



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0047727

(51)^{2020.01} C12N 1/20; A23L 33/135; A61K 35/747; (13) B
C12R 1/225; A61P 13/12; A23K 10/16;
A61P 1/00

(21) 1-2022-02377

(22) 29/09/2020

(86) PCT/KR2020/013379 29/09/2020

(87) WO 2021/066549 08/04/2021

(30) 10-2019-0122531 02/10/2019 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 26/09/2022 414A

(73) KoBioLabs, Inc. (KR)

220-628, 1, Gwanak-ro, Gwanak-Gu, Seoul 08826, Republic of Korea

(72) LEE, Kiuk (KR); SONG, Seok Cheon (KR); NAM, Tae Wook (KR); HAN, Seung Hyeok (KR); NAM, Bo Young (KR); PARK, Ji Min (KR).

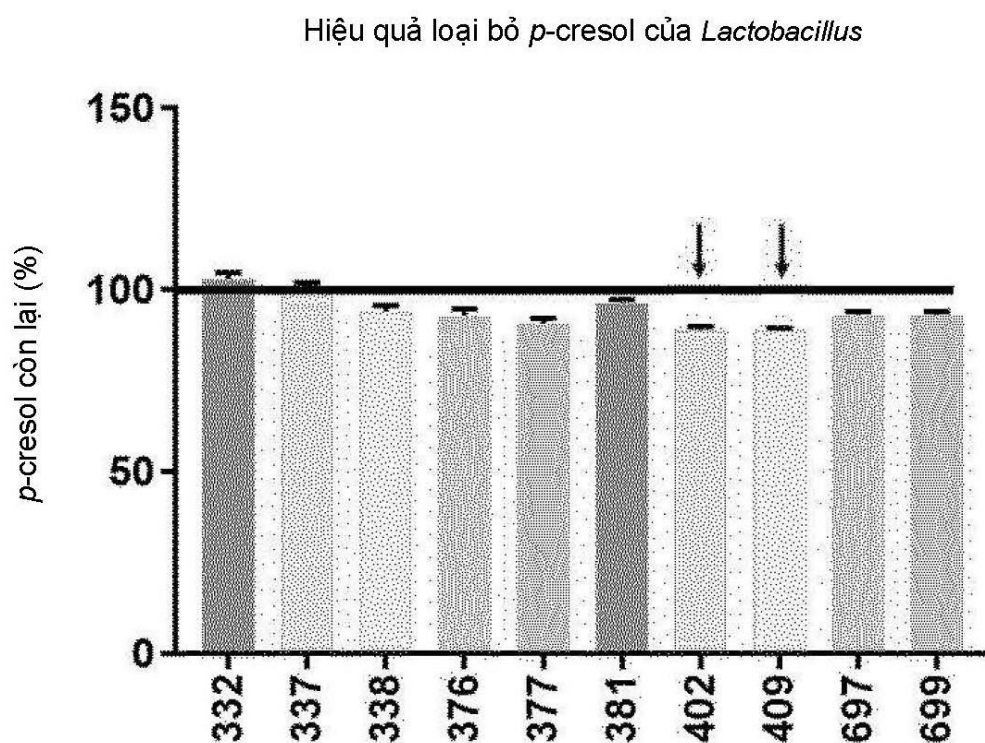
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHỦNG LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS KBL409, CHẾ PHẨM THỰC PHẨM, CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHĂN NUÔI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY

(21) 1-2022-02377

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409, trong đó chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số nộp lưu KCTC 13518BP) theo sáng chế làm giảm viêm thận, làm giảm nồng độ độc tố ure huyết chẳng hạn như nitơ ure huyết, creatinin và p-cresol để bảo vệ thận, và nhờ đó có thể sử dụng hữu ích cho ứng dụng phòng ngừa và điều trị bệnh thận bao gồm cải thiện chức năng của thận và bệnh suy thận mạn tính. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi và dược phẩm chứa chủng này.

