



(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)



1-0032569

(51)<sup>7</sup> C12N 1/20; C12R 1/225; A61K 35/74

(13) B

(21) 1-2015-00403

(22) 09/07/2013

(86) PCT/EP2013/064424 09/07/2013

(87) WO2014/009330 16/01/2014

(30) 1256569 09/07/2012 FR

(45) 25/07/2022 412

(43) 27/04/2015 325A

(73) S.P.M.D (FR)

174, quai de Jemmapes, F-75010 Paris, France

(72) NIVOLIEZ, Adrien (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG LACTOBACILLUS CRISPATUS, DƯỢC PHẨM VÀ DƯỢC THỰC PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus crispatus* được phân lập, có ký hiệu là IP174178 và đã được nộp lưu ở CNCM với số I-4646 hoặc chủng phân lập có các đặc điểm tương tự như IP174178. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm hoặc dược thực phẩm chứa chủng này, và được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm khuẩn sinh dục.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới chủng *Lactobacillus crispatus* đặc hiệu mới, được phân lập từ các mẫu mô khỏe mạnh, và chủng bất kỳ có các đặc điểm tương tự, cũng như đề cập tới chế phẩm chứa chúng.

Ở phụ nữ khỏe mạnh, hệ niệu sinh dục chứa gần 50 loài vi sinh vật khác nhau. Trong số các vi sinh vật này, 95% được cấu thành từ nhiều chủng lactobacilli khác nhau, bao gồm cả “Döderlein’s bacillus”. Các chủng lactobacilli này có tác dụng bảo vệ chống lại các mầm bệnh theo nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm sản sinh hydro peroxit, axit lactic và các kháng sinh diệt khuẩn, kìm hãm quá trình bám dính và lan truyền các mầm bệnh. Cụ thể, các chủng lactobacilli này duy trì độ pH axit bằng cách tạo ra axit lactic từ glycogen có mặt trong dịch âm đạo. Từ đó, chúng có khả năng kìm hãm sự phát triển của nhiều mầm bệnh ở âm đạo, như *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Neisseria gonorrhoeae*, mycoplasmas, *Mobiluncus*, và trên hết là *Candida albicans*.

Vi khuẩn khỏe mạnh ở âm đạo chủ yếu cấu thành từ lactobacilli có khả năng tạo ra màng sinh học bảo vệ trên bề mặt màng nhầy. Lactobacilli phổ biến nhất ở âm đạo chủ yếu là *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus iners* và *Lactobacillus gasseri*.

Bệnh do nấm candida gây ra ở âm hộ-âm đạo ảnh hưởng tới 70–75% phụ nữ ít nhất một lần trong suốt độ tuổi sinh sản, và khoảng 40–50% phụ nữ ở giai đoạn thứ hai của thai kỳ. Tỷ lệ tái phát bệnh do nấm candida gây ra ở âm hộ-âm đạo (tức là mắc bệnh ít nhất 4 lần trong một năm, bao gồm 2 lần được xác nhận bằng cách xét nghiệm nấm) được ước tính là nằm trong khoảng từ 5% đến 8%. Bệnh lành tính này ảnh hưởng tiêu cực tới cuộc sống của bệnh nhân và tốn nhiều chi phí cho chữa bệnh. Bệnh này khó điều trị do sinh bệnh học của nó là đa nhân tố.

Phương pháp trị liệu truyền thống bằng cách sử dụng thuốc chống nấm dùng theo đường miệng hoặc âm đạo cần được thực hiện trong ít nhất 6 tháng, nhưng tốc độ tái phát vẫn giữ ở mức cao ở 60–70% phụ nữ bị tái phát bệnh trong hai tháng sau khi dùng điều trị. Hơn nữa, các thuốc chống nấm thường có nhiều tác dụng phụ và thời gian sử dụng kéo dài có thể thúc đẩy sự xuất hiện của chứng viêm âm đạo do vi khuẩn.

Viêm âm đạo do vi khuẩn là do sự mất cân bằng về chất lượng và số lượng của hệ vi khuẩn khỏe mạnh ở âm đạo, có thể làm biến mất gần như hoàn toàn lactobacilli là vi khuẩn có lợi của hệ vi khuẩn kỵ khí, đồng thời làm xuất hiện các vi khuẩn gây viêm âm đạo như *Gardnerella vaginalis* và *Atopobium vaginae*.

Viêm âm đạo do vi khuẩn là một trong số các bệnh nhiễm khuẩn hay gặp nhất ở âm đạo với tần suất từ 10 đến 15. Bệnh lành tính này có thể trở nên trầm trọng trong thời kỳ mang thai ở phụ nữ do nó có thể gây sinh non, trẻ đẻ ra thiếu cân và gây sảy thai.

Viêm âm đạo do vi khuẩn và các tình trạng mất cân bằng khác của hệ vi khuẩn ở âm đạo thường được điều trị bằng kháng sinh. Phương pháp điều trị này bị các nhược điểm của việc sử

dụng kháng sinh ngày càng tỏ ra là đạt được ít hiệu quả. Ngoài ra, nó không những tiêu diệt hệ vi khuẩn gây bệnh mà còn phá hủy cả hệ vi khuẩn có lợi.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Biết rằng việc dùng lactobacilli có lợi theo đường miệng hoặc âm đạo có thể giúp tăng cường khả năng hồi phục âm đạo và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường sinh dục. Cụ thể, các đơn sáng chế WO 84/04675, WO 2000/035465, US 2002/0044926 và WO 2006/045475 mô tả việc dùng vi khuẩn lactic theo đường miệng hoặc âm đạo để tăng cường khả năng hồi phục âm đạo và phòng ngừa sự tái phát của bệnh do nấm candida gây ra ở âm hộ-âm đạo.

Tốt hơn, nếu lactobacilli là *Lactobacillus rhamnosus* và vi khuẩn hình que của Döderlein (*Lactobacillus acidophilus vaginalis*). Các Patent US 6,093,394, US 6,468,526 và US 7,807,440, cũng như đơn sáng chế US 2010/0151026, mô tả việc dùng chủng *Lactobacillus crispatus* đặc hiệu.

Trong số các chủng này, có thể đề cập tới các chủng *Lactobacillus crispatus* dưới đây:

- Chủng *Lactobacillus crispatus* được nộp lưu ở DSMZ (Đức) với các số nộp lưu DSM 16735, 16736, 16738, 16739, 16740, 16741, 16742 và 16743, như được mô tả trong đơn sáng chế EP 1 824 500; các chủng này có khả năng tập hợp ở màng nhầy âm đạo và từ đó tăng cường khả năng phục hồi âm đạo; chúng cũng có các đặc tính bám dính tốt vào các tế bào biểu mô;
- Chủng *Lactobacillus crispatus* được nộp lưu ở CNCM (Pháp) với các số nộp lưu I-3483, I-3484 và I-3486, như được mô tả trong đơn sáng chế EP 1 812 023; các chủng này được chọn lọc để có khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô; chúng có độ bền tốt đối với pH axit của môi trường dạ dày, cũng như tác dụng chống lại mầm bệnh đã được chứng minh;
- Chủng *Lactobacillus crispatus* được nộp lưu ở BCCM/LMG (Bỉ) với số nộp lưu P-20558 như được mô tả trong Patent EP 1 427 808 B1; chủng này được sử dụng kết hợp với chủng lactic khác, với sự hỗ trợ của nút gạc, chủng này có khả năng tập hợp ở lỗ âm đạo, kể cả trong thời kỳ kinh nguyệt; và
- Chủng *Lactobacillus crispatus* được nộp lưu ở ATCC (USA) với số nộp lưu 202225, như được mô tả trong Patent EP 1 011 721 B1; chủng này có đặc tính bám dính tốt với các tế bào biểu mô, thời gian sống dài, đặc biệt khi có mặt nền bảo vệ đã được mô tả trong tài liệu này, cũng như khả năng sản sinh axit lactic và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tốt.
- Chủng P-17631 của *Lactobacillus crispatus* như được mô tả trong đơn sáng chế EP 949 330 có khả năng lên men glycogen và kìm hãm sự phát triển của *Candida*.

