



(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)



1-0034039

(51)⁸ A61K 35/745; A61K 31/702; A61P
43/00; A61P 37/02; A61K 31/7016

(13) B

(21) 1-2018-04247

(22) 26/08/2016

(86) PCT/JP2016/075071 26/08/2016

(87) WO 2017/145415 A1 31/08/2017

(30) 2016-035957 26/02/2016 JP

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/03/2019 372A

(73) MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (JP)

33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8384 Japan

(72) EHARA, Tatsuya (JP); IZUMI, Hirohisa (JP); MATSUBARA, Takeshi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) CHẤT CÓ TÁC DỤNG THỨC ĐẨY SỰ PHÁT TRIỂN MIỄN DỊCH, THỨC ĂN CHỨA CHẤT NÀY, CHẾ PHẨM THỰC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM ĐỒ UỐNG ĐỂ THỨC ĐẨY SỰ PHÁT TRIỂN MIỄN DỊCH

(57) Sáng chế đề cập đến chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, ví dụ, *Bifidobacterium breve* M-16V (LMG23729), lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit làm hoạt chất. Sáng chế cũng đề cập đến thức ăn chứa chất này, chế phẩm thực phẩm và chế phẩm đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, mối quan hệ giữa vi khuẩn đường ruột và hệ miễn dịch thu hút sự chú ý, và sự cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột và kiểm soát miễn dịch bằng cách sử dụng lợi khuẩn probiotic hoặc prebiotic được nghiên cứu.

Liên quan đến probiotic, đã có báo cáo rằng *Bifidobacterium breve* và *Lactobacillus rhamnosus* có hiệu quả đối với tình trạng viêm ở mô hình chuột nhắt mắc bệnh hen mạn tính (tài liệu phi sáng chế 1). Cũng đã có báo cáo rằng *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 và/hoặc *Bifidobacterium breve* LMG23729 có thể phòng ngừa bệnh dị ứng ở trẻ sơ sinh (tài liệu sáng chế 1).

Liên quan đến prebiotic, đã có báo cáo rằng việc sử dụng hỗn hợp gồm các galactooligosacarit và inulin cho chuột mẹ phòng ngừa được tình trạng dị ứng thức ăn ở chuột con và thúc đẩy dung nạp miễn dịch ở chuột con (tài liệu phi sáng chế 2). Cũng đã có báo cáo rằng các oligosacarit không tiêu hóa được có tác dụng kiểm soát miễn dịch đối với các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ các tế bào đơn nhân của người (tài liệu phi sáng chế 3). Hơn nữa, chế phẩm có tác dụng thúc đẩy sự tăng sinh của bifidobacterium chứa lactuloza, fructooligosacarit và/hoặc galactooligosacarit, và rafinoza làm các hoạt chất là đã biết (tài liệu sáng chế 2).

Đối với chế phẩm gồm probiotic và prebiotic, đã có báo cáo rằng *Bifidobacterium breve* và oligosacarit không tiêu hóa được như fructooligosacarit mạch ngắn (scFOS: short chain fructooligosaccharide), fructooligosacarit mạch dài (lcFOS: long chain fructooligosaccharide), và oligosacarit axit dẫn xuất từ pectin (AOS:

pectin-derived acidic oligosaccharide) có tác dụng ức chế tình trạng viêm đường hô hấp ở mô hình chuột nhất mắc bệnh hen mãn tính (tài liệu phi sáng chế 4). Cũng đã có báo cáo rằng *Bifidobacterium breve* M-16V và galactooligosaccharit hoặc fructooligosaccharit làm tăng mức ARN thông tin của Foxp3 ở các hạch bạch huyết màng treo ruột (tài liệu phi sáng chế 5).

Tuy nhiên, chế phẩm gồm *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza và galactooligosaccharit có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch là chưa được biết đến.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Nhật Bản (KOKAI) số 2014-065669

Tài liệu sáng chế 2: Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Nhật Bản (KOKAI) số 10-175867

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Sager, S. et al., Respiratory Research, 15:46, 2014

Tài liệu phi sáng chế 2: Bouchaud, G. et al., Allergy, 71(1):68-76, 2016

Tài liệu phi sáng chế 3: Lehmann, S. et al., PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0132304, 6.7.2015

Tài liệu phi sáng chế 4: Sager, S. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1842:573-583, 2014

Tài liệu phi sáng chế 5: de Kivit, S. et al., Allergy, 67:343-352, 2012

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng việc ăn vào *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza và galactooligosaccharit bởi động vật có vú có thể thúc đẩy sự phát triển miễn dịch của động vật có vú, và đã hoàn thành sáng chế.

Nghĩa là, sáng chế đề xuất chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosaccharit.

Theo phương án được ưu tiên về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn

dịch, tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch là thúc đẩy sự gia tăng số lượng tế bào T.

Theo phương án được ưu tiên về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, vi khuẩn là *Bifidobacterium breve* M-16V (LMG23729).

Theo phương án được ưu tiên về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, tỷ lệ trọng lượng của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit nằm trong khoảng từ 1 đến 9:1 đến 9:1 đến 9.

Theo phương án được ưu tiên về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, lượng vi khuẩn nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{12} đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu: Colony-Forming Unit) cho 1g tổng lượng của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit.

Sáng chế cũng đề xuất thức ăn chứa chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit làm các hoạt chất.

Theo phương án được ưu tiên về chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống này là thực phẩm có khuyến cáo là có lợi cho sức khỏe.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết.

Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo sáng chế chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, và ba loại oligosacarit là lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit.

Vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* không bị giới hạn cụ thể miễn là vi khuẩn đã chọn này có thể thúc đẩy sự phát triển miễn dịch khi nó được ăn vào bởi động vật có vú cùng với lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, và ví dụ về nó bao gồm *Bifidobacterium breve* M-16V (LMG23729), v.v.. Vi khuẩn này được bảo quản ở Bảo tàng vi sinh vật phối hợp của Bỉ thuộc Tổ chức bảo tồn Bỉ (BCCM: Belgian Coordinated

Collections of Microorganism), <http://bccm.belspo.be/>, UniversiteitGent, Laboratorium voor Microbiologie, K.L. Ledeganckstraat, 35 9000 Gent Belgium) dưới dạng mẫu lưu giữ công khai, và có thể nhận được từ tổ chức này bằng cách định rõ số lưu giữ chủng là LMG23729. *Bifidobacterium breve* M-16V không bị giới hạn ở vi khuẩn được lưu giữ nêu trên, và có thể là vi khuẩn gần như tương đương với vi khuẩn được lưu giữ nêu trên. Vi khuẩn gần như tương đương với vi khuẩn được lưu giữ nêu trên là vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, có thể thúc đẩy sự phát triển miễn dịch khi nó được động vật có vú ăn vào cùng với lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, và tốt hơn là có mức tương đồng về trình tự nucleotit của gen 16SrARN với trình tự nucleotit của gen 16SrARN của vi khuẩn được lưu giữ nêu trên bằng 99,86% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 99,93% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 100%, và có các đặc tính vi khuẩn học giống như các đặc tính vi khuẩn học của vi khuẩn được lưu giữ nêu trên. *Bifidobacterium breve* M-16V có thể là chủng biến thể và chủng tái tổ hợp di truyền được điều chế bằng cách sử dụng vi khuẩn này làm chủng gốc.

Vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* có thể là tế bào của vi khuẩn, hoặc có thể là dịch nuôi cấy chứa tế bào của vi khuẩn. Mặc dù vi khuẩn có thể là tế bào sống, tế bào chết, hoặc có thể bao gồm cả hai loại tế bào này, tốt hơn nếu nó là tế bào sống. Miễn là hiệu quả của sáng chế không bị giảm, vi khuẩn này có thể được xử lý bằng các công đoạn bổ sung khác nhau như làm đông khô nhanh sau khi nuôi cấy. Tốt hơn là các công đoạn bổ sung này cho phép tế bào sống có khả năng sống sót cao.

Vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* có thể dễ dàng được tăng sinh bằng cách nuôi cấy vi khuẩn này. Phương pháp nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là vi khuẩn có thể tăng sinh, và phương pháp thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Bifidobacterium* (vi khuẩn bifidus) có thể được sử dụng với các cải biến thích hợp nếu cần. Ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 25 đến 50°C, tốt hơn là từ 30 đến 40°C. Tốt hơn nếu quá trình nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện kỵ khí, và quá trình nuôi cấy này có thể được thực hiện cùng với việc cung cấp khí kỵ khí như

cacbon dioxit. Quá trình nuôi cấy này cũng có thể được thực hiện trong các điều kiện ưa ít oxy như các điều kiện có thể thu được bằng cách nuôi cấy lỏng tĩnh hoặc điều kiện tương tự.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Bifidobacterium* có thể được sử dụng với các cải biến thích hợp nếu cần. Nghĩa là, để làm nguồn cacbon, ví dụ, sacarit như galactosa, glucoza, fructosa, manosa, xenlobioza, maltoza, lactosa, sucroza, trehalosa, tinh bột, sản phẩm thủy phân tinh bột, và mật đường đen có thể được sử dụng phụ thuộc vào đặc tính đồng hóa của vi khuẩn. Để làm nguồn nitơ, ví dụ, amoniac, muối amoni như amoni sulfat, amoni clorua, và amoni nitrat, và các nitrat có thể được sử dụng. Để làm muối vô cơ, ví dụ, natri clorua, kali clorua, kali phosphat, magie sulfat, canxi clorua, canxi nitrat, mangan clorua, sắt (II) sulfat, v.v. có thể được sử dụng. Các thành phần hữu cơ như pepton, bột đậu nành, bánh đậu nành đã loại chất béo, chất chiết từ thịt, và chất chiết từ nấm men cũng có thể được sử dụng. Để làm môi trường được điều chế, ví dụ, tốt hơn là môi trường MRS có thể được sử dụng.

Lactuloza là một disacarit bao gồm fructosa và galactosa (4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructosa, Gal β 1-4 Fru), và có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong các đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Nhật Bản (KOKAI) số 3-169888 và 6-228179. Để làm lactuloza, sản phẩm thương mại (ví dụ, sản phẩm của Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) cũng có thể được sử dụng.

Rafinoza là một trisacarit bao gồm một phân tử fructosa, một phân tử galactosa, và một phân tử glucoza liên kết với nhau (β -D-fructofuranosyl- α -D-galactopyranosyl-(1-6)- α -D-glucopyranosit, Gal α 1-6 Glc α 1-2 β Fru), và có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp được mô tả trong tài liệu: “Food New Material Effective Use Technique Series No.6, “Rafinose”, trang 2, Japan Confectionery and Innovative Food Ingredients Research

Center, 1996”. Sản phẩm thương mại của rafinoza (ví dụ, sản phẩm của Nippon Beet Sugar Mfg.) cũng có thể được sử dụng.

Galactooligosacarit (GOS) là oligosacarit có cấu trúc được thể hiện là Gal-(Gal) $_n$ -Glc (n nằm trong khoảng từ 1 đến 3, liên kết là liên kết β -1,4 hoặc liên kết β -1,6), hoặc hỗn hợp gồm các oligosacarit có cấu trúc như vậy. Các galactooligosacarit được điều chế trong công nghiệp bằng phản ứng chuyển tiếp được xúc tác bởi β -galactosidaza sử dụng lactoza làm nguyên liệu thô, và thành phần chính là 4'-galactosyllactoza (4'-GL), đây là trisacarit, và trong đó một phân tử galactoza liên kết với đầu không bị khử của lactoza. Sản phẩm thương mại của galactooligosacarit (ví dụ, sản phẩm của Yakult Pharmaceutical Industry) cũng có thể được sử dụng. Galactooligosacarit có thể bao gồm một loại galactooligosacarit, hoặc có thể là hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại galactooligosacarit.

Bằng cách ăn vào vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, sự phát triển miễn dịch của động vật có vú có thể được thúc đẩy.

Chế phẩm chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit có thể được sử dụng rộng rãi dưới dạng thuốc, thực phẩm hoặc đồ uống, và thức ăn. Ví dụ, có thể đề xuất thuốc để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, thực phẩm hoặc đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, thực phẩm có khuyến cáo có lợi cho sức khỏe để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, và thức ăn để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Thuốc theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit. Để làm thuốc theo sáng chế, vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit có thể được sử dụng ở dạng như vậy, hoặc chế phẩm được điều chế bằng cách trộn chất mang dạng lỏng hoặc rắn chấp nhận được về mặt sinh lý với các thành phần nêu trên có thể được sử dụng. Vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*,

lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit có thể được đưa vào một chế phẩm hoặc có thể được đưa vào hai hoặc ba hoặc nhiều chế phẩm riêng rẽ.

Dạng liều của thuốc theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm viên nén (viên nén có thể là viên nén bao đường, viên nén có lớp bao tan trong ruột, hoặc viên nén để ngậm), bột, viên nang (viên nang có thể là viên nang tan trong ruột hoặc viên nang mềm), hạt (hạt có thể là hạt được bao), viên tròn, viên ngậm dẹt, chế phẩm chứa liposom, dung dịch, chế phẩm giải phóng chậm được dụng của các dạng liều nêu trên, v.v.. Khi các chế phẩm này được điều chế, có thể sử dụng các chất phụ gia thường được sử dụng trong chế phẩm dùng qua đường miệng thông thường dưới dạng thành phần của thuốc như chất mang, tá dược, chất kết dính, chất làm phân rã, chất làm trơn, chất làm ổn định, chất làm giảm nhẹ, chất làm loãng, chất hoạt động bề mặt và dung môi. Hơn nữa, miễn là hiệu quả của sáng chế không bị giảm, vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza và galactooligosacarit, và thuốc hoặc dược phẩm có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, hiện tại là đã biết hoặc sẽ được tìm thấy trong tương lai, có thể được sử dụng đồng thời. Dược phẩm được sử dụng đồng thời có thể có mặt trong thuốc theo sáng chế dưới dạng một trong số các hoạt chất, hoặc có thể không có mặt trong thuốc theo sáng chế, và được đưa ra thị trường dưới dạng một thuốc riêng rẽ kết hợp với thuốc theo sáng chế.