[FIG. 3]



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 và việc sử dụng chủng này, và cụ thể hơn là chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 probiotic (lợi khuẩn) mới và được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chế phẩm thực phẩm và chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy, dịch tan và phần chiết của chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh thận mạn tính (chronic renal disease - CKD) là bệnh đã nổi lên là vấn đề sức khỏe toàn cầu, và đã báo cáo rằng ở Mỹ, 13% của toàn bộ tập hợp nghiên cứu thể hiện bệnh suy thận mạn tính ở tần suất một trên mười trên thế giới. Bệnh suy thận mạn tính là bệnh khó mong đợi sự hồi phục đảo ngược được dễ dàng, và cần chuẩn bị thẩm tách hoặc cấy ghép trong tình trạng bệnh suy thận giai đoạn cuối nếu chức năng của thận giảm dần và đi vào 5 giai đoạn của bệnh suy thận mạn tính.

Đến nay, việc điều trị bệnh suy thận đã biết được tập trung chỉ vào điều trị biến chứng do suy giảm chức năng của thận, và chưa có thuốc mà có thể về cơ bản phục hồi bệnh suy thận. Trong các thập kỷ gần đây, một số thuốc đã cố gắng ngăn ngừa sự tiến triển đối với bệnh suy thận, nhưng chỉ ở mức độ thuốc phong bế hệ renin-angiotensin (Renin-angiotensin system - RAS) chỉ làm giảm bớt bệnh suy thận ở một mức nhất định, và đến nay vẫn chưa có thuốc thông dụng nào hữu ích theo lâm sàng trong việc phục hồi bệnh suy thận này.

Khi bệnh suy thận tiến triển, các biến chứng khác nhau xảy ra do độc tố ure huyết tích tụ trong cơ thể. Các độc tố ure huyết này được coi là nguyên nhân của các biến chứng chính, chẳng hạn như gây ra đáp ứng viêm và mất cân bằng oxy hóa trong cơ thể, và thúc đẩy sự lão hóa mạch máu (Cachofeiro V et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. Kidney Int Suppl 2008:S4-9; Wu J et al. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. Biomed Res Int 2014; 2014:615312). Các chất trong nước tiểu bao gồm *p*-cresyl

sulfat (PCS), indoxyl sulfat (IS), và trimetylamin-N-oxit (TMAO), và báo cáo rằng mức PCS, IS, TMAO trong huyết thanh và nước tiểu là cao hơn bình thường ở bệnh nhân mắc bệnh suy thận mạn tính (Ramezani A et al., Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. Am J Kidney Dis. 2016 67:483-498). Chúng là các chất chuyển hóa thứ cấp được chuyển hóa trong gan sau khi hấp thụ *p*-cresol, indol, Trimetylamin (TMA), mà là chất chuyển hóa được tạo ra bởi sự thoái biến tyrosin (hoặc phenylalanin), tryptophan và cholin trong ruột từ thức ăn bởi khu hệ vi sinh vật trong ruột, qua tế bào biểu mô (xem FIG. 25 dưới đây).

Nguyên nhân quan trọng nhất của việc tích tụ các độc tố ure huyết này trong cơ thể là sự giảm bài tiết của thận. Tuy nhiên, một phần đáng kể độc tố ure huyết là sản phẩm thải nitơ được tạo ra trong ruột sau khi thức ăn được hấp thụ qua đường miệng, và điều này bị ảnh hưởng lớn bởi môi trường và vi sinh vật trong ruột. Do đó, khái niệm “thấm tách qua ruột” được đưa vào, và màng nhầy ruột hoạt động như màng bán thấm để bài tiết một số chất thải vào trong ruột. Thực tế, thuốc được phát triển để ức chế sự hấp thụ độc tố ure huyết xảy ra trong ruột được sử dụng trong thực tiễn lâm sàng, và thuốc chẳng hạn như chất liên kết phospho và chất ức chế làm giảm kali là thuốc mà khiến các chất cụ thể chẳng hạn như phospho hoặc kali không được hấp thụ trong ruột. Ngoài ra, AST-120 (Kremezin®, Kureha-Chemical Co., Tokyo, Nhật Bản) là chất hấp phụ qua đường miệng bao gồm vi cầu cacbon, và đây là thuốc gây ra sự bài tiết qua phân bằng cách hấp phụ các chất gốc indol mà là độc tố ure huyết tiêu biểu xuất hiện trong ruột. Tuy nhiên, hầu hết các thuốc này có tác dụng phụ đến hệ tiêu hóa chẳng hạn như chứng khó tiêu, buồn nôn, nôn mửa, và táo bón, vì vậy mức tuân thủ với thuốc này thấp hơn so với mức tuân thủ với các thuốc thông dụng khác. Do đó, vẫn chưa có phương pháp hiệu quả để loại bỏ ure huyết khác với phương pháp thẩm tách hoặc cấy ghép.

