



(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)



1-0042514

(51)^{2020.01} C12R 1/225

(13) B

(21) 1-2020-06714

(22) 24/07/2019

(86) PCT/EP2019/069984 24/07/2019

(87) WO 2020/020982 A1 30/01/2020

(30) 1812079.0 24/07/2018 GB; 1905470.9 17/04/2019 GB

(45) 27/01/2025 442

(43) 27/09/2021 402

(73) BIOGAIA AB (SE)

PO Box 3242, Kungsbrogatan 3A, 10364 Stockholm, Sweden

(72) ROOS, Stefan (SE); MÖLLSTAM, Bo (SE).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) CHỦNG VI KHUẨN SINH AXIT LACTIC CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT
MELATONIN, PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(21) 1-2020-06714

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn sinh axit lactic mà có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sự sản xuất melatonin, để sử dụng trong việc sản xuất melatonin ở đối tượng. Các chủng ưu tiên để sử dụng này có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sự sản xuất adenosin. Sáng chế còn đề xuất phương pháp chọn lọc và sản phẩm chứa chủng vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn sinh axit lactic nhất định được chọn lọc nhờ có khả năng làm tăng các mức melatonin để phòng ngừa và/hoặc điều trị chứng đau bụng (hoặc các bệnh khác liên quan đến các mức giảm melatonin), bao gồm khả năng tạo ra các tiền chất và các thành phần quan trọng khác để giải phóng melatonin, phương pháp chọn lọc các chủng này, và các sản phẩm chứa các chủng này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các dạng bào chế chứa các thành phần cơ chất được chọn đặc hiệu để tăng cường hiệu lực của các chủng này.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Mặc dù các vấn đề nổi bật về tỷ lệ hiện mắc và nỗi đau đớn, bản chất và nguyên nhân của chứng đau bụng ở trẻ nhỏ vẫn chưa được hiểu rõ. Cũng có các thuật ngữ khác nhau được sử dụng để mô tả tình trạng này. Các thuật ngữ này bao gồm, “chứng đau bụng ở trẻ nhỏ”, “chứng đau bụng về đêm” do cơn đau chủ yếu diễn ra vào ban đêm, và “chứng đau bụng ba tháng” vì lý do là chứng bệnh này sẽ biến mất khoảng ba tháng sau khi sinh. Các tác giả khác nhau đã sử dụng các định nghĩa khác nhau. Định nghĩa của Wessels là chứng đau bụng là các cơn khóc kịch phát từ ba giờ hoặc nhiều giờ mỗi ngày trong ba ngày hoặc nhiều hơn mỗi tuần trong khoảng thời gian ít nhất ba tuần là được công nhận nhất trong y văn. Năm 2006, tiêu chuẩn Rome III đã được công bố sửa đổi tiêu chuẩn này để xem xét chẩn đoán về “chứng đau bụng ở trẻ nhỏ” áp dụng cho trẻ nhỏ có cơn đau quặn, quấy, hoặc cơn khóc kịch phát bắt đầu và dừng lại mà không có nguyên nhân rõ ràng, kéo dài 3 hoặc nhiều giờ mỗi ngày và xảy ra ít nhất 3 ngày mỗi tuần, nhưng trong ít nhất 1 tuần (đôi khi được gọi là tiêu chuẩn Wessel sửa đổi). Được tinh chỉnh thêm trong tiêu chuẩn Rome IV; (Benninga et al; Gastroenterology 2016;150:1443–1455). Các định nghĩa này (Rome III hoặc Rome IV) là thích hợp với sáng chế.

Cho đến nay, các yếu tố chính có thể gây ra chứng đau bụng ở trẻ nhỏ được thảo luận được phân chia thành: tâm lý xã hội, đường dạ dày-ruột, bao gồm rối loạn hệ vi sinh, và các rối loạn về phát triển thần kinh.

Các yếu tố tâm lý xã hội bao gồm: các biến thể của cơn khóc thông thường, các tác

động hành vi của việc nuôi dạy con không điển hình và sự biểu hiện về các vấn đề trong tương tác giữa cha mẹ và trẻ nhỏ.

Sự rối loạn về đường dạ dày-ruột kéo theo cơn đau bụng do vị trí chân của trẻ nhỏ và sự nhả nhó trong đợt khóc. Các yếu tố thuộc đường dạ dày-ruột được xem xét ngắn gọn dưới đây:

Các kỹ thuật cho trẻ bú không đúng như bú bình, bú ở vị trí nằm ngang và không có ợ hơi sau khi bú đã được xem là các nguyên nhân. Việc bú mẹ trong sáu tháng đầu đã được xem là yếu tố bảo vệ. Nguy cơ về chứng đau bụng ở trẻ nhỏ cao hơn 1,86 lần ở các trẻ nhỏ không bú mẹ (Saavedra MA, Dacosta JS, Garcias G, Horta BL, Tomasi E, Mendoca R. Infantile, Infantile colic incidence and associated risk factors: a cohort study. *Pediatr (Rio J)* 2003; 79(2): 115-122).

Hiện tại không có cách chữa trị dứt điểm đối với chứng đau bụng. Luận thuyết điều trị hiện tại cho chứng đau bụng bao gồm các phương pháp dược lý và/hoặc phi dược lý, đề xuất cách làm giảm triệu chứng tốt nhất. Các can thiệp điều trị điển hình cho chứng đau bụng đề xuất cho cha mẹ rơi vào bốn hạng mục, bao gồm, chế độ ăn uống, thể chất, hành vi và dược lý. Các vận dụng về chế độ ăn uống bao gồm lời khuyên chuyên gia về các kỹ thuật bú khác nhau, hoặc việc sử dụng sữa không gây dị ứng, sữa công thức không có đậu nành hoặc lactoza, thực phẩm bổ sung như các probiotic và prebiotic khác nhau và việc ăn thô sớm.

Thuốc không kê đơn để điều trị chứng đau bụng phần lớn bao gồm việc sử dụng simeticon hoặc dimethylpolysiloxan, thuốc không hấp thụ, thuốc không cần kê đơn, làm giảm kích thước của các bong bóng khí trong ruột. Simeticon có lược sử an toàn và được khuyến cáo dùng thường xuyên, mặc dù một vài nghiên cứu chứng tỏ rằng hiệu lực của simeticon trên chứng đau bụng ở trẻ nhỏ là không tốt hơn giả dược.

Có một số báo cáo liên quan đến mô hình hệ vi sinh biến đổi ở các trẻ nhỏ bị đau bụng, khiến cho một số nhà nghiên cứu thực hiện và công bố các thử nghiệm được kiểm tra lâm sàng ngẫu nhiên khác nhau (randomized clinical controlled trial - RCT) trong đó khả năng của *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, chẳng hạn, để làm giảm thời gian khóc ở các trẻ nhỏ đã được đánh giá. Ví dụ, Savino et al (*Pediatrics* 2010;126:e526–33) tiến hành RCT vào năm 2010 để kiểm tra hiệu lực của chủng này trên chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Năm mươi trẻ nhỏ bị đau bụng được bú sữa mẹ hoàn toàn, được chẩn đoán theo tiêu chuẩn Wessel được sửa đổi, được ấn định ngẫu nhiên để nhận *L reuteri* DSM 17938 (10^8 đơn vị

hình thành khuẩn lạc) hoặc giả dược hàng ngày trong 21 ngày. Bảng câu hỏi cho cha mẹ theo dõi thời gian khóc hàng ngày và tác dụng phụ. Bốn mươi sáu trẻ nhỏ (nhóm *L reuteri*: 25; nhóm giả dược: 21) hoàn thành thử nghiệm. Số lần khóc trong ngày theo phút/ngày (trung bình) là 370 so với 300 vào ngày 0 và 35,0 so với 90,0 ($p=,022$) vào ngày 21.

Năm 2013 Szajewska et al (J Pediatr 2013;162:257–62) công bố đồ án tương tự RCT ở 80 trẻ nhỏ ở độ tuổi <5 tháng, cho biết rằng tỷ lệ đáp ứng để điều trị là cao hơn đáng kể trong nhóm probiotic so với nhóm giả dược. Phút/ngày (trung bình) là 180 so với 180 vào ngày 7, 75 so với 128 vào ngày 14 và 52 so với 120 ($p<0,05$) vào ngày 21. Đã có một số nghiên cứu khác thể hiện tác động của *L. reuteri* DSM 17938 ở các trẻ nhỏ bị đau bụng trong việc làm giảm đáng kể thời gian khóc ở các trẻ nhỏ được bú mẹ. Tuy nhiên, có nhu cầu về các can thiệp hiệu quả hơn để làm giảm cơn khóc ở tỷ lệ cao hơn ở trẻ mắc chứng đau bụng, bao gồm làm giảm cơn khóc tỷ lệ cao hơn ở trẻ bú sữa công thức.

Do đó, hiện có nhu cầu về các hợp chất, chế phẩm và kỹ thuật mới (và được cải thiện tốt hơn), an toàn và có hiệu quả chứng tỏ là hữu ích để điều trị chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Các chế phẩm và phương pháp của sáng chế, đáp ứng như nhu cầu này, đề xuất các sản phẩm có thể ngăn ngừa và điều trị một cách an toàn và hiệu quả chứng đau bụng (hoặc các triệu chứng liên quan đến chứng đau bụng) ở trẻ nhỏ.

Các mục đích và ưu điểm khác sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả sau đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sự non nớt của hệ hormon ở trẻ sơ sinh được cho là nhân tố chính trong các vấn đề ban đầu về sự phát triển khả năng vận động của ruột và do đó còn gây ra cơn đau và cơn khóc của trẻ nhỏ, như chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Melatonin là hormon có khả năng hỗ trợ nhịp sinh học và có tác động quan trọng lên nhiều chức năng ở người và động vật. Tiền chất cho melatonin là serotonin, chất dẫn truyền thần kinh có thể được dẫn xuất từ axit amin tryptophan.

Melatonin là chất dẫn truyền thần kinh trước đây được cho là tiết ra phần lớn bởi tuyến tùng. Tuy nhiên có các vị trí ngoài tuyến tùng sản xuất melatonin, như võng mạc và đường dạ dày-ruột.

Sự đồng bộ hóa giữa quá trình sản sinh và nhịp sinh học hàng ngày khác nhau và sự giải phóng sau đó của serotonin và melatonin ở trẻ nhỏ có tầm quan trọng tiềm tàng để tránh rối loạn vận động ruột và cơn đau, như chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (infantile colic-IC).

Serotonin làm tăng sự co cơ trơn của ruột, và melatonin làm nhuận các cơ trơn của ruột. Các nồng độ serotonin đỉnh có thể gây ra co thắt ruột nếu không được cân bằng bởi các tác nhân khác, trong đó melatonin là một tác nhân quan trọng. Cả serotonin và melatonin đều có nhịp sinh học hàng ngày. Mặc dù có sản sinh serotonin và tạo ra nhịp sinh học serotonin khi trẻ nhỏ được sinh ra, sự sản sinh melatonin nội sinh và nhịp sinh học melatonin ở nhiều trẻ nhỏ vẫn chưa sẵn sàng sau tháng tuổi thứ ba. Thời gian này trùng với thời gian biến mất thông thường của chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Có thể nói rằng chứng đau bụng ở trẻ nhỏ là tình trạng thiếu hụt melatonin. Do đó, đã có đề xuất đưa melatonin ngoại sinh vào trẻ nhỏ có IC, nhưng nhiều bác sĩ và cha mẹ không đồng tình việc đưa các hormon vào trẻ nhỏ.

Trong số tất cả trẻ em mới sinh ước tính có khoảng 5% đến 25% mắc IC, điều này gây mệt mỏi và tổn kém cho xã hội, cha mẹ và chính bản thân trẻ nhỏ theo nhiều hướng.

Vì vậy, mặc dù một số trẻ có khả năng sản xuất và giải phóng melatonin cần thiết từ thức ăn và/hoặc vi khuẩn trong ruột của chúng và do đó ít có khả năng phát triển chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, nhưng nhiều trẻ khác lại không, và vì vậy cần hỗ trợ bổ sung để ngăn ngừa hoặc điều trị IC.

Vì vậy có nhu cầu tìm ra và phát triển các sản phẩm và phương pháp để hỗ trợ sản xuất và giải phóng melatonin ở trẻ có nguy cơ phát triển IC hoặc mắc IC.

Sáng chế dựa trên phát hiện rằng vi khuẩn, ví dụ vi khuẩn sinh axit lactic, có thể được chọn lọc là có khả năng sản xuất adenosin. Vi khuẩn sinh axit lactic sản xuất adenosin chưa được báo cáo trong lĩnh vực này và vi khuẩn này có thể, chẳng hạn, được sử dụng để làm tăng sản xuất arylalkylamin-N-axetyltransferaza (AANAT), enzym giới hạn tốc độ trong tổng hợp melatonin. Mặc dù enzym AANAT được tìm thấy trong tuyến tùng, enzym AANAT còn được sản xuất tại các vị trí sản xuất melatonin ngoài tuyến tùng, như ở đường dạ dày-ruột. Vì vậy, sự tăng sản xuất AANAT (ví dụ thông qua việc tăng sản xuất adenosin) tạo ra cách thức làm tăng sản xuất melatonin hoặc làm tăng các mức melatonin trong đường dạ dày-ruột. Vì vậy, vi khuẩn này có thể được sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ hoặc các bệnh khác liên quan đến hoặc đặc trưng bởi mức sản xuất hoặc tổng hợp melatonin bị giảm, thấp hoặc thiếu hụt.

Vì vậy, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin, để sử dụng trong sản xuất adenosin (ví dụ làm tăng mức adenosin hoặc tăng hoặc thúc đẩy sản xuất adenosin) ở đối tượng,

hoặc để sử dụng trong sản xuất melatonin (ví dụ làm tăng mức melatonin hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất melatonin) ở đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất adenosin hoặc melatonin (ví dụ làm tăng mức adenosin hoặc melatonin, hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất adenosin hoặc melatonin) ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng chủng vi khuẩn hữu hiệu, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin, trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm để sử dụng trong sản xuất adenosin hoặc melatonin (ví dụ làm tăng mức adenosin hoặc melatonin, hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất adenosin hoặc melatonin) ở đối tượng.

Xem xét toàn diện hơn, sáng chế còn đề xuất vi khuẩn, ví dụ vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin. Vì vậy, vi khuẩn này có thể được sử dụng cho việc sản xuất melatonin, ví dụ để tăng sản xuất hoặc mức melatonin, ở đối tượng.

Vì vậy, theo một khía cạnh của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, để sử dụng trong sản xuất melatonin (ví dụ làm tăng mức melatonin hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất melatonin) ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất melatonin (ví dụ làm tăng mức melatonin hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất melatonin) ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả của chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm để sử dụng trong sản xuất melatonin (ví dụ làm tăng mức melatonin hoặc tăng hoặc thúc đẩy việc sản xuất melatonin) ở đối tượng.

Như được thảo luận ở trên, các chủng này có thể được sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự sản xuất hoặc tổng hợp hoặc mức melatonin giảm, thấp hoặc thiếu hụt.

Vì vậy sáng chế còn đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự sản xuất hoặc tổng hợp hoặc mức melatonin giảm, thấp hoặc thiếu hụt ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự sản xuất hoặc tổng hợp hoặc mức melatonin giảm, thấp hoặc thiếu hụt, ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả của chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác liên quan đến hoặc đặc trưng bởi sự sản xuất hoặc tổng hợp hoặc mức melatonin giảm, thấp hoặc thiếu hụt ở đối tượng.

Các chủng này có thể có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin và do đó sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin (ví dụ, sản xuất xuôi dòng) như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả.

Các mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng cho người đọc và dự tính rằng các đối tượng và ưu điểm này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là giản đồ thể hiện quá trình sản xuất melatonin.

Fig.2 là giản đồ thể hiện vi khuẩn có khả năng sản xuất adenosin theo sáng chế ảnh hưởng như thế nào đến quá trình sản xuất melatonin.

Fig.3 thể hiện số đo hoạt tính 5'-nucleotidaza trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn *L. reuteri*.

Fig.4 thể hiện sự sản xuất melatonin ở mô hình enteroid ruột bằng cách bổ sung phần nổi của các tế bào vi khuẩn *L. reuteri*.

Fig.5A thể hiện số đo hoạt tính 5'-nucleotidaza trong phần nổi của tế bào vi khuẩn *L. reuteri* DSM 33198 so với tế bào vi khuẩn DSM 17938.

Fig.5B thể hiện số đo hoạt tính 5'-nucleotidaza trong phần nổi của tế bào vi khuẩn *L. reuteri* khác nhau so với các tế bào vi khuẩn DSM 17938.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vì vậy, như phác họa ở trên, sáng chế đề xuất các chủng vi khuẩn, ví dụ các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc kích thích hoặc cảm ứng hoặc hỗ trợ việc sản xuất melatonin, ví dụ làm tăng mức melatonin, cụ thể trong đường dạ dày-ruột (gastrointestinal - GI). Các chủng này có thể tự sản xuất melatonin, ví dụ tiết ra melatonin, và do đó tạo ra hoặc sản xuất melatonin một cách trực tiếp.

