



(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)



1-0044350

(51)^{2020.01} C12N 1/20; A61K 35/747; A61P 1/00; (13) B
C12R 1/225; A61P 37/08; A23L 33/135;
A61P 29/00

(21) 1-2020-07112

(22) 09/05/2019

(86) PCT/KR2019/005553 09/05/2019

(87) WO2019/216662 14/11/2019

(30) 10-2018-0053279 09/05/2018 KR

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/05/2021 398A

(71) KoBioLabs, Inc. (KR)

220-745-1, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Republic of Korea

(72) KO, Gwang Pyo (KR); KIM, Woonki (KR); JANG, You-Jin (KR); SEO, Boram (KR); LEE, June-Chul (KR); NAM, Tae-Wook (KR); KIM, Insu (KR); LEE, Jin-Woo (KR).

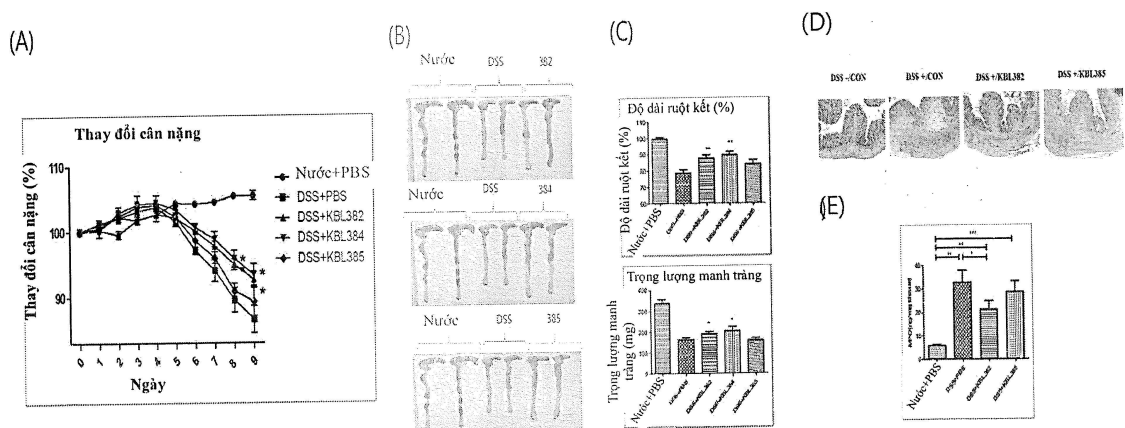
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

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

(21) 1-2020-07112

(57) Sáng chế đề cập tới chủng probiotic thu được từ người mới, là *Lactobacillus paracasei* KBL382, *Lactobacillus paracasei* KBL384, hoặc *Lactobacillus paracasei* KBL385. Chủng theo sáng chế có chức năng chống viêm và điều biến miễn dịch vượt trội, có tác dụng củng cố rất tốt đối với kết nối thành đường ruột, ngăn chặn giảm cân do viêm ruột và giảm độ dài ruột kết, nhờ đó có tác dụng trị liệu cho bệnh viêm ruột, và giảm nhẹ đáng kể triệu chứng của bệnh viêm da dị ứng. Do đó, chủng này có thể hữu ích làm nguyên liệu probiotic để tăng cường tác dụng chống viêm, tăng cường miễn dịch, cải thiện chức năng sức khỏe đường ruột, và giảm nhẹ bệnh dị ứng.

FIG. 4



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới chủng của *Lactobacillus paracasei* và sử dụng chúng. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập tới thực phẩm chức năng để giảm nhẹ triệu chứng dị ứng, cải thiện điều biến miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng viêm, giảm nhẹ bệnh viêm da dị ứng (viêm da cơ địa), và cải thiện sức khoẻ đường ruột; và dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh dị ứng, bệnh tự miễn, bệnh viêm, bệnh viêm da dị ứng và/hoặc bệnh đường ruột, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385, tế bào vi khuẩn của chủng này, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Probiotic chỉ vi sinh vật và sản phẩm thu được từ nó có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzym để hỗ trợ cân bằng vi sinh vật đường ruột. Ngoài ra, probiotic còn được định nghĩa là vi khuẩn sống ở dạng đơn chủng hoặc đa chủng để cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột khi được cung cấp cho người hoặc động vật ở dạng tế bào khô hoặc sản phẩm lên men. Probiotic cần phải cư ngụ ở ruột của người, là không gây bệnh và không độc, và sống đủ kéo dài cho đến khi đến được ruột. Hơn nữa, probiotic cần phải duy trì khả năng sống và hoạt tính cho đến khi chúng được tiêu thụ trong thực phẩm được chuyển vận, là nhạy cảm với kháng sinh được sử dụng để ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng, và không có plasmid kháng kháng sinh. Probiotic cũng cần phải có tính kháng axit, enzym, và dịch mật trong môi trường đường ruột.

Probiotic có thể bao gồm, ví dụ, *Bacillus sp.* có khả năng vượt trội để sản xuất

enzym tiêu hoá như amylaza, proteaza, lipaza, xenlulaza, và phosphataza, *Lactobacillus sp.* sản xuất axit lactic, và vi khuẩn quang hợp để ngăn ngừa mùi hôi bằng cách sử dụng các chất gây mùi hôi (như amoniac, hydro sulfua, và amin) có ở trong phân của gia súc trong quá trình chuyển hoá.

Cụ thể là, *Bacillus sp.* và *Lactobacillus sp.* là đã biết như probiotic rất hữu ích do chúng bao gồm chủng mà sản xuất nhiều loại chất kháng khuẩn. Vi khuẩn axit lactic này sản xuất peptit kháng khuẩn gọi là Bacteriocin, chất này có cơ chế kháng khuẩn mà không liên quan đến cơ chế kháng kháng sinh. Bacteriocin có đặc tính đa hình nên phân tử lượng, tính chất hoá sinh và khoảng kháng khuẩn và cơ chế của chúng đối với vật chủ khác nhau đáng kể. Klaenhammer định nghĩa bacteriocin là protein hoặc phức hợp protein mà có hoạt tính kháng khuẩn trực tiếp đối với các loài gần gũi với vi khuẩn sản xuất bacteriocin.

Đồng thời, hội chứng ruột kích thích (IBS) có triệu chứng đặc trưng bởi đau bụng và/hoặc kích ứng kèm theo thay đổi nhu động ruột hoặc thói quen của ruột, triệu chứng này không thể giải thích được bằng bất thường về giải phẫu hoặc sinh hoá. Triệu chứng hay gặp của IBS còn bao gồm mất đi, trướng bụng và cảm giác nhu động ruột không đầy đủ. Do đó, IBS có thể phân loại là rối loạn dạ dày-ruột chức năng bao gồm tình trạng bệnh như trướng bụng chức năng, đau tức ngực không phải do tim, chứng khó tiêu không viêm loét, và táo bón mạn tính hoặc tiêu chảy. Cụ thể là, trong trường hợp của IBS, do triệu chứng liên quan ảnh hưởng đến thể trạng khoẻ mạnh và hoạt động bình thường của bệnh nhân, bệnh này có tác động to lớn lên tỷ lệ bệnh tật và chất lượng cuộc sống, ngoài đau bụng và khó chịu ở bụng.

Bệnh viêm ruột (IBD) là tình trạng bệnh trong đó viêm mạn tính bất thường ở ruột lặp đi lặp lại và tái phát, bao gồm tất cả bệnh viêm ruột, như bệnh Crohn, viêm loét ruột kết, hoặc bệnh Behcet, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trong lĩnh vực phát triển thuốc điều trị IBS và IBD. Về khía cạnh này, nhiều chất chống trầm cảm hay được sử dụng, mặc dù hiệu lực của

chúng trên thử nghiệm lâm sàng là ở mức vừa phải và tính ứng dụng trên lâm sàng của chúng bị hạn chế do tác dụng phụ đáng kể. Thuốc hệ serotonergic cũng đã được chứng tỏ có hiệu quả đối với triệu chứng IBS tổng thể. Tuy nhiên, ứng dụng của thuốc này bị giới hạn theo nhiều cách do một vài vấn đề về tính an toàn mới phát hiện. Do đó, có nhu cầu phát triển chất trị liệu mới cho IBS.

Đồng thời, dị ứng là một hiện tượng sinh hoá thể hiện đáp ứng độc nhất bị biến đổi với chất lạ (kháng nguyên, dị ứng nguyên). Chất lạ mà gây ra triệu chứng được gọi là dị ứng nguyên, trong khi bệnh của triệu chứng đó gọi là bệnh dị ứng. Dị ứng là quá trình bệnh lý ở cơ thể sống do phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Nói chung, có 4 typ dị ứng tùy thuộc vào thời gian khởi mào phản ứng và sự tham gia của bổ thể. Typ 1, trong số 4 typ này, là typ sốc phản vệ (typ tức thì) trong đó cơ quan đích chủ yếu là cơ quan tiêu hoá, da và phổi, và triệu chứng hay gặp bao gồm dị ứng dạ dày ruột, chứng mày đay, viêm da cơ địa, viêm mũi dị ứng, và bệnh hen phế quản, v.v. Cơ chế bệnh học của Typ 1 đã biết như sau: khi kháng nguyên tiếp xúc kháng thể IgE gắn với bề mặt tế bào mast và bạch cầu ưa bazơ, tế bào đích được hoạt hoá để bài tiết các chất dẫn truyền hoá học như histamin, leukotrien, và PAF, và khi đó mạch máu và cơ trơn co lại. Cơ chế này thường kết hợp với Typ 4 (typ trễ). Nói cách khác, phản ứng sốc phản vệ và phản ứng dị ứng có thể phát sinh do thay đổi khác nhau ở tế bào mast, v.v. Hoạt hoá tế bào mast, dẫn đến khử hạt, là gây ra bởi gắn kết của kháng nguyên, kháng IgE, lectin, v.v. với thụ thể Fc, kích thích độc tố phản vệ, v.v., hoặc thuốc khác như thể mang ion canxi, hợp chất 48/80, codein và hormon hướng vỏ thượng thận tổng hợp.

Tế bào mast và bạch cầu ưa bazơ trong máu đã biết là tế bào chính trong cơ thể gây ra nhiều bệnh dị ứng như viêm mũi dị ứng, viêm da dị ứng, bệnh hen (suyễn), dị ứng thức ăn và chứng sốc phản vệ. Các tế bào này có thụ thể (FcRI) đối với IgE trên bề mặt của chúng mà là kháng thể gây dị ứng, và tế bào này bị kích thích bởi chất gây dị ứng (kháng nguyên, dị ứng nguyên) để bài tiết nhiều loại chất gây dị ứng của

riêng chúng ra khỏi tế bào (Kim K et al, Eur J Pharmacol, 581:191-203, 2008).

Trong số các bệnh dị ứng, bệnh viêm da dị ứng, như được biết đến rộng rãi là bệnh ngoài da tái phát mạn tính có tác động đến trẻ mới sinh hoặc trẻ nhỏ và có thể bị dai dẳng cho đến khi trưởng thành. Tương tự như bệnh hen (suyễn) hoặc viêm mũi dị ứng, bệnh viêm da dị ứng là bệnh viêm da kèm theo thâm nhiễm tế bào lympho T mà sản xuất IL-4 và IL-5. IL-4 kiểm soát sự phát triển của kiểu hình tế bào T hỗ trợ 2 (Th2), dẫn đến sản xuất quá mức globulin miễn dịch (Ig) và bạch cầu ưa eosin, và gia tăng nồng độ IgE huyết thanh. 80-90% đối tượng dương tính với xét nghiệm trên da liên quan đến dị ứng nguyên thức ăn và chất hít phải được xác định là mắc bệnh viêm da dị ứng.

Có cách điều trị khác nhau để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh dị ứng bao gồm bệnh viêm da dị ứng, nhưng chưa tìm thấy cách điều trị hiệu quả. Một vài cách điều trị dựa trên thuốc là đã biết, nhưng ngay cả sử dụng thuốc điều trị trong thời gian ngắn cũng sẽ phát triển tính dung nạp và sử dụng kéo dài có thể gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng, và do đó cách điều trị dựa trên thuốc cho bệnh dị ứng gần đây đã bị tránh dùng. Trong tình huống này, việc không có cách điều trị mà có tác dụng rõ ràng tuyệt đối, triệu chứng kích ứng như ngứa và đỏ da ngoài dị ứng thường không cải thiện được.