Probiotic chỉ vi sinh vật và sản phẩm được tạo ra bởi vi sinh vật có hoạt tính kháng khuẩn và enzym giúp cân bằng hệ vi sinh vật trong ruột. Ngoài ra, probiotic được định nghĩa là vi khuẩn sống ở dạng đơn độc hoặc cộng sinh mà được cung cấp cho người hoặc động vật ở dạng tế bào khô hoặc sản phẩm lên men để cải thiện hệ vi sinh vật trong ruột. Đặc tính mà probiotic nên có là sống được trong ruột của người, có đặc tính không gây bệnh và không độc, và phải tồn tại được khi đi vào ruột. Ngoài ra, nó phải duy trì tỷ lệ sống sót và hoạt tính trước khi tiêu thụ trong thức ăn mang nó, nhạy với kháng sinh được sử dụng để ngăn ngừa nhiễm trùng, và phải không chứa plasmit kháng kháng sinh.

Ngoài ra, nó phải có tính kháng với axit, enzym, và mật trong môi trường ruột. Gần đây, probiotic đã được nêu bật là chất trị liệu chính mà có thể thay thế chất trị liệu gốc hợp chất hiện có vì các tác dụng trong việc cải thiện chức năng của sức khỏe đã được báo cáo.

Qua các nghiên cứu gần đây, quần thể vi sinh vật khỏe mạnh trong ruột đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa dinh dưỡng và chuyển hóa, đáp ứng miễn dịch, và sự mất cân bằng vi sinh vật trong ruột đã được báo cáo là liên quan đến các bệnh khác nhau chẳng hạn như chứng béo phì, bệnh đái tháo đường typ 2, bệnh viêm thận, biến chứng tim mạch, v.v.. Trong trường hợp bệnh suy thận mạn tính, sự sinh trưởng của các chủng mà không được nhận thấy ở người bình thường trong ruột tá và ruột chày của bệnh nhân cũng được quan sát, và cụ thể là nhận thấy sự tăng sinh quá mức của các chủng hiếu khí, một số tài liệu đã báo cáo rằng các chủng chẳng hạn như vi khuẩn ruột hoặc *Enterococci* tăng gấp nhiều hơn 100 lần ở bệnh nhân thẩm tách máu (Simenhoff ML et al. Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22:92-96; Hida M et al., Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis. *Nephron* 1996; 74:349-355). Cũng có báo cáo ở bệnh nhân mắc bệnh suy thận mạn tính rằng sự giảm thiểu các chủng *Lactobacillus* hoặc *Bifidobacteria* đã biết làm cân bằng sự cân bằng thích hợp môi trường vi khuẩn trong ruột, tạo ra axit béo mạch ngắn để ức chế sự lây nhiễm nấm men, nấm và vi khuẩn có hại, và tiết các chất chuyển hóa khác nhau, cuối cùng dẫn đến sự mất cân bằng trong ruột (Koppe L et al., Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int* 2015; 88:958-966; Ramezani A & Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25:657-670; Ranganathan N et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy renal function in patients with chronic kidney disease. *Adv Ther* 2010; 27:634-647).

Do đó, gần đây các thử nghiệm đã được báo cáo để làm giảm biến chứng do bệnh ure huyết và cải thiện chức năng của thận bằng cách chuyển hóa môi trường vi khuẩn không cân bằng trong ruột thành môi trường khỏe mạnh ở bệnh nhân mắc bệnh suy thận mạn tính. Cụ thể, khi probiotic bao gồm chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacteria* được

