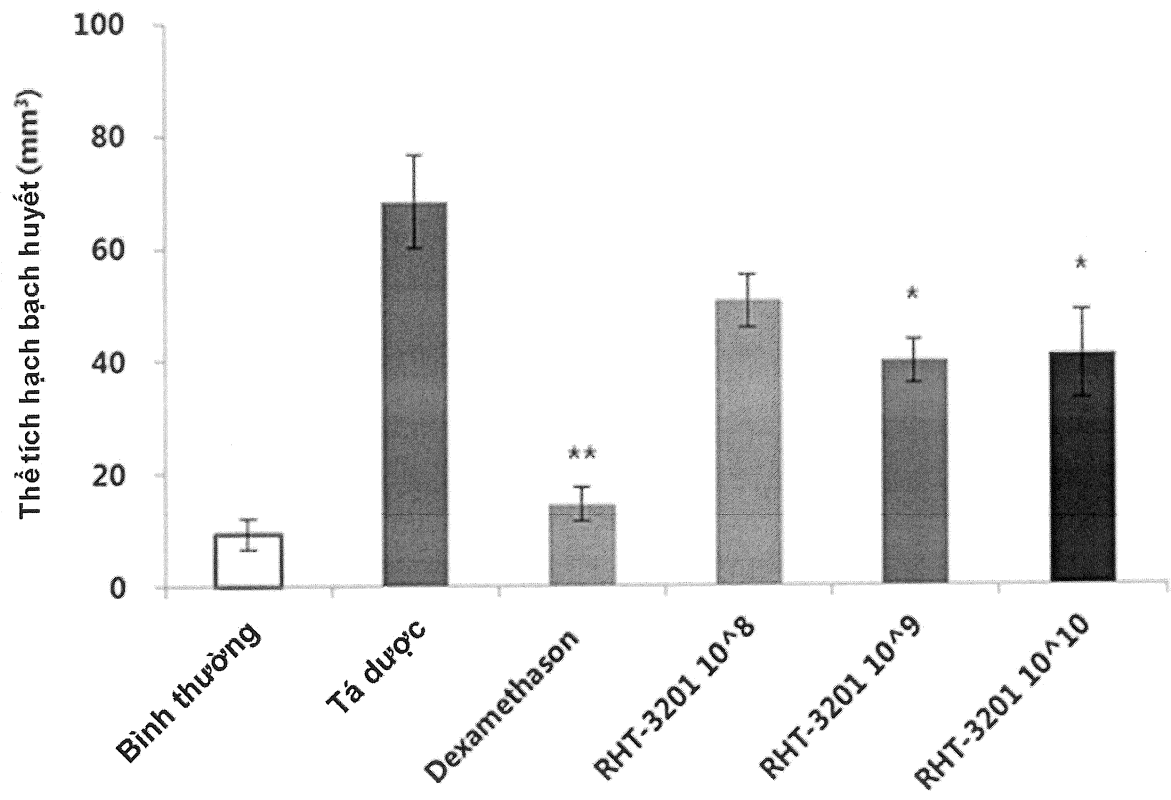


FIG.13

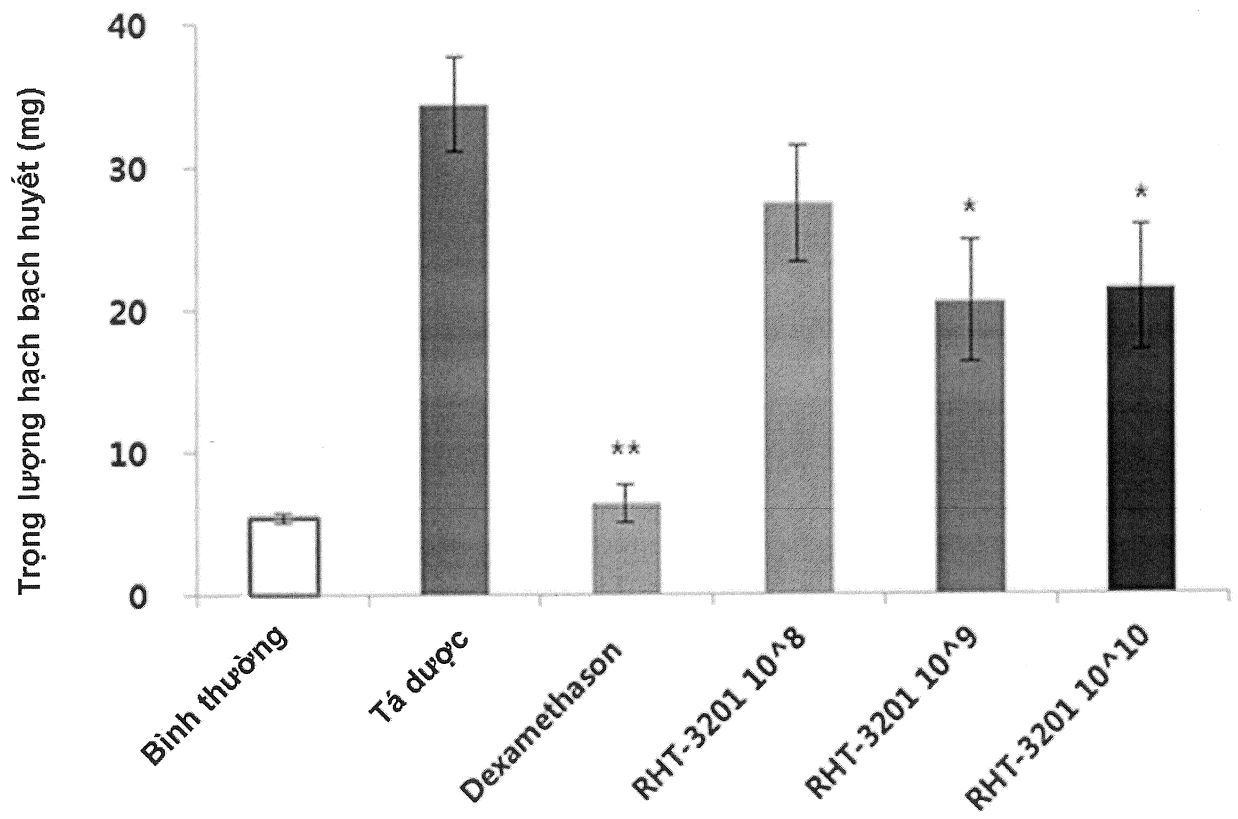