WO 96/29083 và EP 554418 đề cập hai typ chủng *Lactobacillus* mà tạo thành khuẩn lạc ở ruột, nghĩa là, *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 6595) và *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* 271 (DSM 6594), v.v.. EP 415941 đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm dinh dưỡng, bao gồm xử lý cháo yến mạch bằng enzym trước khi phối trộn với lactobacilli. Patent Mỹ số 7195906 đề cập đến chủng *Bifidobacterium* được phân lập từ đường dạ dày ruột được cắt và rửa để điều trị bệnh viêm, đặc biệt là viêm dạ dày ruột như IBD và IBS.

Tuy nhiên, chưa tìm thấy chủng nào có tác dụng tốt để cải thiện sức khỏe đường ruột, ví dụ, điều trị IBD và IBS, và giảm nhẹ triệu chứng dị ứng và để tìm kiếm chủng có tác dụng như thế, nhiều viện nghiên cứu đang tiến hành nghiên cứu.

Trong tình huống này, các tác giả sáng chế đã sàng lọc một loạt các chủng dựa trên thực tế là tác dụng cải thiện sức khỏe của probiotic không phải là tính chất chung của giống và loài mà là đặc hiệu chủng (Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada, 2002), và nhận dạng chủng mới có tác dụng vượt trội để điều hoà miễn dịch, hoạt tính chống viêm, giảm nhẹ dị ứng, cải thiện sức khỏe đường ruột và điều trị bệnh đường ruột. Do đó sáng chế được hoàn thành bằng cách xác nhận các tác dụng ưu việt của chủng này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng mới hữu ích để cải thiện sức khỏe đường ruột, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh đường ruột, cải thiện điều biến (điều hòa) miễn dịch, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn, giảm nhẹ triệu chứng dị ứng, giảm nhẹ triệu chứng viêm, giảm nhẹ và điều trị bệnh viêm da dị ứng.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập (số hiệu lưu giữ) KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP).

Sáng chế còn đề xuất thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh đường ruột, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus*

paracasei KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh dị ứng, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh đường ruột, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh dị ứng, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này .

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh dị ứng, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập

KCTC13510BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh đường ruột.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh dị ứng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 minh hoạ kết quả xác nhận tác dụng kiểm soát xytokin gây viêm bởi chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 của sáng chế ở PBMC.

FIG. 2 minh hoạ kết quả xác nhận tác dụng kiểm soát biểu hiện gen của chất đánh dấu biệt hoá tế bào T bởi chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 của sáng chế ở PBMC.

FIG. 3 minh hoạ kết quả mức biểu hiện xytokin, (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) IL-4, (D) IL-13, (E) IL-17A và (F) IL-10, khi sử dụng chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 của sáng chế, ở dòng tế bào PBMC mà tế bào T được hoạt hoá bằng

cách bổ sung kháng thể kháng-CD3.

FIG. 4 minh hoạ kết quả xác nhận tác dụng giảm nhẹ bệnh viêm ruột thông qua (A) thay đổi thể trọng, (B) thay đổi độ dài ruột kết, (C) thay đổi độ dài ruột kết và thay đổi trọng lượng manh tràng, (D) nhuộm màu H&E mô ruột kết và (E) thay đổi mức MPO (myeloperoxidaza) trong mô ruột kết sau khi sử dụng lần lượt chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 của sáng chế trên mô hình chuột nhắt đã gây cảm ứng bệnh viêm ruột.

FIG. 5 minh hoạ kết quả nhận thấy tác dụng củng cố dải bịt (vùng bít chặt) của chủng KBL382 và chủng KBL385 của sáng chế thông qua thay đổi mức biểu hiện của gen liên quan đến-dải bịt thành đường ruột, (A) ZO1, (B) Claudin3, và (C) MUC4.

FIG. 6 minh hoạ kết quả so sánh tác dụng (A) phục hồi độ dài ruột kết và (B) cải thiện sụt cân bằng chủng KBL382 của sáng chế và infliximab, kháng thể để điều trị bệnh viêm ruột, có bán trên thị trường, để xác nhận tác dụng giảm nhẹ bệnh viêm ruột bởi chủng KBL382 của sáng chế.

FIG. 7 minh hoạ kết quả nhận thấy (A) chỉ số điểm đánh giá bệnh viêm da, (B) tác dụng giảm ngứa, (C) tác dụng làm giảm độ dày của da và (D) tác dụng làm giảm nồng độ IgE trong máu bằng cách sử dụng chủng KBL382 của sáng chế trên mô hình động vật được gây cảm ứng bệnh viêm da dị ứng, để xác nhận tác dụng làm giảm nhẹ triệu chứng dị ứng của chủng KBL382.

Mô tả chi tiết sáng chế và phương án tốt nhất để thực hiện sáng chế

Trừ khi có quy định khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật, khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Nói chung, danh pháp được sử dụng trong bản mô tả này là đã biết trong lĩnh vực này và thường được sử dụng.

Sáng chế xác nhận tác dụng điều hoà miễn dịch của vi sinh vật thu được từ cơ thể người, và xác định được là chủng *Lactobacillus paracasei* có tác dụng điều hoà

miễn dịch rất tốt, nghĩa là, KBL382 (Số truy cập (số hiệu lưu giữ) KCTC13509BP), KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP) và chủng KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP). Phân tích ADN ribosom 16S của chủng này chứng tỏ chủng này là chủng mới chưa được biết đến.

Theo một phương án, sáng chế đề cập tới chủng probiotic mới của *Lactobacillus paracasei* KBL382, của *Lactobacillus paracasei* KBL384 hoặc của *Lactobacillus paracasei* KBL385, và chủng này khác biệt ở chỗ bao gồm trình tự ADN ribosom 16S tương ứng của trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 3 dưới đây <SEQ ID NO: 1> trình tự của ADN ribosom 16S của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382

>KBL382

GCAGGTGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCAACC
GAGATTCAACATGGAACGAGTGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA
GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTC
TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAC
TCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGACGGTATCCAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG
GCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
CGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCCTTCGGGGGCA
AAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCC
CAACGAGCGCAACCCCTTATGACTAGITGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAAT
CTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCCTTAGGGAGCGA
GCGTCTAAGTGGCTCACGCCT

<SEQ ID NO: 2> trình tự của ADN ribosom 16S của chủng *Lactobacillus paracasei*

KBL384

>KBL384

GCCAGTGGGGGGGGTGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGC
 ACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCT
 TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATG
 GTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
 ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA
 AAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGACGGTATCCA
 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT
 GGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA
 GTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC
 AAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGG
 GGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGA
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
 CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGC
 TAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGC
 GAGCCGTCTAAGGTGAACCAAGTTTG

<SEQ ID NO: 3> trình tự của ADN ribosom 16S của chủng *Lactobacillus paracasei*

KBL385

>KBL385

GCAGTTGGGGGGGAGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGAC
CGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTA
AGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTT
CTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACA
ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAA
CTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGCCGGCGTGACGGTATCCAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC
GGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGC
AAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAA
TCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGCGA
GCCGTCTAAGTGTACAAAGTT

Sáng chế cũng xác nhận là chủng KBL382, chủng KBL384, và chủng KBL385 đều có tác dụng củng cố đối với dải bọt của thành đường ruột ngoài tác dụng chống viêm và điều hoà miễn dịch, và việc sử dụng chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 cho mô hình động vật được gây cảm ứng bệnh viêm ruột giảm nhẹ đáng kể sụt cân và giảm độ dài ruột kết do bệnh viêm ruột. Hơn nữa, cũng xác nhận được là sử dụng chủng KBL382, trong số các chủng nêu trên, cho mô hình động vật được gây cảm ứng bệnh viêm da dị ứng cải thiện đáng kể điểm đánh giá bệnh viêm da, giảm nhẹ triệu chứng ngứa, làm giảm độ dày của da và cải thiện đáng kể nồng độ IgE trong máu do phản ứng dị ứng.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một được chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn của chủng KBL382, chủng KBL384, hoặc chủng KBL385, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm nêu trên có thể sẵn sàng để sử dụng như thực phẩm có hiệu quả để cải thiện sức khỏe đường ruột và ngăn ngừa bệnh đường ruột, ví dụ, như thành phần chính hoặc thành phần phụ của thực phẩm, phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng hoặc đồ uống chức năng, nhưng không chỉ giới hạn ở sản phẩm này.

Thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm nêu trên có thể sẵn sàng để sử dụng như thực phẩm có hiệu quả để giảm nhẹ triệu chứng dị ứng, ví dụ, như thành phần chính hoặc thành phần phụ của thực phẩm, phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng hoặc đồ uống chức năng, nhưng không chỉ giới hạn ở sản phẩm này.

Hơn nữa, thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm nêu trên có thể sẵn sàng để sử dụng như thực phẩm có hiệu quả để giảm nhẹ bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, ví dụ, như thành phần chính hoặc thành phần phụ của thực phẩm, phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng hoặc đồ uống chức năng, nhưng không chỉ giới hạn ở sản phẩm này.

Thuật ngữ “thực phẩm” chỉ sản phẩm tự nhiên hoặc nhân tạo bao gồm ít nhất một chất dinh dưỡng, và ưu tiên hơn là chỉ sản phẩm có thể ăn được thông qua chế biến nhất định, thường bao hàm tất cả thực phẩm, phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng và đồ uống chức năng.

Thực phẩm mà có thể bao gồm thực phẩm theo sáng chế như chất phụ gia có thể bao gồm, ví dụ, loại khác nhau của thực phẩm, đồ uống, kẹo cao su, trà, phức hợp vitamin, và thực phẩm chức năng. Ngoài ra, thực phẩm của sáng chế bao gồm thực phẩm dinh dưỡng đặc biệt (ví dụ, sữa được cải biến, thực phẩm cho trẻ sơ sinh /trẻ nhỏ), sản phẩm thịt được chế biến, sản phẩm thịt cá, đậu phụ, muk, mì (ví dụ, mì ramen, mì kiểu châu Á), sản phẩm bánh, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, sản phẩm gia vị (ví dụ,

nước tương, pa-tê đậu tương, pa-tê ớt đỏ, pa-tê hỗn hợp), nước xốt, bánh kẹo (ví dụ, đồ ăn snack), kẹo, sô-cô-la, kẹo cao su, kem, sản phẩm sữa (ví dụ, sữa lên men, phomat), thực phẩm chế biến khác, Kim-chi, thực phẩm được muối (ví dụ, loại Kim-chi khác nhau, thực phẩm được ngâm giấm), đồ uống (ví dụ, nước ép hoa quả (nước quả), nước ép rau, sữa đậu nành, đồ uống lên men), và gia vị tự nhiên (ví dụ, bột súp cho mì), nhưng không chỉ giới hạn ở thực phẩm này. Thực phẩm, đồ uống hoặc phụ gia thực phẩm nêu trên có thể được điều chế theo cách thông thường.

Thuật ngữ “thực phẩm chức năng” là nhóm thực phẩm mà đã được bổ sung giá trị sao cho chức năng của nó đã được thực hiện và thể hiện cho mục đích định trước bằng cách sử dụng kỹ thuật vật lý, sinh hoá hoặc công nghệ sinh học cho thực phẩm này, hoặc thực phẩm được chế biến sao cho có chức năng điều chỉnh *in-vivo* của thực phẩm thích hợp như điều chỉnh nhịp điệu trong phòng ngừa, ngăn ngừa bệnh và phục hồi khỏi bệnh được thể hiện đầy đủ. Thực phẩm chức năng này bao gồm phụ gia bổ sung thực phẩm là được chấp nhận về mặt khoa học thực phẩm, và có thể còn bao gồm chất mang, tá dược và chất pha loãng thích hợp, mà thường được sử dụng trong sản xuất chúng.

Thuật ngữ “đồ uống chức năng”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nói chung chỉ sản phẩm đồ uống để giảm khát hoặc để thưởng thức hương vị. Không có giới hạn cụ thể đồ uống này, ngoại trừ bao gồm chế phẩm để cải thiện hoặc ngăn ngừa triệu chứng bệnh đường ruột nêu trên như là thành phần thiết yếu với tỷ lệ được chỉ định, và nhiều loại chất điều vị hoặc hydrat cacbon tự nhiên có thể có chứa trong đó như thành phần bổ sung tương tự như trong đồ uống thông thường.