Tuy nhiên, sáng chế còn đề xuất các chủng gián tiếp sản xuất melatonin, ví dụ bằng cách sản xuất hoặc kích thích hoặc cảm ứng sản xuất thành phần ngược dòng của quá trình tổng hợp melatonin (hoặc tiền chất của melatonin) và do đó hỗ trợ hoặc làm tăng sản xuất melatonin. Ví dụ ưu tiên là sản xuất hoặc cảm ứng arylalkylamin-N-axetyl transferaza (AANAT), là enzym giới hạn tốc độ trong chuyển hóa serotonin thành N-axetyl serotonin, serotonin sau đó được chuyển hoá thành melatonin.

Như phác họa ở trên, một chủng vi khuẩn sinh axit lactic ưu tiên cụ thể khác là một chủng vi khuẩn có thể sản xuất hoặc cảm ứng adenosin ở đối tượng, cụ thể trong đường dạ dày-ruột (GI). Adenosin này có thể hoạt động trên các thụ thể adenosin bề mặt tế bào thích hợp (ví dụ các thụ thể A2A, các thụ thể A2B, các thụ thể A3 hoặc A4, tốt hơn là các thụ thể A2A) và dẫn đến việc sản xuất các mức cAMP nội bào tăng. A2A và các thụ thể adenosin khác được biết đến là có mặt trong các tế bào đã được tìm thấy trong đường GI. cAMP nội bào lại tham gia vào việc sản xuất AANAT (xem Fig.2). Vì vậy, mức cAMP nội bào tăng có thể dẫn đến các mức AANAT tăng và do đó các mức melatonin tăng. Vì vậy, adenosin tốt hơn là nên được tạo ra ở ngoại bào để có thể gắn vào các thụ thể adenosin bề mặt tế bào. Với mục đích này, adenosin có thể được sản xuất trong các tế bào vi khuẩn và được vận chuyển ngoại bào (hoặc được tiết ra). Theo cách khác, adenosin có thể được sản xuất ngoại bào, ví dụ trên bề mặt tế bào vi khuẩn hoặc trong phần nổi. Sự sản xuất ngoại bào này ví dụ có thể diễn ra thuận lợi nhờ sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào (hoặc bề mặt tế bào) (hoặc enzym ecto enzym 5'-nucleotidaza), có thể chuyển hóa cơ chất thích hợp thành adenosin. Quá trình sản xuất ngoại bào này có thể diễn ra đồng đều nhờ sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza (hoặc enzym ecto enzym 5'-nucleotidaza) trong phần nổi tế bào hoặc không gian ngoại bào. Như được thể hiện ở đây, các chủng vi khuẩn có thể tạo ra hoặc sản xuất hoặc giải phóng enzym 5'-nucleotidaza này (hoặc enzym ecto enzym 5'-nucleotidaza) trong phần nổi tế bào hoặc không gian ngoại bào ở đó enzym này có thể chuyển hóa tiếp cơ chất thích hợp thành adenosin. Các cơ chất

thích hợp bao gồm AMP.

Vì vậy, khi các chủng vi khuẩn được kể đến ở đây là có khả năng sản xuất adenosin, điều này bao gồm việc sản xuất trực tiếp adenosin bằng chính các tế bào vi khuẩn và cũng bao gồm việc sản xuất adenosin bằng các tế bào vi khuẩn thông qua các tế bào có enzym 5'-nucleotidaza hoạt động (ví dụ sự có mặt trên bề mặt tế bào vi khuẩn hoặc được giải phóng trong phần nổi tế bào hoặc không gian ngoại bào) và nhờ đó chuyển hóa hoặc có khả năng chuyển hóa cơ chất thích hợp, ví dụ AMP, thành adenosin. Cơ chất này có thể có mặt tự nhiên, ví dụ theo cách nội sinh trong môi trường, hoặc có thể được cung cấp cho vi khuẩn, ví dụ theo cách thức ngoại sinh.

Do đó, các chủng này có thể dẫn đến mức melatonin tăng, chẳng hạn so với các mức khi các chủng này không có mặt.

Melatonin được biết là được sản xuất trong đường GI và do đó việc sản xuất hoặc việc sản xuất tăng tại vùng này là hữu hiệu về mặt sinh lý. Tốt hơn là, lượng melatonin sản xuất là có ý nghĩa về mặt lâm sàng hoặc điều trị. Vì vậy, các chủng của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bất kỳ liên quan đến (hoặc đặc trưng bởi) mức melatonin giảm, hoặc liên quan đến (hoặc đặc trưng bởi) sự thiếu hụt melatonin, hoặc có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bất kỳ được lợi từ mức melatonin tăng. Các bệnh hoặc tình trạng này (và các đối tượng thực sự mắc các bệnh hoặc các tình trạng này) sẽ được nhận biết dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và sẽ ví dụ bao gồm các bệnh, tình trạng hoặc đối tượng có mức melatonin thấp, bị giảm ví dụ mức melatonin bị giảm đáng kể (hoặc bất thường) hoặc thiếu hụt melatonin, ví dụ so sánh với các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh, ví dụ các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh trong cùng độ tuổi, độ tuổi tương đương hoặc độ tuổi có thể so sánh được. Ví dụ ưu tiên về các bệnh này là chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Các chủng ưu tiên để sử dụng điều trị này là các chủng sản xuất melatonin hoặc adenosin.

Vì vậy, theo các khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, ví dụ do chủng này có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin, hoặc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin. Việc sử dụng để điều trị của các chủng này cũng được đề xuất. Tốt hơn là, các chủng này có gen mã hóa 5'-nucleotidaza hoặc các chủng này có enzym 5'-nucleotidaza hoạt động, ví dụ để chuyển hóa AMP (hoặc cơ chất thích hợp khác) thành adenosin. Các mức sản xuất adenosin hoặc các mức hoạt tính 5'-

nucleotidaza hoặc việc sản xuất melatonin làm ví dụ được mô tả ở phần khác trong bản mô tả.

Các chủng ưu tiên của sáng chế là các chủng *L. reuteri*, tốt hơn nữa là các chủng *L. reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198 (chi tiết việc nộp lưu của chúng được đưa ra tại các phần khác trong bản mô tả), và các chủng này, ví dụ các chủng được phân lập hoặc các mẻ cấy tinh khiết về mặt sinh học hoặc các chế phẩm của các chủng này, tạo ra các khía cạnh khác của sáng chế, tương tự các chế phẩm (ví dụ dược phẩm hoặc dinh dưỡng, ví dụ thực phẩm bổ sung, hoặc probiotic, các chế phẩm, ví dụ với các chất pha loãng và/ hoặc tá dược được chấp nhận về mặt dược phẩm hoặc dinh dưỡng) chứa các chủng này, hoặc việc sử dụng các chủng này trong điều trị, ví dụ như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, cụ thể đối với việc điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả). Theo một số phương án chủng DSM 17938 không được sử dụng. Vì vậy, sáng chế đề xuất các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198 để sử dụng trong liệu pháp, ví dụ, để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả. Sáng chế còn đề xuất các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198 để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Vì vậy, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả của chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198, cho đối tượng này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198 trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, ở đối tượng.

Các phương án và các dấu hiệu ưu tiên và thay thế của sáng chế như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả áp dụng một cách tương đương cho các phương pháp điều trị và sử dụng của sáng chế được mô tả ở đây và tại phần khác trong bản mô tả này.

Các chủng *L. reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và/hoặc DSM 33198 đã được chọn lọc nhờ có khả năng sản xuất adenosin, ví dụ nhờ có gen mã

hóa 5'-nucleotidaza, và enzym 5'-nucleotidaza hoạt động có thể chuyển hóa cơ chất AMP thành adenosin, và phù hợp không chỉ để làm tăng mức adenosin (ví dụ so với các mức khi không có mặt các chủng này) mà còn để làm tăng mức melatonin, ví dụ bằng cách tăng các mức AANAT như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả. Các chủng bao gồm enzym 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào hoạt động và còn thể hiện hoạt tính enzym 5'-nucleotidaza trong các phần nổi tương ứng của chúng (xem Fig.3 và Fig.5 A/B).

Các chủng *L. reuteri* này được phát triển (nói cách khác được cải biến hoặc được làm thích ứng hoặc được cải tiến) từ các chủng tự nhiên và còn được chọn lọc nhờ một hoặc nhiều đặc điểm cải thiện khác như sức chống chịu tăng với mật hoặc tăng sự bám dính vào bề mặt niêm mạc, ví dụ các bề mặt của đường GI. Vì vậy, DSM 32846 và DSM 32847 được cải tiến để có khả năng chịu tốt hơn với các axit mật và nhờ đó tồn tại ở lượng lớn hơn trong đường GI. DSM 32848 và DSM 32849 được cải tiến tốt hơn để bám dính tốt hơn vào dịch nhầy, với mục đích cư trú tốt hơn trong đường GI và do đó hoạt động tốt hơn, chẳng hạn, theo sáng chế. Chủng *L. reuteri* DSM 33198 còn được cải biến theo quy trình chọn lọc nhiều bước bao gồm quy trình sấy lạnh được lặp lại cho phép nó chống chịu tốt hơn và cho khả năng sống sót cao hơn trong quy trình sản xuất so với thể phân lập tự nhiên của nó (chủng bố mẹ). Vì vậy, các chủng này không tương ứng với các chủng xuất hiện trong tự nhiên và đã buộc phải cải tiến và là các chủng không tự nhiên. Tất cả các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848, DSM 32849 và DSM 33198 được chọn lọc. Các chủng ưu tiên là DSM 32846, DSM 32847, DSM 32849 hoặc DSM 33198. Các chủng ưu tiên hơn là DSM 32846, DSM 32847 hoặc DSM 33198.

Theo một phương án các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và/hoặc DSM 32849 được chọn lọc hoặc được sử dụng. Các chủng được ưu tiên là DSM 32846, DSM 32847 hoặc DSM 32849. Các chủng được ưu tiên hơn là DSM 32846 hoặc DSM 32847, ví dụ DSM 32846 được ưu tiên theo một số phương án. Theo một số phương án, chủng DSM 33198 được chọn lọc hoặc được sử dụng.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin (ví dụ tăng mức adenosin, hoặc tăng hoặc thúc đẩy sản xuất adenosin), trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm để sử dụng nhằm sản xuất adenosin ở đối tượng.

Các phương pháp và các sử dụng này có thể được sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau bụng ở trẻ nhỏ hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản

mô tả, ví dụ hội chứng ruột dễ bị kích thích (IBS), rối loạn giấc ngủ, hoặc các bệnh hoặc rối loạn thoái hóa thần kinh, ví dụ bệnh Alzheimer hoặc các loại sa sút trí tuệ khác, ví dụ các loại sa sút trí tuệ do tuổi già khác. Các bệnh này cũng là các ví dụ về các bệnh liên quan đến (hoặc đặc trưng bởi) sự thiếu hụt hoặc sụt giảm melatonin, hoặc ví dụ là các bệnh được hưởng lợi từ mức melatonin cao hoặc tăng.

Vận động dạ dày-ruột có nghĩa là sự duỗi và co của các cơ trong đường dạ dày-ruột để vận chuyển thức ăn được tiêu hóa. Sự co được đồng bộ hóa của các cơ này được gọi là nhu động.

Nhiều yếu tố được giải phóng một cách cục bộ bao gồm các hormon trong đường dạ dày-ruột điều tiết vận động và bài tiết. Các chuyển động của hệ thống tiêu hóa, và sự đi qua của các chất bên trong nó tạo ra sự vận động. Khi dây thần kinh và/hoặc các cơ trong phần bất kỳ của đường tiêu hóa, chức năng vận động trong đường dạ dày-ruột, không hoạt động với cường độ và sự phối hợp bình thường, con người gặp các triệu chứng liên quan đến các rối loạn vận động.

Rối loạn chức năng vận động đã được mô tả là tạo ra nhiều triệu chứng trong các vùng ruột khác nhau như ở đối tượng có chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Chứng đau bụng ở trẻ nhỏ là thuật ngữ được sử dụng để mô tả các trẻ nhỏ khóc quá nhiều không vì lý do rõ ràng nào trong ba tháng tuổi đầu tiên. Chứng đau bụng là một trong các vấn đề gây mệt mỏi nhất của trẻ nhỏ. Nó là sự mệt mỏi cho trẻ nhỏ, cha mẹ, và đối với người cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe. Nguyên nhân của chứng đau bụng không được hiểu một cách đầy đủ.

Sự non nớt về hormon của trẻ sơ sinh được cho là nhân tố chính trong các vấn đề ban đầu về sự phát triển khả năng vận động của ruột và do đó còn gây ra cơn đau và cơn khóc của trẻ nhỏ, như chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Melatonin là hormon có khả năng hỗ trợ nhịp sinh học và có tác động quan trọng lên nhiều chức năng ở người và động vật. Hormon ảnh hưởng đến khả năng vận động của đường dạ dày-ruột bởi các thụ thể chọn lọc (các thụ thể melatonin) được biểu hiện trên các cơ trơn và các tế bào đám rối thần kinh cơ ruột trong đường dạ dày-ruột. Cơ chế cơ bản làm cơ sở cho sự co cơ trơn trong đường dạ dày-ruột là sự sinh dòng điện theo chu kỳ. Hoạt tính điện cơ của đường dạ dày-ruột bao gồm hai loại điện thế: sóng chậm và hoạt tính đột biến được tổ chức trong phức hợp di chuyển điện cơ.

Tiền chất cho melatonin là serotonin, chất dẫn truyền thần kinh có thể được dẫn xuất từ axit amin tryptophan.

Đã thấy rằng sự suy giảm quá trình chuyển hóa của thức ăn gây ra bởi serotonin bị cản trở một phần bởi melatonin. Đây là hệ thống đối trọng của melatonin và serotonin trong sự điều hòa hoạt động ruột.

Hơn nữa hệ thống melatonin-serotonin chức năng và cân bằng ảnh hưởng đến cảm giác ngon miệng và quá trình tiêu hóa bằng nội tiết cũng như tác động cận tiết đến não và đường GI.

Hoạt động của hai hormon này dường như có tác động ngược nhau lên khả năng vận động và tác động cuối cùng là phụ thuộc vào liều dùng. Melatonin và serotonin còn được biết là có liên quan đến các quá trình miễn cảm và dẫn truyền cơn đau.

Melatonin, còn được biết là tryptamin N-axetyl-5-metoxi, là hormon và chất dẫn truyền thần kinh ban đầu được cho là tiết ra phần lớn bởi tuyến tùng. Các vị trí ngoài tuyến tùng quan trọng sản xuất melatonin, như võng mạc và đường dạ dày-ruột. Có các báo cáo hiện nay cho thấy có nhiều melatonin hơn ít nhất 400 lần trong đường dạ dày-ruột so với trong tuyến tùng. Sự biến đổi sinh học của melatonin trong đường dạ dày-ruột có vẻ không được kiểm soát việc phơi sáng (giống như tuyến tùng), mà bằng việc ăn và thành phần thực phẩm.

Sự đồng bộ hóa giữa quá trình sản xuất và nhịp sinh học khác nhau và sự giải phóng sau đó của serotonin và melatonin ở các trẻ nhỏ là quan trọng để tránh rối loạn khả năng vận động của ruột và cơn đau, như chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Serotonin làm tăng sự co cơ trơn của ruột, và melatonin làm nhuận các cơ trơn của ruột. Các đỉnh nồng độ serotonin có thể gây ra co thắt ruột nếu không được cân bằng bởi các tác nhân khác, trong đó melatonin là một tác nhân quan trọng. Cả serotonin và melatonin có các nhịp sinh học. Đồng thời có serotonin sản xuất và các nhịp sinh học serotonin phát triển khi trẻ nhỏ được sinh ra, sự sản xuất melatonin nội sinh và nhịp sinh học melatonin, ở nhiều trẻ nhỏ sẽ không sẵn sàng sau ba tháng tuổi. Thời gian này trùng với thời gian biến mất thông thường của chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Đã cho thấy rằng melatonin là thấp vào các buổi sáng đối với trẻ nhỏ mới sinh có chứng đau bụng, nhưng ngược lại nó lại cao đối với trẻ nhỏ không có chứng đau bụng (Cengiz et al 2015, Turkish journal of family medicine and primary care; 9 (1)/10-15). Các trẻ nhỏ này (ví dụ các trẻ nhỏ có sự hình thành chứng đau bụng ở trẻ nhỏ liên quan đến sự thiếu hụt melatonin hoặc

sự cân bằng melatonin, ví dụ sự thiếu hụt ở các mức melatonin vào buổi sáng, ví dụ tại hoặc trước 6 giờ sáng, 8 giờ sáng, 10 giờ sáng hoặc 12 giờ trưa) là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Vì vậy, mặc dù một số trẻ cho thấy có khả năng sản xuất và giải phóng melatonin nội sinh cần thiết, từ thức ăn của chúng và/hoặc vi khuẩn trong ruột của chúng và do đó có thể ít phát triển chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, có nhiều đứa trẻ khác lại không, và vì vậy cần hỗ trợ bổ sung để ngăn ngừa hoặc điều trị IC. Các trẻ nhỏ này (ví dụ trẻ nhỏ có sự thiếu hụt melatonin ví dụ gây ra bởi hệ vi khuẩn đường ruột không phát triển đầy đủ hoặc trẻ nhỏ gặp các vấn đề về dinh dưỡng hoặc các vấn đề do bú mẹ) cũng là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Có thể nói rằng chứng đau bụng ở trẻ nhỏ là tình trạng về sự thiếu hụt melatonin. Điều này đặc biệt quan trọng đối với trẻ em gặp tình trạng căng thẳng, hoặc những trẻ ít có khả năng đối phó với căng thẳng, như đối với trẻ em sinh ra trước khi đủ thời gian thai kỳ hoặc chức năng chuyển hóa thức ăn chưa hoàn thiện v.v.. Các trẻ này (ví dụ trẻ thiếu hụt melatonin sinh ra trước khi đủ thời gian thai kỳ, hoặc sinh mổ, hoặc chức năng chuyển hóa thức ăn chưa hoàn thiện) cũng là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Một ví dụ khác về tình trạng liên quan đến sự cân bằng chức năng melatonin là hội chứng ruột dễ bị kích thích (IBS) nó là sự rối loạn thông thường được đặc trưng bởi cơn đau hoặc sự khó chịu ở bụng tái diễn, kết hợp với các thể trạng ruột bị rối loạn mà không có nguyên nhân có thể nhận biết. Có giả thuyết là melatonin cho thấy tác động tích cực lên cảm giác đau và thói quen đi ngoài (Siah KTH et al, 2014, World J Gastroenterol; 20(10): 2492-2498). Vì vậy, các đối tượng mắc IBS, cụ thể là các dạng IBS liên quan đến thiếu hụt melatonin hoặc sự cân bằng melatonin, cũng là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Sự thiếu hụt melatonin được nghiên cứu chủ yếu ở tuyến tùng, hệ tuần hoàn, nước bọt, dịch não tủy, và, bằng cách đo chất chuyển hóa 6-sulfatoxymelatonin, trong nước tiểu.