FIG.14

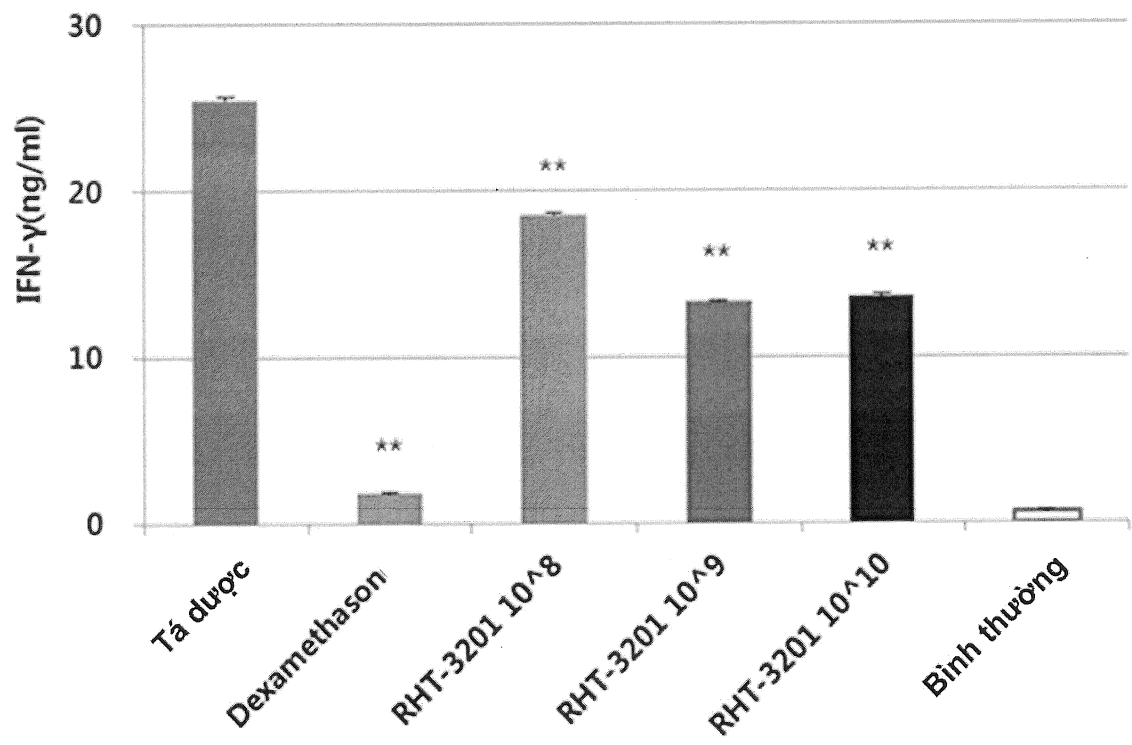


FIG.15

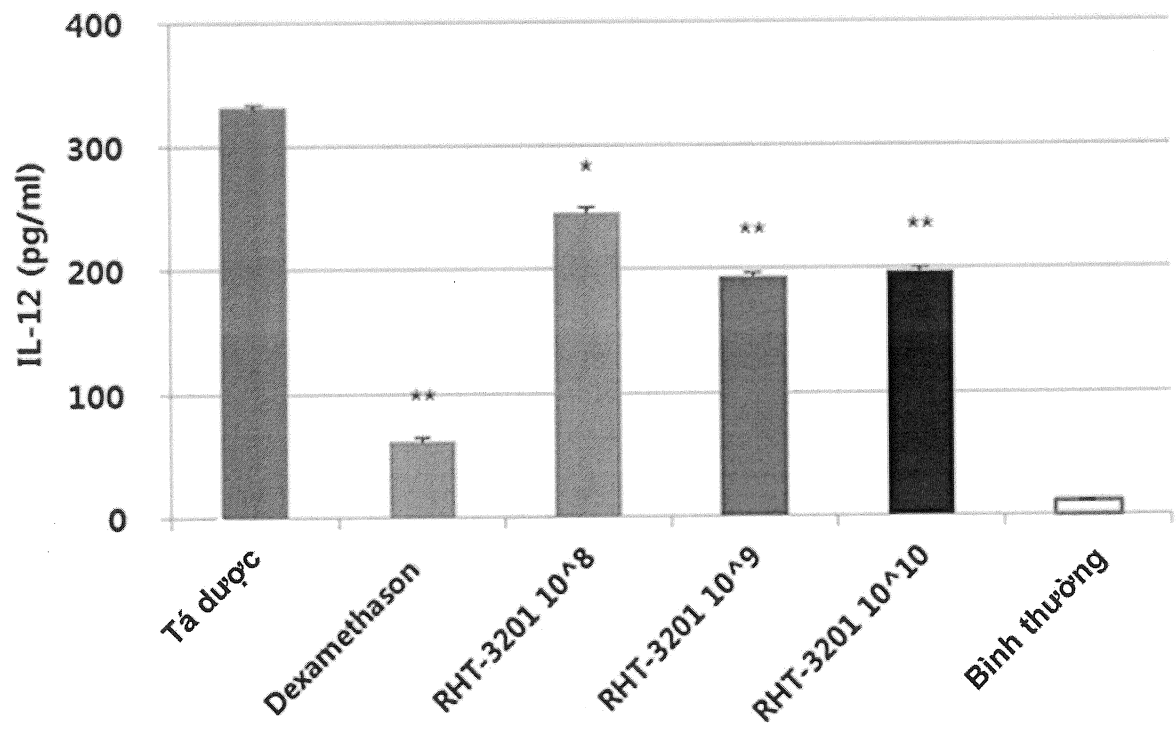