Hầu hết các chủng lợi khuẩn này, đã phân lập từ các mẫu dịch âm đạo của phụ nữ khỏe mạnh, không có khả năng sống sót trong môi trường pH axit hoặc khi tiếp xúc với dịch mật trong thời gian dài.

Độ pH ở âm đạo là thông số thay đổi đáng kể trong cuộc đời của phụ nữ: độ pH sinh lý bằng 7 ở giai đoạn trước tuổi dậy thì, giảm xuống còn 3,8 ở giai đoạn dậy thì, và lớn hơn 5,5 trong thời kỳ

mãn kinh, khi không dùng liệu pháp điều trị thay thế hormon. Các biến đổi này liên quan tới nhiều yếu tố như sự có mặt của estrogen và sự tập hợp của lactobacilli.

Do đó, vấn đề then chốt đối với các chủng lợi khuẩn ngoại sinh là chúng phải có khả năng chịu được độ pH axit sinh lý của lỗ âm đạo, và hơn nữa còn phải có khả năng chịu được độ pH của dạ dày khi dùng theo đường miệng.

Hơn nữa, nhiều chủng này không thể sử dụng glycogen làm nguồn cacbon để lên men (Martín R. *et al.*, 2008). Tuy nhiên, đặc tính này là có lợi do màng nhầy âm đạo thường thiếu glucoza, và quá trình sản sinh axit lactic bởi chủng lợi khuẩn chỉ có thể được duy trì khi có mặt nguồn cacbon để lên men.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus crispatus* phân lập mới, có ký hiệu là IP174178, nộp lưu ở CNCM vào ngày 22 tháng 6 năm 2012 với số truy cập CNCM I-4646, và các chủng *L. crispatus* bất kỳ có các đặc điểm tương tự.

Trong phần mô tả dưới đây, *Lactobacillus crispatus* IP174178 dùng để chỉ chủng này cũng như chủng *L. crispatus* bất kỳ có các đặc điểm tương tự.

Chủng IP174178 mới này có các đặc điểm cấu trúc như sau:

- phát triển được trong các điều kiện hiếu khí-ky khí;
- profin rep-PCR của nó được thể hiện ở Fig.1;
- trình tự của ADN ribosom 16S của nó được thể hiện ở SEQ ID NO: 1.

Các đặc điểm chức năng chủ yếu của nó là:

- tốc độ sản sinh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và axit lactic cao (lớn hơn 7 g/l);
- có khả năng phát triển trên glycogen là cơ chất cacbon duy nhất;
- có tính bền với dịch mật;
- có tính bền với pH axit (cụ thể, độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4);
- có khả năng kìm hãm sự phát triển của mầm bệnh của vùng niệu sinh dục.

Chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 đặc biệt có tính bền với pH axit.

Đặc biệt hơn, chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 có tính bền với dịch mật và với pH axit.

Đặc biệt hơn, chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 có tính bền với dịch mật và với pH axit, và có khả năng chuyển hóa glycogen.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa ít nhất 10<sup>9</sup> CFU chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 này, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với chủng lợi khuẩn khác hoặc hoạt chất khác.

Sáng chế cũng đề xuất chủng IP174178 này được dùng để phòng ngừa và điều trị chứng nhiễm khuẩn tái phát hoặc không tái phát ở đường sinh dục và niệu sinh dục.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1: là đồ thị dạng biểu đồ hình cây so sánh các profin kiểu gen bằng cách rep-PCR.

Fig.2: là đồ thị dạng ma trận về mức độ tương đồng khi so sánh các profin kiểu gen bằng cách rep-PCR.

Fig. 3: Thử nghiệm về mức độ bám dính của chủng *IP174178* vào các tế bào biểu mô âm đạo.

### Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus crispatus* phân lập mới có ký hiệu *IP174178* và nộp lưu ở CNCM với số truy cập I-4646, và các chủng *L. crispatus* phân lập bất kỳ có các đặc điểm tương tự như chủng đã phân lập này.

Thuật ngữ “lactobacilli” dùng để chỉ tất cả các vi khuẩn *Lactobacillus*, gram dương, bất động, có các hình dạng và kích cỡ biến đổi, và tùy ý kỵ khí. Hầu hết các lactobacilli chuyển hóa lactoza và các loại đường đơn giản khác thành axit lactic. Chúng được tìm thấy ở âm đạo và đường dạ dày ruột và chúng cấu thành nên thành phần quan trọng của hệ vi khuẩn đường ruột và âm đạo.

*Lactobacillus crispatus* là một trong số các loài chủ yếu của hệ vi khuẩn ở âm đạo ở phụ nữ Châu Âu, Mỹ và Nhật bản (Antonio, MAD *et al.*, 1999).

Chủng *Lactobacillus crispatus IP174178* phân lập có các đặc điểm chức năng như sau:

- có khả năng sản sinh  $H_2O_2$  và axit lactic cao (lớn hơn 7 g/l);
- có khả năng phát triển trên glycogen là cơ chất nội sinh đã tiết bởi màng nhầy âm đạo;
- có tính bền với pH axit và dịch mật;
- có khả năng kìm hãm sự phát triển của mầm bệnh;
- có khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô âm đạo.

Khả năng phát triển trên glycogen này là tương đối hiếm, và đặc biệt có lợi đối với các chủng cần nghiên cứu phát triển ở đường sinh dục, trong đó glucoza thường không có mặt, và chỉ có nguồn cacbon là glycogen. Do đó, vẫn có thể duy trì được quá trình sản sinh axit lactic bởi chủng này ngay cả khi không có mặt glucoza (xem bảng 5).

Khả năng chịu đựng được pH axit là đặc điểm rất có lợi, do một mặt nó giúp cho chủng theo sáng chế có khả năng kháng lại pH dạ dày khi dùng theo đường miệng, và mặt khác có khả năng phục hồi đường sinh dục ở phụ nữ ngay cả trong trường hợp quá trình tiết axit diễn ra một cách bất thường.

Khả năng kháng dịch mật giúp cho chủng này có thể dùng được theo đường miệng, chứ không chỉ đơn thuần là dùng theo đường âm đạo.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus crispatus IP174178*.