Có hơn 20 loại tế bào nội tiết ruột trong đường ruột, khiến ruột trở thành cơ quan nội tiết lớn nhất trong cơ thể người. Các tế bào Enterochromaffin (EC) là loại tế bào nội tiết ruột và nội tiết thần kinh. Chúng trú ngụ dọc theo biểu mô phủ lòng ống đường tiêu hóa và đóng vai trò then chốt trong điều hòa đường dạ dày-ruột, cụ thể khả năng vận động và sự tiết của ruột. Các tế bào EC điều hòa quá trình truyền tín hiệu qua nơron trong hệ

thống thần kinh ruột (enteric nervous system - ENS) thông qua sự tiết chất dẫn truyền thần kinh serotonin và các peptit khác, chúng còn biểu hiện các thụ thể adenosin và có sự tổng hợp tích cực của melatonin.

Triệu chứng thông thường báo hiệu không đủ melatonin là rối loạn giấc ngủ và melatonin là một trong số các chất bổ sung sức khỏe tự nhiên phổ biến nhất trong thời đại của chúng ta. Melatonin thường được gọi là “hormon bóng tối” do sự tổng hợp và tiết của nó ở một số vị trí của cơ thể được tăng cường bởi bóng tối và bị ức chế bởi ánh sáng. Rối loạn giấc ngủ thường thấy ở mức độ cao ở trẻ em và, nếu không được điều trị thích hợp, có thể trở thành mãn tính và kéo dài trong nhiều năm (Esposito et al. 2019, J Transl Med, 17:77). Thậm chí dân số già được báo cáo là gặp rối loạn giấc ngủ. Đỉnh melatonin về đêm thường được quan sát thấy là giảm theo tuổi tác. Vì vậy, các đối tượng gặp hoặc mắc rối loạn giấc ngủ, cụ thể là các dạng rối loạn giấc ngủ liên quan đến thiếu hụt melatonin hoặc sự cân bằng melatonin, cũng là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Mức melatonin giảm xuống cũng được mô tả nhiều lần ở các rối loạn thoái hóa thần kinh, đặc biệt các bệnh Alzheimer và các loại sa sút trí tuệ do tuổi già khác (Blumenbach Johann Friedrich, 2012, The Scientific World Journal Volume 2012, Article ID 640389). Vì vậy, các đối tượng có sự rối loạn thoái hóa thần kinh này, cụ thể là các dạng rối loạn thoái hóa thần kinh liên quan đến thiếu hụt melatonin hoặc sự cân bằng melatonin, cũng là các ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng cách sử dụng sáng chế.

Tốc độ hình thành melatonin phụ thuộc vào hoạt động của arylalkylamin- N-axetyltransferaza enzym (AANAT) (Fig.1 và Fig.2) không những ở tuyến tùng mà còn tại các vị trí sản xuất melatonin ngoài tuyến tùng, như trong đường dạ dày-ruột.

Adenosin làm tăng các mức cAMP nội bào thông qua các thụ thể adenosin, làm tăng sản xuất AANAT, enzym giới hạn tốc độ trong tổng hợp melatonin.

Mục đích của sáng chế là sử dụng các chủng sinh axit lactic để sản xuất adenosin để ngăn ngừa và/hoặc điều trị chứng đau bụng ở trẻ nhỏ.

Một mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng sinh axit lactic để sản xuất adenosin để ngăn ngừa và/hoặc điều trị IBS.

Một mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng sinh axit lactic để sản xuất adenosin để ngăn ngừa và/hoặc điều trị rối loạn giấc ngủ.

Một mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng sinh axit lactic để sản xuất

adenosin để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự rối loạn thoái hóa thần kinh, ví dụ bệnh Alzheimer và các loại sa sút trí tuệ khác, ví dụ các loại sa sút trí tuệ do tuổi già khác.

Sáng chế còn đề xuất đến phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn cụ thể, bao gồm các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất adenosin và việc sử dụng các chủng này để mang lại tác động có lợi cho trẻ em mắc chứng đau bụng hoặc có nguy cơ mắc chứng đau bụng. Một mục đích khác nữa của sáng chế đề xuất các chủng vi khuẩn mới, có khả năng sản xuất adenosin.

Một quá trình trao đổi chất quan trọng trong cơ thể người là sự chuyển hóa purin, trong đó các purin được chuyển hóa và bị phá vỡ bởi các enzym đặc hiệu. Một ví dụ trong số các enzym này là ecto-5'-nucleotidaza (CD73), được xem là enzym chủ chốt trong quá trình sản sinh adenosin.

Các tác giả đã ngạc nhiên khi phát hiện rằng một số chủng vi khuẩn probiotic đặc hiệu có khả năng sản xuất adenosin.

Vì vậy, sáng chế đề xuất phương pháp mới chọn lọc các chủng vi khuẩn đặc hiệu, bao gồm các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có hiệu quả trong sản xuất adenosin. Mục đích của việc chọn lọc các chủng vi khuẩn cụ thể là để sử dụng cho việc điều trị các rối loạn nhất định như chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn, cụ thể các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, hữu ích để làm probiotic và trong liệu pháp, ví dụ, làm dược phẩm hoặc thực phẩm bổ sung.

Do đó, một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn, tốt hơn là chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất adenosin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) sàng lọc chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có gen mã hóa 5'-nucleotidaza, ví dụ 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào; và/hoặc
- b) sàng lọc chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, hoặc phần nổi của nó có enzym 5'-nucleotidaza hoạt động, ví dụ enzym 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào.

Các enzym 5'-nucleotidaza (5'NT) có thể còn được gọi là các enzym ecto-5' nucleotidaza hoặc CD73 (cụm biệt hóa 73). Các chủng có khả năng sản xuất adenosin có thể sau đó được chọn lọc.

Theo cách khác, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn, tốt hơn là chủng vi khuẩn sinh axit lactic, bằng cách sàng lọc chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, về khả năng sản xuất adenosin của nó và chọn lọc chủng có khả năng đó.

Khi chủng thích hợp đã được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp của sáng chế, sau đó có được sử dụng cho việc sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng các phương pháp của sáng chế, trong đó chủng này có khả năng sản xuất adenosin, ví dụ, sản xuất cục bộ adenosin ở đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng để điều trị chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả) của các chủng được chọn lọc bởi sáng chế.

Vì vậy, các khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng các phương pháp của sáng chế, trong đó chủng này có gen 5'-nucleotidaza hoặc enzym 5'-nucleotidaza hoạt động và có khả năng sản xuất adenosin, để sử dụng trong sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng.

Các phương án khác của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, trong đó chủng này có gen 5'-nucleotidaza hoặc enzym 5'-nucleotidaza hoạt động và có khả năng sản xuất adenosin, để sử dụng trong sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng. Các đặc điểm được ưu tiên của các chủng này và việc sử dụng chúng được mô tả ở phần khác trong bản mô tả.

Như sẽ được nêu tại các phần khác trong bản mô tả này, phương án cụ thể của sáng chế là ngăn ngừa và/hoặc điều trị về chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả).

Các phương pháp điều trị hoặc các phương pháp sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng, cũng được đề xuất, các phương pháp này bao gồm việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp chọn lọc của sáng chế, hoặc việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, trong đó chủng này có gen 5'-nucleotidaza hoặc enzym 5'-nucleotidaza hoạt động và là có khả năng sản xuất adenosin, cho đối tượng

này theo lượng hữu hiệu để kích hoạt sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng này. Các dấu hiệu ưu tiên của chủng này và việc sử dụng để điều trị của chúng, ví dụ ở chúng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả), được mô tả ở phần khác trong bản mô tả.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp chọn lọc của sáng chế, trong đó chủng này có gen 5'nucleotidaza hoặc enzym 5'nucleotidaza hoạt động và có khả năng sản xuất adenosin, trong sản xuất chế phẩm hoặc thuốc để sử dụng trong sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng. Các phương án khác đề xuất việc sử dụng chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, trong đó chủng này có gen 5'nucleotidaza hoặc enzym 5'nucleotidaza hoạt động và có khả năng sản xuất adenosin, trong sản xuất chế phẩm hoặc thuốc để sử dụng trong sản xuất, ví dụ sản xuất cục bộ, adenosin ở đối tượng. Các dấu hiệu ưu tiên của chủng này và việc sử dụng để điều trị của chúng, ví dụ ở chúng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả), được mô tả ở phần khác trong bản mô tả.

Các sản phẩm hoặc chế phẩm, ví dụ các dược phẩm, các chế phẩm probiotic, hoặc các chế phẩm ăn uống/chế phẩm dược thực phẩm, bao gồm các chủng vi khuẩn (ví dụ bao gồm một hoặc nhiều trong số các chủng vi khuẩn) như được mô tả ở đây (ví dụ các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng adenosin, melatonin, v.v.) và việc sử dụng các sản phẩm hoặc chế phẩm này trong các phương pháp và sử dụng như được mô tả ở đây theo các khía cạnh khác nữa của sáng chế.

Tổ chức thực phẩm và nông nghiệp của Mỹ định nghĩa probiotic là “vi sinh vật sống khi sử dụng với lượng thích hợp đem lại lợi ích về mặt sức khỏe cho vật chủ”. Ngày nay, số lượng vi khuẩn khác nhau được sử dụng làm probiotic ví dụ, vi khuẩn sinh axit lactic như các chủng của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*.

Các phương án và các dấu hiệu ưu tiên và thay thế của sáng chế như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả áp dụng một cách tương đương cho các phương pháp điều trị, sử dụng và sản phẩm theo sáng chế.

Như được mô tả ở trên, sáng chế đề xuất việc chọn lọc và sử dụng của các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất adenosin.

Các chủng này có hiệu quả trong sản xuất adenosin có thể được sử dụng để sản xuất cục bộ adenosin ở đối tượng, ví dụ động vật có vú, tốt hơn là người.

Vì vậy, như phác họa ở trên, sáng chế đề xuất các phương pháp khác nhau để chọn lọc hoặc sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất adenosin.

Một số phương pháp bao gồm bước (ví dụ bước a)) sàng lọc sự có mặt của gen mã hóa 5'-nucleotidaza, ví dụ 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào. Bước sàng lọc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ và các chủng có gen 5'-nucleotidaza được chọn lọc. Thuận lợi hơn khi các phương pháp này được thực hiện *in vitro*, ví dụ, là các phương pháp dựa trên gen hoặc axit nucleic để phát hiện sự có mặt của gen mã hóa 5'-nucleotidaza, ví dụ 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào (hoặc các phân đoạn để nhận diện của chúng), các trình tự của gen này đã được biết trong lĩnh vực. Ví dụ, phương thức PCR (hoặc kỹ thuật dựa trên axit nucleic khác) có thể dễ dàng được thiết kế để thực hiện phương pháp này dựa trên trình tự axit nucleic đã biết mã hóa các enzym này, hoặc thay vào đó, các trình tự bộ gen của các chủng ứng viên có thể được xem xét kỹ lưỡng để nhận dạng gen mã hóa 5'-nucleotidaza này, ví dụ 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào, ví dụ, dựa trên độ tương đồng với các trình tự 5'-nucleotidaza đã biết, bao gồm ví dụ sự có mặt của motif LPXTG (SEQ ID NO:1) như được thảo luận dưới đây.

Gen làm ví dụ sẽ được phát hiện trong các phương pháp của sáng chế là (ecto) gen 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào từ *L. reuteri* (ví dụ số nộp lưu ngân hàng gen: AEI56270.1, protein domain neo ở thành tế bào motif LPXTG [*Lactobacillus reuteri* SD2112]), hoặc dạng tương đồng thích hợp/5' nucleotidaza từ các loại vi khuẩn khác, ví dụ vi khuẩn sinh axit lactic khác. Kỹ thuật làm ví dụ được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm.

Một số phương pháp bao gồm bước (ví dụ bước b)) sàng lọc sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza (chức năng) hoạt động, ví dụ enzym 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào. Bước này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym. Enzym 5'-nucleotidaza xúc tác cho phản ứng sau đây: $AMP + H_2O \rightleftharpoons \text{adenosin} + \text{phosphat}$ (AMP là monophosphat adenosin) và thử nghiệm để đo phản ứng này có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza hoạt động (hoặc hoạt tính 5'-nucleotidaza). Nói cách khác, việc nói đến enzym 5'-nucleotidaza chức năng hoặc hoạt động ở đây là enzym có khả năng xúc tác phản ứng này trong các điều kiện thích hợp, ví dụ khi được cung cấp cơ chất thích hợp như AMP. Hoạt tính của enzym 5'-nucleotidaza có thể, nếu muốn, được định lượng, ví dụ trong thử nghiệm enzym, ví dụ bằng cách đo lượng hoặc nồng độ của phosphat hoặc adenosin hoặc sản phẩm xuôi dòng thích hợp khác của adenosin được tạo ra trong phản

ứng và có thể được đo hoặc định lượng. Hoạt tính có thể được đo một cách thuận tiện trên mẫu tế bào vi khuẩn, hoặc phần nổi từ các tế bào vi khuẩn.

Các phương pháp tiến hành thử nghiệm này được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các kit thích hợp có sẵn trên thị trường, như Kit thử nghiệm 5'-Nucleotidaza hóa tinh thể (Crystal Chem, catalogue# 80229, Downers Grove, IL, Mỹ) trong đó hoạt tính enzym 5'-nucleotidaza được đo thông qua việc sản xuất chất nhuộm (chất nhuộm quinon) được hình thành dưới dạng sản phẩm xuôi dòng của quá trình chuyển hóa AMP thành adenosin (tức là kết quả của việc sản xuất adenosin). AMP được cung cấp làm cơ chất. Kỹ thuật làm ví dụ được mô tả trong các phần ví dụ. Phương pháp thích hợp cũng có sẵn từ các nhà cung cấp thuốc thử khác, ví dụ Sigma, đi kèm với thuốc thử enzym 5'-nucleotidaza của họ.

Các chủng có mức sản xuất enzym 5'-nucleotidaza cao hoặc đáng kể (hoặc hoạt tính 5'-nucleotidaza) được ưu tiên, ví dụ các chủng có hoạt tính 5'-nucleotidaza ít nhất là hoặc cao hơn 2 đơn vị/L (đơn vị trên lít) và/hoặc có khả năng sản xuất adenosin ở mức ít nhất là hoặc cao hơn 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ phút⁻¹ (μmol trên lít trên mỗi phút). Vì vậy, theo các phương án ưu tiên, chủng được chọn lọc có hoạt tính 5'-nucleotidaza ở mức ít nhất là, hoặc cao hơn, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 hoặc 150 đơn vị/L, và/hoặc có khả năng sản xuất adenosin ở mức ít nhất là, hoặc cao hơn, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 hoặc 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ phút⁻¹. Theo một số phương án các giá trị này có thể biểu diễn các giới hạn trên. Các giá trị này nói chung chỉ giá trị của hoạt tính 5'-nucleotidaza đo được trên mẫu tế bào vi khuẩn, ví dụ trên bề mặt của các tế bào vi khuẩn, hoặc trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn nuôi cấy, tốt hơn là trong phần nổi. Các giá trị này nói chung là chỉ các mức adenosin (tốt hơn là các mức adenosin ngoại bào) đo được trong mẫu tế bào vi khuẩn, ví dụ trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn nuôi cấy. Các giá trị này nói chung chỉ giá trị của hoạt tính 5'-nucleotidaza (hoặc các mức adenosin) khi đo với nồng độ 10^9 vi khuẩn/ml, hoặc phần nổi từ mẻ nuôi cấy này. Một đơn vị được xác định là lượng enzym cần thiết để sản xuất 1 μmol sản phẩm/phút (ví dụ 1 μmol sản phẩm/lít/phút). Nồng độ theo đơn vị/lít sau đó sẽ tương ứng với nồng độ enzym cần thiết để tăng nồng độ với 1 μM /phút (ví dụ, 1 μM /lít/phút). Thử nghiệm thích hợp và làm ví dụ để đo hoạt tính này được thể hiện trong các ví dụ bằng cách sử dụng kit 5'-nucleotidaza (#80229) từ Crystal Chem Inc. Vì vậy, trong các phương án ưu tiên, các đơn vị và giá trị ở trên chỉ các đơn vị

và giá trị khi được đo bằng cách sử dụng kit này và/hoặc các điều kiện được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, cụ thể với nồng độ 10^9 vi khuẩn/ml, hoặc phần nổi từ mẻ nuôi cấy này, hoặc thử nghiệm tương đương. Vì vậy, các phương pháp này sẽ được thực hiện thuận lợi *in vitro*.