FIG.16

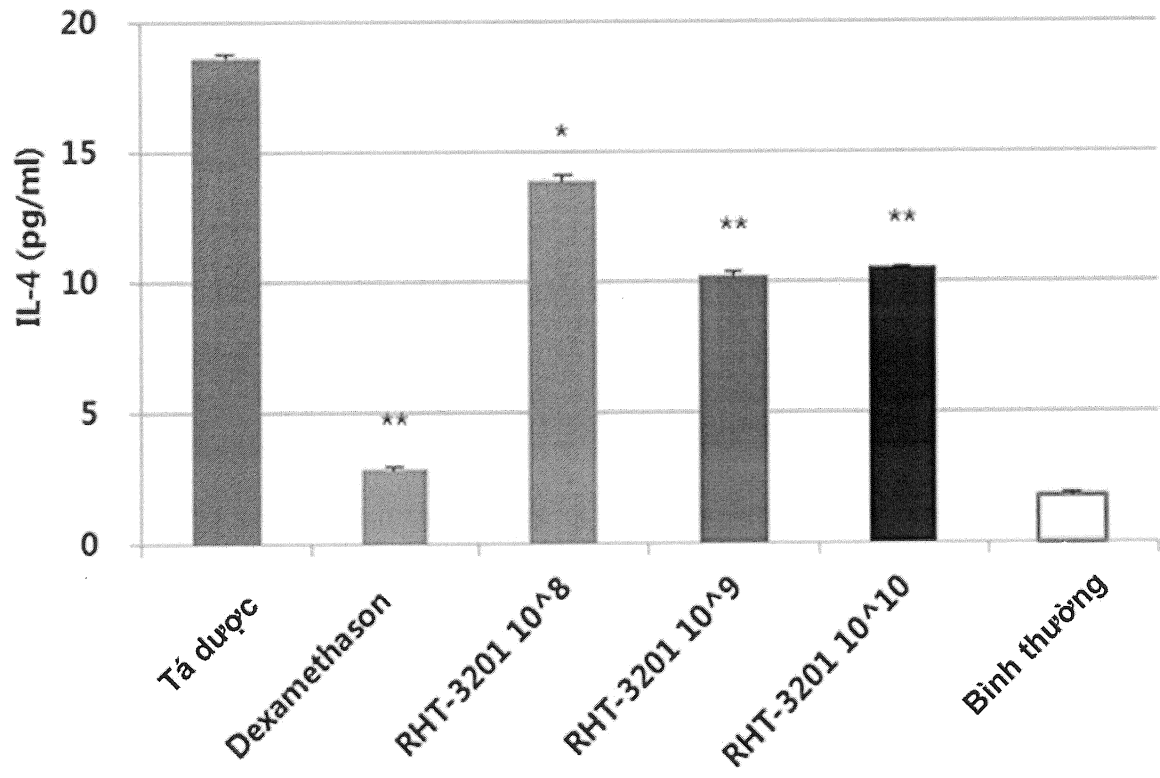


FIG.17