Trong dược phẩm theo sáng chế, nhiều vi khuẩn trên một gam dược phẩm tốt hơn là lớn hơn  $10^8$ , và đặc biệt là nằm trong khoảng từ  $10^8$  đến  $10^{10}$ . Theo một khía cạnh đặc trưng của sáng chế, dược phẩm bao gồm ít nhất  $10^9$  CFU chủng *Lactobacillus crispatus*. Thuật ngữ “CFU” dùng để chỉ “đơn vị tạo khuẩn lạc” và là đơn vị đo thường nhận biết được bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định số lượng vi khuẩn có thể tạo ra được khuẩn lạc.

Tốt hơn, nếu chủng *Lactobacillus crispatus* được đông khô nhanh. Chủng này có thể chỉ là một thành phần đông khô nhanh của chế phẩm, nhưng tốt hơn nếu chủng này được đông khô nhanh trong môi trường bao gồm các thành phần khác được bổ sung trước hoặc sau bước đông khô.

Theo khía cạnh đặc trưng khác của sáng chế, được phẩm còn bao gồm nền bảo quản và/hoặc các tá dược đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và tùy ý hoạt chất khác có hoạt tính bổ sung.

Theo một khía cạnh đặc trưng của sáng chế, được phẩm ở dạng bột, có thể được chứa trong viên nang, hoặc có thể được hợp nhất với loại chất mang thích hợp bất kỳ như kem bôi hoặc được thực phẩm.

Cụ thể, chế phẩm này có thể bao gồm các hoạt chất sau đây: hormon và/hoặc chất chống viêm và/hoặc chất diệt khuẩn và/hoặc chất chống nấm. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được các hoạt chất có thể được liên hợp theo cách có lợi với chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178.

Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm bao gồm natri thiosulfat, tốt hơn là ở nồng độ ít nhất bằng 100 mg/g bột chứa *Lactobacillus crispatus* IP174178 với lượng nằm trong khoảng từ  $10^8$  đến  $10^{10}$  CFU. Ví dụ dưới đây minh họa chế phẩm được gọi là “Chế phẩm A” bao gồm 113 g/l natri thiosulfat trước khi đông khô nhanh, và cuối cùng là 230 mg bột natri thiosulfat/g. Sự có mặt của natri thiosulfat giúp cho chủng IP174178 này có thể có tác dụng chống lại mầm bệnh (xem bảng 6C).

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm chủng *Lactobacillus* khác.

Theo sáng chế, được phẩm có thể được bào chế để dùng ở âm đạo hoặc để dùng theo đường miệng. Cụ thể, dự định rằng vi khuẩn dùng theo đường miệng được thử nghiệm về tính bền với dịch mật, tính bền với pH axit và khả năng phát triển khi có mặt dịch mật. Chủng IP174178 theo sáng chế có các đặc điểm này sẽ có thể được dùng theo đường miệng.

Đối với được phẩm để dùng theo đường miệng, các được phẩm thích hợp cụ thể là viên nén, viên nang, bột, hạt, dung dịch và huyền phù dùng theo đường miệng.

Đối với được phẩm để dùng ở âm đạo, các được phẩm thích hợp cụ thể là kem bôi, viên nang và thuốc đạn và nút gạc âm đạo.

Dự định rằng chế phẩm theo sáng chế cụ thể được dùng để điều trị nhiễm khuẩn đường sinh dục và niệu sinh dục như chứng viêm âm đạo và bệnh do nấm candida gây ra.

Thuật ngữ “viêm âm đạo” dùng để chỉ tình trạng mất cân bằng của hệ vi khuẩn ở âm đạo. Nó được đặc trưng bởi sự biến mất của lactobacilli và sự nhân lên của vi khuẩn gây bệnh như các vi khuẩn nêu trên.

Thuật ngữ “bệnh do nấm candida gây ra” dùng để chỉ nhiễm khuẩn âm đạo gây ra bởi các loại nấm men của giống *Candida*.

Các nhiễm khuẩn này liên quan tới sự có mặt của các mầm bệnh, cụ thể thuộc họ *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, mycoplasmas hoặc *Mobiluncus*.

*Candida albicans* là loại nấm men quan trọng nhất và phổ biến nhất của giống *Candida*. Nó gây ra các nhiễm khuẩn do nấm (bệnh do nấm candida gây ra, cũng được gọi là chứng viêm do nấm candida) chủ yếu ở màng nhầy tiêu hóa và màng nhầy sinh dục.

*Gardnerella vaginalis* là vi khuẩn dạng que có nhiều hình dạng khác nhau hoặc cầu trực khuẩn (cocci). Nó là vi khuẩn thường được tìm thấy trong các trường hợp bị viêm âm đạo (viêm âm đạo không đặc hiệu), chỉ là vi khuẩn gây bệnh hoặc kết hợp với vi khuẩn khác. Nó tạo ra độc tố đục lỗ (perforating toxin) chỉ gây ảnh hưởng tới các tế bào của người.

Thuật ngữ “mycoplasmas” dùng để chỉ họ bao gồm hơn 100 loài vi khuẩn nhạy với các họ kháng sinh hướng tới thành tế bào (penicillin hoặc beta-lactam). Cụ thể, *Mycoplasma genitalium* đáp ứng với nhiễm khuẩn sinh dục và niệu sinh dục (viêm niệu đạo, viêm cổ tử cung, viêm âm đạo, viêm vòi trứng) và các trường hợp vô sinh.

*Mobiluncus* là vi khuẩn gram dương kỵ khí thường được tìm thấy có liên quan tới *Gardnerella vaginalis* ở chứng viêm âm đạo do vi khuẩn.

Sáng chế còn đề cập đến dược thực phẩm chứa chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178, hoặc chủng có các đặc điểm tương tự. Dược thực phẩm như vậy có thể được tạo ra ở dạng thực phẩm hoặc thực phẩm bổ sung.

Thực phẩm được cấu thành từ chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178, tốt hơn là được đông khô nhanh, được trộn với các thực phẩm như các sản phẩm từ bơ sữa, chất béo, các sản phẩm chứa ngũ cốc, mứt kẹo hoặc đồ uống.

Cụ thể, thực phẩm bổ sung có thể được tạo ra ở dạng viên nang hoặc viên nang mềm chứa gelatin hoặc chất có nguồn gốc từ thực vật, như được nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề cập đến dụng cụ y khoa bao gồm một trong số các chế phẩm như đã nêu trên, cụ thể, dụng cụ y khoa này là nút gạc âm đạo, que trộn, khăn lót vệ sinh, xà phòng dùng cho đường sinh dục, v.v..

Sáng chế còn đề cập đến chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 phân lập, dùng để phòng ngừa và điều trị các nhiễm khuẩn đường sinh dục và niệu sinh dục như viêm âm đạo và bệnh do nấm candida gây ra.