Các phương pháp bao gồm ít nhất bước b) sẽ được ưu tiên, vì sự có mặt của gen mã hóa 5'-nucleotidaza không phải lúc nào cũng biểu thị sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza hoạt động. Trong các phương pháp này, việc sử dụng và vi khuẩn sinh axit lactic theo sáng chế, việc sản xuất adenosin hoặc hoạt tính adenosin sẽ diễn ra ngoại bào, tức là bên ngoài hoặc trên bề mặt của vi khuẩn sinh axit lactic, do đó nó có thể có mặt ví dụ trong phần nổi hoặc chất lỏng ngoại bào khác được sản xuất bởi vi khuẩn sinh axit lactic. Vì vậy, sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza hoạt động trên bề mặt tế bào, ví dụ dưới dạng 5'-nucleotidaza được neo ở thành tế bào, hoặc ngoại bào từ tế bào vi khuẩn, ví dụ trong phần nổi, có thể là đặc điểm có lợi để cho phản ứng sản xuất adenosin diễn ra bên ngoài tế bào, ví dụ trên bề mặt của tế bào vi khuẩn.

Vì vậy, sự sản xuất adenosin ở mức cao (ví dụ adenosin ngoại bào được sản xuất bởi enzym 5'-nucleotidaza) cũng có thể là chỉ thị cho sự có mặt của gen 5'-nucleotidaza hoặc sự có mặt của enzym 5'-nucleotidaza hoạt động. Vì vậy, phương pháp chọn lọc của sáng chế có thể còn bao gồm bước chọn lọc chủng đang sản xuất adenosin. Các chủng có mức sản xuất adenosin cao hoặc đáng kể, ví dụ adenosin ngoại bào, được ưu tiên, ví dụ các chủng sản xuất adenosin ở mức có hiệu quả điều trị ở đối tượng, hoặc ở mức sao cho mức melatonin tăng (và tốt hơn là hiệu quả điều trị) được quan sát. Các giá trị này nói chung chỉ giá trị của adenosin được đo trong phần nổi của các chủng nuôi cấy hoặc trên bề mặt tế bào của các chủng nuôi cấy (*in vitro*) và một số giá trị cụ thể làm ví dụ được đề xuất ở trên.

Tuy nhiên, theo một số phương án, sẽ thích hợp nếu các giá trị này chỉ các giá trị, mức hoặc lượng adenosin được sản xuất ở đối tượng, ví dụ cục bộ, ví dụ tại vị trí sử dụng, ví dụ trong đường dạ dày-ruột. Ví dụ, các chủng được ưu tiên có thể cho phép việc sản xuất adenosin tăng, ví dụ sản xuất *in vivo* tăng, ví dụ, sản xuất cục bộ (ví dụ trong đường GI), adenosin, ví dụ khi so sánh với sự đối chứng thích hợp như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, như mức adenosin khi không có chủng nào được sử dụng, hoặc mức adenosin cơ sở hoặc tự nhiên ở đối tượng cụ thể.

Theo tất cả các khía cạnh của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, sản xuất cục bộ có thể chỉ việc sản xuất hoặc mức adenosin tại vị trí sử dụng, ví dụ việc sản xuất hoặc mức adenosin trong đường dạ dày-ruột (ví dụ khi sử dụng qua miệng). Theo một khía cạnh, sự sản xuất cục bộ adenosin có thể có tác động xuôi dòng toàn thân và có thể tăng mức adenosin hoặc melatonin trong hệ thống tuần hoàn, ví dụ trong máu hoặc huyết tương, hoặc các nơi khác bên ngoài đường dạ dày-ruột.

Các chủng có thể cho phép mức adenosin cục bộ tăng (hoặc melatonin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza), ví dụ trong đường GI của đối tượng, do đó được ưu tiên, cụ thể tại nơi tác động này được quan sát khi các chủng được sử dụng bằng đường miệng. Tốt hơn là sự tăng lên này là sự tăng đo được hoặc có ý nghĩa, ví dụ có ý nghĩa thống kê hoặc có ý nghĩa về mặt lâm sàng. Ví dụ, các chủng có thể cho phép các mức tăng ít nhất, hoặc lên đến, 1,5 lần, 2 lần, 2,5 lần, 3 lần, 3,5 lần, 4 lần, 4,5 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần hoặc 10 lần, ở mức adenosin (hoặc melatonin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza), ví dụ mức adenosin cục bộ (hoặc melatonin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza), được ưu tiên. Sự so sánh thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, ví dụ mức tăng khi so sánh với các mức được quan sát khi không có chủng nào được sử dụng, hoặc các mức khi công thức đối chứng, ví dụ công thức đối chứng không chứa chủng thích hợp, được sử dụng.

Các phương pháp thích hợp để đo mức sản xuất adenosin (hoặc melatonin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza) sẽ được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Vì vậy, theo một số phương án của sáng chế, phương pháp chọn lọc sẽ liên quan đến bước phát hiện hoặc xác định lượng hoặc mức (ví dụ, nồng độ) của adenosin được sản xuất bởi chủng ứng viên.

Tùy ý, mức sản xuất adenosin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza (hoặc đặc tính thực tế bất kỳ thích hợp khác của các chủng được mô tả trong bản mô tả này) có thể dễ dàng được so sánh với các chủng đối chứng dương hoặc âm. Chủng đối chứng dương thích hợp có thể là DSM 17938 đã được chứng minh trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế để sản xuất mức adenosin/ hoạt tính 5'nucleotidaza đáng kể, ví dụ trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn. Một số chủng sẽ sản xuất các mức adenosin/ hoạt tính 5'nucleotidaza cao hơn, đôi lúc các mức cao hơn một cách đáng kể, so với DSM 17938, ví dụ trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn. Vì vậy, các chủng có khả năng sản xuất các mức hoạt tính 5'nucleotidaza cao hơn (tăng), hoặc các mức hoạt tính 5'nucleotidaza cao hơn đáng kể (tăng) so với DSM 17938, ví dụ trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn, ví dụ khi được đánh giá in vitro, tạo

nên khía cạnh khác nữa của sáng chế. Các chủng làm ví dụ là DSM 32846, DSM 32847, DSM 32849 và DSM 33198 (xem Fig.3 và Fig.5 A/B). Theo cách khác, các chủng có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất các mức adenosin cao hơn (tăng), hoặc các mức adenosin cao hơn đáng kể (tăng) so với DSM 17938, ví dụ trong phần nổi của các tế bào vi khuẩn, ví dụ khi đánh giá *in vitro*, tạo nên khía cạnh khác nữa của sáng chế. Ví dụ, các chủng có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất các mức adenosin cao hơn (tăng), hoặc các mức adenosin cao hơn đáng kể (tăng) ở đối tượng, ví dụ cao hơn v.v., mức adenosin cục bộ ở đối tượng so với DSM 17938, ví dụ khi đánh giá *in vivo*, tạo nên khía cạnh khác nữa của sáng chế, cụ thể khi hiệu quả này được quan sát khi các chủng được sử dụng bằng đường miệng.

Nói chung, các chủng có một hoặc nhiều đặc tính được cải thiện (ví dụ được cải thiện đáng kể) khi so sánh với DSM17938 được ưu tiên đối với một số phương án.

Tốt hơn là sự tăng này (trong sản xuất adenosin hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza) là mức tăng do được hoặc có ý nghĩa, ví dụ có ý nghĩa thống kê hoặc có ý nghĩa về mặt lâm sàng. Ví dụ, các chủng có thể tạo ra các mức tăng ít nhất, hoặc lên đến 10 %, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, hoặc cao hơn, trong mức adenosin, ví dụ mức adenosin cục bộ hoặc *in vitro*, hoặc trong các mức hoạt tính 5'nucleotidaza (ví dụ khi đánh giá *in vitro*), so sánh với các mức có DSM 17938 được ưu tiên. Theo cách khác, các chủng được ưu tiên là các chủng có thể tạo ra các mức adenosin tăng ít nhất, hoặc lên đến, 1,5 lần, 2 lần, 2,5 lần, 3 lần, 3,5 lần, 4 lần, 4,5 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, hoặc 10 lần, ví dụ mức adenosin cục bộ hoặc *in vitro*, hoặc các mức hoạt tính 5'nucleotidaza, so sánh với các mức của DSM 17938. Các mức *in vitro* có thể được đo một cách thuận tiện đo như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, ví dụ các mẻ nuôi cấy vi khuẩn. Tốt hơn là, các mức tăng này là các mức tăng ở mức adenosin ngoại bào hoặc hoạt tính 5'nucleotidaza, ví dụ như được đo *in vitro*, ví dụ trong phần nổi của sự nuôi cấy vi khuẩn.

Chủng đối chứng âm thích hợp có thể là chủng không chứa gen mã hóa 5'nucleotidaza hoặc không chứa enzym 5'nucleotidaza hoạt động (hoặc không có hoạt tính 5'nucleotidaza như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả).

Do việc sử dụng xuôi dòng của các chủng được chọn lọc bởi các phương pháp của sáng chế, sau khi các chủng sản xuất adenosin được chọn lọc hoặc được phân lập, các phương án khác sẽ đề cập đến các bước tiếp theo của việc nuôi cấy hoặc nhân giống hoặc

sản xuất các chủng này, và tùy ý bào chế các chủng được nuôi cấy hoặc được nhân giống hoặc được sản xuất này thành chế phẩm chứa chủng này, ví dụ được phẩm hoặc chế phẩm dinh dưỡng, ví dụ như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, hoặc có thể bảo quản các chủng này để sử dụng trong tương lai, ví dụ bằng cách làm khô lạnh hoặc làm sấy lạnh. Theo một phương án các chủng vi khuẩn được đề xuất dưới dạng sấy lạnh.

Các bước chọn lọc theo các phương pháp của sáng chế (và các phương pháp điều trị như được mô tả ở đây) nói chung sẽ cần được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thích hợp (hoặc môi trường *in vivo*), hỗ trợ việc sản xuất adenosin. Môi trường nuôi cấy ưu tiên (hoặc môi trường *in vivo*) sẽ chứa nguồn cacbon thích hợp, sẽ hỗ trợ việc sản xuất adenosin bởi chủng này, tốt hơn là cùng với cơ chất thích hợp để sản xuất adenosin bởi enzym 5'nucleotidaza, ví dụ AMP.

Mặc dù các thử nghiệm này có thể được thực hiện thuận lợi *in vitro*, một lựa chọn khác có thể được thực hiện để đánh giá các chủng trong thử nghiệm *ex vivo* thích hợp, ví dụ bằng cách sử dụng mô hình enteroid ruột thích hợp (xem ví dụ mô hình enteroid và các thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5, trong đó ví dụ mức melatonin có thể được đánh giá).

Vì vậy, mặc dù các mô hình *in vitro* hoặc *ex vivo* thích hợp để đánh giá về các chủng, ví dụ để đánh giá về sự cảm ứng của adenosin hoặc việc sản xuất melatonin bởi các chủng, các mô hình *in vitro* hoặc *ex vivo* được ưu tiên đánh giá về các chủng là các mô hình enteroid ruột, tốt hơn là các mô hình enteroid ruột của người, ví dụ có thể được sử dụng để đánh giá các mức melatonin. Các mô hình này tốt hơn là gồm các tế bào nội tiết ruột, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 5.

Các chủng ưu tiên của sáng chế có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất ít nhất hoặc lên đến 10, 20, 30, 40, 50, 60 hoặc 70 pg/ml melatonin. Theo một số phương án các giá trị này có thể tượng trưng cho các giới hạn trên. Các giá trị này nói chung chỉ mức sản xuất melatonin được cảm ứng bởi các chủng này khi đo trong thử nghiệm *in vitro* hoặc *ex vivo* thích hợp, ví dụ chỉ mức melatonin được sản xuất bởi tế bào nội tiết ruột (tốt hơn là các tế bào của người), hoặc được sản xuất trong mô hình enteroid ruột gồm tế bào nội tiết ruột (ví dụ có % tế bào nội tiết ruột như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả), tốt hơn là mô hình gồm các tế bào của người, khi các tế bào này được tiếp xúc với các chủng của sáng chế hoặc các phần nổi lấy từ các chủng này. Thử nghiệm thích hợp và làm ví dụ để đo hoạt tính này được thể hiện trong các ví dụ sử dụng mô hình enteroid ruột của người gồm tế bào nội tiết ruột, ví dụ ít nhất 20% hoặc 30%, ví dụ 20-40%, 30-40% hoặc lên đến

40%, tế bào nội tiết ruột. Vì vậy, theo phương án ưu tiên các giá trị ở trên chỉ các giá trị khi được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm này (hoặc thử nghiệm tương đương, ví dụ có % tế bào nội tiết ruột ở trên) và/hoặc các điều kiện được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Một số chủng sẽ có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng các mức melatonin cao hơn, đôi khi là các mức cao hơn một cách đáng kể, so với DSM 17938, ví dụ từ tế bào nội tiết ruột hoặc trong mô hình enteroid ruột như được mô tả ở trên. Vì vậy, các chủng có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng các mức (tăng) cao hơn, hoặc các mức (tăng) cao hơn đáng kể, về melatonin so với DSM 17938, ví dụ khi đánh giá như được mô tả ở trên, ví dụ sử dụng tế bào nội tiết ruột hoặc mô hình enteroid ruột, tạo nên khía cạnh khác nữa của sáng chế. Các chủng ví dụ có thể tạo ra các mức tăng ít nhất, hoặc lên đến, 1,5 lần, 2 lần, 2,5 lần, 3 lần, 3,5 lần, 4 lần, 4,5 lần, 5 lần, 5,5 lần, 6 lần, 6,5 lần, 7 lần, 7,5 lần, 8 lần, 8,5 lần, 9 lần, 9,5 lần hoặc 10 lần, ở mức sản xuất melatonin, so sánh với các mức này của chủng DSM 17938, và được ưu tiên.

Do đó, các phương pháp sàng lọc của sáng chế có thể tùy ý bao gồm bước tiếp theo để chọn lọc chủng có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin, ví dụ sử dụng phương pháp như được mô tả ở trên hoặc phương pháp luận bất kỳ thích hợp khác. Tốt hơn nếu các chủng được chọn lọc có thể cảm ứng sản xuất melatonin ở các mức như được mô tả ở trên.

Theo các phương án trong đó nhiều hơn một chủng vi khuẩn được sàng lọc bằng cách sử dụng các phương pháp của sáng chế, lượng adenosin hoặc hoạt tính 5'-nucleotidaza (hoặc melatonin) được tạo ra có thể được định lượng tùy ý và chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có hoạt tính hoặc mức enzym 5'-nucleotidaza cao nhất, hoặc hoạt tính hoặc mức enzym 5'-nucleotidaza cao đáng kể, ví dụ có các hoạt tính hoặc các mức như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, ví dụ có các hoạt tính hoặc các mức cao hơn (tốt hơn là cao hơn đáng kể) so với DSM17938, hoặc có thể chọn lọc chủng sản xuất lượng hoặc mức adenosin hoặc melatonin cao nhất, hoặc lượng hoặc mức adenosin hoặc melatonin cao đáng kể, ví dụ có lượng hoặc các mức như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, ví dụ có lượng hoặc các mức cao hơn (tốt hơn là cao hơn đáng kể) so với DSM17938.

Do đó, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn, tốt hơn là các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, hiệu quả trong sản xuất adenosin

(hoặc melatonin) bao gồm:

- a) sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh axit lactic có gen mã hóa 5'-nucleotidaza, ví dụ 5'-nucleotidaza được neo ở bề mặt tế bào, và;
- b) định lượng hoạt tính của enzym 5'-nucleotidaza và; tùy ý
- c) chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hoạt tính enzym 5'-nucleotidaza cao nhất hoặc cao một cách đáng kể.

Các phương pháp bao gồm các bước nhất định như được mô tả ở đây còn bao gồm, khi thích hợp, các phương pháp gồm các bước này.

Như được nêu ở trên, một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng các phương pháp của sáng chế, trong đó chủng này có khả năng sản xuất adenosin, và tốt hơn lại sản xuất hoặc hỗ trợ việc sản xuất, ví dụ, sản xuất tăng, melatonin.

Chủng vi khuẩn thích hợp bất kỳ, ví dụ chủng vi khuẩn probiotic, ví dụ vi khuẩn probiotic bất kỳ, có thể được đưa vào các phương pháp chọn lọc của sáng chế và chủng vi khuẩn thích hợp bất kỳ, ví dụ chủng vi khuẩn probiotic, có khả năng sản xuất adenosin có thể được sử dụng trong các phương pháp hoặc việc sử dụng theo sáng chế, ví dụ trong các phương pháp điều trị hoặc sử dụng được mô tả trong bản mô tả này.