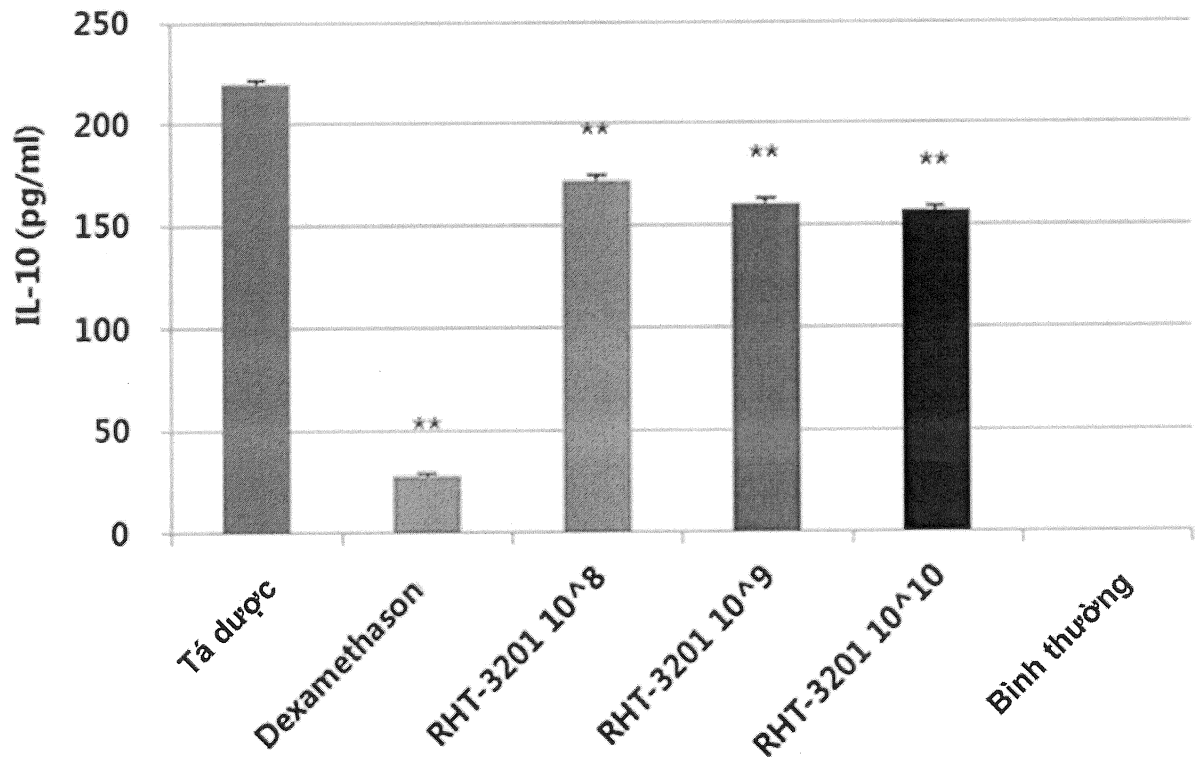


FIG.18

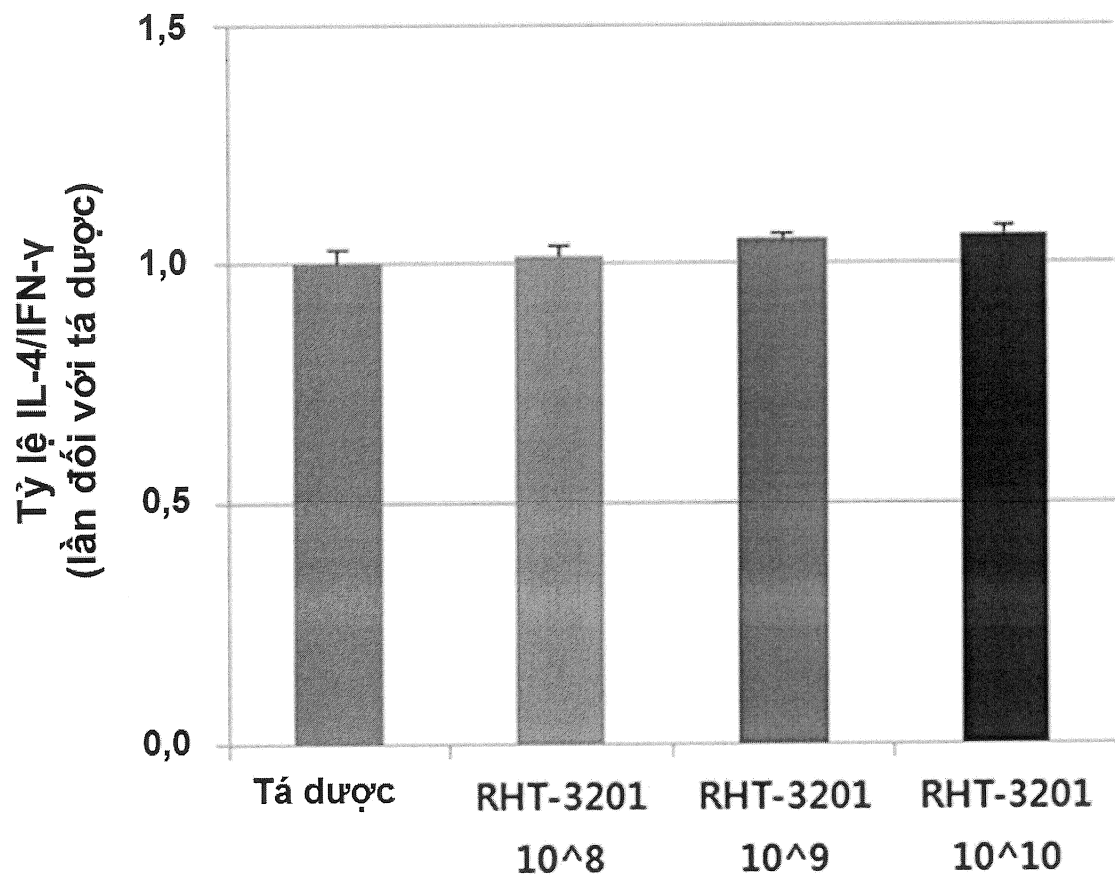


FIG.19