Ví dụ về chất mang và tá dược được sử dụng cho các chế phẩm nêu trên bao gồm lactoza, glucoza, sucroza, manitol, tinh bột khoai tây, tinh bột ngô, canxi cacbonat, canxi phosphat, canxi sulfat, xenluloza tinh thể, bột cam thảo, bột tần giao, v.v., và ví dụ về chất kết dính bao gồm, ví dụ, tinh bột, gelatin, xi rô, rượu polyvinyl, polyvinyl ete, polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylxenluloza, etylxenluloza, metylxenluloza, carboxymetylxenluloza, v.v..

Ví dụ về chất làm phân rã bao gồm tinh bột, aga, bột gelatin, carboxymetylxenluloza natri, carboxymetylxenluloza canxi, xenluloza tinh thể, canxi cacbonat, natri hydrocacbonat, natri arginin, v.v..

Ví dụ về chất làm trơn bao gồm magie stearat, dầu thực vật hydro hóa, polyetylen glycol, v.v., và ví dụ về chất tạo màu bao gồm chất tạo màu đỏ số 2, chất tạo màu vàng số 4, chất tạo màu xanh dương số 1 mà việc bổ sung chúng vào thuốc được chấp thuận, v.v..

Viên nén và hạt có thể được bao bằng sucroza, hydroxypropylxenluloza, senlac tinh khiết, gelatin, sorbitol, glyxerin, etylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, xenluloza axetat phtalat, hydroxypropylmetylxenluloza phtalat, metyl metacrylat, polyme axit metacrylic, hoặc chất tương tự, nếu cần.

Một khía cạnh khác của sáng chế là sử dụng vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit để sản xuất thuốc để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế bao gồm vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit được sử dụng để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là phương pháp thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, bao gồm bước cho động vật có vú sử dụng vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, hoặc thuốc theo sáng chế. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là phương pháp để điều trị dự phòng hoặc điều trị bệnh mà có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, bao gồm bước cho động vật có vú sử dụng vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit. Ví dụ về động vật có vú bao gồm người, gia súc, cừu, dê, lợn, chó, mèo, ngựa, v.v..

Mặc dù lượng vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* có mặt trong thuốc theo sáng chế được xác định một cách thích hợp, nếu cần, phụ thuộc vào dạng liều, hướng dẫn sử dụng, tuổi và giới tính của đối tượng, loại bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh, các tình trạng khác, v.v., nói chung, tốt hơn nếu lượng này nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{12} cfu/g, hoặc từ 1×10^6 đến 1×10^{12} cfu/ml, tốt hơn nữa là từ 1×10^7 đến 1×10^{11} cfu/g, hoặc từ 1×10^7 đến 1×10^{11} cfu/ml. Khi vi khuẩn gồm có các tế bào chết, đơn vị của lượng vi khuẩn, cfu/g hoặc cfu/ml, được thay bằng số lượng tế bào/g, hoặc số

lượng tế bào/ml. “cfu” là chữ viết tắt của đơn vị tạo khuẩn lạc.

Lượng vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{12} cfu, tốt hơn là từ 1×10^7 đến 1×10^{12} cfu, tốt hơn nữa là từ 1×10^8 đến 1×10^{12} cfu, cho 1g tổng lượng của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit.

Tỷ lệ trọng lượng của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit nằm trong khoảng từ 1 đến 9:1 đến 9:1 đến 9, tốt hơn là từ 2 đến 8:2 đến 8:2 đến 8, tốt hơn nữa là từ 3 đến 7:3 đến 7:3 đến 7.

Thuốc theo sáng chế là hữu ích để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch của động vật có vú. Ở động vật hoặc người sau khi được sinh ra, tính miễn dịch phát triển khi động vật hoặc người lớn lên. Việc thúc đẩy sự phát triển miễn dịch có thể có cả nghĩa tăng tốc độ phát triển miễn dịch lẫn nghĩa tăng mức độ phát triển miễn dịch. Ví dụ, thúc đẩy sự phát triển miễn dịch có thể là thúc đẩy sự gia tăng số lượng tế bào T.

Ở người hoặc động vật sau khi được sinh ra, các cơ quan và mô bên trong như đại tràng và hạch bạch huyết màng treo ruột phát triển to lên, và số lượng lympho bào như tế bào T cũng tăng lên khi người hoặc động vật lớn lên. Trong số các tế bào T, tế bào Foxp3+, nghĩa là, tế bào T điều hòa (Treg: regulatory T cell), là một nhóm tế bào T hỗ trợ có tác dụng ức chế phản ứng miễn dịch quá mức, có xu hướng trong đó, với sự phát triển của người hoặc động vật, số lượng các tế bào này tăng lên, và tỷ lệ của chúng trong tế bào T cũng tăng lên. Thuốc theo sáng chế có thể tăng tốc độ gia tăng số lượng tế bào của các tế bào T điều hòa này, hoặc thúc đẩy sự gia tăng số lượng tế bào của các tế bào T điều hòa. Do đó, thuật ngữ “thúc đẩy sự phát triển miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả này có thể được thay thế bằng “gia tăng tế bào Foxp3+” hoặc “gia tăng tế bào T điều hòa”.

Hơn nữa, đối với các tế bào RORgt+, nghĩa là tế bào Th17, tạo thành nhóm các tế bào T hỗ trợ gây viêm, và được đặc trưng bởi khả năng sản sinh IL-17 cao, tỷ lệ của nó trong số các tế bào T giảm cùng với sự phát triển sau khi sinh. Tuy nhiên, do số lượng tế bào T tăng lên, nên số lượng tế bào Th17 có xu hướng tăng lên. Thuốc theo sáng chế có

thể tăng tốc độ gia tăng số lượng tế bào Th17 này, hoặc thúc đẩy sự gia tăng như vậy của số lượng tế bào Th17. Do đó, thuật ngữ “thúc đẩy sự phát triển miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả này có thể được thay thế bằng “gia tăng các tế bào RORgt+”, hoặc “gia tăng tế bào Th17”. Thuật ngữ “thúc đẩy sự phát triển miễn dịch” có thể được thay thế bằng “gia tăng ít nhất tế bào bất kỳ trong số các tế bào Foxp3+, tế bào T điều hòa, tế bào RORgt+, và tế bào Th17”.

Theo sáng chế, khi thúc đẩy sự phát triển miễn dịch thì có thể tăng số tế bào T điều hòa như tế bào Foxp3+ mà ức chế phản ứng miễn dịch quá mức. Do đó, ví dụ về bệnh hoặc tình trạng bệnh mà thuốc theo sáng chế có hiệu quả, hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách thúc đẩy sự phát triển miễn dịch bao gồm bệnh do các phản ứng miễn dịch quá mức gây ra như các bệnh tự miễn, bệnh dị ứng, thải ghép miễn dịch, bệnh truyền nhiễm, và bệnh bắt nguồn từ viêm mô mỡ.