Các chủng vi khuẩn được ưu tiên là vi khuẩn sinh axit lactic, ví dụ *Lactobacillus* hoặc *Bifidobacterium*. Các chủng vi khuẩn được ưu tiên cụ thể là *Lactobacillus reuteri*, cụ thể các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và DSM 32849 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 4 tháng 7 năm 2018 và *Lactobacillus reuteri* DSM 33198 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) ngày 9 tháng 7 năm 2019. Các chủng vi khuẩn này hoặc các chủng vi khuẩn được phân lập (và các chủng khác, ví dụ các chủng *L. reuteri*, cụ thể các chủng *L. reuteri* liên quan, có một hoặc nhiều trong số các đặc điểm, ví dụ có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng các tác động lên việc sản xuất adenosin và/hoặc hoạt tính 5' nucleotidaza, và/hoặc melatonin, trong một hoặc nhiều chủng đã lưu nộp) tạo ra các khía cạnh ưu tiên của sáng chế và ví dụ có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các tình trạng như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả hoặc cho bất kỳ việc sử dụng nào như được mô tả ở đây. Theo một số

phương án, chủng *L. reuteri* DSM 17938 không được sử dụng.

Vì vậy, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng các chủng này để điều trị hoặc ngăn ngừa một hoặc nhiều trong số các bệnh như được mô tả ở đây.

Một mục đích khác của sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện việc sử dụng và hiệu quả của việc điều trị các rối loạn cụ thể như được mô tả ở đây bao gồm làm tăng tối đa, làm tăng lên hoặc cải thiện hoạt tính 5'-nucleotidaza của các chủng được chọn lọc, ví dụ các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, tốt hơn là dẫn đến việc sản xuất adenosin tăng lên hoặc được cải thiện. Điều này có thể đạt được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trong các điều kiện tăng trưởng đặc hiệu để cho phép hiệu suất adenosin cao (hoặc cao hơn, ví dụ hiệu suất adenosin cao hơn đáng kể, ví dụ so sánh với hiệu suất quan sát được khi không có điều kiện tăng trưởng đặc hiệu này). Theo một phương án của sáng chế, điều kiện tăng trưởng đặc hiệu có thể là ví dụ nuôi cấy vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy bình thường có bổ sung cơ chất thích hợp cho việc sản xuất adenosin bằng enzym 5'-nucleotidaza, ví dụ AMP, hoặc các thành phần ngược dòng thích hợp của AMP như ADP và/hoặc ATP.

Theo phương án liên quan khác của sáng chế, để tối đa hóa hoạt tính của 5'-nucleotidaza, có thể dùng nồng độ của vi khuẩn cao hơn, ví dụ vi khuẩn sinh axit lactic. Nồng độ làm ví dụ có thể cao hơn từ 2 đến 10 lần so với liều lượng thông thường.

Theo các phương án liên quan khác của sáng chế, gen 5'-nucleotidaza có thể được biểu hiện quá mức hoặc được cảm ứng ở các chủng vi khuẩn bằng các phương pháp thích hợp, ví dụ chèn vectơ plasmit có gen 5'-nucleotidaza dưới sự kiểm soát của gen khởi động thích hợp, ví dụ gen khởi động có thể cảm ứng. Theo cách khác, gen 5'-nucleotidaza có thể được biểu hiện quá mức bởi việc chèn một hoặc nhiều bản sao gen bổ sung vào tế bào vi khuẩn, ví dụ chèn nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn, dưới sự kiểm soát của gen khởi động thích hợp, ví dụ gen khởi động có thể cảm ứng được hoặc tự nhiên.

Như được mô tả ở trên, các chủng của sáng chế, hoặc các chủng được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng các phương pháp của sáng chế có các ứng dụng trong điều trị. Vì vậy, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất các chủng sản xuất adenosin của sáng chế, hoặc các chủng được chọn lọc, thu được hoặc có thể thu được bằng cách sử dụng các phương pháp chọn lọc theo sáng chế, để sử dụng trong sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin, và do đó tốt hơn là melatonin ở đối tượng. Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, sự sản xuất adenosin này, v.v., và tốt hơn là sự sản xuất melatonin được sử

dùng để điều trị về chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (và các bệnh khác như được mô tả ở đây), chứng bệnh này sẽ được lợi từ sự sản xuất hoặc sản xuất tăng, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin và melatonin liên quan.

Việc dùng các chủng vi khuẩn trong các phương pháp điều trị và sử dụng của sáng chế được thực hiện với lượng có hiệu quả về dược lý, điều trị, hoặc sinh lý, cho các đối tượng (động vật/động vật có vú) cần điều trị. Vì vậy, các phương pháp và việc sử dụng này có thể bao gồm thêm bước nhận dạng đối tượng cần điều trị.

Việc điều trị bệnh hoặc các tình trạng bệnh lý theo sáng chế (ví dụ điều trị bệnh có trước) bao gồm việc chữa bệnh hoặc tình trạng bệnh này, hoặc việc giảm hoặc thuyên giảm bất kỳ đối với các bệnh (ví dụ làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh) hoặc các triệu chứng của bệnh.

Các phương pháp và sử dụng theo sáng chế là phù hợp để ngăn ngừa các bệnh hoặc các tình trạng bệnh lý cũng như điều trị các bệnh hoặc các tình trạng bệnh lý. Vì vậy, điều trị phòng ngừa cũng được sáng chế đề xuất. Đối với lý do này theo các phương pháp và sử dụng của sáng chế, điều trị hoặc trị liệu còn bao gồm phòng ngừa hoặc ngăn ngừa trong khi thích hợp.

Các khía cạnh ngăn ngừa (hoặc bảo vệ) này có thể được thực hiện thuận lợi trên các đối tượng khỏe mạnh hoặc bình thường như được mô tả ở đây, và có thể bao gồm sự ngăn ngừa hoàn toàn và ngăn ngừa đáng kể. Tương tự, sự ngăn ngừa đáng kể có thể bao gồm kịch bản trong đó mức độ trầm trọng của bệnh hoặc các triệu chứng của bệnh được giảm (ví dụ được giảm có thể đo được hoặc đáng kể) so sánh với mức độ trầm trọng hoặc các triệu chứng kỳ vọng nếu không được điều trị.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chủng hoặc sản phẩm để sử dụng điều trị như được định nghĩa tại phần khác trong bản mô tả này, trong đó việc sử dụng này còn bao gồm việc dùng ít nhất một tác nhân khác nữa, ví dụ tác nhân điều trị hoặc dinh dưỡng khác nữa. Các tác nhân làm ví dụ có thể là các thành phần cơ chất làm tăng hoặc tăng cường sản xuất adenosin (ví dụ thành phần có thể làm tăng hoặc tăng cường sản xuất adenosin), hoặc chất gốc của thành phần này.

Vì vậy, theo phương án khác nữa của sáng chế, khi vi khuẩn sản xuất adenosin được sử dụng, việc sử dụng các chủng này hoặc các sản phẩm còn bao gồm việc sử dụng thành phần cơ chất, ví dụ AMP và/hoặc vật liệu hoặc tác nhân sản xuất thành phần này. Cơ chất ưu tiên sẽ là AMP, hoặc chất gốc của AMP.

Theo các phương án này, thành phần cơ chất, hoặc thành phần bổ sung khác, sẽ được bổ sung vào dạng bào chế vi khuẩn ngay trước khi dùng cho đối tượng. Theo cách khác, chất này sẽ được bổ sung vào dạng bào chế vi khuẩn ở cuối của quá trình sản xuất, ví dụ ở cuối quá trình lên men, sau đó vi khuẩn có thể được bảo quản để sử dụng trong tương lai, ví dụ bằng cách làm khô lạnh hoặc sấy lạnh. Theo cách khác, có thể sử dụng riêng rẽ như được mô tả dưới đây.

Theo các phương án này, tác nhân điều trị khác có thể là tác nhân khác hữu ích trong điều trị bệnh đang được đề cập.

Các tác nhân khác này có thể được sử dụng cùng với các chủng hoặc các sản phẩm của sáng chế (ví dụ, dưới dạng bào chế kết hợp) hoặc có thể được sử dụng riêng biệt. Ngoài ra, các tác nhân khác này có thể được sử dụng tại cùng thời điểm như các chủng hoặc các sản phẩm của sáng chế hoặc tại các thời điểm khác nhau, ví dụ, theo tuần tự. Các chế độ và thời gian dùng thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình tùy thuộc vào tác nhân khác được đề cập.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm (hoặc sản phẩm hoặc kit kết hợp) bao gồm:

- (i) chủng vi khuẩn, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc, sản xuất, thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp chọn lọc của sáng chế (hoặc chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất adenosin như được xác định trong bản mô tả), trong đó chủng vi khuẩn này có gen mã hóa 5'-nucleotidaza được neo ở bề mặt tế bào hoặc enzym 5'-nucleotidaza hoạt động và có khả năng sản xuất adenosin; và
- (ii) một hoặc nhiều thành phần cơ chất hoặc tác nhân làm tăng hoặc tăng cường sản xuất adenosin, hoặc chất gốc của các thành phần hoặc tác nhân này.

Các thành phần hoặc các tác nhân làm ví dụ được nêu ở trên. Thành phần ưu tiên là AMP hoặc chất gốc của AMP.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm (hoặc sản phẩm hoặc kit kết hợp) phù hợp cho việc làm tăng sản xuất melatonin hoặc adenosin ở đối tượng bao gồm:

- (i) chủng vi khuẩn thứ nhất, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, có khả năng sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin hoặc adenosin như được mô tả ở đây; và
- (ii) nguồn melatonin và/hoặc adenosin khác, hoặc một hoặc nhiều thành phần cơ chất hoặc các tác nhân làm tăng hoặc tăng cường sản xuất hoặc cảm ứng sản xuất melatonin và/hoặc adenosin, hoặc chất gốc của các thành phần hoặc tác

nhân này, khi thích hợp, bởi chủng vi khuẩn sinh axit lactic.

Thành phần ưu tiên là AMP hoặc chất gốc của AMP.

Trong các kit hoặc các sản phẩm kết hợp của sáng chế, các thành phần (i) và (ii) được thường được cung cấp trong các ngăn hoặc các lọ riêng biệt hoặc là các thành phần riêng biệt của kit hoặc sản phẩm. Các kit có thể bao gồm các thành phần khác, có thể là ở trong các ngăn hoặc lọ riêng biệt. Tốt hơn là các kit (hoặc các sản phẩm kết hợp) để sử dụng theo các phương pháp hoặc sử dụng của sáng chế như được mô tả ở đây, ví dụ để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh khác được mô tả trong bản mô tả này, cụ thể chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Các hướng dẫn sử dụng của các kit hoặc các sản phẩm theo các phương pháp và sử dụng của sáng chế có thể được cung cấp tùy ý.

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng ở đây bao gồm các loài có vú, cụ thể là người, đặc biệt là trẻ nhỏ (ví dụ trong đó các bệnh sẽ ngăn ngừa hoặc điều trị là chứng đau bụng). Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, chủng được chọn lọc, ví dụ chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được sử dụng cho người. Đối với các bệnh khác chứng đau bụng, đối tượng bất kỳ, ví dụ đối tượng là người, ví dụ đối tượng người lớn hoặc trẻ em hoặc trẻ nhỏ, mắc bệnh này hoặc bị nghi ngờ sẽ mắc bệnh này hoặc chịu rủi ro từ các bệnh này là thích hợp.

Đối tượng ưu tiên theo sáng chế là trẻ nhỏ ít hơn hoặc lớn hơn 12 tháng tuổi, tốt hơn là ít hơn hoặc lên đến 5 hoặc 6 tháng tuổi, tốt hơn là ít hơn hoặc lên đến 3 hoặc 4 tháng tuổi. Các đối tượng này là đặc biệt thích hợp khi các bệnh cần điều trị hoặc ngăn ngừa là chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Do đó, các đối tượng có thể được điều trị từ khi sinh ra, hoặc trong vòng một vài tuần đầu tiên (ví dụ trong vòng 1, 2, 3 hoặc 4 tuần đầu) hoặc trong vòng vài tháng đầu tiên (ví dụ trong vòng 1, 2, 3 hoặc 4 tháng đầu) của cuộc đời.

Như được mô tả ở phần khác trong bản mô tả, các đối tượng ưu tiên là các đối tượng mắc chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc một trong số các bệnh khác như được mô tả ở đây) hoặc được cho là hoặc nghi ngờ sẽ mắc chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc một trong số các bệnh khác như được mô tả ở đây). Vì việc sử dụng điều trị của sáng chế có thể còn được sử dụng để ngăn ngừa bệnh, các đối tượng thích hợp bao gồm người có nguy cơ mắc chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc một trong các bệnh khác như được mô tả ở đây).

Các đối tượng làm ví dụ sẽ bao gồm trẻ nhỏ chỉ (duy nhất) bú sữa mẹ và trẻ nhỏ chỉ (duy nhất) nuôi bằng sữa công thức (các trẻ nhỏ không bú mẹ) hoặc trẻ nhỏ được nuôi bằng cả sữa mẹ và sữa công thức.

Các đối tượng làm ví dụ khác bao gồm trẻ nhỏ, cụ thể trẻ nhỏ có chứng đau bụng, nghi ngờ có chứng đau bụng, hoặc nguy cơ phát triển chứng đau bụng, chưa sản xuất hoặc giải phóng melatonin hoặc nếu không thì không có khả năng sản xuất hoặc giải phóng melatonin, ví dụ trẻ nhỏ có chu kỳ sinh học về melatonin hàng ngày vẫn chưa phát triển hoặc bắt đầu, hoặc trẻ nhỏ không có khả năng sản xuất hoặc giải phóng melatonin cần thiết từ thức ăn của chúng và/hoặc vi khuẩn trong ruột của chúng, hoặc bao gồm trẻ nhỏ có mức melatonin thấp, giảm, ví dụ giảm đáng kể (hoặc bất thường) hoặc thiếu hụt melatonin, ví dụ so sánh với các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh, ví dụ các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh trong cùng độ tuổi, độ tuổi tương đương hoặc độ tuổi có thể so sánh được.

Đối với các bệnh ngoài chứng đau bụng, các đối tượng làm ví dụ bao gồm các đối tượng có mức melatonin thấp, giảm, ví dụ giảm đáng kể (hoặc bất thường) hoặc thiếu hụt melatonin, ví dụ so sánh với các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh, ví dụ các mức ở đối tượng bình thường hoặc khỏe mạnh trong cùng độ tuổi, độ tuổi tương đương hoặc độ tuổi có thể so sánh được.

Các đối tượng làm ví dụ khác bao gồm trẻ nhỏ có một số loại phát sinh hoặc vấn đề thuộc về dinh dưỡng hoặc chế độ ăn, ví dụ dẫn đến mức melatonin thấp hoặc thiếu hụt. Các đối tượng này có thể bao gồm trẻ nhỏ sinh ra trước khi đủ thời gian thai kỳ, ví dụ trẻ nhỏ sinh non hoặc trẻ nhỏ sinh trước 36 tuần của thai kỳ, hoặc trẻ nhỏ thiếu sự chuyển hóa thức ăn chức năng đầy đủ, hoặc trẻ nhỏ có các vấn đề về bú hoặc dinh dưỡng.

Các đối tượng làm ví dụ bao gồm người, tốt hơn là trẻ nhỏ, thiếu độ trưởng thành về hormon (nói cách khác sự sản xuất hormon dưới mức tối ưu, dưới mức bình thường, kém phát triển, thiếu hụt, thấp hoặc non nớt) ví dụ so sánh với trẻ nhỏ hoặc đối tượng bình thường trong cùng độ tuổi, ví dụ thiếu độ trưởng thành về melatonin, cụ thể các đối tượng có sự thiếu hụt về khả năng vận động của ruột dẫn đến sự thiếu độ trưởng thành về hormon. Thiếu độ trưởng thành về hormon này, ví dụ thiếu độ trưởng thành về melatonin hoặc giảm hoặc thiếu hụt melatonin, ví dụ có thể là liên quan đến một số trẻ nhỏ mắc chứng đau bụng ở trẻ nhỏ. Các bệnh ưu tiên khác (và cũng như các đối tượng) cần điều trị là các bệnh hoặc các tình trạng liên quan đến sự thiếu hụt melatonin (hoặc các đối tượng mắc các bệnh này).

Trong tất cả các đối tượng này, nếu thích hợp hoặc cần thiết, mức melatonin ở đối tượng này có thể được đo dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật có sẵn dễ dàng và được biết đến trong lĩnh vực. Ví dụ, mức melatonin có thể được đo dễ dàng trong các mẫu huyết

thanh/máu hoặc nước bọt. Các kit sử dụng thương mại cho các đo này cũng là có sẵn.

Phương thức sử dụng thích hợp bất kỳ có thể được dùng. Thuận tiện là việc sử dụng này là qua đường miệng, trực tràng hoặc ăn bằng đường ống. Vì vậy, vi khuẩn có thể được dùng cho đường GI, hoặc khoang miệng, như mong muốn hoặc thích hợp. Vi khuẩn có thể được đưa vào sữa công thức cho trẻ em hoặc thực phẩm bổ sung hoặc giọt dầu, cũng như trong chế phẩm dược phẩm.

Liều lượng thích hợp của các chủng, sản phẩm và chế phẩm của sáng chế như được xác định ở đây có thể được chọn dễ dàng phụ thuộc vào bệnh (hoặc tình trạng) cần điều trị, phương thức sử dụng và công thức liên quan.