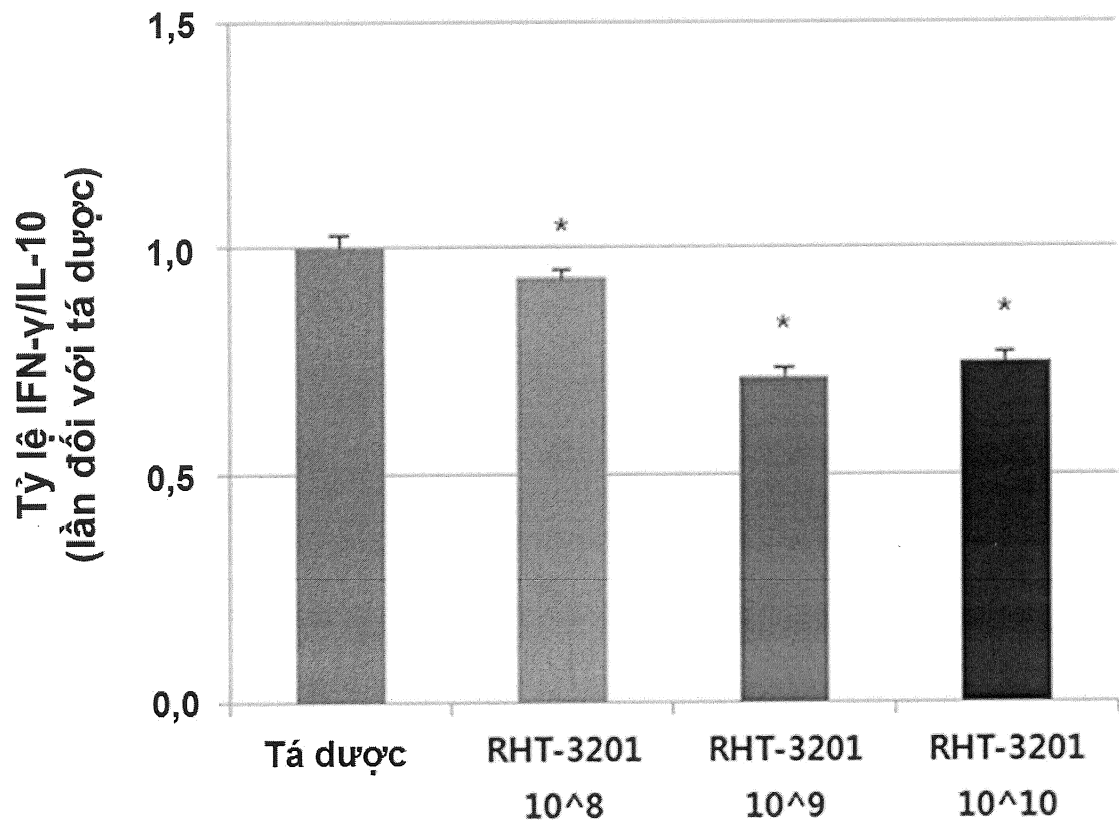


FIG.20

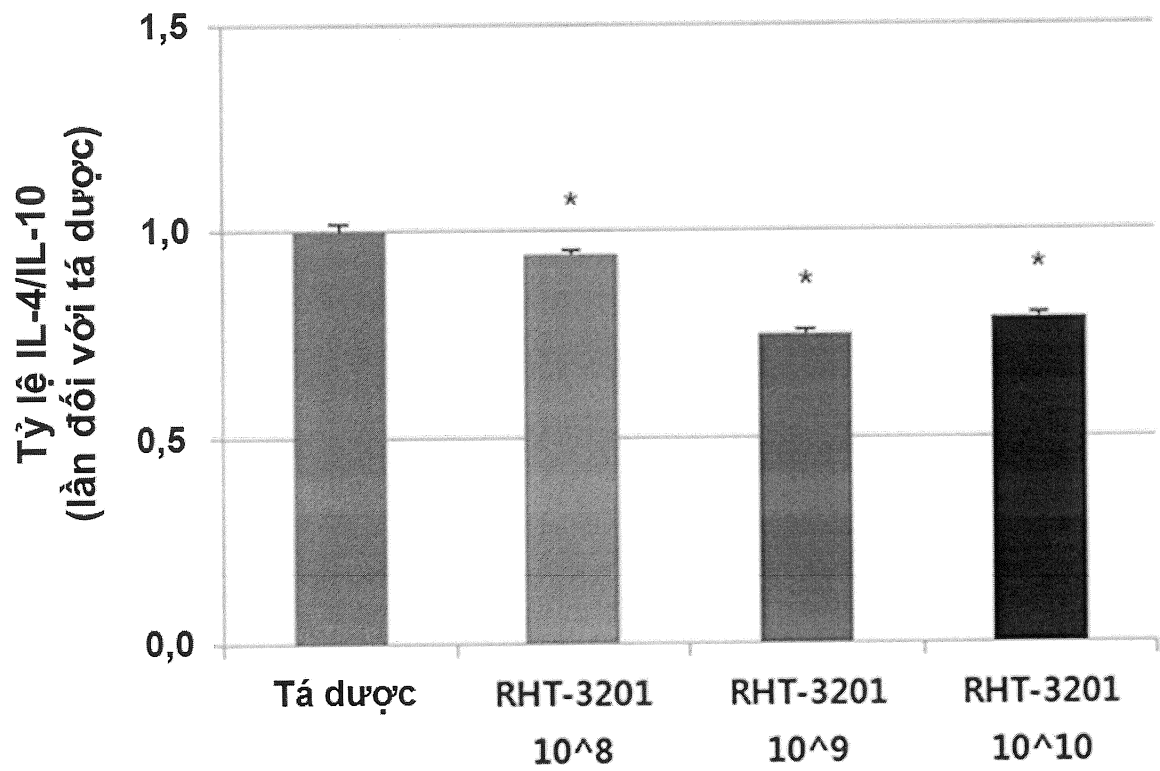