Ngoài thực phẩm nêu trên, thực phẩm bao gồm thực phẩm theo sáng chế để cải thiện triệu chứng bệnh đường ruột nêu trên hoặc ngăn ngừa bệnh này có thể có chứa nhiều loại chất dinh dưỡng, vitamin, muối khoáng (chất điện giải), chất điều vị như chất điều vị tổng hợp và chất điều vị tự nhiên, chất tạo màu, và chất độn (phomat, sô-cô-la, v.v.), axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ,

chất làm đặc dạng keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất làm ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất, cacbonic hoá như được sử dụng trong đồ uống được cacbonat hoá và chất tương tự, và mỗi thành phần trong các thành phần nêu trên có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với nhau.

Trong thực phẩm bao gồm thực phẩm theo sáng chế, chế phẩm của sáng chế có thể được bao gồm với lượng từ 0,001% đến 100% theo trọng lượng, và ưu tiên là từ 1% đến 99% theo trọng lượng, dựa trên tổng trọng lượng của thực phẩm, trong trường hợp đồ uống, có thể được bao gồm với lượng từ 0,001 g đến 10 g, và ưu tiên là từ 0,01 g đến 1 g, dựa trên 100 mL. Để dùng lâu dài cho mục đích sức khoẻ và vệ sinh hoặc nhằm mục đích kiểm soát sức khoẻ, tuy nhiên, lượng này có thể thấp hơn khoảng nêu trên; và do thành phần hữu hiệu không có vấn đề gì về tính an toàn, chúng có thể được sử dụng với lượng lớn hơn khoảng nêu trên và không bị giới hạn ở khoảng nêu trên.

Thực phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chủng KBL382, chủng KBL384, hoặc chủng KBL385 đơn độc hoặc kết hợp với chất mang có thể chấp nhận, hoặc có thể được điều chế ở dạng chế phẩm thích hợp để dùng cho người hoặc động vật. Nghĩa là, chế phẩm có thể được thêm vào thực phẩm mà không chứa vi khuẩn probiotic hoặc một vài vi khuẩn probiotic. Ví dụ, vi sinh vật có thể được sử dụng kết hợp với chủng theo sáng chế để điều chế thực phẩm của sáng chế phải thích hợp để dùng cho người hoặc động vật, và có hoạt tính probiotic để ức chế vi khuẩn gây bệnh, có hại hoặc để cải thiện cân bằng vi sinh vật trong đường ruột của động vật có vú khi dùng, nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này. Vi sinh vật probiotic này có thể bao gồm, ví dụ, nấm men như *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, nấm như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, và *Penicillium*, và vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, và *Pediococcus*. Vi sinh vật probiotic thích hợp cụ thể có thể bao gồm, ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus*

licheniformis, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbruckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, hoặc *Pediococcus acidilactici*. Ưu tiên là, thực phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm hỗn hợp vi sinh vật probiotic có hoạt tính probiotic rất tốt và tác dụng ưu việt tăng cường tính miễn dịch để tăng cường hơn nữa tác dụng của chúng. Chất mang có thể được bao gồm trong thực phẩm của sáng chế có thể bao gồm, ví dụ, chất độn, chất bổ sung chất xơ, chất tạo nang, và lipid, mà được biết rộng rãi trong lĩnh vực này. Chúng *Lactobacillus paracasei* trong sáng chế có thể ở dạng được đông khô hoặc đóng nang hoặc ở dạng huyền phù nuôi cấy hoặc bột khô.

Chế phẩm của sáng chế cũng có thể được cung cấp ở dạng phụ gia thức ăn chăn nuôi bao gồm chủng nêu trên hoặc thức ăn chăn nuôi bao gồm chủng này.

Phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể ở dạng chế phẩm khô hoặc lỏng, và còn bao gồm vi sinh vật không gây bệnh khác ngoài các chủng KBL382, KBL384, hoặc KBL385 nêu trên. Vi sinh vật mà có thể được bổ sung cho phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm, ví dụ, *Bacillus subtilis* mà có thể sản xuất proteaza, lipaza và enzym biến đổi đường, chủng *Lactobacillus* có hoạt tính sinh lý và khả năng phân huỷ hợp chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí như trong dạ dày của bò, nấm dạng sợi như *Aspergillus oryzae* cho tác dụng tăng trọng lượng của gia súc, sản lượng sữa và khả năng tiêu hoá thức ăn (Slyter, L. L. J. Animal Sci.1976, 43. 910-926) và nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* (Johnson, D. E et al. J. Anim. Sci.,1983, 56, 735-739 ; Williams, P. E. V. et al,1990, 211).

Phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể còn bao gồm ít nhất một enzym ngoài chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei*

KBL384, hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 nêu trên. Enzym bổ sung có thể ở dạng khô hoặc lỏng, và có thể bao gồm, ví dụ, enzym thuỷ phân mỡ như lipaza, phytaza để sản xuất phosphat và inositol phosphat bằng cách phân huỷ axit phytic, amylaza, nghĩa là, enzym thuỷ phân liên kết α -1,4-glycosit được bao gồm trong, ví dụ, tinh bột và glycogen, phosphataza, nghĩa là, enzym thuỷ phân este của axit phosphoric hữu cơ, carboxymethylxenlulaza để phân huỷ xenluloza, xylaza để phân huỷ xyloza, maltaza để thuỷ phân maltoza thành hai phân tử glucoza, và enzym sản xuất đường như invertaza để sản xuất hỗn hợp glucoza-fructoza bằng cách thuỷ phân sacaroza.

Trong sử dụng chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 của sáng chế làm phụ gia thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu cho thức ăn này, như lạc, đậu, củ cải đường, bã ép, sản phẩm phụ của hạt, bột ruột động vật và bột cá, bao gồm nhiều loại hạt và protein đậu nành, có thể được sử dụng. Chúng có thể được chế biến hoặc không được chế biến, và có thể được sử dụng không bị giới hạn. Chế biến có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chế biến này, như quy trình mà nguyên liệu của thức ăn được nạp và ép nén dưới áp suất theo định dạng nhất định, và cho protein, ép đùn mà bằng quy trình này protein được thoái giáng để gia tăng độ khả dụng có thể được ưu tiên sử dụng. Quy trình ép đùn có lợi là làm biến tính protein thông qua xử lý nhiệt và phá huỷ yếu tố chống enzym. Hơn nữa, cho protein đậu nành, khả năng tiêu hoá của nó có thể được cải thiện thông qua ép đùn làm bất hoạt chất chống chất dinh dưỡng như chất ức chế trypsin, một trong số các chất ức chế proteaza mà có mặt trong đậu nành. Hơn nữa, ép đùn có thể thúc đẩy cải thiện khả năng tiêu hoá bởi proteaza, tăng cường giá trị dinh dưỡng của protein đậu nành.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh đường ruột, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một vi khuẩn được

chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh dị ứng, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Dược phẩm của sáng chế có thể được cung cấp ở dạng vi khuẩn sống, chủng khô, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, hoặc chế phẩm kết hợp với chất mang hoặc môi trường được dụng. Chất mang hoặc môi trường mà có thể được sử dụng ở đây có thể bao gồm dung môi, chất phân tán, chất bao, chất tăng cường, chế phẩm giải phóng có kiểm soát (nghĩa là, chế phẩm giải phóng kéo dài), hoặc ít nhất một tá dược trợ bao gồm tinh bột, polyol, cốm, xenluloza vi thể, xenluloza vi tinh thể như Celphere, hạt Celphere, chất pha loãng, chất làm trơn, chất kết dính, chất phân rã, và chất tương tự. Viên nén của chế phẩm nêu trên, nếu muốn, có thể được bao bằng kỹ thuật trong nước hoặc không trong nước tiêu chuẩn. Ví dụ về chất mang và tá dược được dụng để sử dụng làm chất mang trợ được dụng và thành phần bổ sung nêu trên có thể bao gồm, ví dụ, chất kết dính, chất độn, chất phân rã, chất làm trơn, chất kháng khuẩn và chất bao, nhưng không chỉ giới hạn ở chất này.

Sáng chế có thể khác biệt ở chỗ bệnh đường ruột nêu trên được chọn từ nhóm

gồm trướng bụng, đau tức bụng, tiêu chảy nhiễm khuẩn gây ra bởi vi sinh vật gây bệnh, viêm dạ dày ruột, bệnh viêm ruột, hội chứng viêm ruột do nguyên nhân thần kinh, hội chứng ruột kích thích, tăng trưởng quá mức vi sinh vật ở ruột non và tiêu chảy do ăn qua ống xông, và bệnh còn bao gồm bệnh gây ra bởi hư hại chức năng rào cản của ruột.

Bệnh viêm ruột (IBD) có thể bao gồm bệnh Crohn, tổn thương ở ruột kèm theo bệnh Behcet, viêm loét ruột kết, loét chảy máu trực tràng, và bệnh viêm túi trong, và chỉ nhóm bệnh bao gồm bệnh Crohn và viêm loét ruột kết. Viêm loét ruột kết chỉ ảnh hưởng đến ruột kết. Viêm và loét trong viêm loét ruột kết giới hạn ở hai lớp tận cùng bên trong, niêm mạc, dưới niêm mạc trong số bốn lớp của ruột kết. Viêm và loét trong bệnh Crohn có thể lan rộng ra tất cả các lớp của thành ruột ở cả ruột non và ruột già.

Trong khi đó, hội chứng ruột kích thích là tình trạng mạn tính kèm theo không chỉ tức bụng và đau bụng tái phát dai dẳng như trướng bụng, mà còn kéo theo các thay đổi của thói quen ruột như tiêu chảy và táo bón. Triệu chứng có thể bị nặng thêm bởi yếu tố tâm lý hoặc tình trạng bị stress.

Trong sáng chế, bệnh dị ứng có thể bao gồm bệnh viêm da dị ứng, chứng mày đay, viêm mũi dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, bệnh hen (suyễn), dị ứng thức ăn và chứng sốc phản vệ, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Trong sáng chế, bệnh tự miễn có thể bao gồm, ví dụ, viêm khớp dạng thấp, luput, xơ cứng bì toàn thân, bệnh viêm da dị ứng, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh hen (suyễn), hội chứng Guillian-Barre, bệnh nhược cơ, viêm da cơ, viêm đa cơ, đa xơ cứng, viêm não tuỷ tự miễn, viêm đa khớp dạng nốt, viêm tuyến giáp Hashimoto, đa xơ cứng, viêm động mạch thái dương, bệnh đái tháo đường ở thanh thiếu niên, chứng rụng tóc từng mảng, bệnh pemphigut, bệnh viêm miệng Aphthous, thiếu máu tan máu tự miễn, bệnh u hạt Wegener, hội chứng Sjogren, bệnh Addison, bệnh Crohn, và bệnh Behcet, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Hơn nữa, bệnh viêm của sáng chế nói chung chỉ tình trạng bệnh lý có viêm là

tổn thương chính, và có thể bao gồm, ví dụ, phù, viêm kết mạc, viêm quanh chân răng, viêm mũi, viêm tai trong, viêm xoang mạn tính, viêm họng thanh quản, viêm amidan, viêm phế quản, viêm phổi, loét dạ dày, viêm ruột kết, bệnh gút, bệnh eczema, bệnh trứng cá, bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh viêm đốt sống dính khớp, sốt thấp khớp, đau cơ khớp, viêm xương khớp, viêm khớp vẩy nến viêm khớp dạng thấp, viêm quanh khớp vai, viêm gân, viêm bao hoạt dịch gân, viêm cơ, viêm gan, viêm bàng quang, viêm thận, hội chứng Sjogren, bệnh nhược cơ, nhiễm khuẩn huyết, viêm mạch, viêm túi thanh mạc, viêm động mạch thái dương, và bệnh đa xơ cứng, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Đã biết là bệnh tự miễn có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách hoạt hoá tế bào T điều hoà (Treg) hoặc biệt hoá thành tế bào T. Treg, một loại tế bào T CD4+, đóng vai trò điều hoà hệ miễn dịch và kiểm soát bệnh tự miễn bằng cách duy trì tính dung nạp với tự kháng nguyên. Yếu tố phiên mã gọi là Foxp3 cụ thể tham gia vào quá trình phát triển, duy trì và chức năng của tế bào T điều hoà, điều hoà đáp ứng miễn dịch thông qua bài tiết xytokin ức chế miễn dịch IL-10 và TGF- β .