Ví dụ về các bệnh tự miễn bao gồm bệnh viêm da gây ra bởi chứng dày da, bệnh saccit, bệnh vữa xơ động mạch, hội chứng đông máu nội mạch lan tỏa, bệnh Kawasaki, bệnh Graves (bệnh Basedow), hội chứng thận hư, hội chứng mệt mỏi mạn tính, bệnh u hạt Wegener, ban xuất huyết Henoch Schonlein, viêm mạch vi thể ở thận, viêm gan mạn hoạt động, viêm màng mạch nhỏ, sốc nhiễm khuẩn, hội chứng sốc do độc tố, hội chứng nhiễm khuẩn, chứng suy mòn, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome), viêm tủy ngang cấp, chứng múa giật Huntington, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, chứng ngập máu não, xơ gan mật nguyên phát, bệnh thiếu máu tan huyết, hội chứng loạn chức năng đa tuyến typ I, hội chứng loạn chức năng đa tuyến typ II, hội chứng Schmidt, hội chứng suy hô hấp (cấp) ở người lớn, chứng rụng lông tóc, chứng rụng lông tóc từng vùng, bệnh khớp huyết thanh âm tính, bệnh khớp, bệnh Reiter, bệnh khớp vảy nến, bệnh truyền nhiễm Chlamydia, bệnh viêm khớp do nhiễm *Yersinia* và *Salmonella*, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh bọng nước tự miễn, pemphigut thông thường, pemphigut tróc, dạng pemphigut, bệnh IgA bọng nước thành dải, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh thiếu máu tan huyết Coombs+, bệnh thiếu

máu ác tính mắc phải, bệnh thiếu máu ác tính ở trẻ vị thành niên, viêm não tủy đau cơ, bệnh Royal Free, bệnh nấm Candida niêm mạc da mạn tính, bệnh viêm động mạch tế bào lớn, bệnh viêm gan gây cứng nguyên phát, bệnh viêm gan tự miễn nguồn gốc ẩn, bệnh liên quan tới chứng thiếu hụt miễn dịch mắc phải, bệnh viêm gan C, chứng thiếu hụt miễn dịch chưa phân loại (giảm gama globulin-huyết chưa phân loại), bệnh cơ tim giãn, phổi xơ hóa, viêm phế nang xơ hóa nguồn gốc ẩn, bệnh viêm phổi kẽ, bệnh phổi kẽ trong bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh phổi kẽ do xơ cứng toàn thân, bệnh viêm khớp dạng thấp-bệnh phổi kẽ, bệnh phổi trong bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh phổi trong bệnh viêm da cơ và viêm đa cơ, bệnh phổi trong hội chứng Sjogren, bệnh phổi liên quan đến viêm đốt sống dạng thấp, bệnh phổi trong bệnh viêm toàn mạch, bệnh phổi trong bệnh truyền nhiễm hemosiderin, bệnh phổi kẽ do thuốc gây ra, bệnh xơ hóa do bức xạ, bệnh viêm tiểu phế quản tắc nghẽn, bệnh viêm phổi ưa eosin mạn tính, bệnh phổi có thâm nhiễm lympho bào, bệnh viêm khớp thông phong, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh viêm gan tự miễn typ I (bệnh viêm gan tự miễn cổ điển hoặc bệnh viêm gan dạng luput), bệnh viêm gan tự miễn typ II (bệnh viêm gan kháng thể+ kháng LKM1), giảm glucoza-huyết tự miễn, tình trạng bất bình thường typ B của thụ thể insulin do chứng dày lớp gai đen, giảm nang tuyến cận giáp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đường mật xơ cứng nguyên phát, chứng giảm bạch cầu tự phát, chứng giảm bạch cầu trung tính tự miễn, bệnh thận NOS, viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm mạch vi thể ở thận, bệnh luput ban đỏ dạng đĩa, bệnh vô sinh tự phát ở nam giới NOS, bệnh tự miễn liên quan đến tinh trùng, bệnh viêm mắt đồng cảm, bệnh mô liên kết trong bệnh tăng huyết áp động mạch phổi, hội chứng Goodpasture, các triệu chứng phổi trong bệnh viêm nút đa động mạch, bệnh thấp khớp cấp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh Still, bệnh xơ cứng toàn thể, bệnh Takayasu, bệnh viêm động mạch, chứng tăng tiểu cầu tự miễn, chứng tăng tiểu cầu tự phát, bệnh tuyến giáp tự miễn, chứng tăng năng tuyến giáp, bướu giáp và giảm năng tuyến giáp (bệnh Hashimoto), chứng giảm năng tuyến giáp teo tự miễn, chứng phù niêm nguyên phát, bệnh viêm màng mạch nhỏ do kính áp tròng, bệnh viêm mạch nguyên phát, bệnh bạch biến, bệnh ban đỏ da, v.v.. NOS

có nghĩa là “không xác định khác”.

Ví dụ về bệnh dị ứng bao gồm bệnh viêm da cơ địa, bệnh dị ứng cơ địa, dị ứng thức ăn, dị ứng phấn hoa, bệnh viêm mũi dị ứng (dị ứng phấn hoa), phản vệ, dị ứng vật nuôi cảnh, dị ứng latec, dị ứng thuốc, viêm mũi-kết mạc dị ứng, viêm thực quản ưa eosin, hội chứng tăng tính ưa eosin, viêm dạ dày-ruột ưa eosin, v.v..

Ví dụ về thải ghép miễn dịch bao gồm bệnh mô ghép chống lại vật chủ, v.v..

Ví dụ về bệnh truyền nhiễm bao gồm bệnh truyền nhiễm gây bởi *Salmonella*, trực khuẩn lỵ, *Clostridium difficile*, Mycobacterium (ví dụ, bệnh lao), động vật nguyên sinh (ví dụ, bệnh sốt rét), giun tròn hình chỉ (ví dụ, bệnh giun chỉ), sán máng (ví dụ, bệnh sán máng), ký sinh trùng *Toxoplasma* (ví dụ, bệnh do Toxoplasma), động vật nguyên sinh *Leishmania* (ví dụ, bệnh do Leishmania), virus gây bệnh viêm gan C (HCV: Hepatitis C Virus) và virus gây bệnh viêm gan B (HBV: Hepatitis B Virus) (ví dụ, bệnh viêm gan C và bệnh viêm gan B), virus ecpet (ví dụ, bệnh ecpet), v.v..

Ví dụ về các bệnh có nguồn gốc từ viêm mô mỡ bao gồm hội chứng chuyển hóa, bệnh béo phì nội tạng, tình trạng kháng insulin, chứng tăng glucoza-huyết, rối loạn chuyển hóa lipid, chứng tăng triglycerit-huyết, chứng giảm cholesterol lipoprotein tỷ trọng cao (HDL: High-Density Lipoprotein)-huyết, chứng tăng huyết áp, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh đái tháo đường typ II, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH: Non-Alcoholic SteatoHepatitis), v.v..