FIG.21

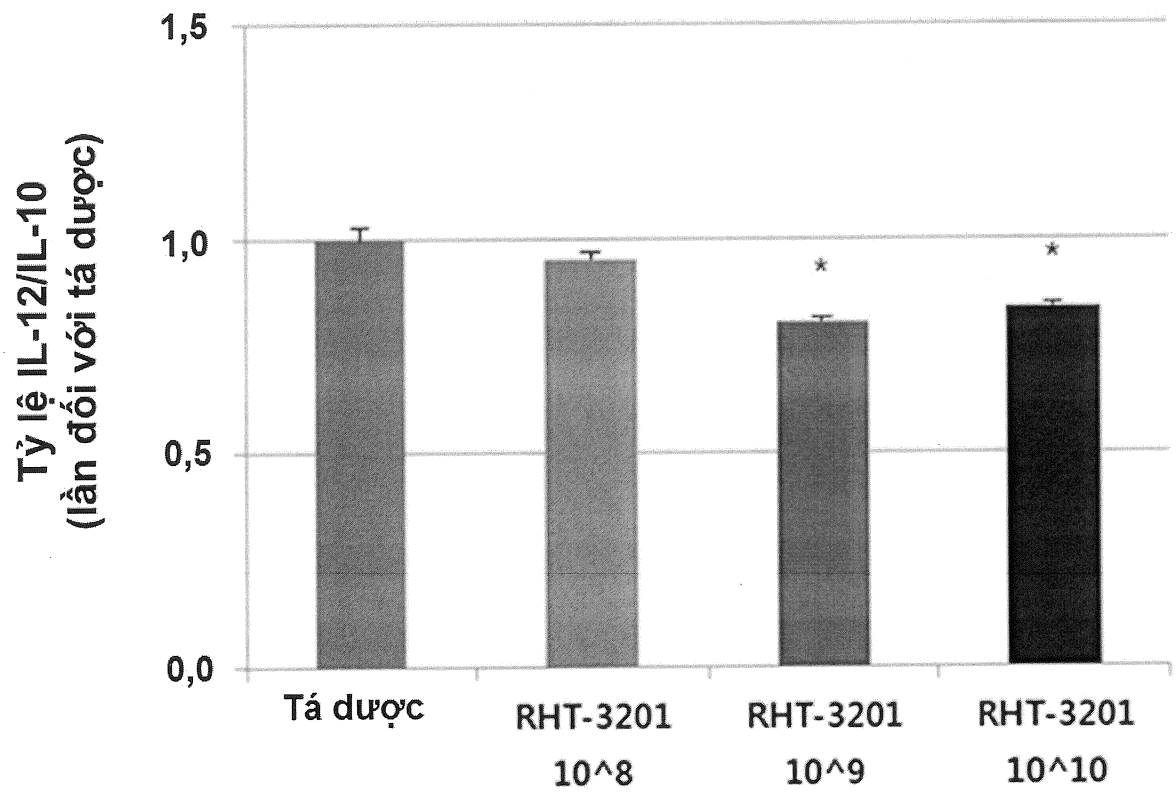


FIG.22

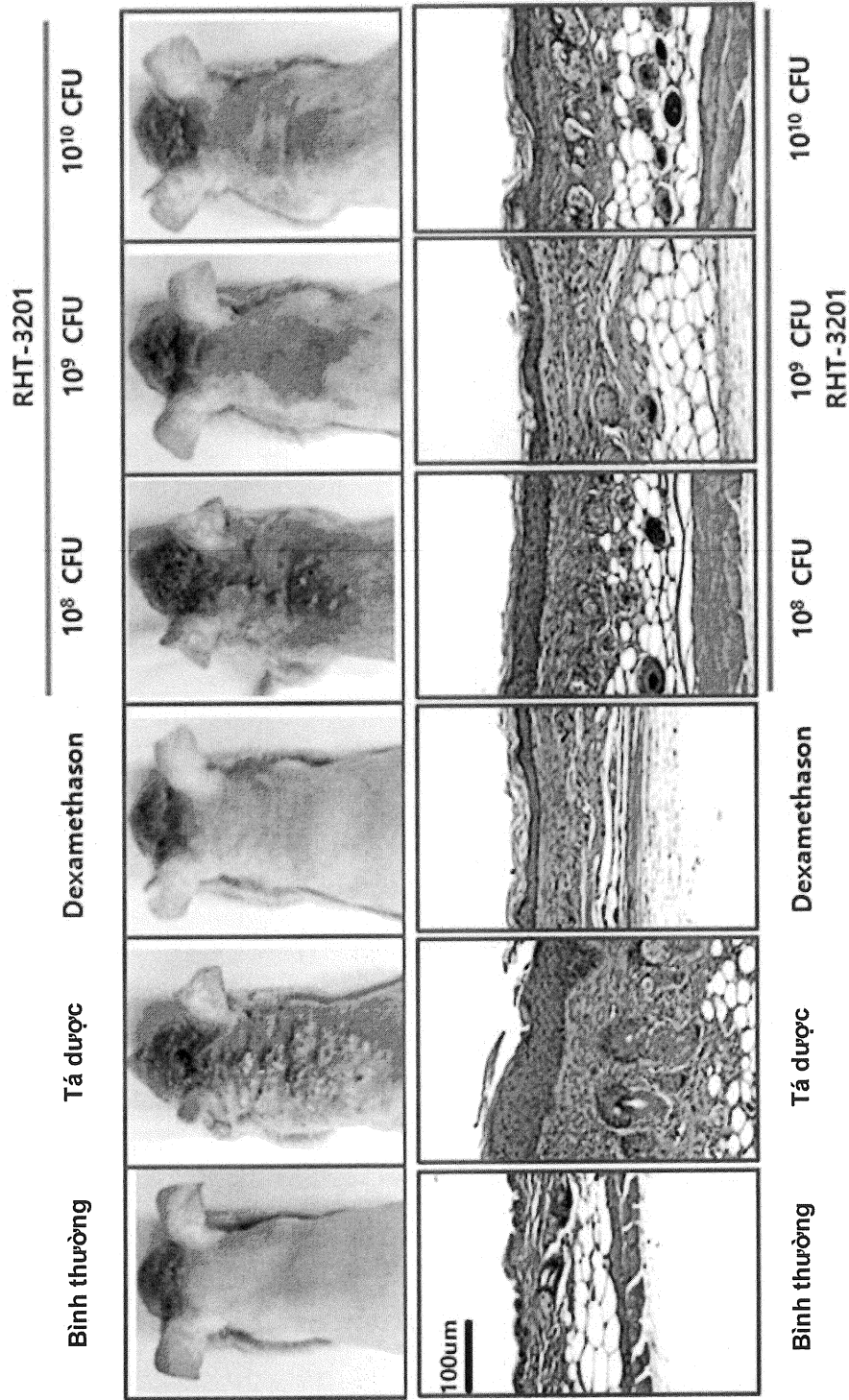