Ngoài ra, đã biết là tốc độ biệt hoá của tế bào T thành tế bào Th1, tế bào Th2, và tế bào Th17 là thấp và tốc độ biệt hoá của tế bào T thành tế bào Treg là cao, đáp ứng viêm có thể bị ức chế hiệu quả.

Tế bào Th1, tế bào Th2 và tế bào Th17 được biệt hoá từ tế bào T lá lách đã biết là có liên quan đến biểu hiện của các yếu tố phiên mã và xytokin sau đây: trong trường hợp tế bào Th1, T-bet, IFN- γ và IL-12; trong trường hợp tế bào Th2, GATA3 và IL-5; trong trường hợp tế bào Th17, ROR γ t, IL-17.

Sáng chế có thể khác biệt ở chỗ các tác dụng thu được từ chủng của sáng chế để giảm nhẹ, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm có thể được gây cảm ứng bởi ít nhất một cơ chế được chọn từ cơ chế sau đây:

i) ức chế biểu hiện hoặc bài tiết ít nhất một xytokin được chọn từ nhóm gồm xytokin gây viêm sau đây: IL-6, TNF, IL-1b, IL-8, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-13, và IL-

17A;

ii) ức chế biểu hiện hoặc bài tiết của xytokin chống viêm và điều hoà miễn dịch IL-10; và

iii) tăng biểu hiện của Treg tham gia vào hoạt tính chống viêm và điều hoà miễn dịch.

Thuật ngữ ‘điều trị’, trừ khi được đề cập khác, chỉ làm đảo ngược hoặc giảm nhẹ bệnh hoặc tình trạng bệnh được sử dụng với thuật ngữ này hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, ức chế sự tiến triển của nó hoặc ngăn ngừa nó. Thuật ngữ ‘điều trị’ như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hành động ‘điều trị’ như được định nghĩa ở trên. Do đó, điều trị hoặc chế độ điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm ở động vật có vú có thể bao gồm một hoặc nhiều tác dụng sau đây:

(1) ức chế phát triển của bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm,

(2) ngăn ngừa sự lan rộng của bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm,

(3) giảm nhẹ bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm,

(4) ngăn ngừa tái phát bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, và

(5) làm giảm nhẹ triệu chứng của bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm

Chế phẩm của sáng chế để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm có thể bao gồm lượng hữu hiệu được dụng của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384, chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 đơn độc hoặc kết hợp với ít nhất một chất trong số chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dụng.

Trong sáng chế, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng mà đủ cao để tạo ra tác dụng mong muốn, nhưng đủ thấp để ngăn ngừa tác dụng phụ theo phán xét y học.

Lượng vi sinh vật được sử dụng cho cơ thể bởi chế phẩm của sáng chế có thể được điều chỉnh thích hợp có xét đến đường dùng và đích sử dụng.

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng một hoặc nhiều lần/ngày. Dạng phân liều đơn vị có nghĩa là đơn vị riêng lẻ về mặt vật lý thích hợp để sử dụng một lần cho đối tượng là người và động vật có vú khác, và mỗi đơn vị bao gồm chất mang được thích hợp và lượng định trước của vi sinh vật của sáng chế để tạo ra tác dụng trị liệu. Đơn vị phân liều để sử dụng qua đường miệng cho bệnh nhân là người trưởng thành ưu tiên có chứa 0,001 g hoặc nhiều hơn vi sinh vật của sáng chế, và liều lượng qua đường miệng chế phẩm của sáng chế là từ 0,001 g đến 10 g, và ưu tiên là từ 0,01 g đến 5 g/liều dùng. Lượng hữu hiệu được phẩm vi sinh vật của sáng chế từ 0,01 g đến 10 g/ngày. Tuy nhiên, liều lượng thay đổi tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh ở bệnh nhân và vi sinh vật và thành phần hữu hiệu phụ trợ được sử dụng kèm theo. Ngoài ra, tổng liều lượng hằng ngày có thể được chia thành một vài lần và được sử dụng liên tục theo nhu cầu. Do đó, khoảng liều lượng nêu trên không giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Hơn nữa, thuật ngữ “được dùng” như được sử dụng ở trên chỉ chế phẩm mà có thể chấp nhận về mặt sinh lý và không gây ra phản ứng dị ứng như rối loạn dạ dày ruột, chóng mặt hoặc phản ứng tương tự khi được sử dụng cho người.

Chế phẩm của sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này sao cho có thể tạo ra giải phóng nhanh, kéo dài hoặc chậm của thành phần hoạt tính, sau khi được sử dụng cho động vật có vú. Dạng phân liều có thể là bột, cốm, viên nén, nhũ tương, xi-rô, sol khí, nang gelatin mềm hoặc cứng, dung dịch tiêm vô khuẩn, hoặc bột vô khuẩn. Hơn nữa, chế phẩm của sáng chế để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột có thể được sử dụng qua nhiều đường, bao gồm sử dụng qua đường miệng, qua da, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong bắp cơ. Liều lượng của thành phần hoạt tính có thể được lựa chọn thích hợp tùy thuộc vào nhiều yếu tố như

đường dùng, tuổi tác, giới tính, cân nặng của bệnh nhân, và mức độ nghiêm trọng của bệnh nhân. Chế phẩm của sáng chế để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh dạ dày ruột có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất đã biết có tác dụng ngăn ngừa hoặc điều trị triệu chứng của bệnh đường ruột.

Dược phẩm của sáng chế, cụ thể có thể được cung cấp dưới dạng phân liều đơn vị của chế phẩm bao tan ở ruột. Thuật ngữ "bao tan ở ruột", như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm màng bao được dụng bất kỳ đã biết mà có thể ở trong dạ dày mà không phân huỷ bởi axit dạ dày và có thể phân rã đủ trong đường ruột để giải phóng thành phần hoạt tính trong đó. Thuật ngữ "bao tan ở ruột" của sáng chế chỉ lớp bao có thể duy trì trong 2 giờ hoặc lâu hơn khi tiếp xúc với dịch dạ dày nhân tạo như dung dịch HCl có pH = 1 ở từ 36°C đến 38°C, và sau đó có thể phân huỷ, ưu tiên là trong dịch ruột nhân tạo như dung dịch đệm KH_2PO_4 có pH 6,8 trong 30 phút.

Bao tan ở ruột của sáng chế được bao lên một nhân với lượng từ khoảng 16 mg đến 30 mg, tốt hơn là từ 16 mg đến 20 mg hoặc 25 mg hoặc nhỏ hơn. Khi độ dày của lớp bao tan ở ruột của sáng chế là từ 5 μm đến 100 μm , và tốt hơn là từ 20 μm đến 80 μm , có thể thu được kết quả thoả mãn làm lớp bao tan ở ruột. Vật liệu bao tan ở ruột có thể được lựa chọn thích hợp từ vật liệu polyme đã biết. Vật liệu polyme thích hợp được liệt kê trong một số tài liệu đã biết [L. Lachman et al., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd ed., 1986, pp. 365~373; H. Sucker et al., *Pharmazeutische Technologie*, Thieme, 1991, pp. 355-359; Hagers *Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 4th ed., Vol. 7, pp. 739 ~ 742, và 766 ~ 778, (SpringerVerlag, 1971); và *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 13th ed., pp. 1689 ~ 1691 (Mack Publ., Co., 1970)], và dẫn xuất xenluloza este, xenluloza ete, copolyme của nhựa acrylic và metylacrylat, và copolyme của dẫn xuất axit maleic và axit phthalic cũng có thể được bao gồm.

Lớp bao tan ở ruột của sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp bao tan ở ruột thông thường, trong đó dung dịch bao tan ở ruột được

phun lên nhân. Dung môi thích hợp được sử dụng cho quá trình bao tan ở ruột là rượu như etanol, keton như axeton, dung môi hydrocarbon halogen hoá như diclometan (CH_2Cl_2), và dung môi hỗn hợp của các dung môi này. Chất làm mềm như di-n-butyl phthalat hoặc triaxetin được thêm vào dung dịch bao theo tỷ lệ 1 : từ ~ 0,05 đến khoảng 0,3 (vật liệu bao : chất làm mềm). Sẽ là thích hợp khi thực hiện quá trình phun liên tục, và có thể điều chỉnh lượng phun xét đến điều kiện bao. Áp lực phun có thể được điều chỉnh khác nhau, và nói chung có thể thu được kết quả thoả mãn với áp lực phun từ khoảng 1 bar đến khoảng 1,5 bar.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới việc sử dụng chủng này hoặc chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, và sử dụng chủng này hoặc chế phẩm này để điều chế chất trị liệu cho bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

Cụ thể là, sáng chế đề cập tới chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập tới chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh dị ứng, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập tới chế phẩm để sử dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng

Lactobacillus paracasei KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Sáng chế còn đề cập tới việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh đường ruột.

Ngoài ra, sáng chế đề cập tới việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh dị ứng.

Ngoài ra, sáng chế đề cập tới việc sử dụng chế phẩm bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này, để điều chế được chất ngăn ngừa hoặc trị liệu cho bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

Thuật ngữ ‘ngăn ngừa’, như được sử dụng trong bản mô tả này, là liên quan đến ngăn chặn, làm chậm, cản trở, hoặc ngăn cản bệnh để giảm thiểu bệnh này.

Thuật ngữ ‘điều trị’, như được sử dụng trong bản mô tả này, là liên quan đến chăm sóc cho đối tượng mắc bệnh để cải thiện, chữa khỏi hoặc giảm thiểu triệu chứng

của bệnh hoặc làm ngừng sự tiến triển của bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh này, hoặc cần giảm nhẹ sức khoẻ đường ruột, mức giảm thiểu miễn dịch hoặc phản ứng viêm, sử dụng lượng hữu hiệu được phẩm của chủng hoặc chế phẩm này.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh đường ruột, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh dị ứng, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), chủng *Lactobacillus paracasei* KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP), dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

Do được phẩm được sử dụng cho phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm nêu trên, và phương pháp sử dụng chúng đã được mô tả ở trên, nội dung trùng lặp giữa chế phẩm và phương pháp

ở đây sẽ được bỏ qua để tránh mức độ phức tạp của bản mô tả này.

Trong khi đó, đối tượng nêu trên mà chế phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng này để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm nêu trên bao gồm tất cả các động vật, bao gồm cả người. Ví dụ, đối tượng có thể là động vật như chó, mèo hoặc chuột.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Các ví dụ này chỉ nhằm để minh họa sáng chế, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này là phạm vi của sáng chế sẽ không được hiểu là bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sàng lọc chủng probiotic có chức năng điều hoà miễn dịch

Chủng probiotic có chức năng điều hoà miễn dịch được sàng lọc bằng cách sử dụng dòng tế bào THP-1 bạch cầu đơn nhân to và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC). Chủng thu được từ ruột hoặc âm đạo của người được nhân giống tương ứng vào hai dòng tế bào nêu trên sao cho tỷ lệ dòng tế bào: chủng là 1:100, và đo xác định tỷ lệ của IL-10, xytokin chính chỉ báo đối chứng viêm, so với IL-6, xytokin chính chỉ báo phản ứng viêm (IL-10/IL-6), và tỷ lệ của IL-10 so với IFN- γ , xytokin chính chỉ báo phản ứng tự miễn (IL-10/IFN- γ). Tổng cộng 23 chủng được sử dụng để sàng lọc như sau: hai chủng *Lactobacillus gasseri*, một chủng *Lactobacillus reuteri*, năm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, hai chủng *Lactobacillus fermentum*, bốn chủng *Lactobacillus paracasei*, bốn chủng *Lactobacillus salivarius*, một chủng *Lactobacillus plantarum*, hai chủng *Lactobacillus acidophilus* và hai chủng *Lactococcus lactis*.