Các đường dùng tối ưu, liệu trình dùng và dạng liều của chế phẩm theo sáng chế có thể được xác định theo tiêu chuẩn thường liên quan tới dược phẩm điều trị phù hợp với bệnh nhân, như, ví dụ, tuổi tác hoặc cân nặng của bệnh nhân, tình trạng trầm trọng về sức khỏe tổng thể của bệnh nhân, khả năng dung nạp với việc điều trị và các tác dụng phụ quan sát được. Chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 phân lập được sử dụng cả tại chỗ (âm đạo) và đường miệng, nhận thấy rằng cả hai đường dùng này có thể được tiến hành riêng rẽ hoặc kết hợp.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 phân lập được sử dụng để duy trì hệ vi khuẩn có lợi ở âm đạo ở phụ nữ mà không gây nhiễm khuẩn.

Vẫn theo khía cạnh khác của sáng chế, chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 phân lập được sử dụng để phục hồi hệ vi khuẩn có lợi ở âm đạo sau khi điều trị bằng kháng sinh.

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus crispatus* IP174178 phân lập, dùng để duy trì hoặc phục hồi hệ vi khuẩn có lợi ở âm đạo.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ 1 – Phân lập và chọn lọc chủng *L. crispatus* IP174178

Bảy thử nghiệm được dùng cho 10 chủng đã phân lập từ phụ nữ khỏe mạnh, và được chọn lọc trước về khả năng sản sinh hydro peroxit ( $H_2O_2$ ) của chúng. Các thử nghiệm này là: khả năng phát triển trong môi trường MRS cải biến (Man JC *et al.*, 1960), khả năng sản sinh  $H_2O_2$ , khả năng sản sinh axit lactic, mức độ bám dính với các tế bào của dòng tế bào âm đạo, khả năng kìm hãm một số mầm bệnh sinh dục nhất định (phương pháp kìm hãm trên đĩa) và tính kháng metronidazole.

Sau thử nghiệm thứ nhất này, ba chủng được xác định là các chủng đặc biệt quan trọng, cụ thể là có khả năng sinh sản  $H_2O_2$  và axit lactic cao, là các đối tượng của thử nghiệm về sự phát triển khi có mặt glycogen, chủng IP174178 chỉ có khả năng sử dụng glycoden làm nguồn cacbon, là cơ chất nội sinh đã tiết bởi màng nhầy âm đạo. Ngoài ra, chủng này có sự phát triển tốt nhất khi có mặt dịch mật.

Các kết quả thu được được thể hiện dưới đây:

Bảng 1 – Thử nghiệm chọn lọc cuối cùng của chủng IP174178

| Chủng so sánh | Mức độ bám dính vào các tế bào biểu mô | Khả năng phát triển khi có mặt glycogen | Phát triển khi có mặt dịch mật |
|---------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| PB 0040       | 37%                                    | –                                       | +                              |
| IP 174178     | 58%                                    | ++                                      | ++                             |
| PB 0042       | 62%                                    | –                                       | +                              |

#### Ví dụ 2 – Profin sinh hóa

Các profin sinh hóa thu được từ hệ thống VITEK II Compact (bioMérieux), là hệ thống tự động để xác định vi khuẩn bằng cách so sánh khả năng lên men đường đặc hiệu. Tác giả sáng chế thu được profin sinh hóa như sau: 11033303414010.

Bảng 2. Profin sinh hóa của chủng IP174178



| Phân tích sinh hóa |       |   |    |       |   |    |      |   |    |         |   |    |         |    |       |       |   |
|--------------------|-------|---|----|-------|---|----|------|---|----|---------|---|----|---------|----|-------|-------|---|
| 2                  | APPA  | + | 4  | dGAL  | - | 5  | ODC  | - | 6  | PheA    | + | 7  | ARG     | -  | 8     | PVATE | - |
| 9                  | BGAL  | - | 10 | PYRA  | - | 11 | SUCT | - | 12 | TyrA    | + | 13 | dGLU    | +  | 17    | BGLU  | - |
| 18                 | dMAL  | + | 19 | dMAN  | + | 21 | BXYL | - | 22 | O/129 R | + | 23 | ProA    | +  | 26    | LIP   | - |
| 27                 | AMAN  | - | 30 | dMLZ  | - | 31 | URE  | - | 33 | SAC     | + | 35 | dTRE    | +  | 36    | CIT   | - |
| 37                 | BGURi | - | 40 | ILATk | - | 41 | AGLU | + | 43 | dSOR    | + | 44 | AGAL    | -  | 46    | GlyA  | - |
| 47                 | dMLT  | - | 50 | dRiB  | - | 51 | MTE  | + | 52 | IGLM    | - | 53 | OPS (+) | 54 | BdFUC | -     |   |
| 56                 | CMT   | + | 59 | 2KG   | - | 61 | ESC  | - | 62 | ELLM    | - | 64 | dXYL    | -  |       |       |   |

### Ví dụ 3 – Profin kiểu gen

Profin kiểu gen của chủng *IP174178* được thiết lập trên hệ thống DiversiLab (bioMérieux). Nó tương ứng với khả năng khuếch đại ADN nằm trong các trình tự lặp lại không mã hóa của bộ gen. Sự sắp hàng và kích cỡ của các đoạn này là đơn nhất đối với mỗi chủng và do đó có thể thiết lập được các profin đơn nhất đối với mỗi chủng này (xem Fig.1).

Sau đó, tác giả sáng chế tiến hành so sánh profin rep-PCR này với profin của chủng 26 *Lactobacillus crispatus*, bao gồm 11 chủng được bảo quản ở viện Pasteur để kiểm tra đặc tính đơn nhất của chủng (xem Fig. 2). Trong mỗi trường hợp, chủng *IP174178* có nhiều điểm khác biệt, từ đó chứng minh được tính đơn nhất của nó.

Hơn nữa, chủng *IP174178* chỉ có khả năng phát triển trên glycogen, là có lợi cho việc cấy vào màng nhầy âm đạo, và có tốc độ sản sinh  $H_2O_2$  và axit lactic cao.

### Ví dụ 4 – Sắp trình tự và nhận biết các oligonucleotit đặc hiệu

Việc sắp trình tự chủng *IP174178* được tiến hành bằng cách sử dụng kỹ thuật Roche 454. Sau thao tác này, tiến hành chú thích. Cuối cùng, các gen 1982 mã hóa các protein được nhận biết.

Bảng 3. Các gen được chú thích trong chủng *IP174178*

| Tên chủng được chú thích       | Protein đã biết | Protein giả thuyết |          | Tổng số |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|----------|---------|
|                                |                 | không đặc hiệu     | đặc hiệu |         |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 1439            | 75                 | 468      | 1982    |

Việc sắp trình tự có thể đảm bảo được thao tác sinh học phân tử bổ sung trên chủng để xác định các cặp đoạn mỗi PCR đặc hiệu.

Cuối cùng, ba đoạn mỗi PCR được chọn lọc và đặc hiệu với chủng trong bước khuếch đại bao gồm 30 vòng. Các đoạn mỗi này có thể được tạo ra một cách dễ dàng và nhận biết rất đặc hiệu chủng *IP174178* của *L. crispatus* trong mẫu sinh học, chẳng hạn.