Ví dụ, chế độ liều và sử dụng được chọn sao cho vi khuẩn sử dụng cho đối tượng theo sáng chế có thể dẫn đến tăng sản xuất, ví dụ, sản xuất cục bộ, adenosin (hoặc melatonin) và để làm tăng tác dụng điều trị mong muốn hoặc các lợi ích sức khỏe về chứng đau bụng ở trẻ nhỏ (hoặc các bệnh khác cần điều trị). Vì vậy, tốt hơn là liều dùng này là liều dùng có hiệu quả điều trị thích hợp cho động vật có vú và tình trạng được điều trị và ví dụ, được sử dụng cho đối tượng có nhu cầu. Ví dụ, liều dùng hàng ngày, ví dụ một liều dùng hàng ngày, 10^4 đến 10^{12} , ví dụ 10^5 đến 10^9 , hoặc 10^6 đến 10^8 , hoặc 10^8 đến 10^{10} , hoặc 10^{10} đến 10^{12} tổng CFU của vi khuẩn có thể được sử dụng.

Theo một phương án, liều dùng hàng ngày (ví dụ 10^5 đến 10^9 hoặc 10^6 đến 10^8 hoặc 10^8 đến 10^{10} hoặc 10^{10} đến 10^{12} CFU) được phân chia thành nhiều lần dùng ví dụ 2 đến 8 lần dùng (như 3 đến 5 lần dùng) hoặc kết hợp với mỗi bữa ăn (bú mẹ và/hoặc sữa công thức) của đối tượng. Theo một phương án, liều dùng cao hơn, như 2 đến 10 hoặc 10 đến 100 lần liều dùng sau thời gian bắt đầu, và/hoặc liều dùng sử dụng thường xuyên hơn được sử dụng khi liều dùng bắt đầu 3-14 ngày (ví dụ 5-10 ngày, như 7 ngày) để làm giảm nhẹ nhanh hơn cho đối tượng.

Thuật ngữ "tăng" hoặc "tăng cường" hoặc "cao hơn" (hoặc các thuật ngữ tương đương) như được mô tả ở đây bao gồm mức tăng có thể đo được bất kỳ khi so sánh với mức đối chứng thích hợp. Các mức đối chứng thích hợp sẽ dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể bao gồm các mức khi không có các chủng này, hoặc các mức ở các đối tượng không điều trị hoặc đối tượng điều trị bằng giả dược, hoặc các mức ở đối tượng khỏe mạnh hoặc bình thường, ví dụ đối tượng phù hợp về độ tuổi, hoặc cùng đối tượng trước khi điều trị. Tốt hơn là mức tăng sẽ là đáng kể, ví dụ có ý nghĩa về mặt lâm sàng hoặc thống kê, ví dụ với giá trị xác suất $\leq 0,05$.

Tốt hơn là các mức tăng này (và các mức tăng khác, các cải thiện hoặc các tác động dương như được nêu tại phần khác trong bản mô tả này) là mức tăng có thể đo, v.v., (tùy trường hợp), tốt hơn nữa là chúng là các mức tăng đáng kể, tốt hơn là các mức tăng có ý nghĩa về mặt lâm sàng hoặc có ý nghĩa về mặt thống kê, ví dụ với giá trị xác suất $\leq 0,05$, khi so sánh với mức hoặc giá trị đối chứng thích hợp (ví dụ so sánh với đối tượng không được điều trị hoặc được điều trị bằng giả dược hoặc so sánh với đối tượng khỏe mạnh hoặc bình thường, hoặc cùng đối tượng trước khi điều trị).

Thuật ngữ "giảm" hoặc "giảm xuống" (hoặc các thuật ngữ tương đương) như được mô tả ở đây bao gồm mức giảm hoặc sự giảm có thể đo được bất kỳ khi so sánh với mức đối chứng thích hợp. Các mức đối chứng thích hợp sẽ dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể bao gồm các mức khi không có các chứng này, hoặc các mức ở các đối tượng không điều trị hoặc đối tượng điều trị bằng giả dược, hoặc các mức ở đối tượng khỏe mạnh hoặc bình thường, ví dụ đối tượng phù hợp về độ tuổi, hoặc cùng đối tượng trước khi điều trị. Tốt hơn là mức giảm này là đáng kể, ví dụ có ý nghĩa về mặt lâm sàng hoặc mặt thống kê, ví dụ với giá trị xác suất $\leq 0,05$.

Vì vậy, tốt hơn là các mức giảm này (và các mức giảm khác, sự giảm hoặc các tác động âm như được nêu tại phần khác trong bản mô tả này) là các mức giảm có thể đo, v.v., (tùy trường hợp), tốt hơn nữa là giảm xuống đáng kể, tốt hơn là các mức giảm có ý nghĩa về mặt lâm sàng hoặc có ý nghĩa về mặt thống kê, ví dụ với giá trị xác suất $\leq 0,05$, khi so sánh với mức hoặc giá trị đối chứng thích hợp (ví dụ so sánh với đối tượng chưa được điều trị hoặc được điều trị bằng giả dược hoặc so sánh với đối tượng khỏe mạnh hoặc bình thường, hoặc cùng đối tượng trước khi điều trị).

Như được sử dụng khắp sáng chế, danh từ số ít được sử dụng có nghĩa "ít nhất một", "ít nhất đầu tiên", "một hoặc nhiều" hoặc "nhiều" thành phần hoặc bước được nói đến, ngoại trừ các trường hợp sau đó có nêu cụ thể giới hạn trên.

Ngoài ra, khi các thuật ngữ "bao gồm", "gồm có", "có", hoặc các thuật ngữ tương đương khác được sử dụng ở đây, thì theo một số phương án cụ thể hơn, các thuật ngữ này bao gồm thuật ngữ "gồm có" hoặc "chủ yếu gồm có", hoặc các thuật ngữ tương đương khác.

Các danh sách "gồm có" các thành phần và đặc điểm khác nhau như được thảo luận ở đây cũng được gọi là các danh sách "bao gồm" các thành phần hoặc đặc điểm khác nhau này.

Các đối tượng và ưu điểm khác sẽ trở nên đầy đủ rõ ràng hơn từ các ví dụ không giới hạn sau đây và yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

VÍ DỤ 1

Phương pháp nhận dạng các chủng có gen mã hóa 5'-nucleotidaza được đặt ở bề mặt tế bào

Nuôi cấy vi khuẩn trên các đĩa MRS trong 16 giờ ở 37°C trong môi trường kỵ khí. Thu gom 10 khuẩn lạc vi khuẩn bằng vòng nhựa vô trùng và được huyền phù trong 100 micrô lít nước vô trùng (loại dùng cho PCR). (Theo cách khác: Điều chế ADN ADN bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp).

Sự có mặt của gen 5'-nucleotidaza có thể được kiểm tra bởi PCR, ví dụ bằng cách sử dụng hạt PuReTaq Ready To Go PCR (GE HealthCare) và bất kỳ trong số các cặp mồi được mô tả sau đây (0,4 mM cho mỗi cặp). Dịch huyền phù vi khuẩn hoặc dạng điều chế ADN (0,5µl) sẽ được bổ sung vào hỗn hợp PCR và thực hiện phản ứng PCR bằng cách chạy chương trình 95°C, 5 phút; 30× (95°C, 30 giây; 55°C, 30 giây; 72°C, 30 giây); 72°, 10 phút. Sản phẩm PCR sẽ được phân tách và quan sát bằng mắt bằng cách sử dụng phương pháp điện di trên gel agarosa chuẩn và trình tự được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger chuẩn (bằng cách sử dụng đoạn mồi xuôi được dùng cho PCR).

Gen có thể được phát hiện bằng cách sử dụng bất kỳ trong số các đoạn mồi sau đây:

Cặp mồi 1 (kích thước sản phẩm 233 bp)

LrNuc1f: GGAAC TTTGGGAAACCATGA (SEQ ID NO:2)

LrNuc1r: CGGGCAACTTTACCATCACT (SEQ ID NO:3)

Cặp mồi 2 (kích thước sản phẩm 212 bp)

LrNuc2f: TACTCGTGAAAATGCCGTTG (SEQ ID NO:4)

LrNuc2r: GTGCCCCTGTCA TTTCAACT (SEQ ID NO:5)

Cặp mồi 3 (kích thước sản phẩm 232 bp)

LrNuc3f: AGCTTTACCAAATTGACCCTGA (SEQ ID NO:6)

LrNuc3r: TTGATATTAGGCGCATCCTTTT (SEQ ID NO:7)

Trình tự

Gen mã hóa 5'-nucleotidaza được neo ở bề mặt tế bào, số nộp lưu ngân hàng gen: AEI56270.1, protein domain neo ở thành tế bào motif LPXTG [*Lactobacillus reuteri* SD2112] (SEQ ID NO:8)

ATGAAGAATAATAGTTCAAAATATTGTTTATTGTTAGGGACAGCGCTGTTAG
GACTATATTTCCAAGCTAATAGTGTTTCATGCGGATGCGACTGGTATCACAGC
TAATGGAGAACTACCCATAGCAATGTTACTCCAATGGTTCAGACTAATAAG
GATGAGGCAAGTACACCGCAAACAACACTACTGATTGGTCTGACCCGGCCAAAT
ATCAAAGTGACATTCCAGTTCAGATTTTAGGAATCAATGACTTGCATGGTGG
GTTAGAAACGACTGGATCAGCTACGATTGGAGATAAGACTTATTCGAATGCC
GGAACAGTTGCACGCCTAGCTGGTAACCTTGATGCGGGCGGAGGAAAGTTTAA
AGAACGCTAATCCGACGGGAAGCTCAATTCGGGTAGAAGCCGGAGATATGG
TTGGGGGCTTCTCCAGCAAATTCCTGCTCTTCTCCAAGACGAATCAACCATGCAT
GCTTTAGACGCAATGCATTTTGAAATAGGAACCTTGGGAAACCATGAGTTCG
ATGAAGGTTTAGCTGAGTATATGCGGATTGTTAATGGTGGTGAACCTACTAA
ACAATATAATGAAGCTGAGATGGCCTATCCTCATGTGAAAACAGGGATTAAAT
ATCATTACTGCCAATGTTGTAAATAAATCTGATGGTCAAATCCCATTTGGAAT
GCAACCATACTTGATTAAAGAAATTCATACTAGTGATGGTAAAGTTGCCCGG
ATCGGATTTATTGGGATTGAAACTACTTCCCTACCAATTTTAACTTATACGA
TAATTACAAAGATTATGATGTTTTAGACGAGGCTGAAACAATTGCAAAATAT
GATCAAATTTTACGCAAAAAAAGGTGTTAACGCAATTGTAGTTCTTGCCCAT
CAGGGGTTTCAACTGATAAAGATGGCAGCACTAAAGGTAATGCTGTTGATAT
CATTAAAGAAGCTTTACCAAATTGACCCTGATAATTCTGTGCGACCTTTATATTG
CTGGTCACTCCCACCAATATGCTAATGCTACTGTTGGAAGTGTAATAATTAGT
GCAAGCCATTTACACGGGTAAAGCTTACGATGATATTATCGGTTACATCGAT
CCAACAATAATGATTTTGCGCCCAATAGTCTCGTTTCACATGTCTTTCCGGT
ACTATCTGAAAAGGATGCGCCTAATATCAAAACGGATGCAAATGTTACAGCA
ATTGTTGAAGATGCGAACAACCGAGTAGCACCGATTATTAACAAGAAAATA
GGGGAAGCTGCTACAACAGGCGATATTCTTGGACGACTTCATAATACTCCTA
CTCGTGAAAATGCCGTTGGTGAATTAGTTGTGCGATGGTCAATTATATGCCGCT
CATAAAGTAGGCTTACCAGCTGATTTTGCGATGACTAATACAGGGGGCGTTC
GTGCAGATCTGCATGTTAATCCTGATCGTTCCATTACATGGGGGAGTGCCCA
AGCAGTTCAACCATTTGGTAATATTTTGCGGGTAGTTGAAATGACAGGGGGCA
CAAATCGTTGAAGCCTTGAATCAACAATACGACGAAGATCAAGCTTACTACT
TACAGATTTCCGGGGCTACATTATACTTATACTGACCAAAACGATCCTAACCA
ACCATATAAGGTCGTTCAAGTTTATGACCAACATAATCAACCGCTTGATATG
AATAAGACTTACAATGTTGTTATTAATGACTTTTTAGCAGGTGGCGGAGATG
GCTTTTCTGCATTTAAGGGTACTAAAGTTGTGCGGGATTGTTGGTCAAGATACA
GACGCGTTTATTGACTATATTACTGATATGACTAATGATGGTAAACCAATTA
CTGCGCCAACAATGAACCGTAAGATTTACTTGACTGCTGAACAAGTAGCGAA
GGCTGACTCAGATTCACAGTTACAAACAGGAATAATCAGAACAACCTCAAAA
CGATGCTAATTCACAGACTGAAGGAAATCAGCTTCAAGAAGTTCCGAGCCAA

CCGGTATCTCCAACAGTAACCTTGCCAACAACAGCTGGTCAACCCGCCGAAA
 CTGTTACACTACATGCTCAATCTAAGCAACAAACCGTAGCTGCTAATAATCA
 ATTAATTAATTTGACGCCTACATCAATTAATGGCCAAAAACAAAAAGCAGCT
 GACCAGCAAGCAGCTTTACCACAACTAGTAACGATGAAGATCTTGCATTAC
 TTCTTCTCGGAAGTTCATTAATGGCAGCAACCGGATTGACAATTATTGATCGC
 AAGCGTAAACATGCTTAA

Protein 5'-nucleotidaza được neo ở bề mặt tế bào, số nộp lưu ngân hàng gen: AEI56270.1, protein domain neo ở thành tế bào motif LPXTG [*Lactobacillus reuteri* SD2112] (SEQ ID NO:9)

MKNNSSKYCLLLGTALLGLYFQANSVHADATGITANGETTHSNVTPMVQTNKD
 EASTPQTTTDWSDPAKYQSDIPVQILGINDLHGGLLETTGSATIGDKTYSNAGTVA
 RLAGNLDAAEESFKNANPTGSSIRVEAGDMVGASPANSALLQDESTMHALDAM
 HFEIGTLGNHEFDEGLAEYMRIVNGGEPTKQYNEAEMAYPHVKTGINIITANVV
 NKSDGQIPFGMQPYLIKEIHTSDGKVARIGFIGIETTSLPILTLYDNYKDYDVLDE
 AETIAKYDQILRKKGVNAIVVLAHTGVSTDKDGSTKGNAVDIIKKLYQIDPDNSV
 DLYIAGHSHQYANATVGSVKLVQAIYTGKAYDDIIGYIDPTTNDFAPNLSVSHVF
 PVLSEKDAPNIKTDANVTAIVEDANNRVAPIINKKIGEAATTGDILGRLHNTPTRE
 NAVGELVVDGQLYAAHKVGLPADFAMTNTGGVRADLHVNPDRSITWGSAQAV
 QPFGNILRVVEMTGAQIVEALNQQYDEDQAYYLQISGLHYTYTDQNDPNQPYK
 VVQVYDQHNQPLDMNKTYNVVINDFLAGGGDGFSAFKGTKVVGIVGQDQDAFI
 DYITDMTNDGKPITAPTMNRKIYLTAEQVAKADSDSQLQTGTNQNTQNDANSQ
 TEGNQLQEVPSQPVSPTVTLPTTAGQPAETVTLHAQSKQQTVAANNQLINLTPTS
 INGQKQKAADQQAALPQTSNDEDLALLLLGSSLMAATGLTIIDRKRKHA

VÍ DỤ 2

Quy trình phân tích hoạt tính 5'-nucleotidaza

Kit thử nghiệm 5'-Nucleotidaza hóa tinh thể (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, Mỹ) được sử dụng để xác định hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các tế bào vi khuẩn và các phần nổi lên men. Tóm lại, quy trình là như sau.

Trong hai bước, các chất phản ứng CC1 và CC2 được thêm vào các mẫu chứa vi khuẩn hoặc phần nổi. Chất phản ứng 1 chứa AMP được chuyển hóa thành adenosin bởi enzym 5'-nucleotidaza do vi khuẩn. Adenosin được thủy phân tiếp thành inosin và hypoxanthin bởi các thành phần trong chất phản ứng 1. Trong bước thứ hai, hypoxanthin được chuyển hóa thành axit uric và hydro peroxit, được sử dụng để tạo ra chất nhuộm quinon được đo về mặt động học tại 550 nm trong quang phổ kế. Hoạt tính được xác định bằng cách tính toán sự thay đổi độ hấp thụ giữa 3 và 5 phút và so với giá trị từ mẫu của bộ định chuẩn.

VÍ DỤ 3

Hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các chủng *Lactobacillus reuteri*

Dữ liệu thực nghiệm thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và DSM 32849 cũng như trong *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) vào 30 tháng 01 năm 2006) được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2 ở trên. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

VÍ DỤ 4

Chọn lọc các chủng

Tất cả các chủng mới trong ví dụ 3 ở trên, tức là *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và DSM 32849 cho biết hoạt tính 5'-nucleotidaza trong phần nổi vi khuẩn. Phân tích được thực hiện trên các phần nổi nuôi cấy vi khuẩn với nồng độ 10^9 vi khuẩn trên ml.