FIG.23

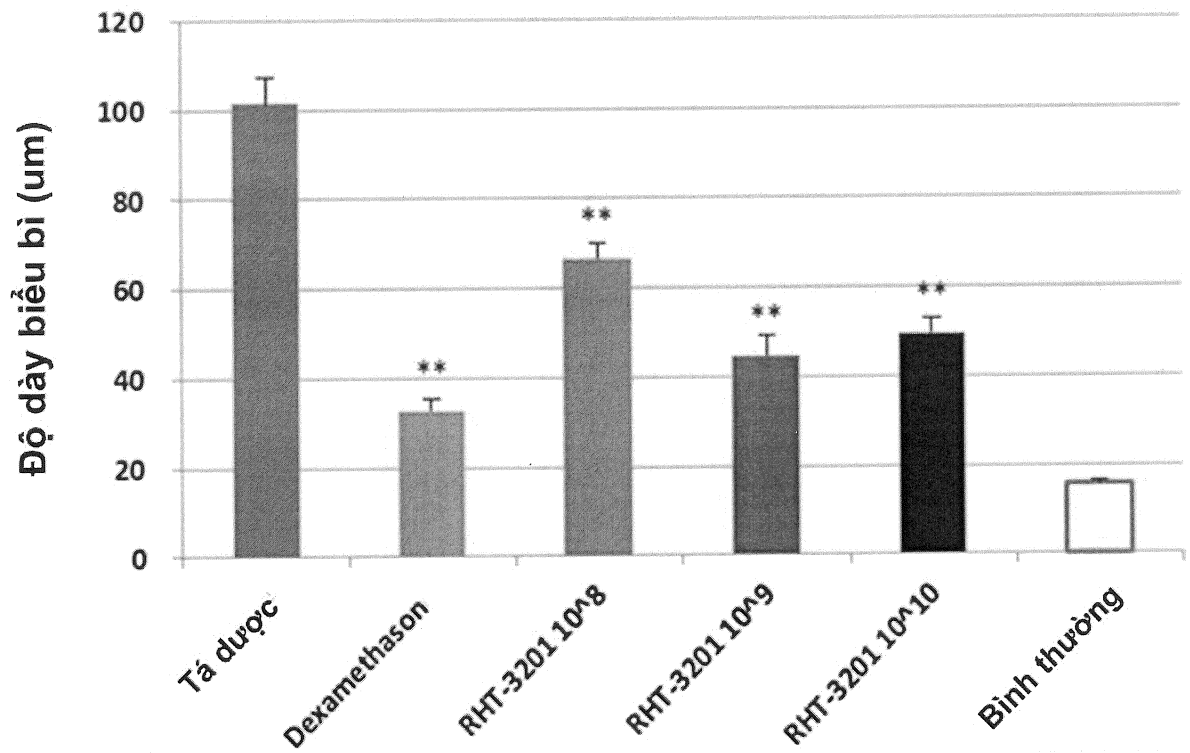


FIG.24