Bảng 4. Trình tự của các đoạn mồi PCR đặc hiệu đối với chủng *IP174178*

| Tên         | Số trình tự  | Trình tự             | Hướng       |
|-------------|--------------|----------------------|-------------|
| Contig00070 | SEQ ID NO: 2 | CAACAGGCATCCCTAAGTCT | thuận chiều |
|             | SEQ ID NO: 3 | CAACGTCTTCAGACCACATC | ngược chiều |
| Contig00074 | SEQ ID NO: 4 | TCTGCCTCATGTAGATCCAA | thuận chiều |
|             | SEQ ID NO: 5 | GCTCCATCTTTAAGACCCAA | ngược chiều |
| Contig00145 | SEQ ID NO: 6 | AAGTGTTATGGGCCTAGTCG | thuận chiều |
|             | SEQ ID NO: 7 | GCCACCACTTTTGCTTTAAT | ngược chiều |

## Ví dụ 5 – Điều chế “Chế phẩm A”

Chủng *IP174178* được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy như sau:

116 g/l sữa, 15 g/l dextroza, 10 g/l nấm men tự phân giải, 2 ml/l Tween.

Sau khi cấy mầm của môi trường nuôi cấy, quá trình lên men được duy trì ở nhiệt độ 37°C bằng thiết bị ổn nhiệt thích hợp trong thời gian từ 48 đến 72 giờ. Ở giai đoạn cuối của quá trình lên men, môi trường nuôi cấy, đạt số lượng lớn hơn hoặc bằng 10<sup>8</sup> CFU/ml, được đổ vào thùng phối trộn. Môi trường nuôi cấy được lắc nhanh để phá vỡ cục đông và bổ sung các chất bổ trợ đông khô nhanh như sau: 110 g/l sữa, 101,5 g/l FOS, 9,5 ml/l natri glutamat, 5,25 g/l axit ascorbic, 113 g/l natri thiosulfat.

Sau đó, tiến hành đông khô nhanh theo các điều kiện tiêu chuẩn đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này: vi khuẩn được phân phối vô trùng vào các khay bằng thép không gỉ, được làm đông nhanh ở -40°C, và tiếp đó tiến hành thăng hoa ở -22°C. Sau đó, cấy chủng ở 37°C.

Sau đó, sản phẩm thu được được nghiền và được lọc trong điều kiện không khí có kiểm soát. Bột thu được có thể được trộn theo cách có lợi với 1% magie stearat để điều kiện thuận lợi cho quá trình nạp viên nang.

Do đó, bột thu được được phân phối vào viên nang cỡ “0” với lượng 350 mg bột trong một viên nang.

Ví dụ 6 – Các đặc tính chức năng của chủng *IP174178* và của ‘Chế phẩm A’

Chủng đã nhận biết là *IP174178* được thử nghiệm song song, đơn lẻ và trong ‘Chế phẩm A’ của nó như được thể hiện ở ví dụ 5, để xác định các đặc tính chức năng của nó.

Trong ví dụ dưới đây, sự biểu hiện ‘chủng tinh khiết’ hoặc ‘chủng đơn lẻ’ hoặc ‘chủng *IP174178*’ dùng để chỉ chủng *IP174178* mà không có chất bổ trợ, và đặc biệt là không có các hợp chất của chế phẩm A, thu được từ các khuẩn lạc đã phân lập trên đường sau khi bảo quản trong lọ làm lạnh sâu trong môi trường bảo quản tiêu chuẩn.

#### Chất bổ trợ diệt khuẩn

##### *Chứng minh khả năng sản sinh hydro peroxit:*

Vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường đường MRS có bổ sung vitamin B12, peroxidaza và tetrametylbenzidin. Sau khi cấy 48 giờ trong điều kiện kỵ khí, các đĩa nuôi cấy được để tiếp xúc với oxy không khí và các khuẩn lạc sản sinh hydro peroxit nhanh chóng chuyển sang màu xanh da trời. Các thang điểm tùy ý nằm trong khoảng từ 0 đến 5 được sử dụng để giải thích mật độ sản sinh  $H_2O_2$ .

Bảng 5. Các đặc tính chức năng của chủng *IP174178*

|                       | Sản sinh $H_2O_2$ | Sản sinh axit lactic (g/l) |                |
|-----------------------|-------------------|----------------------------|----------------|
|                       |                   | Nguồn glucoza              | Nguồn glycogen |
| Chế phẩm A            | 5                 | D-LACT: 3,69               | D-LACT: 3,91   |
|                       |                   | L-LACT: 4,88               | L-LACT: 4,74   |
| Chủng <i>IP174178</i> | 5                 | D-LACT: 5,90               | D-LACT: 5,65   |
|                       |                   | L-LACT: 3,10               | L-LACT: 3,16   |

Các kết quả nêu trên chứng tỏ rằng:

- Khả năng sản sinh hydro peroxit là tối đa theo các thang điểm tùy ý đã dùng;
- Chủng sử dụng theo cách gần như giống nhau, với glucoza cũng như với glycogen, các quá trình chuyển hóa cho phép tổng hợp D- và L-lactat. Do glycogen là một trong số các nguồn cacbon chủ yếu trong môi trường âm đạo, chủng này có các tính chất cần thiết để sản sinh axit lactic *in vivo*.

#### Kìm hãm sự phát triển của *C. albicans* và *G. vaginalis*

Mục đích: Nhằm đánh giá khả năng của chủng *Lactobacillus* trong việc kìm hãm phát triển của chủng gây bệnh: *Candida albicans*; quy trình tương tự được áp dụng đối với *G. vaginalis*, là phù hợp với chủng gây bệnh này.

#### Mô tả quy trình:

Xác định sự phát triển của các mầm bệnh đơn lẻ và khi có mặt môi trường nuôi cấy chủng *Lactobacillus* với việc xác định độ chuẩn nằm trong khoảng từ T0 đến T28h.

Môi trường nuôi cấy sử dụng để điều chế chất cấy và để đọc độ chuẩn:

- Nước luộc thịt Sabouraud và aga Sabouraud đối với *Candida albicans* (ở 37°C)
- Nước luộc thịt/aga MRS đối với chủng *Lactobacillus*.

Nước luộc thịt nuôi cấy sử dụng trong thử nghiệm là hỗn hợp đồng nhất chứa môi trường nuôi cấy của mầm bệnh và môi trường nuôi cấy vi khuẩn lợi khuẩn.

#### Chuẩn bị thử nghiệm:

Điều chế chất cấy:

- *Candida albicans*: nuôi cấy trong nước luộc thịt Sabouraud – 0,3 ml trong 30 ml ở 37°C trong 48 giờ.
- *Chủng lợi khuẩn*:
  - Chế phẩm A: 0,35 g bột chứa Chế phẩm A được để trong 10 ml nước luộc thịt MRS – trong thiết bị ủ ở 37°C trong 48 giờ.
  - Chủng tinh khiết *IP174178*: 0,2 ml chủng tinh khiết, thu được từ các khuẩn lạc đã phân lập trên aga, được bảo quản sẵn trong lọ làm lạnh sâu trong môi trường bảo quản, được để trong 10 ml nước luộc thịt MRS – trong thiết bị ủ ở 37°C trong 48 giờ.

Điều chế *Candida* đối chứng:

Để tạo ra *Candida* đối chứng, 5 ml nước luộc thịt Sabouraud được cấy với chủng gây bệnh (độ chuẩn gần bằng  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) được trộn với 5 ml nước luộc thịt MRS không được cấy.