dùng trong 16 tuần qua thử nghiệm ở mô hình cắt 5/6 quả thận sử dụng chuột nhắt Sprague Dawley, mức nitơ trong máu được giảm đi và tác dụng cải thiện chức năng của thận nhờ sử dụng probiotic được kỳ vọng (Ranganathan N et al. Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats. ScientificWorldJournal 2005; 5:652-660). Bệnh nhân cũng thể hiện kết quả dương tính trong nghiên cứu lâm sàng, và đã thể hiện trong năm 1996 rằng chúng hạ mức nitơ ure huyết (blood ure nitrogen - BUN), mà là chỉ thị của bệnh suy thận, khi probiotic được dùng ở bệnh nhân mắc bệnh suy thận mạn tính bởi vì họ báo cáo dimethylamin (DMA) và Nitrosodimethylamin trong máu bằng cách dùng chủng *Lactobacillus* qua đường miệng cho bệnh nhân mắc bệnh suy thận giai đoạn cuối đã trải qua 8 lần thẩm tách (Ranganathan N et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy renal function in patients with chronic kidney disease. Adv Ther 2010; 27:634-647; Ranganathan N et al. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. Curr Med Res Opin 2009; 25:1919-1930). Trong nghiên cứu ngẫu nhiên hóa, mù đôi trong đó bệnh nhân mắc bệnh suy thận mạn tính tiến triển lần đầu, chế phẩm viên nang bao ruột trong đó probiotic và prebiotics được trộn và dùng cho bệnh nhân ở giai đoạn 4 của bệnh suy thận mạn tính được quan sát là làm giảm đáng kể mức *p*-cresol trong máu, mà là ure huyết phát triển trong ruột quan trọng, trong khi không làm giảm mức indoxyl sulfat trong máu của toàn bộ bệnh nhân, nhưng làm giảm đáng kể ở bệnh nhân không tiếp xúc với kháng sinh. Ngoài ra, được báo cáo rằng có sự tăng đáng kể chủng *Bifidobacteria* trong phép phân tích vi khuẩn trong ruột, mà có thể cải thiện môi trường ruột (Rossi M et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. Clin J Am Soc Nephrol 2016; 11:223-231).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo đó, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế bằng cách xác nhận là chủng *Lactobacillus acidophilus* mới có tác dụng tốt trong việc ngăn ngừa viêm thận, làm giảm độc tố ure huyết, làm giảm protein niệu, phục hồi chức năng của ty thể thận và ngăn ngừa xơ hóa thận, và hữu ích trong việc cải thiện chức năng của thận và điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh thận để điều trị bệnh thận, và do đó, đã được thực hiện để nghiên cứu các probiotic cho bệnh thận bao gồm bệnh suy thận mạn tính mà chưa có điều trị làm

thỏa mãn trước đây.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Lactobacillus acidophilus* mới và việc sử dụng chủng này, mà thể hiện tác dụng tốt trong việc cải thiện chức năng của thận, hoặc ngăn ngừa và điều trị bệnh thận.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 có số nộp lưu KCTC 13518BP.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận nhờ sự giảm viêm thận, giảm nồng độ độc tố ure huyết trong máu, giảm protein niệu, phục hồi chức năng của ty thể thận và/hoặc ức chế xơ hóa thận.

Theo sáng chế, độc tố ure huyết có thể bao gồm nitơ ure huyết, creatinin máu và/hoặc *p*-cresol máu.

Theo sáng chế, bệnh thận có thể được chọn từ, nhưng không giới hạn ở, nhóm bao gồm ure huyết, bệnh suy thận mạn tính, bệnh suy thận cấp tính, bệnh suy thận bán cấp, xơ hóa thận, viêm thận tiểu cầu, viêm thận-bể thận, viêm thận kẽ, protein niệu, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh thận do huyết áp cao, chứng loạn thần kinh ác tính, viêm thận do luput, bệnh mao mạch huyết khối, thải ghép, bệnh tiểu cầu thận, chứng phì đại thận, chứng tăng sản thận, bệnh thận do chất cản quang gây ra, tổn thương thận do độc tố gây ra, bệnh thận do gốc oxy tự do, bệnh thận đa nang và viêm thận.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này và phần chiết của chủng này.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này và phần chiết của chủng này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với chủng probiotic bổ sung có khả năng tăng cường tác dụng cải thiện chức năng của thận của chủng *Lactobacillus*

acidophilus (KBL409) theo sáng chế, chẳng hạn như *Lactobacillus paracasei* và/hoặc *Lactobacillus plantarum*. Tốt hơn là, chủng probiotic bổ sung này bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (số nộp lưu KCTC13509BP) và/hoặc *Lactobacillus plantarum* KBL396 (số nộp lưu KCTC13278BP).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, bao gồm bước dùng cho cá thể cần điều trị ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này, và phần chiết của chủng này.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chế phẩm để bào chế thuốc trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này và phần chiết của chủng này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là kết quả so sánh khả năng thoái biến *p*-cresol của 67 loại chủng *Lactobacillus* và chủng *Lactococcus*.