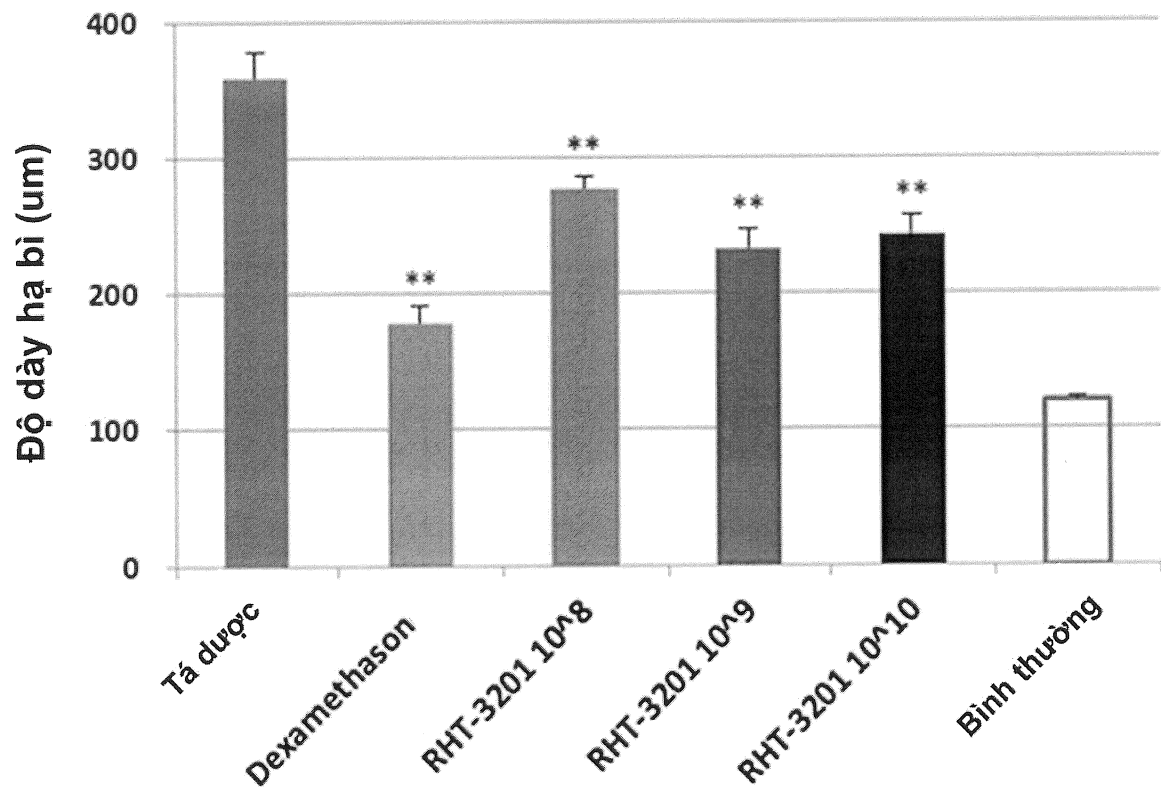


FIG.25

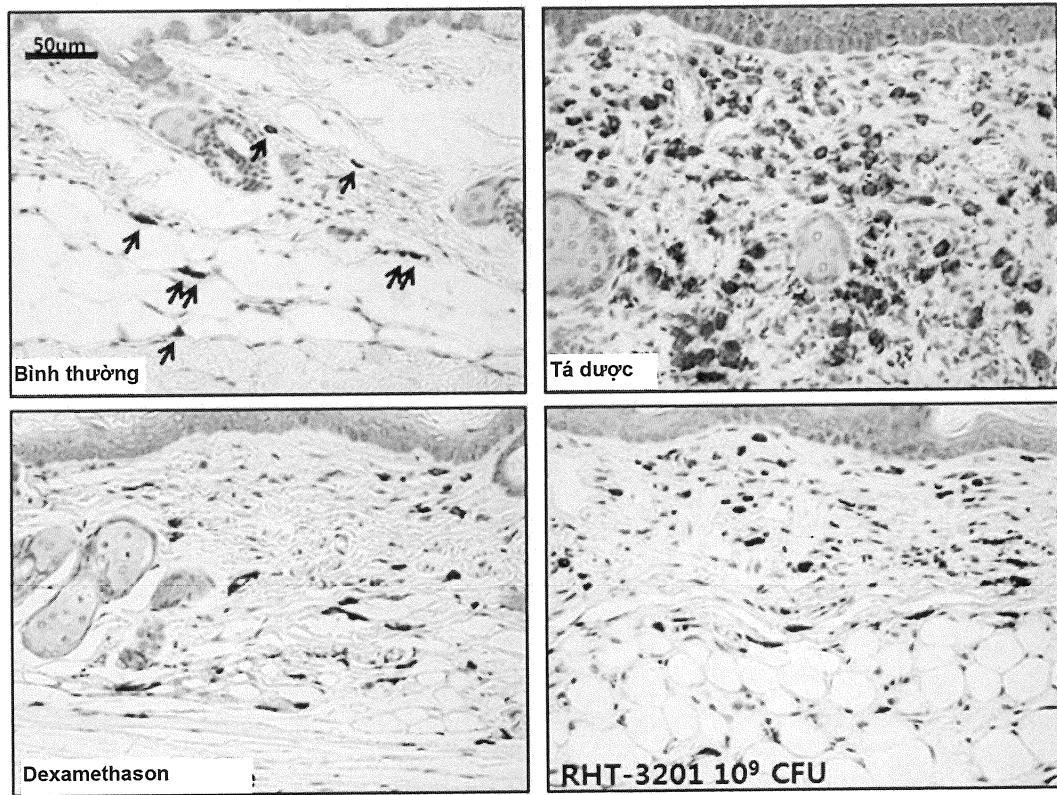


FIG.26