Cho chất cấy tiếp xúc:

Cho 5 ml chủng gây bệnh tiếp xúc với 5 ml chủng theo sáng chế trong các cấu hình khác nhau.

Các mẫu được sử dụng và độ chuẩn được xác định ở các thời điểm T0, T4h, T24h và T28h. Các kết quả được biểu thị bằng CFU/ml. Nồng độ CFU ở T0 đương nhiên là không giống như trong ba trường hợp so sánh (do các điều kiện làm việc) nhưng các giá trị ở T0 là theo thứ tự như nhau về độ lớn, và do đó sự khác biệt này không làm ảnh hưởng đến kết quả.

Bảng 6A. Kìm hãm *Candida albicans*

|                                  | Thời gian tiếp xúc theo giờ |                   |                   |                   |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | 0                           | T4h               | T24h              | T28h              |
| Chủng <i>IP174178</i> tinh khiết | $1,24 \cdot 10^7$           | $7,87 \cdot 10^6$ | $1,40 \cdot 10^6$ | $4,60 \cdot 10^5$ |

|                                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Chế phẩm A                        | $5,43 \cdot 10^6$ | $5,47 \cdot 10^6$ | 0                 | 0                 |
| <i>Candida albicans</i> đối chứng | $6,20 \cdot 10^6$ | $9,72 \cdot 10^6$ | $1,72 \cdot 10^7$ | $1,40 \cdot 10^7$ |

Bảng 6B. Kim hãm *Gardnerella vaginalis*

|                                        | Thời gian tiếp xúc theo giờ |                   |                   |                   |
|----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                        | 0                           | T4h               | T24h              | T28h              |
| Chủng tinh khiết <i>IP174178</i>       | $1,53 \cdot 10^7$           | $1,67 \cdot 10^6$ | 0                 | 0                 |
| Chế phẩm A                             | $3,87 \cdot 10^6$           | $6,73 \cdot 10^1$ | 0                 | 0                 |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> đối chứng | $6,33 \cdot 10^7$           | $3,83 \cdot 10^7$ | $6,71 \cdot 10^7$ | $5,05 \cdot 10^7$ |

Bảng 6C. Kim hãm *Candida albicans* – ảnh hưởng của nồng độ natri thiosulfat trong chế phẩm của chủng *IP174178*

Chế phẩm A1 và Chế phẩm A2 được điều chế bằng cách tiến hành như đối với Chế phẩm A, ngoại trừ rằng Chế phẩm A1 không chứa natri thiosulfat và Chế phẩm A2 chỉ chứa 50 g/l natri thiosulfat. Khả năng ức chế sự phát triển *C. albicans* được xác định trong ba trường hợp.

|                                 | Mức giảm theo $\log_{10}$ |        |        |
|---------------------------------|---------------------------|--------|--------|
|                                 | 4 giờ                     | 24 giờ | 28 giờ |
| Chế phẩm A1 (0 g/l thiosulfat)  | 0                         | 1      | 2      |
| Chế phẩm A2 (50 g/l thiosulfat) | 0                         | 3      | 3      |
| Chế phẩm A (113 g/l thiosulfat) | 0                         | 6      | 7      |

Trong bảng này, các kết quả được biểu thị bằng mức giảm logarit thập phân ( $\log_{10}$ ) về số CFU nằm trong khoảng từ thời điểm T0 và các thời điểm lấy mẫu khác nhau (T4h, T24h và T28h).

Các kết quả đã nêu trên, trong các bảng 6A–6C, chứng tỏ rằng:

- có khả năng ức chế sự phát triển của *C. albicans* gây bệnh là có thực ở 24 giờ, bởi chủng tinh khiết hoặc chủng trong Chế phẩm A. Tuy nhiên, chỉ có Chế phẩm A mới có khả năng kim hãm hoàn toàn sau 24 giờ.
- có khả năng ức chế sự phát triển của *G. vaginalis* gây bệnh được kết thúc sau 24 giờ nuôi cấy đồng thời, khi có mặt chủng đơn lẻ hoặc trong Chế phẩm A của nó; tuy nhiên quá trình ức chế sự phát triển của mầm bệnh diễn ra nhanh hơn so với chủng trong Chế phẩm A của nó (sau 4 giờ).

- sự có mặt của natri thiosulfat trong Chế phẩm A có thể có tác dụng chống lại mầm bệnh của chủng *IP174178*. Thực vậy, nồng độ natri thiosulfat càng lớn, thì khả năng kìm hãm càng mạnh quan sát được ở 24 giờ.

#### Tính bền với dịch vi

Theo từng cá thể và đặc biệt là theo thời gian trong ngày, độ pH dạ dày thay đổi trong khoảng từ 2,5 đến 5. Tính bền của chủng *IP174178*, ở dạng đơn lẻ hoặc trong Chế phẩm A, được thử nghiệm trong môi trường ở độ pH=2,5, 3 và 4. Các kết quả được biểu thị bằng mức giảm số lượng vi khuẩn, theo thời gian.

Bảng 7. Tính bền của chủng đơn lẻ hoặc trong Chế phẩm A của nó, ở độ pH thấp

|                       | Tính bền ở pH 2,5<br>Mức giảm ( $\log_{10}$ ) |           | Tính bền ở pH 3<br>Mức giảm ( $\log_{10}$ ) |           | Tính bền ở pH 4<br>Mức giảm ( $\log_{10}$ ) |           |
|-----------------------|-----------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------|-----------|
|                       | 45 phút                                       | 90 phút   | 45 phút                                     | 90 phút   | 45 phút                                     | 90 phút   |
| Chế phẩm A            | -1,12 log                                     | -4,36 log | -0,18 log                                   | -0,72 log | -0,02 log                                   | -0,15 log |
| Chủng <i>IP174178</i> | -0,73 log                                     | -2,59 log | -0,51 log                                   | -0,58 log | -0,68 log                                   | -0,80 log |

Các kết quả chứng tỏ rằng sau 90 phút, ở độ pH=3 hoặc 4, mức hao hụt về số lượng vi khuẩn là nhỏ hơn so với một  $\log_{10}$ . Tính bền ở pH=2,5 là kém hơn, đặc biệt là khi chủng được sử dụng trong Chế phẩm A của nó.

Tính bền với dịch mật cũng được thử nghiệm, theo thời gian (60, 120, 180 và 240 phút), khi có mặt 3% dịch mật. Các kết quả được biểu thị bằng cách so sánh số lượng vi khuẩn sống sót trong môi trường đối chứng không chứa dịch mật và trong môi trường chứa 3% dịch mật.

Bảng 8. Tính bền của chủng đơn lẻ hoặc trong Chế phẩm A của nó, khi có mặt dịch mật

| Có mặt 3% dịch mật<br>trong môi trường nuôi cấy | So sánh môi trường không chứa dịch mật/môi trường<br>với môi trường có dịch mật ( $\log_{10}$ ) |         |          |          |          |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|----------|----------|
|                                                 | 0                                                                                               | 60 phút | 120 phút | 180 phút | 240 phút |
| Chủng tinh khiết <i>IP174178</i>                | -0,46                                                                                           | -0,50   | -0,54    | -0,63    | -0,86    |
| Chế phẩm A                                      | -0,56                                                                                           | -0,66   | -0,58    | -0,68    | -0,79    |

Sau 240 phút (4 giờ), sự khác biệt giữa môi trường nuôi cấy đối chứng không có dịch mật và môi trường có dịch mật là nhỏ hơn một logarit thập phân, có nghĩa là sự phát triển của vi khuẩn *IP174178* ít ảnh hưởng khi có mặt dịch mật.