Liều lượng của thuốc theo sáng chế có thể được lựa chọn một cách thích hợp phụ thuộc vào tuổi, giới tính, và tình trạng bệnh của đối tượng sử dụng, các tình trạng bệnh khác, v.v.. Tốt hơn là, lượng sử dụng thăm dò của vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve* nằm trong khoảng từ 2×10^4 đến 2×10^9 cfu/kg/ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2×10^6 đến 2×10^9 cfu/kg/ngày.

Thời gian sử dụng thuốc theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể được chọn thích hợp theo tình trạng bệnh của đối tượng sử dụng. Thuốc theo sáng chế cũng có

thể được sử dụng dự phòng, hoặc có thể được sử dụng để điều trị duy trì. Tốt hơn là, cách sử dụng được xác định theo dạng liều, tuổi và giới tính của bệnh nhân, các tình trạng khác, các triệu chứng của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng, v.v..

Trong trường hợp bất kỳ, thuốc theo sáng chế có thể được sử dụng một lần mỗi ngày hoặc nhiều lần mỗi ngày theo các liều chia, hoặc nó có thể được sử dụng vài ngày hoặc vài tuần một lần.

Thuốc theo sáng chế, hoặc các hoạt chất của nó, vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, có thể có mặt trong thực phẩm hoặc đồ uống.

Vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, hoặc thuốc theo sáng chế cũng có thể được thêm vào thực phẩm hoặc đồ uống dưới dạng hoạt chất và bằng cách đó được chế biến thành thực phẩm hoặc đồ uống có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch là một phương án về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch. Nghĩa là, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch, chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit làm hoạt chất.

Các dạng và tính chất của thực phẩm và đồ uống không bị giới hạn cụ thể, miễn là hiệu quả thúc đẩy sự phát triển miễn dịch không bị giảm, và chúng có thể được ăn vào thể qua đường miệng, và chúng có thể được chế biến bằng cách sử dụng các nguyên liệu thô thường được sử dụng đối với thực phẩm và đồ uống và các phương pháp thông thường, ngoại trừ việc vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit được thêm vào.

Dạng của các thực phẩm và đồ uống như được nêu trên không bị giới hạn cụ thể và chúng có thể ở dạng chất lỏng, bột nhão, chất rắn gel hóa, bột, hoặc dạng tương tự. Các ví dụ về chúng bao gồm, ví dụ, viên kẹo cứng vừa, và thức ăn lỏng, ví dụ như các sản phẩm từ bột mì như bánh mì, mì ống, mì Ý, mì sợi, bột làm bánh, bột chiên và bánh mì vụn; thực phẩm chế biến sẵn để ăn ngay như mì ăn liền, mì cốc, thực phẩm đã hấp và

nấu, thực phẩm đóng hộp, thực phẩm để làm nóng bằng vi sóng, súp và món hầm ăn liền, súp miso ăn liền và súp loãng Nhật bản, súp đóng hộp, thực phẩm sấy thăng hoa, và các thực phẩm chế biến sẵn để ăn ngay khác; các sản phẩm nông nghiệp đã chế biến như sản phẩm nông nghiệp đóng hộp, hoa quả đóng hộp, mứt dẻo và mứt miếng đông, dưa góp, đậu đóng hộp, sản phẩm nông nghiệp sấy khô, và ngũ cốc (sản phẩm hạt ngũ cốc đã chế biến); sản phẩm biển đã chế biến như sản phẩm biển đóng hộp, giăm bông và xúc xích cá, sản phẩm biển ở dạng bột nhào, các thức ăn có nguồn gốc từ biển, và món tsukudani (các sản phẩm biển được đun sôi trong xì dầu); sản phẩm gia súc đã chế biến như sản phẩm và bột nhào gia súc đóng hộp, và giăm bông và xúc xích từ thịt gia súc; sữa và các sản phẩm sữa như sữa đã chế biến, đồ uống có sữa, sữa chua, đồ uống có axit lactic, fomat, kem, bột công thức dành cho trẻ nhỏ, váng sữa, và các sản phẩm sữa khác; dầu và mỡ như bơ, macgarin và dầu thực vật; các gia vị cơ bản như xì dầu, miso, nước sốt, gia vị từ cà chua đã chế biến, mirin, và giấm; các gia vị và thực phẩm phức hợp như bột nấu, bột cà ri hoặc bột đảo bơ, nước sốt để nhúng, nước xốt, xúp mì, đồ gia vị, và các gia vị phức hợp khác; thực phẩm đông lạnh như nguyên liệu thực phẩm đông lạnh, thức ăn đông lạnh đã nấu sơ bộ, và thức ăn đông lạnh đã nấu chín; bánh kẹo như kẹo caramen, kẹo, kẹo cao su, sô cô la, bánh quy, bánh bơ tròn, bánh ga tô, bánh nướng nhân mặn, đồ ăn nhẹ, bánh quy giòn, bánh ngọt Nhật bản, bánh làm từ gạo, bánh làm từ đậu, bánh ngọt tráng miệng, kẹo dẻo, và các loại bánh kẹo khác; đồ uống như đồ uống có ga, nước ép hoa quả tự nhiên, đồ uống từ nước ép hoa quả, đồ uống không có rượu từ nước ép hoa quả, đồ uống từ thịt quả, đồ uống từ hoa quả chứa thịt quả, đồ uống từ rau, sữa đậu nành, đồ uống từ sữa đậu nành, đồ uống từ cà phê, đồ uống từ trà, đồ uống dạng bột, đồ uống đậm đặc, đồ uống dùng trong thể thao, đồ uống năng lượng, đồ uống có rượu, và các loại đồ uống khác; các thực phẩm thương mại khác như thực phẩm dành cho trẻ em, gia vị rắc cơm, và gia vị rong biển dùng cho cơm ngâm với nước trà; bột công thức dành cho trẻ em; chất dinh dưỡng để dùng qua đường ruột; thực phẩm để sử dụng trong chế độ ăn uống đặc biệt, thực phẩm có khuyến cáo về lợi ích cho sức khỏe (thực phẩm để sử dụng cho tình trạng sức khỏe

xác định, thực phẩm có khuyến cáo chức năng dinh dưỡng, thực phẩm có khuyến cáo chức năng); thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, v.v..

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể được bán dưới dạng thực phẩm hoặc đồ uống có chỉ báo công dụng, nghĩa là, để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch. Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế cũng có thể có chỉ báo là “để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch”. Hơn nữa, tất nhiên là các chỉ báo khác với chỉ báo nêu trên thể hiện hiệu quả thứ phát có thể đạt được bằng cách thúc đẩy sự phát triển miễn dịch có thể được sử dụng.

Việc sử dụng thuật ngữ “chỉ báo” nêu trên bao gồm tất cả các hành vi để thông báo cho người tiêu dùng về công dụng nêu trên và các chỉ báo bất kỳ để nhắc nhở hoặc đưa ra sự tương tự với công dụng nêu trên trong phạm vi “chỉ báo” theo sáng chế bất kể mục đích, nội dung, bài viết khách quan, hoàn cảnh, v.v. của chỉ báo này. Tuy nhiên, tốt hơn nếu chỉ báo được thể hiện cho phép người tiêu dùng trực tiếp nhận ra công dụng nêu trên.