Do sàng lọc, giá trị IL-10/IL-6 cao nhất được thể hiện ở ba chủng của *Lactobacillus paracasei* KBL382, KBL384 và KBL385. Cụ thể là, trong số ba chủng *Lactobacillus paracasei*, KBL382 có giá trị IL-10/IL-6 cao nhất là 2,22 ở dòng tế bào

THP-1, và giá trị IL-10/IFN- γ là 9 ở tế bào đơn nhân máu ngoại vi, thể hiện tác dụng điều hoà miễn dịch mạnh. Bảng 1 bên dưới thể hiện kết quả của giá trị IL-10/IL-6 và giá trị IL-10/IFN- γ đo được cho ba chủng *Lactobacillus paracasei* trong số 23 chủng được sử dụng cho sàng lọc nêu trên. Do đó, 3 chủng của *Lactobacillus paracasei* KBL382, KBL384 và KBL385 được dự đoán là có tác dụng mạnh để cải thiện sức khoẻ đường ruột, và thí nghiệm bổ sung được thực hiện trên các chủng này.

Bảng 1

Dòng tế bào	Chủng	IL-10/IL6
THP-1	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL382	2,222168
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL384	0,612436
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL382	1,08215
Tế bào	Chủng	IL-10/IFN-r
PBMC	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL382	9,0295403
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL384	7,4016942
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL385	7,9818579

Ví dụ 2. Kiểm nghiệm tác dụng của *Lactobacillus paracasei* các chủng KBL382, KBL384 và KBL385 lên biểu hiện xytokin viêm và điều hoà biệt hoá tế bào T (thử nghiệm *in vitro*)

Để kiểm nghiệm tác dụng điều hoà miễn dịch của *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 nêu trên, khả năng sản sinh xytokin tham gia vào điều hoà miễn dịch được xác nhận ở dòng tế bào THP-1 được điều trị bằng *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385, đồng thời gen chất đánh dấu biệt hoá tế bào T được biểu hiện ở PBMC được điều trị bằng *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385.

Trước tiên, dòng tế bào THP-1 được nhân giống vào mỗi giếng của đĩa 24 giếng ở mức 1×10^5 tế bào, được biệt hoá thành đại thực bào trưởng thành, và tiếp đó thay thế dung dịch nuôi cấy. Sau 3 giờ, một giếng được điều trị bằng LPS ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ làm đối chứng dương tính, và các giếng còn lại được điều trị bằng *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 hoặc chủng KBL385, mỗi chủng 1×10^7 tế bào dựa trên số lượng vi khuẩn sống sót; sau 24 giờ, thu gom dung dịch nuôi cấy và đo xác định lượng xytokin bằng kit viêm cho người BD Cytometric Bead Array (CBA) (Cat No. 551811) theo phương pháp của nhà sản xuất. Làm đối chứng âm tính (Con), điều trị giếng bằng đệm PBS và thực hiện quy trình thí nghiệm giống như trên. Do đó, như thể hiện trên FIG. 1, việc đo cho thấy là nhóm dòng tế bào THP-1 được điều trị bằng *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385 có lượng xytokin viêm thấp hơn đáng kể IL-6, TNF, IL-1b và IL-8 so với nhóm được điều trị bằng-LPS. Trong trường hợp điều trị bằng chủng KBL384, đã xác nhận là IL-6 thấp hơn đáng kể so với nhóm thử nghiệm được điều trị bằng LPS, nhưng TNF, IL-1b và IL-8 không khác biệt đáng kể so với nhóm được điều trị bằng LPS. Trong trường hợp IL-10, không nhận thấy có tăng hoặc giảm đáng kể ở nhóm được điều trị bằng KBL382, KBL384 và KBL385 so với nhóm được điều trị bằng LPS, nhưng nhận thấy là gia tăng tổng thể nồng độ IL-10 được gây cảm ứng so với nhóm đối chứng âm tính. Do đó, kết luận là *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385 có hiệu quả ức chế đáng kể sản sinh xytokin viêm ở tế bào THP-1, và thực hiện thí nghiệm tiếp theo để kiểm nghiệm kiểu biệt hoá tế bào T.

Để xác nhận tác dụng của chủng KBL382 và chủng KBL385 lên biệt hoá tế bào T, nhân giống tế bào PBMC vào mỗi giếng của đĩa 24 giếng ở mức 5×10^5 tế bào, và tiếp đó thêm vào *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 hoặc chủng KBL385 ở mức 5×10^6 tế bào. Để làm đối chứng, *E.coli* (*E.coli* 0157 EC4115) được thêm vào mỗi giếng ở mức 5×10^6 tế bào dựa trên số lượng tế bào sống sót, hoặc LPS được thêm vào ở nồng độ 500 ng/mL. *E.coli* đã biết là làm tăng mức biểu hiện của các gen

T-bet, GATA3, và ROR γ t, đây là chất đánh dấu tế bào hiệu ứng của đáp ứng viêm có liên quan đến tế bào T, đồng thời LPS đã biết là làm gia tăng biểu hiện của gen FOXP3, chất đánh dấu của tế bào Treg liên quan đến điều hoà viêm. Nhóm thử nghiệm tế bào PBMC được điều chế trong điều kiện trên được ủ trong 5 ngày và tiếp đó thu được và thu gom tế bào. Để xác nhận mức biểu hiện gen, trước tiên sử dụng kit chiết xuất ARN toàn phần easy-spinTM (không chứa ADN) để chiết xuất ARN và tiếp đó sử dụng kit chuyển từ ARN-thành-ADN bổ trợ (cDNA) năng suất cao (ThermoFisher) để tổng hợp cDNA. Thực hiện PCR thời gian thực trên cDNA đã tổng hợp bằng kit PCR Rotor-Gene SYBR Green (Qiagen) bằng cách sử dụng thiết bị Rotor-Gene® Q (Qiagen) theo phương pháp của nhà sản xuất và đo xác định mức biểu hiện ARN thông tin (mRNA) của mà là gen chất đánh dấu Th1 (chất đánh dấu tế bào hiệu ứng), GATA3 mà là gen chất đánh dấu Th2, ROR γ t mà là gen chất đánh dấu Th17, và FOXP3 mà là gen chất đánh dấu tế bào Treg. Tại thời điểm này, mức biểu hiện của gen B2M được đo xác định làm đối chứng nội để hiệu chỉnh mức biểu hiện gen tương đối giữa mỗi nhóm thử nghiệm. Trình tự bazơ của đoạn mỗi được sử dụng để xác nhận biểu hiện của mỗi gen như sau.

B2M

Đoạn mỗi xuôi: 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3'(SEQ ID NO. 4)

Đoạn mỗi ngược: 5'-GAT GCT TCT TAC ATG TCT CG-3' (SEQ ID NO. 5)

T-bet

Đoạn mỗi xuôi: 5'-CCC CAA GGA ATT GAC AGT TG-3' (SEQ ID NO. 6)

Đoạn mỗi ngược) 5'-GGG AAA CTA AAG CTC ACA AAC-3'(SEQ ID NO. 7)

GATA3

Đoạn môi xuôi: 5'-CTG CAA TGC CTG TGG GCT C-3'(SEQ ID NO. 8)

Đoạn môi ngược: 5'-GAC TGC AGG GAC TCT CGC T-3' (SEQ ID NO. 9)

ROR γ t

Đoạn môi xuôi: 5'-AAG ACT CAT CGC CAA AGC AT-3'(SEQ ID NO. 10)

Đoạn môi ngược: 5'-TCC ACA TGC TGG CTA CAC A-3'(SEQ ID NO. 11)

FOXP3

Đoạn môi xuôi: 5'-TCA AGC ACT GCC AGG CG-3' (SEQ ID NO. 12)

Đoạn môi ngược: 5'-CAG GAG CCC TTG TCG GAT-3' (SEQ ID NO. 13)

Do đó, như thể hiện trên FIG. 2, đã xác nhận được là *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385, so với *E.coli*, duy trì mức biểu hiện của các gen Tbet, GATA3, và ROR γ t, mà là chất đánh dấu tế bào hiệu ứng của tế bào T viêm, ở mức thấp đáng kể, nhưng gia tăng đáng kể mRNA của FOXP3, chất đánh dấu của tế bào Treg để duy trì cân bằng nội mô miễn dịch tương tự như LPS.

Ví dụ 3. Kiểm nghiệm tác dụng của *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, KBL384 và chủng KBL385 lên điều hoà miễn dịch tế bào (thử nghiệm *in vitro*)

Trong khi đó, để kiểm nghiệm tác dụng điều hoà miễn dịch tế bào T bởi *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385, kiểm nghiệm mức biểu hiện của xytokin viêm khi tế bào T được hoạt hoá ở tế bào PBMC, và tiếp đó điều trị bằng *paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 nêu trên.

Nhân giống tế bào PBMC vào mỗi giếng (lỗ) của đĩa 96 giếng ở mức 2×10^5

tế bào bằng kháng thể kháng-CD3 (1 µg/mL, ebioscience) để hoạt hoá tế bào T, và tiếp đó *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 hoặc chủng KBL385 được thêm vào ở mức 1×10^7 tế bào để có tỷ lệ “vi khuẩn:PBMC = 50:1”, dựa trên số lượng tế bào sống sót. Để làm đối chứng, *Escherichia coli* K12 (ATCC 10798) được thêm vào mỗi giếng ở mức 1×10^7 tế bào dựa trên số lượng tế bào sống sót. Sau khi ủ nhóm thử nghiệm tế bào PBMC được hoạt hoá-tế bào T trong điều kiện nêu trên trong 3 ngày, thu gom dịch nổi và đo xác định lượng mỗi xytokin bằng kit viêm cho người BD Cytometric Bead Array (CBA) (Cat No. 551811) theo phương pháp của nhà sản xuất.

Từ đó, như thể hiện trên FIG. 3, ở dòng tế bào PBMC mà tế bào T được hoạt hoá bằng cách thêm vào kháng thể kháng-CD3, *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 tất cả đều làm giảm đáng kể mức biểu hiện của IL-2, đây là xytokin của Th1, IL-4 và IL-13, mà tương ứng là xytokin của IFN γ và Th2, và IL-17A, đây là xytokin của Th17, so với nhóm thử nghiệm chỉ được điều trị bằng chủng thêm vào *E.coli* và PBS, trong khi đó xytokin chống viêm IL-10 tăng đáng kể ở tất cả ba chủng *Lactobacillus paracasei* được sử dụng trong thí nghiệm, so với nhóm thử nghiệm chỉ điều trị bằng PBS; đã xác nhận đặc biệt là chủng KBL 382 trong số ba chủng, tăng đáng kể IL-10 so với nhóm được thêm vào *E.coli*. Kết quả thí nghiệm như trên dẫn đến kết luận là tất cả ba *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 làm giảm đáng kể xytokin viêm của tế bào T và gia tăng xytokin chống viêm.

Ví dụ 4. Kiểm nghiệm tác dụng của *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 lên tác dụng giảm nhẹ bệnh viêm ruột (thử nghiệm *in vivo*)

Ví dụ này là để xác nhận liệu *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 thể hiện tác dụng cải thiện chức năng của ruột ngay cả *in*

vivo. Cho mục đích này, chuột C57BL/6 được chia thành nhóm 10 con/nhóm, và sau đó cho uống nước vôi có 2% DSS được hoà tan trong đó trong 9 ngày, và nhờ đó gây cảm ứng bệnh viêm ruột. Đồng thời, chuột ở nhóm đối chứng được cho dùng qua đường miệng 200 μ L PBS hằng ngày, và chuột ở nhóm thử nghiệm được cung cấp hằng ngày bằng cho sử dụng qua đường miệng 200 μ L *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382, chủng KBL384 hoặc chủng KBL385 được pha loãng trong PBS đến nồng độ 2×10^{10} CFU/mL sao cho lượng sử dụng hằng ngày định mức là 4×10^9 CFU. Sau đó, trong 9 ngày mà bệnh viêm ruột được gây cảm ứng bởi DSS, thay đổi thể trọng của chuột ở nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm được xác định hằng ngày, và vào ngày thứ 9 sau khi cung cấp DSS, mổ xác chuột để đo xác định độ dài của ruột kết.

Từ đó, như thể hiện trên FIG 4, đã xác nhận là liên quan đến thay đổi thể trọng, nhóm được điều trị bằng chủng KBL382, chủng KBL384 và chủng KBL385 tất cả đều thể hiện tác dụng đáng kể lên giảm nhẹ sụt cân, so với nhóm chuột đối chứng không được điều trị; liên quan đến thay đổi độ dài ruột kết, mức độ giảm độ dài ruột kết được cải thiện đáng kể ở tất cả nhóm của ba chủng, so với chuột ở nhóm đối chứng.