#### Tính kháng kháng sinh

Bảng 9. Tính kháng kháng sinh của chủng đơn lẻ hoặc trong Chế phẩm A của nó

| Kháng sinh được thử nghiệm    | Chế phẩm A      | Chủng tinh khiết <i>IP174178</i> | Kháng sinh được thử nghiệm | Chế phẩm A      | Chủng tinh khiết <i>IP174178</i> |
|-------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Tetracycline                  | <b>Nhạy cảm</b> | <b>Nhạy cảm</b>                  | Axit nalidixic             | Kháng           | Kháng                            |
| Colistin                      | Kháng           | Kháng                            | Erythromyxin               | <b>Nhạy cảm</b> | <b>Nhạy cảm</b>                  |
| Axit fusidic                  | Kháng           | Kháng                            | Polymyxin                  | Kháng           | Kháng                            |
| Chloramphenicol               | <b>Nhạy cảm</b> | <b>Nhạy cảm</b>                  | Axit pipemidic             | Kháng           | Kháng                            |
| Streptomycin                  | Kháng           | Kháng                            | Clindamycin 25 µg          | <b>Nhạy cảm</b> | <b>Nhạy cảm</b>                  |
| Trimethoprim sulfamethoxazole | Kháng           | Kháng                            | Clindamycin 2 µg           | <b>Nhạy cảm</b> | <b>Nhạy cảm</b>                  |
| Metronidazole 50 µg           | Kháng           | Kháng                            |                            |                 |                                  |

Đã biết rằng các gen dưới đây liên quan tới tính kháng kháng sinh nêu trong bảng 10 dưới đây, được nhận biết khi được biểu hiện ở chủng *L. crispatus*:

| Kháng sinh        |                | <i>L. crispatus</i> IP174178 |
|-------------------|----------------|------------------------------|
| Họ                | Tên            |                              |
| Aminoglycosit     | Gentamycin     | <i>aac3</i>                  |
|                   | Neomycin       |                              |
|                   | Kanamycin      |                              |
|                   | Streptomycin   |                              |
| Diaminopyrimidine | Trimethoprim   | <i>dfrA</i>                  |
| Fusidanine        | Fusidic axit   | <i>fusA</i>                  |
| Quinolone         | Axit nalidixic | <i>gyrA, norA</i>            |
| Fluoroquinolone   | Ciprofloxacin  | <i>gyrA, norA</i>            |

Khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô âm đạo CRL-2616

Các kết quả được thể hiện ở Fig. 3, và chỉ liên quan tới chủng *IP174178* đơn lẻ.

Theo thời gian, tỷ lệ phần trăm bám dính của vi khuẩn *IP174178* vào các tế bào CRL-2616 tăng lên và tỷ lệ này đạt 15% sau 3 giờ, khi số bội nhiễm khuẩn bằng 10 hoặc 1.



## Tài liệu viện dẫn

## Tài liệu sáng chế

WO 84/04675

WO 2000/035465

WO 2006/045475

US 2002/0044926

US 6,093,394

US 6,468,526

US 7,807,440

US 2010/0151026

EP 0 949 330

EP 1 824 500

EP 1 812 023

EP 1 427 808

EP 1 011 721

## Tài liệu khoa học

Martín R, Soberón N, Vaneechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Suárez JE. *Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates*. Int Microbiol. 2008 Dec;11(4):261–6.

Antonio, MAD, SE Hawes, and SL Hillier. *The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species*. J. Infect. Dis. (1999) 180: 1950–1956.

Man J.C., de Rogosa M. and Sharpe, ME. *A medium for the cultivation of Lactobacilli*, Appl. Bact. (1960) 23, 130–135.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chủng *Lactobacillus crispatus* được phân lập, có ký hiệu là *IP174178* và đã được nộp lưu ở CNCM với số truy cập I-4646.
2. Dược phẩm chứa chủng theo điểm 1.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó dược phẩm này bao gồm ít nhất  $10^9$  CFU chủng nêu trên.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 hoặc 3, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất nền bảo quản và tùy ý hoạt chất khác.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó dược phẩm còn bao gồm natri thiosulfat.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó dược phẩm được bào chế để dùng ở âm đạo hoặc để dùng theo đường miệng.
7. Dụng cụ y khoa, cụ thể là nút gạc âm đạo, chứa dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6.
8. Dược thực phẩm chứa chủng theo điểm 1.