Lactobacillus reuteri DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và DSM 32849 được phát triển/cải tiến các đặc tính cải thiện. DSM 32846 và DSM 32847 được tiến hành để cải tiến sẽ chống chịu tốt hơn đối các axit mật và do đó tồn tại với số lượng lớn hơn trong đường GI. DSM 32848 và DSM 32849 được cải tiến để bám tốt hơn vào dịch nhầy, với mục đích gây nhiễm tốt hơn trong đường GI và do đó chức năng tốt hơn theo sáng chế.

Tất cả các chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32848 và DSM 32849 được chọn lọc. Các chủng ưu tiên là DSM 32846, DSM 32847 và DSM 32849.

VÍ DỤ 5

Các tác động các chủng vi khuẩn probiotic lên việc sản xuất melatonin trong mô hình enteroid ruột của người

Tình trạng kỹ thuật

Các enteroid ruột của người (HIE) được dẫn xuất từ các tế bào gốc nang ruột là thích hợp về mặt sinh học trong mô hình biểu mô ruột in vitro. Các HIE chứa tất cả các loại tế bào biểu mô ruột; tuy nhiên, tương tự ruột của người, HIE thường sản xuất tế bào nội tiết ruột (EEC) ở lượng thấp (~1%), điều này hạn chế việc nghiên cứu chúng. Để tăng số lượng EEC trong HIE, chuyển nạp lentivirus được sử dụng để thiết kế ổn định HIE hồng tràng với sự biểu hiện có thể cảm ứng bởi doxyxycyclin của neurogenin-3 (NGN3), yếu tố phiên mã điều khiển quá trình biệt hóa EEC (tetNGN3- HIEs). Ở dòng tế bào được thiết kế di truyền lượng tế bào nội tiết ruột có mặt trong mô nuôi cấy tăng từ $\leq 1\%$ đến ~40%.

Vật liệu và các phương pháp

Enteroid ruột của người

Các mô nuôi cấy HIE được tạo ra từ các nang được phân lập với các mô hồng tràng của các bệnh nhân trưởng thành trải qua phẫu thuật giảm cân. Các mô nuôi cấy được thiết lập thu được tại Đại học Y khoa Baylor thông qua Trung tâm Y tế Texas Thiết kế Nghiên cứu Các bệnh Tiêu hóa và Nghiên cứu Lâm sàng Cốt lõi. Các mô nuôi cấy HIE ba chiều được điều chế từ các mẫu mô và được duy trì trong mô nuôi cấy. Để tăng số lượng EEC trong HIE, chuyển nạp qua lentivirus được sử dụng để thiết kế ổn định HIE hồng tràng với sự biểu hiện cảm ứng được bởi doxyxycyclin của neurogenin-3 (NGN3), yếu tố phiên mã điều khiển quá trình biệt hóa EEC (tetNGN3- HIEs). Ở dòng tế bào được thiết kế di truyền này, số lượng tế bào nội tiết ruột có mặt trong mô nuôi cấy tăng từ $\leq 1\%$ đến ~40%. Tất cả enteroid được nhân giống và được biệt hóa ở dạng đơn lớp trong đĩa 96 giếng theo các phương thức chuẩn. Nhiều thông tin về dòng enteroid này, được nuôi cấy như thế nào và phương pháp chung cho thử nghiệm được mô tả trong Chang-Graham *et al* (Chang-Graham *et al.*, Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2019, S2352-345X(19)30049-9, ấn bản, có bản trực tuyến).

Các chủng vi khuẩn và các dạng điều chế

Trong thí nghiệm này hai chủng *Lactobacillus reuteri* khác nhau (DSM 17938 và DSM 32846) được nghiên cứu về khả năng tăng sản xuất melatonin trong đường ruột.

Môi trường được điều chỉnh (phần nổi) từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 và *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 được nuôi trong môi trường xác định Lactobacillus 4

(LDM4) cho đến khi chúng đạt được pha ổn định được sử dụng trong nghiên cứu này, xem chi tiết hơn dưới đây.

Một lạc khuẩn của chủng vi khuẩn được lấy từ đĩa thạch MRS và được sử dụng để cấy vào 10 mL canh trường MRS và được ủ trong ống nón kín trong bể nước 37°C. Sau tám giờ thực hiện pha loãng 1:10 dịch nuôi cấy và đo mật độ quang tại bước sóng 600 nm bằng quang phổ kế, sau đó 25 mL LDM4 được làm ấm trước được cấy ở OD ban đầu là 0,1, (tính toán dưới đây) và được đặt vào bể nước để ủ trong 16 giờ.

$$\circ \text{OD} = 0,307. \text{ Dịch pha loãng } 1:10 = \text{OD } 3,07$$

$$25\text{mL} * (0,1 \text{ OD}) = 3,07x \quad x = 0,814 \text{ mL}$$

$$\circ 814 \text{ uL được kết hợp với } 24,19 \text{ mL LDM4}$$

Sau 16 giờ mẻ nuôi cấy được lấy ra. OD cuối cùng là 2,6. Các tế bào được tạo viên vón bằng cách ly tâm 4700 vòng/phút và phần nổi được chuyển vào ống nón 50 mL mới. Phần nổi được bảo quản ở nhiệt độ -20°C qua đêm.

Các hóa chất sử dụng

AMP = Adenosin 5'-monophosphat, 99% (Acros Organics) Mã: 102790259, Lot: A0395274.

10 mL dung dịch gốc (dung dịch gốc 2 mM = 6.9 mg/ml (FW=347.224)) được tạo trong nước MiliQ và được tiệt trùng bằng cách lọc thông qua bộ lọc 0,22 µm.

Thiết lập thử nghiệm:

Các điều trị đối chứng trên các enteroid được cảm ứng:

- LDM4 (môi trường nuôi cấy),
- LDM4 + 20 µM AMP,
- LDM4 + 200 µM AMP

Các điều trị thử nghiệm của phần nổi DSM 32846 và DSM 17938 trên các enteroid được cảm ứng:

- phần nổi DSM 32846 riêng
- phần nổi DSM 32846 + 20 µM AMP

- phần nổi DSM 32846 + 200 μ M AMP
- phần nổi DSM 17938 riêng
- phần nổi DSM 17938 + 20 μ M AMP
- phần nổi DSM 17938 + 200 μ M AMP

Trước khi phần nổi hoặc các chất bổ sung khác sẵn sàng dùng cho các enteroid, pH được trung hòa và phần nổi được tiệt trùng bằng cách lọc. pH được điều chỉnh đến 7,0 bằng cách sử dụng 10 – 30 μ L của 10M dung dịch natri hydroxit và pH được đo bằng cách phết 2 μ L của phần nổi lên trên giấy pH (Fisher Brand – Cat. 13-640-510 khoảng 6,0 – 8,0). Phần nổi được tiệt trùng bằng cách lọc bằng cách sử dụng bộ lọc 0,22 μ M (Thermo Scientific Nalgene Rapid Flow bộ lọc 0,22 μ M Mã: 00158]

100 μ L (tổng thể tích) điều trị được đặt vào các enteroid. Quá trình ủ là 1 giờ trên các enteroid ở nhiệt độ 37°C, máy ủ nuôi cấy mô 5% CO₂. Sau khi ủ, phần nổi được loại bỏ và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến phân tích tiếp theo.

Melatonin được phát hiện bằng ELISA (Eagle Biosciences Inc, Amherst, NH, Mỹ). Bước duy nhất được thực hiện trước khi tiến hành theo phương thức chuẩn là phần nổi được rã đông, và cho phép đạt đến nhiệt độ phòng. (khoảng 20 – 21 độ C).

Kết quả:

Các enteroid ruột của người (HIE) là thích hợp về mặt sinh học làm mô hình biểu mô ruột in vitro. Như được thể hiện trên Fig.4, DSM 32846 riêng rẽ không có tác dụng đáng kể, nhưng khi được bổ sung AMP nó thể hiện tác dụng rõ rệt lên việc sản xuất melatonin của các HIE. Nồng độ cao hơn của AMP dẫn đến mức sản xuất melatonin thậm chí cao hơn. DSM 17938 có sự tăng sản xuất melatonin so với đối chứng nhưng thấp hơn DSM 32846. Do đó, DSM 32846 là chủng ứng viên tốt để sử dụng trong sản xuất melatonin trong đường ruột.

VÍ DỤ 6

Hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các chủng *Lactobacillus reuteri*

Dữ liệu thử nghiệm thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong *Lactobacillus reuteri* DSM 33198 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong ví dụ 2 ở trên. Các kết quả được thể hiện trên Fig.5A trong đó các kết quả này được chuẩn hóa liên hệ với hoạt tính 5'-nucleotidaza của DSM17938 (hoạt tính DSM17938 =1) từ cùng thử nghiệm. Cùng loại chuẩn hóa liên hệ với hoạt tính 5'-nucleotidaza của DSM17938 (hoạt tính DSM17938 =1) cũng được thực hiện cho các kết quả từ Fig.3 và được trình bày trên Fig.5B, giúp dễ dàng so sánh sự thay đổi hoạt tính 5'-nucleotidaza ở mức liên hệ với DSM17938 đối với các chủng vi khuẩn khác nhau.

VÍ DỤ 7

Chọn lọc các chủng

Chủng mới trong ví dụ 6 ở trên, tức là *Lactobacillus reuteri* DSM 33198 thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza cao trong phần nổi vi khuẩn. Phân tích được thực hiện trên các phần nổi nuôi cấy vi khuẩn với nồng độ 10^9 vi khuẩn trên ml.

Lactobacillus reuteri DSM 33198 được phát triển đổi các đặc tính cải thiện. Chủng *L. reuteri* DSM 33198 được cải biến theo quy trình chọn lọc nhiều bước bao gồm quy trình sấy lạnh lặp lại cho phép chống chịu tốt hơn và cho khả năng sống sót cao hơn trong quá trình sản xuất so với dạng phân lập tự nhiên của chủng này.

Lactobacillus reuteri DSM 33198 được chọn lọc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* DSM 32846, DSM 32847, DSM 32849 hoặc DSM 33198.
2. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* DSM 32846.
3. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* DSM 32847.
4. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* DSM 32849.
5. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* DSM 33198.
6. Phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất adenosin, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri* và trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) sàng lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có gen mã hóa 5'-nucleotidaza, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri*; và/hoặc

b) sàng lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic, hoặc phần nổi của nó, có enzym 5'-nucleotidaza hoạt động, trong đó chủng này là *Lactobacillus reuteri*; và

c) chọn lọc chủng *Lactobacillus reuteri* sản xuất adenosin ở mức độ tăng so với *Lactobacillus reuteri* DSM 17938; và tùy ý

d) nuôi cấy hoặc nhân giống chủng *Lactobacillus reuteri* này.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chủng vi khuẩn được chọn lọc nhờ:

(i) có hoạt tính 5'-nucleotidaza cao hơn 8 đơn vị/L và/hoặc sản xuất adenosin ở mức cao hơn 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ phút⁻¹; và/hoặc

(ii) tạo ra mức tăng hoạt tính 5'-nucleotidaza và/hoặc mức adenosin lên đến 5 lần, so với các mức này của chủng DSM 17938; hoặc mức tăng hoạt tính 5'-nucleotidaza và/hoặc mức adenosin ít nhất 1,5 lần, tốt hơn là mức tăng ít nhất 2 lần, tốt hơn nữa là mức tăng ít nhất 3, 4 hoặc 5 lần, so với các mức này của chủng DSM 17938.

8. Sản phẩm kết hợp thích hợp để làm tăng sản xuất melatonin hoặc adenosin ở đối tượng, sản phẩm này chứa:

(i) chủng *Lactobacillus reuteri* thứ nhất có khả năng cảm ứng sản xuất melatonin hoặc có khả năng sản xuất adenosin, trong đó chủng này chủng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5; và

(ii) thành phần cơ chất để làm tăng hoặc tăng cường khả năng cảm ứng sản xuất melatonin và/hoặc khả năng sản xuất adenosin của chủng *Lactobacillus reuteri*, trong đó thành phần cơ chất này là AMP.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BIOGAIA AB

<120> Chứng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất melatonin, phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn này

<130> 69.139115/02

<150> GB 1905470.9

<151> 2019-04-17

<150> GB 1812079.0

<151> 2018-07-24

<160> 9

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Motif

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> axit amin bất kỳ

<400> 1

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi LrNuc1f

<400> 2

ggaacttttg gaaaccatga

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi LrNuc1r

<400> 3

cgggcaactt taccatcact

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi LrNuc2f

<400> 4

tactcgtgaa aatgccgttg

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi LrNuc2r

<400> 5

gtgccctgt catttcaact

20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi LrNuc3f

<400> 6

agctttacca aattgaccct ga

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi LrNuc3r

<400> 7

ttgatattag gcgcacctt tt

22

<210> 8

<211> 2259

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri SD112

<400> 8

atgaagaata atagttcaaa atattgttta ttgttaggga cagcgctgtt
aggactatat 60

ttccaagcta atagtgttca tgcggatgcg actggtatca cagctaattg
agaaactacc 120

catagcaatg ttactccaat ggttcagact aataaggatg aggcaagtac
accgcaaaca 180

actactgatt ggtctgacct ggccaaatat caaagtgaca ttccagtcca
gatttttagga 240

atcaatgact tgcattggtg gttagaaacg actggatcag ctacgattgg
agataagact 300

tattcgaatg ccggaacagt tgcacgccta gctggtaacc ttgatgcggc
ggaggaaaagt 360

tttaagaacg ctaatccgac gggaagctca attcgggtag aagccggaga
tatggttggg 420

gcttctccag caaattctgc tcttctccaa gacgaatcaa ccatgcatgc
ttagacgca 480

atgcattttg aaataggaac tttgggaaac catgagttcg atgaaggttt
agctgagtat 540

atgcggattg ttaatgggtg tgaacctact aaacaatata atgaagctga
gatggcctat 600

cctcatgtga aaacagggat taatatcatt actgccaatg ttgtaaataa
atctgatggt 660

caaatcccat ttggaatgca accatacttg attaaagaaa ttcatactag
tgatggtaaa 720

gttgcccgga tcggatttat tgggattgaa actacttccc taccaatttt
aaccttatac 780

gataattaca aagattatga tgtttttagac gaggctgaaa caattgcaaa
atatgatcaa 840

atttttacgca aaaaagggtg taacgcaatt gtagttcttg cccatacagg
ggttttcaact 900

gataaagatg gcagcactaa aggtaatgct gttgatatca ttaagaagct
ttaccaaatt 960

gaccctgata attctgtcga cctttatatt gctggtcact cccaccaata
tgctaattgct 1020

actggttgaa gtgtaaaatt agtgcaagcc atttacacgg gtaaagctta
cgatgatatt 1080

atcggttaca tcgatccaac aactaatgat ttgcgccca atagtctcgt
ttcacatgtc 1140

tttccggtac tatctgaaaa ggatgcgcct aatatcaaaa cggatgcaaa
tgttacagca 1200

attggtgaag atgcgaacaa ccgagtagca ccgattatta acaagaaaat
aggggaagct 1260

gctacaacag gcgatattct tggacgactt cataatactc ctactcgtga
aatgccgtt 1320

ggatgaattag ttgtcgatgg tcaattatat gccgctcata aagtaggctt
accagctgat 1380

tttgcgatga ctaatacagg gggcgctcgt gcagatctgc atgttaatcc
tgategttcc 1440

attacatggg ggagtgccca agcagttcaa ccatttggtg atattttgcg
gtagttgaa 1500

atgacagggg cacaaatcgt tgaagccttg aatcaacaat acgacgaaga
tcaagcttac 1560

tacttacaga tttccggggt acattatact tatactgacc aaaacgatcc
taaccaacca 1620

tataaggctg ttcaagttta tgaccaacat aatcaaaccgc ttgatatgaa
taagacttac 1680

aatgttggtt ttaatgactt tttagcaggt ggcggagatg gcttttctgc
atttaagggt 1740

actaaagttg tcgggattgt tggatcaagat acagacgcgt ttattgacta
tattactgat 1800

atgactaatg atggtaaacc aattactgcg ccaacaatga accgtaagat
ttacttgact 1860

gctgaacaag tagcgaaggc tgactcagat tcacagttac aaacaggaac
taatcagaac 1920

actcaaaacg atgctaattc ccagactgaa ggaaatcagc ttcaagaagt
tccgagccaa 1980

ccggtatctc caacagtaac cttgccaaac acagctgggc aaccgcgcga
aactgttaca 2040

ctacatgctc aatctaagca acaaacctga gctgctaata atcaattaat

taatttgacg 2100

cctacatcaa ttaatggcca aaaacaaaaa gcagctgacc agcaagcagc
tttaccacaa 2160

actagtaacg atgaagatct tgcattactt cttctcggaa gttcattaat
ggcagcaacc 2220

ggattgacaa ttattgatcg caagcgtaaa catgcttaa 2259

<210> 9

<211> 752

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri SD112

<400> 9

Met Lys Asn Asn Ser Ser Lys Tyr Cys Leu Leu Leu Gly Thr Ala Leu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Tyr Phe Gln Ala Asn Ser Val His Ala Asp Ala Thr Gly
20 25 30