Ngoài ra, thực hiện nhuộm màu H&E để đo xác định mức độ viêm ở nhóm thử nghiệm của chủng KBL382 và chủng KBL385, và đo xác định mức Myeloperoxidase (MPO) ở các mô. Sau khi khám nghiệm xác, để xét nghiệm tổn thương của ruột kết bằng cách nhuộm màu H&E, phần xa của ruột kết được cố định trong dung dịch formalin trung tính 10%, và tiếp đó cắt lấy mẫu bệnh phẩm mô parafin độ dày 5 μ m, nhuộm màu bằng hematoxylin & eosin, và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Từ đó, để đo xác định MPO, mô ruột kết trước tiên được cho vào đệm RIPA mà chất ức chế proteaza được thêm vào đó, và được phá vỡ bằng thiết bị đồng thể hoá. Sau khi ly tâm mô đã phá vỡ ở 4°C ở $15000 \times g$ trong 10 phút, đo xác định MPO bằng cách sử dụng dịch nổi theo quy trình của kit ELISA (Hycult Biotech, MPO, Mouse, cat. HK210-02).

Từ đó, như thể hiện trên FIG. 4, xác nhận thông qua kết quả nhuộm màu H&E,

là nhóm thử nghiệm mà đã sử dụng hai chủng KBL382 và KBL385, đều có giảm nhẹ viêm so với nhóm đối chứng, và nồng độ MPO giảm nhẹ ở nhóm thử nghiệm KBL385 và giảm đáng kể ở nhóm thử nghiệm KBL382. Bằng cách sử dụng mô ruột kết thu được bằng cách này để xác nhận tác dụng củng cố lên dải bịt của thành đường ruột.

Ví dụ 5. Tác dụng của *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385 lên củng cố dải bịt thành đường ruột

Để kiểm nghiệm tác dụng của *Lactobacillus paracasei* chủng KBL382 và chủng KBL385 lên củng cố dải bịt thành đường ruột, so sánh và xác định mức biểu hiện mRNA của gen liên quan đến dải bịt thành đường ruột ở tế bào được phân lập từ mô ruột kết của chuột được phân lập ở Ví dụ 4. Để kiểm nghiệm mức biểu hiện gen, trước tiên ARN được chiết xuất từ mô bằng cách sử dụng kit chiết xuất ARN toàn phần easy-spin™ (không có ADN) (Intron), và sau đó tổng hợp cDNA bằng kit chuyển từ ARN-thành-ADN bổ trợ (cDNA) năng suất cao (ThermoFisher) để tổng hợp cDNA. Kit PCR Rotor-gene SYBR green (Qiagen) được sử dụng để đo xác định mức biểu hiện mRNA *in vivo* của zonula occluden-1 (ZO-1), Claudin3 và MUC-4, đây là protein chất đánh dấu dải bịt thành đường ruột, bằng cách sử dụng Rotor-Gene® Q (Qiagen). Đo xác định mức biểu hiện của gen hypoxanthin-guanin phosphoribosyl-transferaza (HPRT) để làm đối chứng chuẩn hoá mức biểu hiện gen tương đối giữa mỗi nhóm thử nghiệm. Đoạn mỗi được sử dụng để xác nhận mức biểu hiện được điều chế để có thể gắn kết đặc hiệu với mỗi gen như sau.

Zo-1

Đoạn mỗi xuôi: 5'-ACC CGA AAC TGA TGC TGT GGA TAG-3' (SEQ ID No. 14)

Đoạn mỗi ngược: 5'-AAA TGG CCG GGC AGA ACT TGT GTA-3' (SEQ ID No. 15)

Claudin3

Đoạn mỗi xuôi: 5'-CAG ACG TCC GTC AGT TTT CG-3' (SEQ ID No. 16)

Đoạn mỗi ngược: 5'-CAT GGC TGC TGG ACT TGA AC-3' (SEQ ID No. 17)

MUC-4

Đoạn mỗi xuôi: 5'-GTC TCC CAT CAC GGT TCA GT-3' (SEQ ID No. 18)

Đoạn mỗi ngược: 5'-TGT CAT TCC ACA CTC CCA GA-3' (SEQ ID No. 19)

HPRT

Đoạn mỗi xuôi: 5'-TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC-3" (SEQ ID No. 20)

Đoạn mỗi ngược: 5'-GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T-3" (SEQ ID No. 21)

Từ đó, như thể hiện trên FIG. 5, đã xác định được là mức biểu hiện của ba gen được xác định ở chuột cho dùng chủng KBL382 và chủng KBL385 là gia tăng so với nhóm đối chứng chỉ dùng PBS, và nhờ đó dải bịt thành đường ruột được phục hồi; do đó, chủng nêu trên có thể sử dụng để điều trị bệnh như IBD và IBS.

Ví dụ 6. So sánh tác dụng giảm nhẹ bệnh viêm ruột giữa kháng thể trị liệu cho bệnh viêm ruột và KBL382

Infliximab (tên thương mại: Remicade) là dược chất kháng thể tái tổ hợp trị liệu được sử dụng để tiêm cho bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp, viêm cứng khớp đốt sống, viêm loét ruột kết, bệnh Crohn ở người trưởng thành, bệnh Crohn ở trẻ em, bệnh vẩy nến và bệnh viêm khớp vẩy nến. Mục đích của nghiên cứu này là để xác nhận mức chênh lệch về tác dụng làm giảm nhẹ triệu chứng bệnh đường ruột *in vivo* giữa chủng KBL 382 và infliximab.

Để so sánh tác dụng, sau khi chia chuột C57BL/6 thành nhóm 8 chuột/nhóm, sau đó cho uống nước vôi có 2% DSS được hoà tan trong đó trong 9 ngày, và nhờ đó gây cảm ứng bệnh viêm ruột. Đồng thời, chuột ở nhóm đối chứng được cho dùng qua

đường miệng 200 μ L PBS hằng ngày, và chuột ở nhóm thử nghiệm được cung cấp hằng ngày bằng cho sử dụng qua đường miệng 200 μ L chủng KBL382, được pha loãng trong PBS đến nồng độ 2×10^{10} CFU/mL sao cho lượng sử dụng hằng ngày định mức là 4×10^9 CFU. Cho nhóm sử dụng kháng thể trị liệu, kháng thể infliximab được sử dụng một lần vào ngày 3 với liều dùng 5 mg/kg/chuột.

Sau đó, trong 9 ngày mà bệnh viêm ruột được gây cảm ứng bởi DSS, thay đổi thể trọng của chuột ở nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm được xác định hằng ngày, và vào ngày thứ 9 sau khi cung cấp DSS, mổ xác chuột để đo xác định độ dài của ruột kết.

Từ đó, như thể hiện trên FIG. 6(A), liên quan đến thay đổi độ dài ruột kết, đã xác nhận là mức độ giảm độ dài ruột kết được cải thiện đáng kể ở nhóm mà chủng KBL382 được điều trị và infliximab được sử dụng, so với chuột ở nhóm đối chứng. Xác nhận là tác dụng cải thiện độ dài ruột kết của nhóm mà được điều trị chủng KBL382 là tương tự hoặc cao hơn là nhóm sử dụng infliximab.

Liên quan đến thay đổi cân nặng, như thể hiện trên FIG. 6(B), tác dụng lên giảm cân nặng được cải thiện đáng kể ở nhóm điều trị chủng KBL382 và sử dụng infliximab, so với nhóm đối chứng không có điều trị. Xác nhận là tác dụng giảm nhẹ sụt cân ban đầu trong vòng 5 ngày sau khi sử dụng là cao hơn ở nhóm sử dụng infliximab so với nhóm điều trị chủng KBL382, nhưng sau đó tác dụng cải thiện bởi infliximab giảm đi, trong khi tác dụng của nhóm điều trị bằng chủng KBL382 lên sụt cân gia tăng, thể hiện tác dụng tương tự giữa hai nhóm cho đến ngày thứ 9. Do đó, liên quan đến việc sử dụng chủng này để điều trị bệnh viêm ruột và hội chứng ruột kích thích, đã xác nhận có thể kỳ vọng là có tác dụng trị liệu tương tự như kháng thể trị liệu có bán sẵn.

Ví dụ 7. Tác dụng của KBL382 lên giảm nhẹ tình trạng dị ứng

Để kiểm nghiệm tác dụng giảm nhẹ dị ứng của chủng KBL382, sử dụng mô

hình chuột NC/Nga, mô hình động vật bệnh da dị ứng.

Sau khi chia chuột NC/Nga thành nhóm 9 con/nhóm, lưng của chuột được cạo lông từ phía dưới tai cho đến phía trên của đuôi và bỏ chuột đó trong 24 giờ. Tiếp đó, bôi mỡ bao gồm phần chiết *Dermatophagoides farinae* (DFE), kháng nguyên mạt bụi nhà (HDM), một lần hoặc hai lần/tuần trong 7 tuần vào phần đã cạo lông sao cho chuột được điều trị bằng 100 mg DFE, và nhờ đó gây cảm ứng bệnh viêm da dị ứng. Từ tuần thứ ba sau khi gây cảm ứng bệnh viêm da, 200 μ L PBS được cho dùng qua đường miệng ở nhóm đối chứng hằng ngày; cho chuột sử dụng lần lượt chủng KBL382 và *Lactobacillus rhamnosus* chủng KBL365, mà được pha loãng trong 200 μ L PBS ở liều ít nhất là 1×10^9 CFU/chuột, qua đường miệng ở nhóm thử nghiệm ở liều 200 μ L hằng ngày. Sau đó, trong vòng 4 tuần sử dụng vi khuẩn, đo xác định điểm đánh giá bệnh viêm da của chuột ở nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm hàng tuần, và vào tuần thứ 4 sau khi sử dụng vi khuẩn, thời gian chuột cào gãi và độ dày của da, và nồng độ IgE trong máu sau khi khám nghiệm xác chuột.

7-1. Đánh giá điểm đánh giá bệnh viêm da

Để đánh giá tổn thương da gây cảm ứng bởi-DFE, xác định điểm đánh giá bệnh viêm da bằng phương pháp sau. Theo dõi tình trạng da bằng cách chụp ảnh trong 4 tuần cách quãng 1 tuần từ tuần thứ ba kể từ khi sử dụng chủng. Kiểm tra 4 chỉ số khô da, phù nề, ban đỏ/xuất huyết, và ăn mòn/sây da. Đánh giá điểm tổng cộng với 0 điểm là không có tổn thương, 1 điểm cho tổn thương nhẹ, 2 điểm cho tổn thương vừa phải, và 3 điểm cho tổn thương nặng.

Từ đó, như thể hiện trên FIG. 7(A), điểm đánh giá bệnh viêm da giảm đáng kể ở nhóm dùng chủng KBL382, so với nhóm đối chứng (âm tính) ở đó bệnh viêm da dị ứng được gây cảm ứng, và nhóm sử dụng chủng KBL365. Do đó, tác dụng giảm nhẹ bệnh viêm da dị ứng do dùng chủng KBL382 được kiểm định.

7-2 Tác dụng giảm nhẹ triệu chứng ngứa

Để kiểm nghiệm tác dụng giảm nhẹ ngứa ngứa do sử dụng chủng KBL382 ở mô hình chuột mắc bệnh viêm da dị ứng gây cảm ứng bởi DFE, số lần cào gãi được xác định ở chuột trong 10 phút sau 4 tuần sử dụng chủng.

Từ đó, như có thể nhận thấy trên FIG. 7(B), có vẻ là số lần cào gãi giảm đáng kể ở nhóm thử nghiệm được sử dụng KBL382, so với nhóm sử dụng PBS, kết quả này xác nhận là triệu chứng ngứa của bệnh viêm da dị ứng được giảm nhẹ bằng cách sử dụng chủng KBL382.

7-3. Giảm độ dày da

Để kiểm nghiệm tác dụng giảm độ dày da sau khi sử dụng KBL382 cho mô hình chuột mắc bệnh viêm da dị ứng gây cảm ứng bởi DFE, đo độ dày tai chuột và độ dày da lưng bằng thước kẹp 4 tuần sau khi chủng được sử dụng, và nhận thấy có giảm nhẹ triệu chứng phù nề do bệnh viêm da dị ứng. Do đó, như có thể nhận thấy trên FIG. 7(C), nhận thấy là nhóm thử nghiệm được dùng KBL382, độ dày tai và da giảm đáng kể, so với nhóm đối chứng và nhóm được sử dụng KBL365.