Ví dụ cụ thể về chỉ báo bao gồm các hành vi chỉ ra công dụng nêu trên trên hàng hóa hoặc bao bì của hàng hóa liên quan đến thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế, hành vi chuyển nhượng, phân phối, trưng bày cho mục đích chuyển nhượng hoặc phân phối, hoặc nhập khẩu hàng hóa hoặc bao bì của hàng hóa mà trên đó công dụng nêu trên được chỉ ra, trưng bày hoặc phân phát tài liệu quảng cáo, bảng giá hoặc các giấy tờ kinh doanh liên quan đến hàng hóa mà trên đó công dụng nêu trên được chỉ ra, hoặc cung cấp thông tin bao gồm các thông tin như các nội dung cho biết công dụng nêu trên bằng phương pháp điện tử (Internet, v.v.) , v.v.. Các chỉ báo trên bao bì, đồ chứa, catalog, tờ rơi, tài liệu quảng cáo được sử dụng tại các điểm bán hàng như POP và các giấy tờ khác là được đặc biệt ưu tiên.

Tốt hơn nếu chỉ báo là chỉ báo được chính phủ chấp thuận v.v. (ví dụ, chỉ báo ở dạng dựa trên sự phê chuẩn được chứng nhận dựa trên hệ thống pháp lý bất kỳ trong số các hệ thống pháp lý khác nhau do chính phủ cung cấp). Ví dụ về các chỉ báo như nêu trên bao gồm các chỉ báo như thực phẩm cho sức khỏe, thực phẩm chức năng, dinh dưỡng đường ruột, thực phẩm để sử dụng trong chế độ ăn đặc biệt, thực phẩm có khuyến cáo chức năng

dinh dưỡng, dược mỹ phẩm, v.v. cũng như các chỉ báo được chấp bởi Cơ quan bảo vệ người tiêu dùng Nhật Bản (Consumer Affairs Agency), ví dụ, các chỉ báo được chấp thuận dựa trên hệ thống thực phẩm có khuyến cáo có lợi cho sức khỏe, cụ thể hơn nữa là thực phẩm để sử dụng cho tình trạng sức khỏe xác định, thực phẩm có khuyến cáo chức năng dinh dưỡng, hoặc thực phẩm có khuyến cáo chức năng và các hệ thống tương tự. Các ví dụ về chỉ báo vừa nêu bao gồm các chỉ báo như thực phẩm để sử dụng cho tình trạng sức khỏe xác định, các chỉ báo như thực phẩm đạt tiêu chuẩn để sử dụng cho tình trạng sức khỏe xác định chỉ báo về ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của cơ thể, chỉ báo về việc làm giảm các nguy cơ bệnh tật, chỉ báo chức năng dựa trên các bằng chứng khoa học, v.v., và chính xác hơn, các ví dụ điển hình bao gồm các chỉ báo như thực phẩm để sử dụng cho tình trạng sức khỏe xác định được nêu trong Pháp lệnh của Văn phòng Nội các về việc phê chuẩn chỉ báo mục đích đặc biệt được quy định trong Luật Khuyến khích Y tế (Cabinet Office Ordinance No. 57, 31.8.2009) (đặc biệt là các chỉ báo về công dụng đối với sức khỏe), các chỉ báo tương tự, v.v..

Vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit còn có thể được thêm vào thức ăn dưới dạng hoạt chất, và bằng cách đó được chế biến thành thức ăn có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch là một phương án về chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

Dạng thức ăn không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, thức ăn có thể được tạo ra bằng cách trộn lẫn chúng với ngũ cốc như ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen và milo; bột dầu thực vật như bột dầu đậu nành, bột dầu hạt cải dầu, bột dầu dừa và bột dầu hạt lanh; cám như cám lúa mì, cám gạo và cám gạo đã loại chất béo; bột sản xuất như bột áo gluten và bột mứt ngô; thức ăn có nguồn gốc từ động vật hoặc cá như bột cá, bột sữa gầy, protein sữa, mỡ vàng và mỡ động vật; nấm men như nấm men torula và nấm men bia; thức ăn chứa nguyên liệu khoáng chất như canxi phosphat và canxi cacbonat; dầu và chất béo; axit amin đơn giản; sacarit, v.v.. Ví dụ về dạng của thức ăn, ví dụ, bao gồm thức ăn cho thú cưng, thức ăn gia súc, thức ăn chăn nuôi cá, v.v..

Lượng của vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit có mặt trong thực phẩm hoặc đồ uống (hoặc thức ăn) theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và được xác định thích hợp nếu cần. Tuy nhiên, tốt hơn nếu các lượng này được xác định như nêu trên đối với thuốc theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được giải thích cụ thể hơn bằng cách tham khảo các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Sự thay đổi theo tuổi của tỷ lệ và số lượng tế bào của các tế bào Foxp3+ và tế bào RORgt+ trong số các tế bào CD4+ có mặt trong các lympho bào ở lớp đệm niêm mạc đại tràng và lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột của chuột.

Chuột đực C57BL/6J 2 ngày tuổi sau khi sinh được mua từ Japan SLC cùng với chuột mẹ. Chuột mới sinh này được nuôi bằng sữa của chuột mẹ tùy ý. Chuột mới sinh được chia thành hai nhóm để không có sự mất cân bằng về trọng lượng giữa hai nhóm, và chuột của hai nhóm này được giải phẫu sau 14 ngày, và 21 ngày kể từ khi sinh ra tương ứng để thu lấy đại tràng, và hạch bạch huyết màng treo ruột (sau đây còn được viết tắt là “MLN”).

Các mẫu đại tràng thu được được cắt theo chiều dọc, cho vào DPBS (Dulbecco PBS) chứa EDTA 5mM, DTT 1mM, và huyết thanh bào thai bò 2% (FCS: Fetal Calf Serum), và lắc trong 30 phút trong tủ áp ở 37°C. Sau đó, các mẫu được cho đi qua rây có kích thước mắt lưới 70µm, và chất lỏng chứa tế bào biểu mô được loại bỏ. Các mẫu đại tràng còn lại được cho vào môi trường RPMI1640 chứa collagenaza (Sigma) 0,5mg/ml, DNaza I (Roche Diagnostics) 25µg/mlf, dispaza (Gibco) 50µg/ml, HEPES 0,01M, và FCS 2%, và được thủy phân ở 37°C trong 30 phút. Sau khi thủy phân, chất lỏng được lọc qua rây có kích thước lỗ rây bằng 70µm, và phần lọc thu được được ly tâm ở tốc độ 340 x g và 4°C trong 5 phút để thu được hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào thu được và dung dịch Percoll được trộn để điều chế hỗn dịch tế bào Percoll 40%, và hỗn dịch này được

phủ lên dung dịch Percoll 90%. Hỗn dịch này được ly tâm cùng với dung dịch ở tốc độ 720 x g và nhiệt độ trong phòng trong 25 phút, và lympho bào của lớp đệm niêm mạc (sau đây còn được viết tắt là “LPL: Lamina Propria”) xuất hiện ở ranh giới của dung dịch Percoll 40% và dung dịch Percoll 90% được thu hồi.

Lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột (sau đây còn được viết tắt là “MLNL”) được nghiền trên rây có kích thước mắt lưới 70µm để thu được hỗn dịch tế bào đã đi qua rây.

LPL và MLNL thu được được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể CD4 kháng chuột đã đánh dấu bằng FITC (số hiệu dòng vô tính RM4-5, BD Biosciences), Foxp3 kháng chuột/chuột nhắt được đánh dấu bằng allophycocyanin (APC) (số hiệu dòng vô tính FJK-16a, e-Bioscience), RORgt kháng người/chuột nhắt được đánh dấu bằng phycoerythrin (PE) (số hiệu dòng vô tính AFKJS-9, e-Bioscience), và bộ đệm nhuộm màu Foxp3 (e-Bioscience), các tế bào được phân tích bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng FACSCanto (BD Biosciences), và việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình phần mềm FlowJo (TreeStar).

Tỷ lệ (giá trị trung bình, đơn vị là %) của tế bào Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ được thể hiện trong các bảng từ 1 đến 4. Trong trường hợp LPL đại tràng, tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ (tế bào Treg) trong số các tế bào CD4⁺ tăng lên khi tăng tuổi, trong khi đó, trong trường hợp MLNL, tỷ lệ các tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ không thay đổi ngay cả khi tuổi tăng lên (các bảng 1 và 2). Các tế bào CD4⁺ của LPL đại tràng và MLNL chủ yếu bao gồm tế bào T.

Mặt khác, tỷ lệ tế bào RORgt⁺ (tế bào Th17) trong số các tế bào CD4⁺ giảm khi tăng tuổi trong tất cả các trường hợp (các bảng 3 và 4).

Tổng số tế bào MLNL, và số lượng tế bào Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ (giá trị trung bình, đơn vị là $\times 10^6$) được thể hiện trong các bảng từ 5 đến 7. Tất cả các tế bào đều tăng khi tăng tuổi.

Bảng 1: Tỷ lệ tế bào Foxp3+ trong số các tế bào CD4+ của LPL (%)

	Trung bình	Độ lệch chuẩn (SD: Standard Deviation)	Sai số chuẩn (SE: Standard Error)
14 ngày tuổi	11,48	1,30	0,39
21 ngày tuổi	18,79	5,56	1,49

Bảng 2: Tỷ lệ tế bào Foxp3+ trong số các tế bào CD4+ của MLNL (%)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	9,60	0,94	0,28
21 ngày tuổi	10,11	1,24	0,33

Bảng 3: Tỷ lệ tế bào RORgt+ trong số các tế bào CD4+ của LPL (%)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	20,17	5,33	1,67
21 ngày tuổi	12,27	4,13	1,10

Bảng 4: Tỷ lệ tế bào RORgt+ trong số các tế bào CD4+ của MLNL (%)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	2,74	0,94	0,28
21 ngày tuổi	1,18	0,17	0,04

Bảng 5: Tổng số tế bào của MLNL ($\times 10^6$)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	0,80	0,25	0,08
21 ngày tuổi	3,84	0,87	0,23

Bảng 6: Số lượng tế bào Foxp + trong số các tế bào CD43+ ở MLNL ($\times 10^6$)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	0,029	0,011	0,003
21 ngày tuổi	0,130	0,039	0,011

Bảng 7

Bảng 7: Số lượng tế bào RORgt + trong số các tế bào CD4+ ở MLNL ($\times 10^6$)

	Trung bình	SD	SE
14 ngày tuổi	0,0077	0,0031	0,0009
21 ngày tuổi	0,0148	0,0032	0,0008

Ví dụ 2

Sự ảnh hưởng của *Bifidobacterium breve* và ba loại oligosacarit đối với tỷ lệ tế bào

Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL đại tràng và MLNL ở chuột

Bột tế bào *Bifidobacterium breve* M-16V đã nghiền trong tinh bột (2,4 x 10¹¹cfu/g, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) được tạo hỗn dịch trong nước muối sinh lý để điều chế hỗn dịch bifidobacterium 2,5 x 10⁹cfu/ml.

Lactuloza (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), rafinoza (Nitten Rafinoza, Nippon Beet Sugar Mfg.), và các galactooligosacarit được trộn theo tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1:1, và hòa tan trong nước cất để điều chế dung dịch oligosacarit có tổng hàm lượng cuối bằng 250mg/ml. Galactosacarit thu được bằng cách loại bỏ monosacarit và disacarit ra khỏi sản phẩm thương mại (Oligomate 55N, Yakult Pharmaceutical Industry), và chứa Galβ1-4Galβ1-4Glc (4'-galactosyllactoza) với lượng khoảng 65% theo trọng lượng và Galβ1-6Galβ1-4Glc (6'-galactosynlactoza) với lượng khoảng 15% theo trọng lượng.

Nước muối sinh lý, hỗn dịch tế bào loãng thu được bằng cách pha loãng hỗn dịch bifidobacterium nêu trên 5 lần bằng nước muối sinh lý (nồng độ cuối của bifidobacteria bằng 5 x 10⁸cfu/ml), và hỗn hợp gồm hỗn dịch bifidobacterium và dung dịch oligosacarit ở tỷ lệ thể tích bằng 1:4 (nồng độ cuối của bifidobacteria bằng 5 x 10⁸cfu/ml và của oligosacarit bằng 200mg/ml) được dùng làm mẫu để sử dụng.

Chuột nhắt đực C57BL/6J 2 ngày tuổi sau khi sinh ra được mua từ Japan SLC cùng với chuột mẹ. Chuột mới sinh này được nuôi dưỡng bằng sữa của chuột mẹ tùy ý. Chuột mới sinh 5 ngày tuổi sau khi sinh ra được chia thành ba nhóm sau đây để không có sự mất cân bằng về trọng lượng giữa các nhóm.

A: Nhóm chất dẫn (sử dụng nước muối sinh lý)

B: nhóm *Bifidobacterium* (sử dụng hỗn dịch bifidobacterium loãng)

C: nhóm oligosacarit + bifidobacterium (sử dụng hỗn hợp bao gồm dung dịch oligosacarit và hỗn dịch bifidobacterium)

Từ 6 ngày đến 13 ngày sau khi sinh ra, 100μl nước muối sinh lý, hỗn dịch bifidobacterium loãng, hoặc hỗn hợp gồm hỗn dịch bifidobacterium và dung dịch oligosacarit (1:4) được sử dụng mỗi ngày ở tần suất một lần một ngày cho chuột mới sinh

của các nhóm. Tức là, bằng cách sử dụng một lần, 5×10^7 cfu *Bifidobacterium breve* M-16V được sử dụng cho chuột nhất của nhóm bifidobacterium, và 20mg oligosacarit và 5×10^7 cfu *Bifidobacterium breve* M-16V được sử dụng cho chuột nhất của nhóm oligosacarit + bifidobacterium.