Ile Thr Ala Asn Gly Glu Thr Thr His Ser Asn Val Thr Pro Met Val
35 40 45

Gln Thr Asn Lys Asp Glu Ala Ser Thr Pro Gln Thr Thr Thr Asp Trp
50 55 60

Ser Asp Pro Ala Lys Tyr Gln Ser Asp Ile Pro Val Gln Ile Leu Gly
65 70 75 80

Ile Asn Asp Leu His Gly Gly Leu Glu Thr Thr Gly Ser Ala Thr Ile
85 90 95

Gly Asp Lys Thr Tyr Ser Asn Ala Gly Thr Val Ala Arg Leu Ala Gly
100 105 110

Asn Leu Asp Ala Ala Glu Glu Ser Phe Lys Asn Ala Asn Pro Thr Gly
115 120 125

Ser Ser Ile Arg Val Glu Ala Gly Asp Met Val Gly Ala Ser Pro Ala
130 135 140

Asn Ser Ala Leu Leu Gln Asp Glu Ser Thr Met His Ala Leu Asp Ala
145 150 155 160

Met His Phe Glu Ile Gly Thr Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Glu Tyr Met Arg Ile Val Asn Gly Gly Glu Pro Thr Lys Gln
180 185 190

Tyr Asn Glu Ala Glu Met Ala Tyr Pro His Val Lys Thr Gly Ile Asn
 195 200 205
 Ile Ile Thr Ala Asn Val Val Asn Lys Ser Asp Gly Gln Ile Pro Phe
 210 215 220
 Gly Met Gln Pro Tyr Leu Ile Lys Glu Ile His Thr Ser Asp Gly Lys
 225 230 235 240
 Val Ala Arg Ile Gly Phe Ile Gly Ile Glu Thr Thr Ser Leu Pro Ile
 245 250 255
 Leu Thr Leu Tyr Asp Asn Tyr Lys Asp Tyr Asp Val Leu Asp Glu Ala
 260 265 270
 Glu Thr Ile Ala Lys Tyr Asp Gln Ile Leu Arg Lys Lys Gly Val Asn
 275 280 285
 Ala Ile Val Val Leu Ala His Thr Gly Val Ser Thr Asp Lys Asp Gly
 290 295 300
 Ser Thr Lys Gly Asn Ala Val Asp Ile Ile Lys Lys Leu Tyr Gln Ile
 305 310 315 320
 Asp Pro Asp Asn Ser Val Asp Leu Tyr Ile Ala Gly His Ser His Gln
 325 330 335
 Tyr Ala Asn Ala Thr Val Gly Ser Val Lys Leu Val Gln Ala Ile Tyr
 340 345 350
 Thr Gly Lys Ala Tyr Asp Asp Ile Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Thr Thr
 355 360 365
 Asn Asp Phe Ala Pro Asn Ser Leu Val Ser His Val Phe Pro Val Leu
 370 375 380
 Ser Glu Lys Asp Ala Pro Asn Ile Lys Thr Asp Ala Asn Val Thr Ala
 385 390 395 400
 Ile Val Glu Asp Ala Asn Asn Arg Val Ala Pro Ile Ile Asn Lys Lys
 405 410 415
 Ile Gly Glu Ala Ala Thr Thr Gly Asp Ile Leu Gly Arg Leu His Asn
 420 425 430
 Thr Pro Thr Arg Glu Asn Ala Val Gly Glu Leu Val Val Asp Gly Gln
 435 440 445
 Leu Tyr Ala Ala His Lys Val Gly Leu Pro Ala Asp Phe Ala Met Thr
 450 455 460
 Asn Thr Gly Gly Val Arg Ala Asp Leu His Val Asn Pro Asp Arg Ser
 465 470 475 480

Ile Thr Trp Gly Ser Ala Gln Ala Val Gln Pro Phe Gly Asn Ile Leu
485 490 495

Arg Val Val Glu Met Thr Gly Ala Gln Ile Val Glu Ala Leu Asn Gln
500 505 510

Gln Tyr Asp Glu Asp Gln Ala Tyr Tyr Leu Gln Ile Ser Gly Leu His
515 520 525

Tyr Thr Tyr Thr Asp Gln Asn Asp Pro Asn Gln Pro Tyr Lys Val Val
530 535 540

Gln Val Tyr Asp Gln His Asn Gln Pro Leu Asp Met Asn Lys Thr Tyr
545 550 555 560

Asn Val Val Ile Asn Asp Phe Leu Ala Gly Gly Gly Asp Gly Phe Ser
565 570 575

Ala Phe Lys Gly Thr Lys Val Val Gly Ile Val Gly Gln Asp Thr Asp
580 585 590

Ala Phe Ile Asp Tyr Ile Thr Asp Met Thr Asn Asp Gly Lys Pro Ile
595 600 605

Thr Ala Pro Thr Met Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Thr Ala Glu Gln Val
610 615 620

Ala Lys Ala Asp Ser Asp Ser Gln Leu Gln Thr Gly Thr Asn Gln Asn
625 630 635 640

Thr Gln Asn Asp Ala Asn Ser Gln Thr Glu Gly Asn Gln Leu Gln Glu
645 650 655

Val Pro Ser Gln Pro Val Ser Pro Thr Val Thr Leu Pro Thr Thr Ala
660 665 670

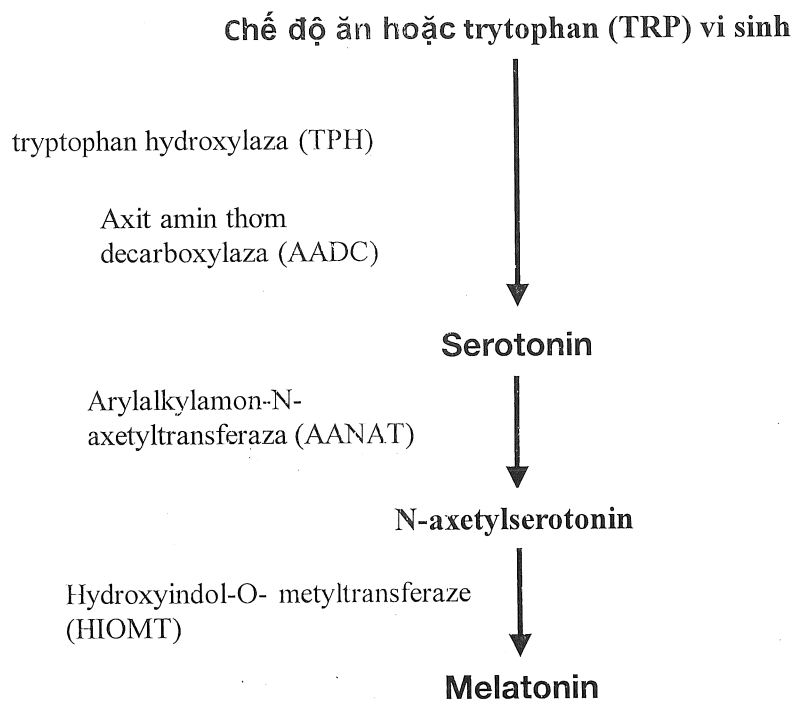
Gly Gln Pro Ala Glu Thr Val Thr Leu His Ala Gln Ser Lys Gln Gln
675 680 685

Thr Val Ala Ala Asn Asn Gln Leu Ile Asn Leu Thr Pro Thr Ser Ile
690 695 700

Asn Gly Gln Lys Gln Lys Ala Ala Asp Gln Gln Ala Ala Leu Pro Gln
705 710 715 720

Thr Ser Asn Asp Glu Asp Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ser Leu
725 730 735

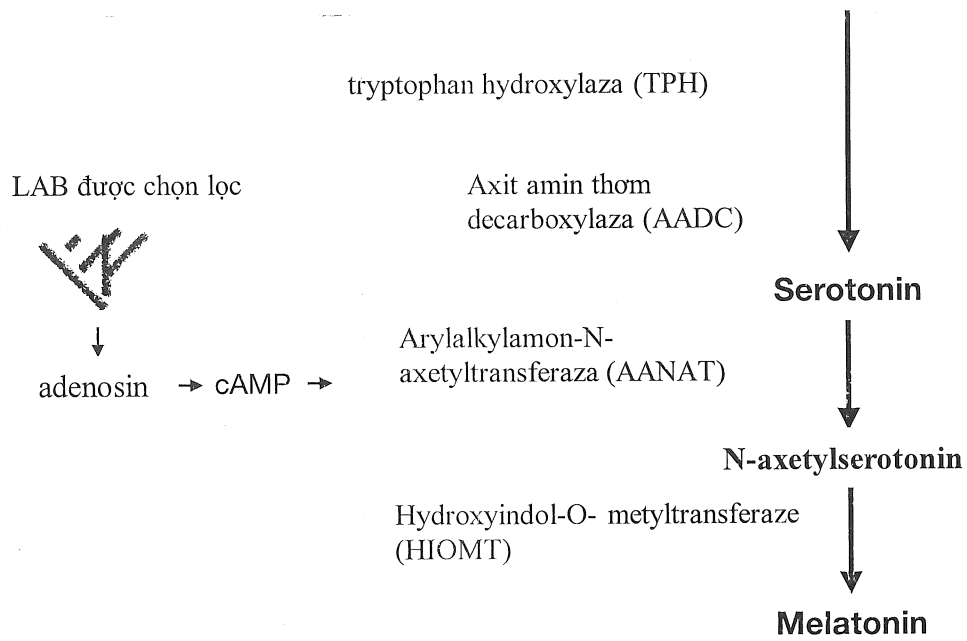
Met Ala Ala Thr Gly Leu Thr Ile Ile Asp Arg Lys Arg Lys His Ala
740 745 750



Tốc độ hình thành melatonin phụ thuộc vào hoạt động của enzym ANNAT và TPH ở mức độ ít hơn

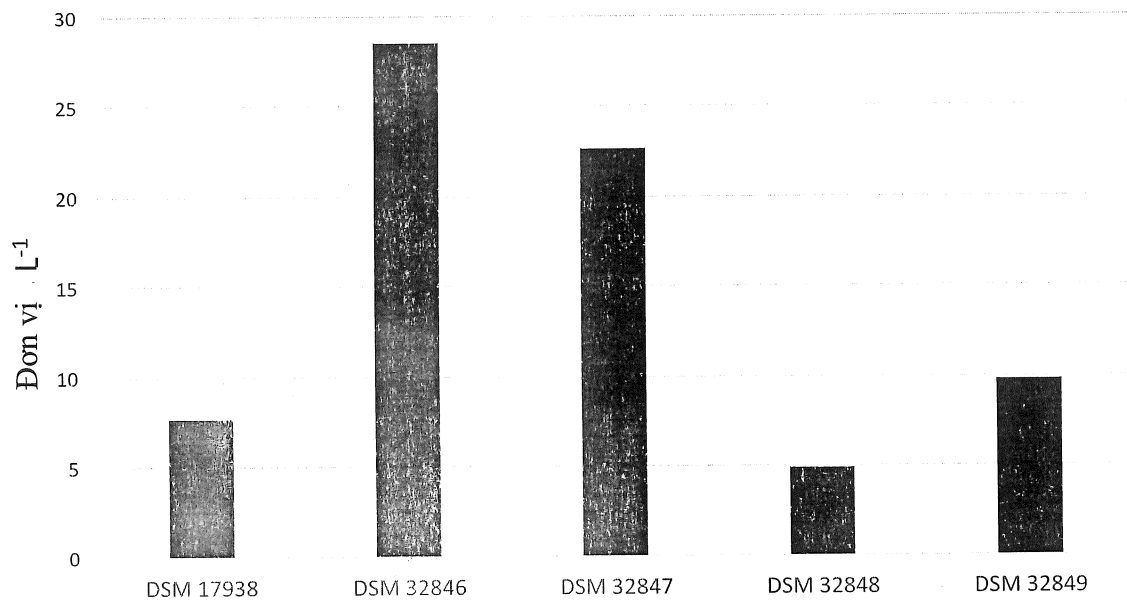
Fig. 1

Chế độ ăn hoặc tryptophan (TRP) vi sinh



Adenosin làm tăng mức cAMP nội bào thông qua thụ thể adenosin, làm tăng sản xuất AANAT, enzyme giới hạn tốc độ tổng hợp melatonin

Fig. 2



Hoạt tính 5'-nucleotidaza. Phân tích các phần nổi nuôi cấy vi khuẩn có nồng độ 10 mũ 9 vi khuẩn trên mỗi ml

Fig. 3

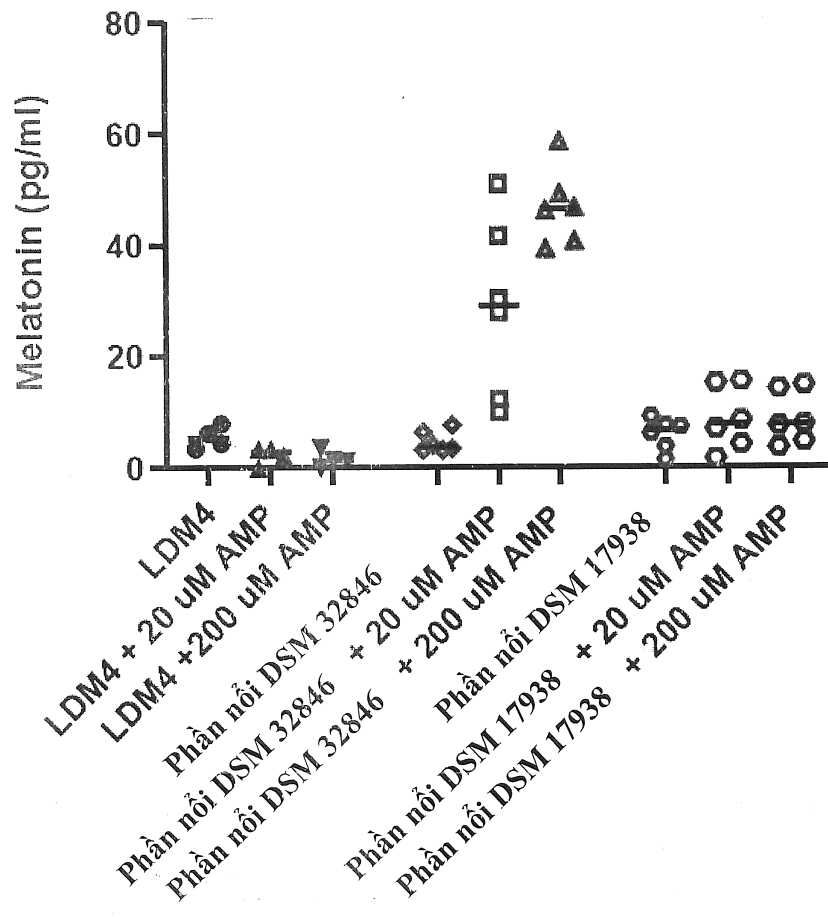
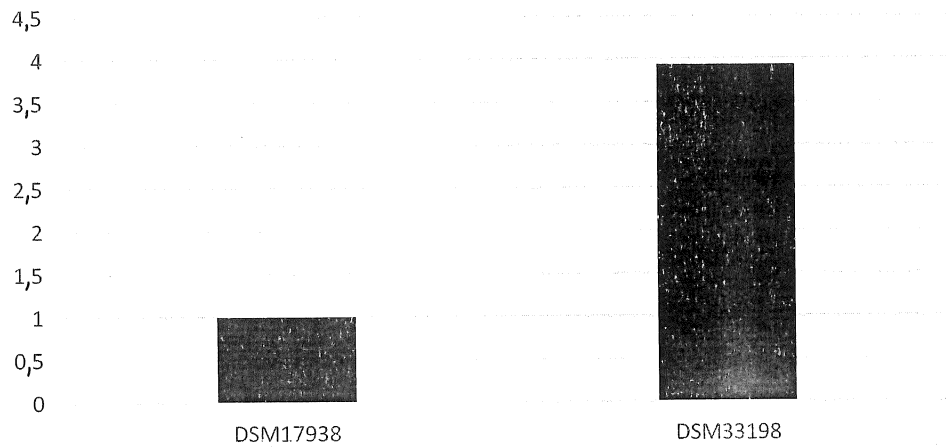


Fig. 4

Hoạt tính 5'Nucleotidaza



Hoạt tính 5'Nucleotidaza

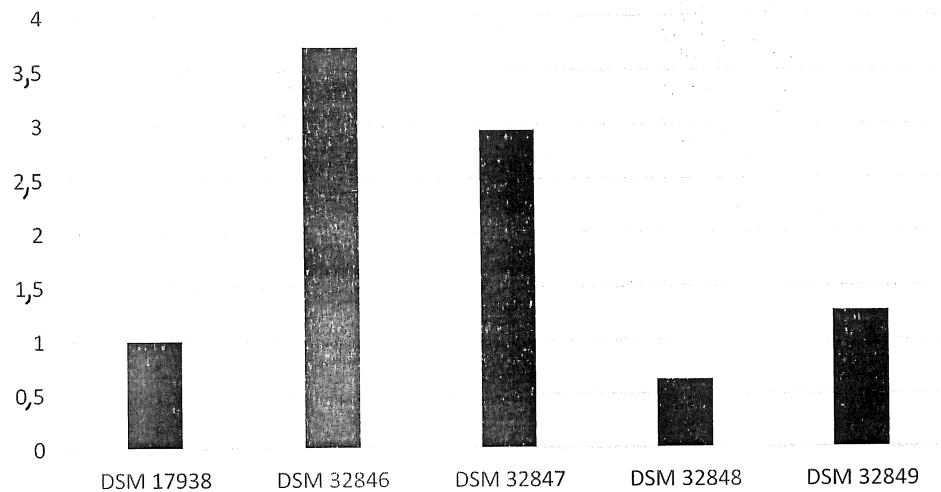


Fig. 5