7-4. Giảm nồng độ IgE trong máu

Đã xác định được là nồng độ IgE ở bệnh nhân mắc bệnh viêm da dị ứng phần lớn gia tăng khi mức độ nghiêm trọng trên lâm sàng của bệnh viêm da dị ứng gia tăng (Matsumoto M, J. Immunol. 1999). Do đó, nồng độ của IgE, yếu tố huyết học đại diện xuất hiện khi bệnh viêm da dị ứng phát sinh, được đo bằng cách thu gom máu 3 tuần sau khi sử dụng chủng, tách huyết thanh từ máu này và sử dụng bộ ELISA cho IgE của chuột (Cat No. 555248, BD OptEIA™). Từ đó, như thể hiện trên FIG. 7(D), đã xác định được là nồng độ IgE trong máu giảm đáng kể ở nhóm thử nghiệm được sử dụng KBL382 qua đường miệng, kết quả này chỉ ra là có tác dụng điều trị bệnh viêm da dị ứng sau khi dùng KBL382.

Các khía cạnh cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết ở trên, và sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là các khía cạnh cụ thể này chỉ là phương án được ưu tiên, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án này. Do đó, phạm vi của sáng chế về cơ bản được xác định bằng yêu cầu bảo hộ sau đây, với các phương án tương đương với yêu cầu bảo hộ này.

Tên của tổ chức nộp lưu: Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

Số truy cập: KCTC13509BP

Ngày truy cập: 20180417

Tên của tổ chức nộp lưu: Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

Số truy cập: KCTC13510BP

Ngày truy cập: 20180417

Tên của tổ chức nộp lưu: Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

Số truy cập: KCTC13511BP

Ngày truy cập: 20180417

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Lactobacillus paracasei chủng KBL382 (Số truy cập KCTC13509BP), *Lactobacillus paracasei* chủng KBL384 (Số truy cập KCTC13510BP), và *Lactobacillus paracasei* chủng KBL385 (Số truy cập KCTC13511BP) theo sáng chế có chức năng chống viêm và điều biến miễn dịch rất tốt, có tác dụng củng cố vượt trội đối với dải bít của thành đường ruột, ngăn chặn sự cân và giảm độ dài ruột kết gây cảm ứng bởi-bệnh viêm ruột, nhờ đó thể hiện tác dụng trị liệu đối với bệnh viêm ruột, và làm suy yếu phản ứng dị ứng của tế bào, và giảm nhẹ đáng kể triệu chứng của bệnh viêm da dị ứng, và nhờ đó cải thiện bệnh dị ứng. Do đó, chủng đơn nhất có thể đạt

được tăng cường tác dụng chống viêm, tăng cường miễn dịch, cải thiện chức năng sức khoẻ đường ruột, và giảm nhẹ bệnh dị ứng, và do đó có thể hữu ích làm nguyên liệu probiotic.

Danh mục trình tự

Bản điện tử của danh mục trình tự được đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng *Lactobacillus paracasei* KBL382 với số truy cập KCTC13509BP.
2. Chúng theo điểm 1, khác biệt ở chỗ chủng này bao gồm trình tự của ADN ribosom 16S là SEQ ID NO: 1.
3. Thực phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất chủng được chọn từ nhóm gồm chủng theo điểm 1 hoặc 2, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.
4. Phụ gia thực phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất chủng được chọn từ nhóm gồm chủng theo điểm 1 hoặc 2, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.
5. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh đường ruột, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất chủng được chọn từ nhóm gồm chủng theo điểm 1 hoặc 2, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.
6. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh dị ứng, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất chủng được chọn từ nhóm gồm chủng theo điểm 1 hoặc 2, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.
7. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, bao gồm lượng hữu hiệu của ít nhất chủng được chọn từ nhóm gồm chủng theo điểm 1 hoặc 2, dịch nuôi cấy của chủng này, dịch phân giải của chủng này, và phân chiết của chủng này.