Chuột nhất của các nhóm này được giải phẫu ở ngày tuổi thứ 14 để thu hồi đại tràng và MLN, và tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL đại tràng và MLNL được nghiên cứu theo cách giống như cách nêu trong ví dụ 1. Kết quả được thể hiện trong các bảng 8 và 9 (tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ trung bình, đơn vị là %), và các bảng 10 và 11 (tỷ lệ tế bào RORgt⁺ trung bình, đơn vị là %). Trong các bảng này, “M-16V” có nghĩa là *Bifidobacterium breve* M-16V, và “M-16V + oligosacarit” có nghĩa là hỗn hợp gồm *Bifidobacterium breve* M-16V, lactuloza, rafinoza, và các galactooligosacarit.

Bảng 8: Tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL (%)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	11,48	1,30	0,39
M-16V	11,09	1,89	0,57
M-16V + oligosacarit	14,32	1,87	0,56

Bảng 9: Tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của MLNL (%)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	9,60	0,94	0,28
M-16V	9,51	1,01	0,30
M-16V + oligosacarit	10,84	0,75	0,23

Bảng 10: Tỷ lệ tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL (%)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	20,17	5,53	1,67
M-16V	21,12	7,53	2,27
M-16V + oligosacarit	20,83	6,18	1,86

Bảng 11: Tỷ lệ tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của MLNL (%)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	2,74	0,94	0,28
M-16V	2,43	0,74	0,22
M-16V + oligosacarit	2,71	0,45	0,13

Như được thể hiện trong các bảng 8 và 9, ở thời điểm 14 ngày sau khi sinh ra, tỷ lệ tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL và MLNL được tăng lên nhờ sử dụng hỗn hợp gồm *Bifidobacterium breve* M-16V và oligosacarit (lactuloza + rafinoza + các galactooligosacarit) (M-16V + oligosacarit) so với nhóm chất dẫn (đối chứng) và nhóm bifidobacterium (M-16V).

Mặt khác, như được thể hiện trong các bảng 10 và 11, ở thời điểm 14 ngày sau khi sinh ra, việc sử dụng hỗn hợp gồm M-16V và oligosacarit không ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của LPL và MLNL.

Ví dụ 3

Ảnh hưởng của *Bifidobacterium breve* và ba loại oligosacarit đối với số lượng tế bào Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của MLNL chuột nhắt

Theo cách tương tự như cách nêu trong ví dụ 2, chuột nhắt mới sinh có sử dụng các mẫu để sử dụng nêu trên được phẫu thuật ở thời điểm 14 ngày tuổi, và số lượng tế bào Foxp3⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ của MLNL được nghiên cứu. Kết quả được thể hiện trong các bảng từ 12 đến 14 (giá trị trung bình, đơn vị là $\times 10^6$). Ở thời điểm 14 ngày tuổi sau khi sinh ra, tổng số tế bào, và số lượng tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ và tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ trong MLNL được tăng lên bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm *Bifidobacterium breve* M-16V và oligosacarit.

Bảng 12: Tổng số tế bào MLNL ($\times 10^6$)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	0,80	0,25	0,08
M-16V	1,10	0,42	0,13
M-16V + oligosacarit	1,68	0,35	0,10

Bảng 13: Số lượng tế bào Foxp3⁺ trong số các tế bào CD4⁺ trong MLNL ($\times 10^6$)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	0,029	0,011	0,003
M-16V	0,038	0,015	0,005
M-16V + oligosacarit	0,058	0,012	0,004

Bảng 14: Số lượng tế bào RORgt⁺ trong số các tế bào CD4⁺ trong MLNL (x 10⁶)

	Trung bình	SD	SE
Đối chứng	0,0077	0,0031	0,0009
M-16V	0,0089	0,0024	0,0007
M-16V + oligosacarit	0,0145	0,0033	0,0010

Các kết quả nêu trên được tổng hợp trong bảng 15.

Bảng 15

		Sự thay đổi theo tuổi	Sử dụng bifidobacterium và oligosacarit
LPL	Tỷ lệ tế bào Foxp3 ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Tăng lên	Tăng lên
	Tỷ lệ tế bào RORgt ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Giảm xuống	Không thay đổi
MLNL	Tỷ lệ tế bào Foxp3 ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Không thay đổi	Tăng lên
	Số lượng tế bào Foxp3 ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Tăng lên	Tăng lên
	Tỷ lệ tế bào RORgt ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Giảm xuống	Không thay đổi
	Số lượng tế bào RORgt ⁺ trong số các tế bào CD4 ⁺	Tăng lên	Tăng lên

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo sáng chế có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch của động vật có vú. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch này có thể dùng để phòng ngừa và điều trị nhiều bệnh khác nhau mà trong đó đạt được tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch cho trẻ em, chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, trong đó sự thúc đẩy phát triển miễn dịch là sự thúc đẩy gia tăng số lượng của ít nhất tế bào Foxp3+, tế bào RORgt+, tế bào Th17, và các lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột.
2. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo điểm 1, trong đó tế bào Foxp3+ là tế bào T điều hòa Foxp3+.
3. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trẻ là trẻ có thân thể khỏe mạnh.
4. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn là *Bifidobacterium breve* M-16V.
5. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4, trong đó tỷ lệ của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit bằng từ 1 đến 9:1 đến 9:1 đến 9.
6. Chất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó lượng vi khuẩn nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{12} cfu cho 1g tổng lượng của lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit.
7. Thức ăn để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch cho trẻ em, chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, trong đó sự thúc đẩy phát triển miễn dịch là sự thúc đẩy gia tăng số lượng của ít nhất tế bào Foxp3+, tế bào RORgt+, tế bào Th17, và các lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột.
8. Thức ăn theo điểm 7, trong đó tế bào Foxp3+ là tế bào T điều hòa Foxp3+.
9. Chế phẩm thực phẩm để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch cho trẻ em, mà chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, trong đó sự thúc đẩy phát triển miễn dịch là sự thúc đẩy gia tăng số lượng của ít nhất tế bào Foxp3+, tế bào RORgt+, tế bào Th17, và các lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột.

10. Chế phẩm đồ uống để thúc đẩy sự phát triển miễn dịch cho trẻ em, mà chứa vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium breve*, lactuloza, rafinoza, và galactooligosacarit, trong đó sự thúc đẩy phát triển miễn dịch là sự thúc đẩy gia tăng số lượng của ít nhất tế bào Foxp3+, tế bào RORgt+, tế bào Th17, và các lympho bào hạch bạch huyết màng treo ruột.
11. Chế phẩm thực phẩm theo điểm 9, trong đó tế bào Foxp3+ là tế bào T điều hòa Foxp3+.
12. Chế phẩm đồ uống theo điểm 10, trong đó tế bào Foxp3+ là tế bào T điều hòa Foxp3+.
13. Chế phẩm thực phẩm theo điểm 9 hoặc 11, trong đó chế phẩm thực phẩm này là thực phẩm có khuyến cáo có lợi cho sức khỏe.
14. Chế phẩm đồ uống theo điểm 10 hoặc 12, trong đó chế phẩm đồ uống này là đồ uống có khuyến cáo có lợi cho sức khỏe.