## BIỂU ĐỒ HÌNH CÂY

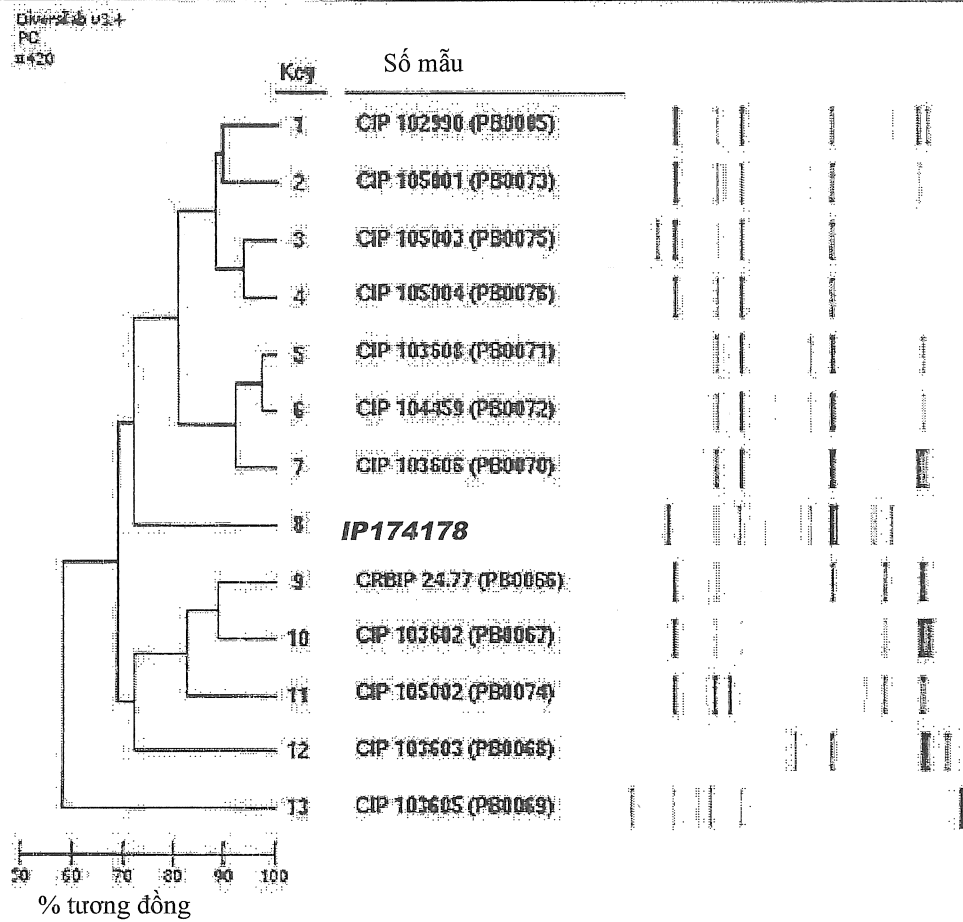
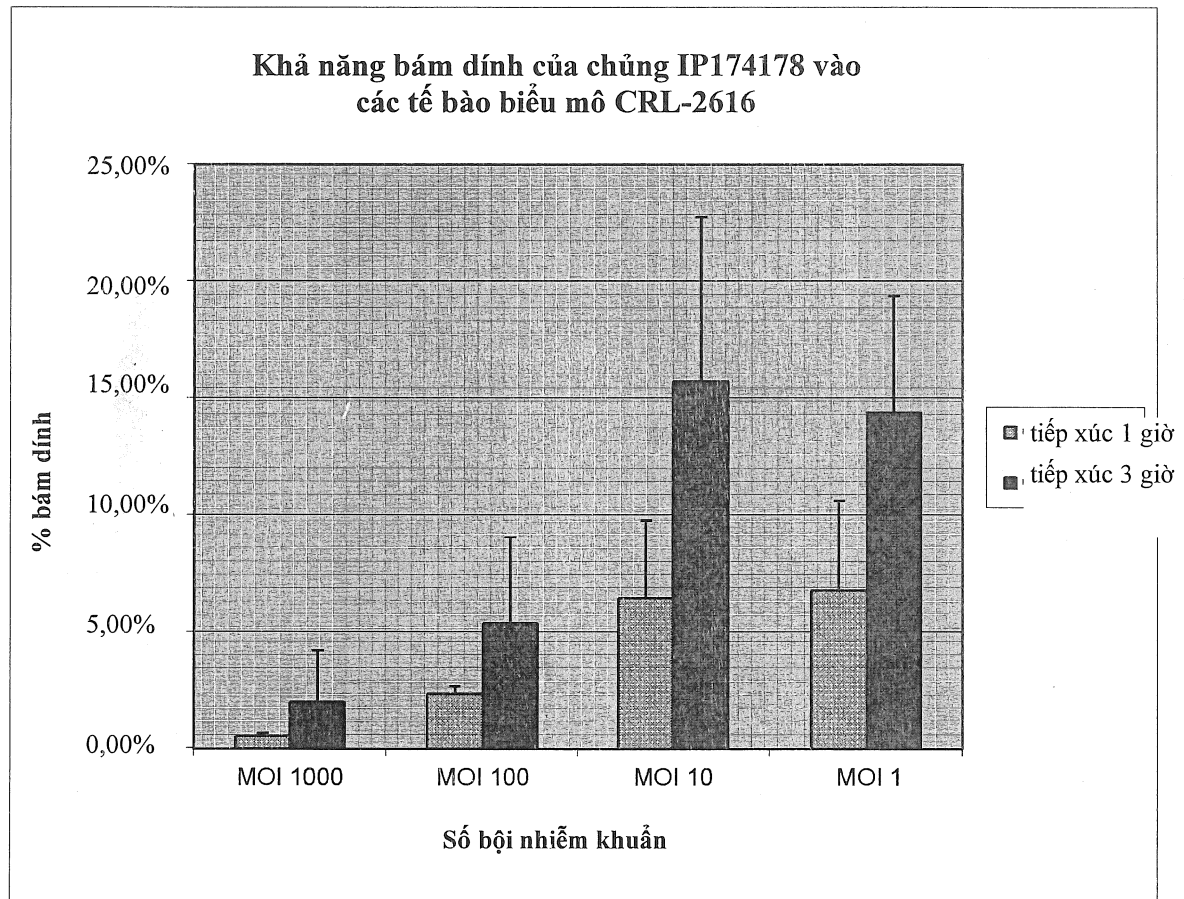


Fig.1



**Fig.3**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

&lt;110&gt; SPMD

&lt;120&gt;

CHÙNG LACTOBACILLUS CRISPATUS, DƯỢC PHẨM  
VÀ DƯỢC THỰC PHẨM CHỨA CHÙNG NÀY

&lt;130&gt; D30896

&lt;140&gt; PCT/EP2013/064424

&lt;141&gt; 2013-07-09

&lt;150&gt; FR 1256569

&lt;151&gt; 2012-07-09

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1061

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Lactobacillus crispatus

&lt;400&gt; 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| agccatgcac cacctgtctt agcgtccccg aagggaactt tgtatctcta caaatggcac  | 60   |
| tagatgtcaa gacctggtaa ggttcttcgc gttgcttcga attaaaccac atgctccacc  | 120  |
| gcttggtcgg gccccgtca attcctttga gtttcaacct tgcggtcgta ctccccaggc   | 180  |
| ggagtgttta atgcgttagc tgcagcactg agaggcgga acctccaac acttagcact    | 240  |
| catcgtttac ggcattggact accagggtat ctaatcctgt tcgctacca tgctttcgag  | 300  |
| cctcagcgtc agttgcagac cagagagccg ctttcgccac tgggtgttctt ccatatatct | 360  |
| acgcattcca ccgctacaca tggagttcca ctctcctctt ctgactcaa gaaaaacagt   | 420  |
| ttccgatgca gttcctcggg taagccgagg gctttcacat cagacttatt cttccgcctg  | 480  |
| cgctcgcttt acgccaata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg   | 540  |
| ctggcacgta gttagccgtg actttctggt tgattaccgt caaataaagg ccagttacta  | 600  |
| cctctatcct tcttcaccaa caacagagct ttacgatccg aaaaccttct tcactcacgc  | 660  |
| ggcgttgctc catcagactt gcgtccattg tggaagattc cctactgctg cctcccgtag  | 720  |
| gagtttgggc cgtgtctcag tccaatgtg gccgatcagt ctctcaactc ggctatgcat   | 780  |
| catcgccttg gtaagccttt accttaccaa ctagctaatt caccgcgggg ccatcccata  | 840  |
| gcgacagctt acgccgcctt ttaaaagctg atcatgcgat ctgctttctt atccggtatt  | 900  |
| agcacctggt tccaagtggg atcccagact atggggcagg ttccccacgt gttactcacc  | 960  |
| catccgccgc tcgctttcct aacgtcatta ccgaagtaaa tctgttagtt ccgctcgctc  | 1020 |
| gacttgcattg tattaggcac gccgccagcg ttcgtcctga g                     | 1061 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 2  
 caacaggcat ccctaagtct 20

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 3  
 caacgtcttc agaccacatc 20

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 4  
 tctgcctcat gtagatccaa 20

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 5  
 gctccatctt taagacccaa 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 6  
 aagtgttatg ggcctagtcg 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotit  
  
 <400> 7  
 gccaccactt ttgctttaat 20