FIG. 1

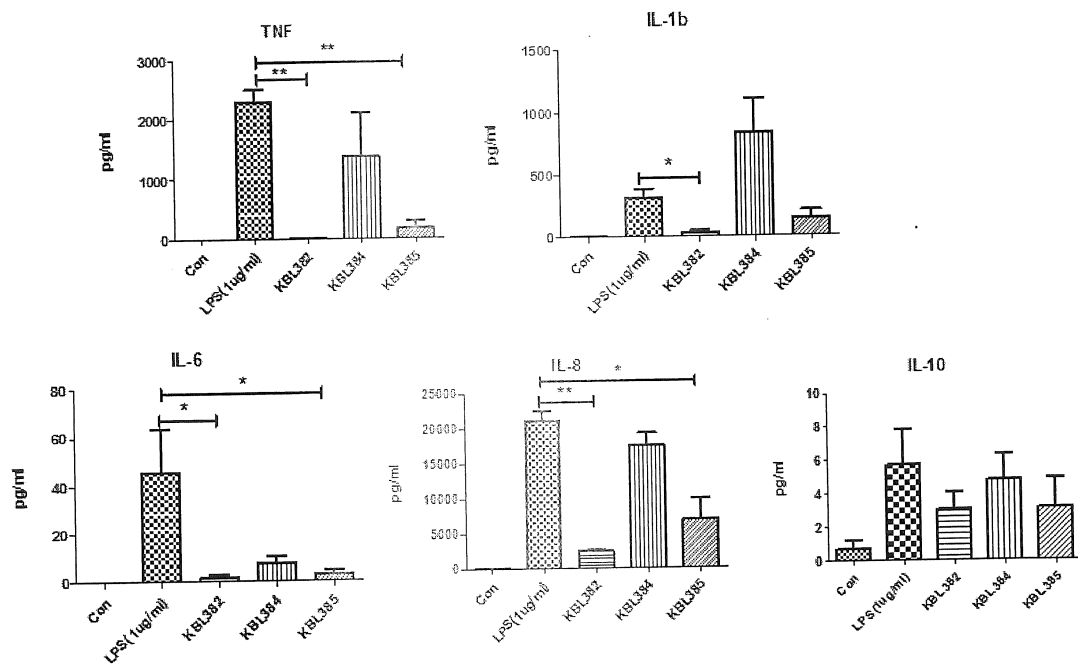


FIG. 2

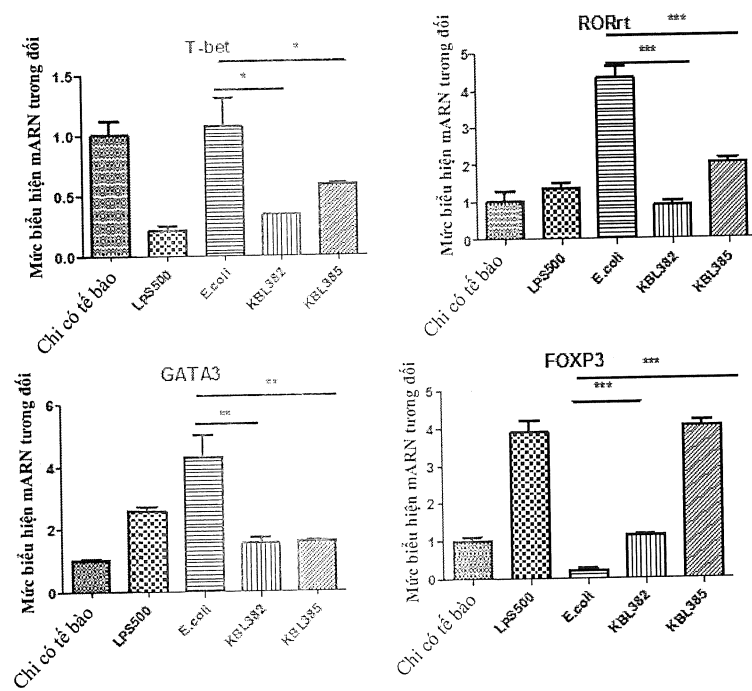


FIG. 3

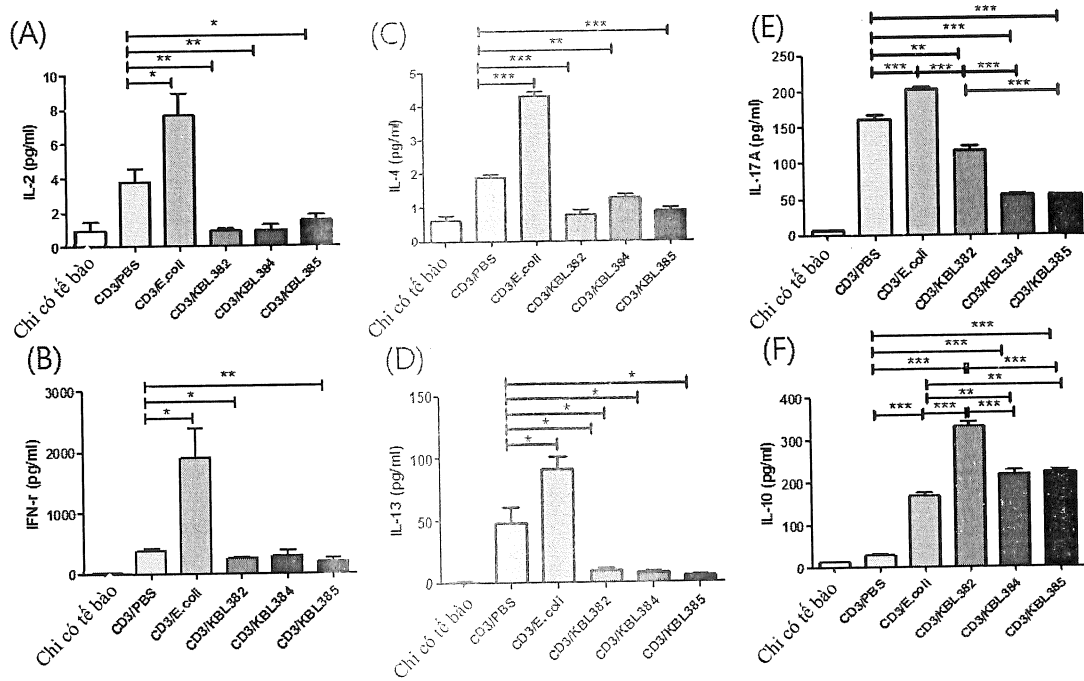


FIG. 4

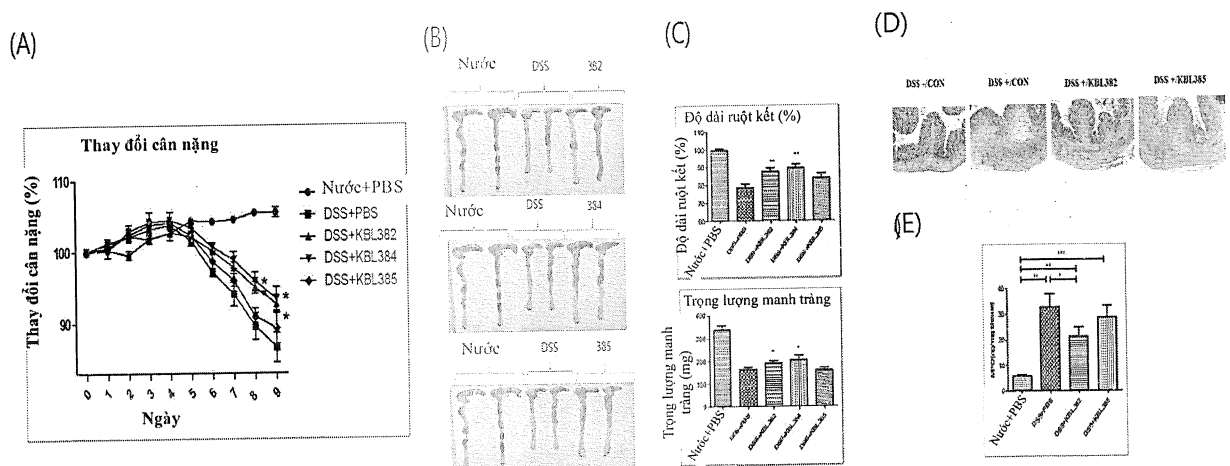


FIG. 5

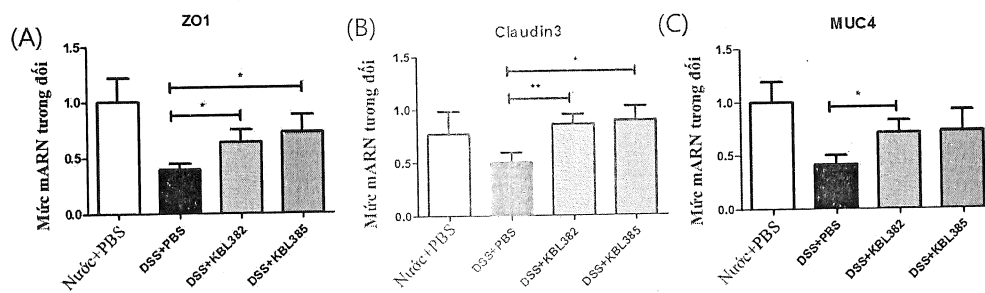


FIG. 6

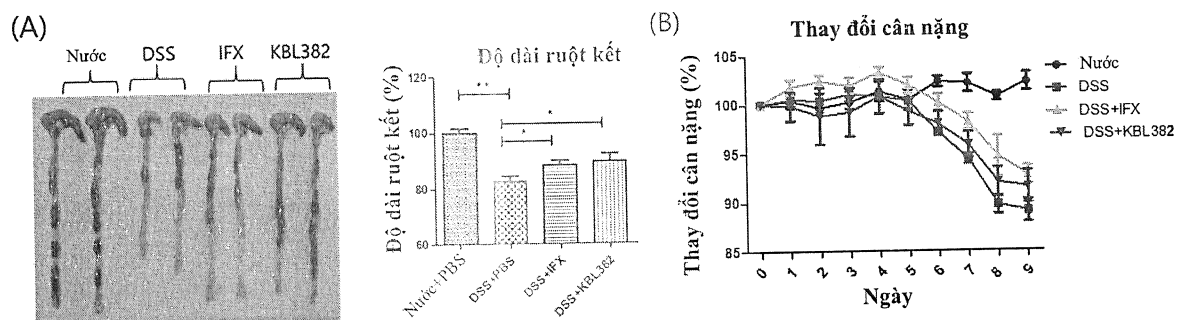
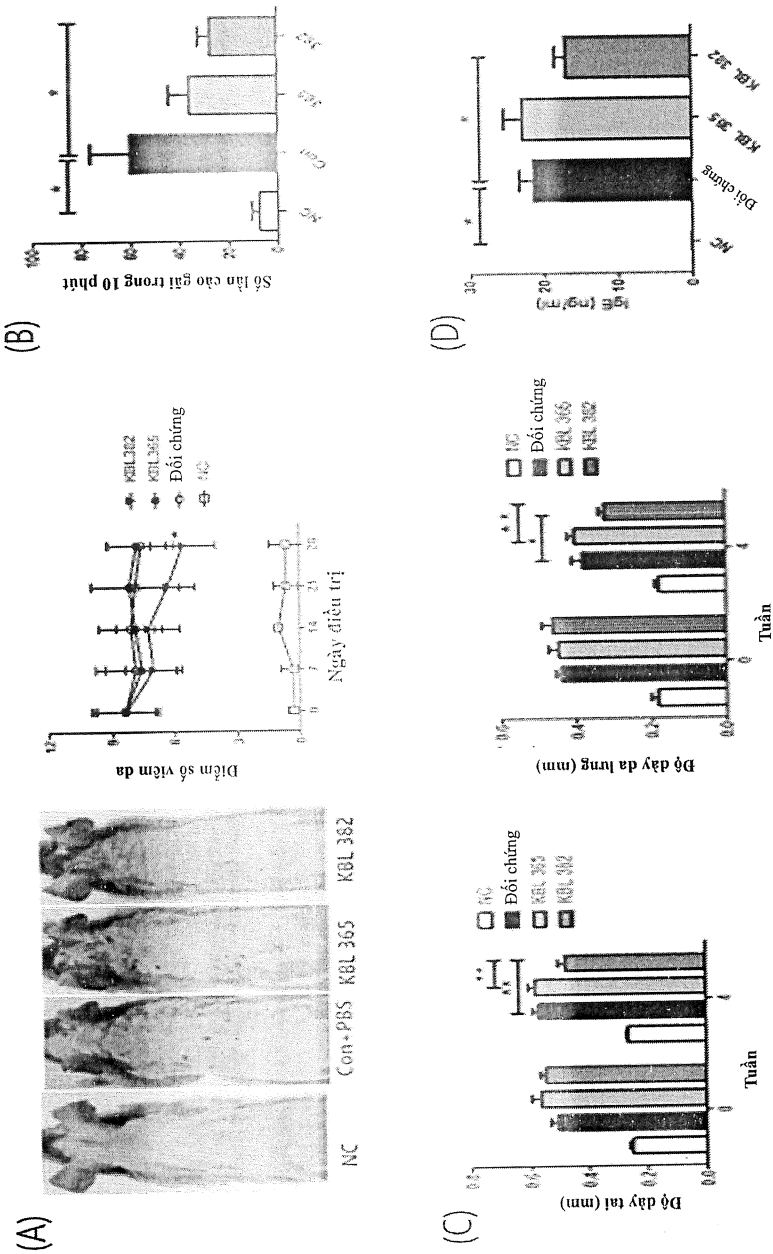


FIG. 7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ko BioLabs, Inc.
 <120> CHỦNG LACTOBACILLUS PARACASEI, THỰC PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY
 <130> PP-B2198
 <150> KR 10-2018-0053279
 <151> 2018-05-09
 <160> 21
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1472
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus paracasei
 <400> 1
 gcaggtggcg ggtgctatac atgcagtcga cgagttctcg ttgatgatcg gtgcttgac
 60
 cgagattcaa catggaacga gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta
 120
 agtgggggat aacatttgga aacagatgct aataccgcat agatccaaga accgcatggt
 180
 tcttggtga aagatggcgt aagctatcgc ttttgatgg acccgcggcg tattagctag
 240
 ttggtgaggt aatggctcac caaggcgaat atacgtagcc gaactgagag gttgatcggc
 300
 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca
 360
 caatggacgc aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggcttt cgggtcgtaa
 420
 aactctgttg ttggagaaga atggtcggca gagtaactgt tgcggcgtg acggtatcca
 480
 accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt
 540
 tatccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt tttaagtctg atgtgaaagc
 600
 cctcggctta accgaggaag cgcacggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag
 660

tggaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg
720

cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagca tgggtagcga acaggattag
780

ataccctggg agtccatgcc gtaaacgatg aatgctaggt gttggagggt ttccgccctt
840

cagtgccgca gctaacgcat taagcattcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac
900

tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac
960

gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ttgatcacct gagagatcag gtttcccctt
1020

cgggggcaaa atgacagggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt
1080

taagtcccg c aacgagcgca acccttatga ctagttgcc a gcatttagtt gggcactcta
1140

gtaagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtgggggatga cgtcaaatca tcatgccctt
1200

tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa cgagttgcga gaccgcgagg
1260

tcaagctaata ctcttaaagc cattctcagt tcggactgta ggctgcaact cgcctacacg
1320

aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag cacgccgcgg tgaatacggt cccgggcctt
1380

gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacaccc gaagccggtg gcgtaaccct
1440

ttagggagcg agcgtctaag tggtcacgc ct
1472

<210> 2
<211> 1479
<212> ADN
<213> Lactobacillus paracasei

<400> 2
gccagtggg ggggtgctat acatgcagtc gaacgagttc tcgttgatga tcggtgcttg
60

caccgagatt caacatggaa cgagtggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgccc
120

ttaagtgggg gataacattt ggaaacagat gctaataccg catagatcca agaaccgcat
180

ggttcttggc tgaaagatgg cgtaagctat cgcttttggg tggacccgcg gcgtattagc
240

tagttgggtga ggtaatggct caccaaggcg atgatacgta gccgaactga gaggttgatc
300

ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatctt
360

ccacaatgga cgcaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggc ttctgggtcg
420

taaaactctg ttgttgaga agaatggctg gcagagtaac tggtgtcggc gtgacgggat
480

ccaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag
540

cgttatccgg atttattggg cgtaaagcga ggcgagggcg ttttttaagt ctgatgtgaa
600

agccctcggc ttaaccgagg aagcgcatcg gaaactggga aacttgagtg cagaagagga
660

cagtggaaact ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga
720

aggcggctgt ctggtctgta actgacgctg aggcctcgaaa gcatgggtag cgaacaggat
780

tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgaatgcta ggtgttggag ggtttccgcc
840

cttcagtgcc gcagctaacg cattaagcat tccgcctggg gagtacgacc gcaaggttga
900

aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggaggag catgtgggtt aattcgaagc
960

aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cttttgatca cctgagagat caggtttccc
1020

cttcgggggc aaaatgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg
1080

ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccotta tgactagttg ccagcattta gttgggcact
1140

ctagtaagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1200

ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta caacgagttg cgagaccgcg
1260

aggtcaagct aatctcttaa agccattctc agttcggact gtaggctgca actcgcctac
1320

acgaagtcgg aatcgctagt aatcgcggat cagcacgccg cggatgaatac gttccccggg
1380

cttgtagaca ccgcccgtca caccatgaga gtttgtaaca cccgaagccg gtggcgtaac
1440

cctttaggga gcgagccgtc taaggtgaac caaagtttg
1479

<210> 3
<211> 1473
<212> ADN
<213> Lactobacillus paracasei

<400> 3
gcagttgggg gggagctata catgcagtcg acgagttctc gttgatgatc ggtgcttgca
60

ccgagattca acatggaacg agtggcggac gggtagagtaa cacgtgggta acctgccctt
120

aagtggggga taacatttgg aaacagatgc taataccgca tagatccaag aaccgcatgg
180

ttcttggtg aaagatggcg taagctatcg cttttggatg gaccgcgggc gtattagcta
240

gttggtgagg taatggctca ccaaggcgat gatacgtagc cgaactgaga ggttgatcgg
300

ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
360

acaatggacg caagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaaggctt tcgggtcgta
420

aaactctgtt gttggagaag aatggtcggc agagtaactg ttgccggcgt gacggtatcc
480

aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
540

ttatccgat ttattgggcg taaagcgagc gcaggcggtt ttttaagtct gatgtgaaag
600

ccctcggctt aaccgaggaa gcgcacgcga aactgggaaa cttgagtga gaagaggaca
660

gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag
720

gcggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag gctcgaaagc atgggtagcg aacaggatta
780

gataccctgg tagtccatgc cgtaaacgat gaatgctagg tggtggaggg tttccgccct
840

tcagtgccgc agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacgaccgc aagggtgaaa
900

ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
960

cgcaagaac cttaccaggt cttgacatct tttgatcacc tgagagatca gggttcccct
1020

tcgggggcaa aatgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatggtggg
1080

ttaagtcccc caacgagcgc aacccttatg actagttgcc agcatttagt tgggcactct
1140

agtaagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtgggggatg acgtcaaata atcatgcccc
1200

ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcg agaccgcgag
1260

gtcaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggactgt aggctgcaac tcgcctacac
1320

gaagtgcgaa tcgctagtaa tcgcggatca gcacgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
1380

tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc cgaagccggt ggcgtaaccc
1440

tttagggagc gagccgtcta agtgtacaaa gtt
1473

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 4
ccagcagaga atggaaagtc
20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 5
gatgcttctt acatgtctcg
20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 6
ccccaaggaa ttgacagttg
20

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 7
gggaaactaa agctcacaaa c
21

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 8

ctgcaatgcc tgtgggctc

19

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 9

gactgcaggg actctcgct

19

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 10

aagactcatc gccaaagcat

20

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 11

tccacatgct ggctacaca

19

<210> 12

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 12

tcaagcactg ccaggcg

17

<210> 13

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 13

caggagccct tgcggat

18

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 14

acccgaaact gatgctgtgg atag

24

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 15

aaatggccgg gcagaacttg tgta

24

<210> 16

<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 16
cagacgtccg tcagttttcg
20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 17
catggctgct ggacttgaac
20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 18
gtctcccatc acggttcagt
20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 19
tgtcattcca cactcccaga
20

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 20
ttatggacag gactgaaaga c
21

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 21
gctttaatgt aatccagcag gt
22