FIG. 2 là kết quả so sánh khả năng thoái biến *p*-cresol của 33 loại chủng *Bifidobacterium*.

FIG. 3 là kết quả so sánh khả năng thoái biến *p*-cresol của 10 loại chủng *Lactobacillus* ứng viên thể hiện khả năng thoái biến *p*-cresol cao.

FIG. 4 là kết quả thể hiện khả năng thoái biến *p*-cresol theo thời gian điều trị của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409.

FIG. 5 là kết quả xác nhận mức biểu hiện IL-2, IL-4, IL-13 và IL-17A của PBMC khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được điều trị.

FIG. 6 là kết quả xác nhận mức biểu hiện IFN- γ của PBMC khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được điều trị.

FIG. 7 là kết quả xác nhận mức biểu hiện IL-10 của PBMC khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được điều trị.

FIG. 8 là biểu đồ dạng sơ đồ của thí nghiệm xác định tác dụng bảo vệ thận của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 ở mô hình động vật mắc bệnh suy thận mạn

tính.

FIG. 9 là kết quả thể hiện sự thay đổi chức năng của thận bằng cách dùng adenin và chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409.

FIG. 10 là kết quả thể hiện sự thay đổi của albumin niệu bằng cách dùng adenin và chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409.

FIG. 11 là kết quả thể hiện sự thay đổi của hình thái của thận và xơ hóa thận bằng cách dùng adenin và chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409: (A) nhóm đối chứng, (B) nhóm dùng KBL409, (C) nhóm dùng thức ăn adenin, (D) nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409.

FIG. 12 là kết quả thể hiện sự thay đổi của mức biểu hiện mRNA của Procolla và Acta2 bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 trong khi gây bệnh suy thận mạn tính.

FIG. 13 là kết quả thể hiện sự thay đổi của chỉ số protein liên quan đến thận do xơ hóa suy thận mạn tính gây ra khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được dùng.

FIG. 14 là kết quả thể hiện sự thay đổi các chỉ số liên quan đến đại thực bào ở thận khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được dùng.

FIG. 15 là kết quả xác nhận sự thay đổi của đại thực bào ở mô thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 thông qua kiểm tra hóa học mô miễn dịch: (A) nhuộm F4/80, (B) nhuộm CD68.

FIG. 16 là kết quả thể hiện sự thay đổi mức biểu hiện mRNA của Tlr4, Asc, Nlrp3, IL-18 ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409.

FIG. 17 là kết quả xác nhận sự thay đổi của hoạt tính NRLP3 trong mô thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 thông qua kiểm tra hóa học mô miễn dịch.

FIG. 18 là kết quả xác nhận sự thay đổi hình thái của ty thể ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 thông qua kính hiển vi điện tử truyền qua.

FIG. 19 là kết quả thể hiện sự thay đổi của đáp ứng viêm hệ thống ở mô hình gây suy thận mạn tính khi chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 được dùng.

FIG. 20 là kết quả thể hiện sự thay đổi của nồng độ *p*-cresol máu theo việc dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409: (A) So sánh với *E. coli* (B) So sánh giữa các chủng *Lactobacillus acidophilus*.

FIG. 21 là kết quả thể hiện sự thay đổi của nồng độ TMAO máu theo việc dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409.

FIG. 22 là kết quả thể hiện sự thay đổi của mức biểu hiện mRNA của Nlrp3 và Pre-IL18 ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 một mình, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL382, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL396.

FIG. 23 là kết quả thể hiện sự thay đổi của mức biểu hiện mRNA của Ppargc1a, Tfam và Mfn1 ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 một mình, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL382, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL396.

FIG. 24 là kết quả thể hiện sự thay đổi của mức biểu hiện mRNA của Fn và Procoll1 ở thận và sự thay đổi của tỷ lệ Bax/Bcl2 ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra bằng cách dùng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 một mình, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL382, dùng kết hợp chủng KBL409 và KBL396.

FIG. 25 là biểu đồ dạng sơ đồ minh họa con đường mà tyrosin, tryptophan, và cholin được chứa trong thức ăn được chuyển hóa thành độc tố ure huyết nhờ khu hệ vi sinh vật trong ruột và gan.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa với cách hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Nói chung, danh pháp được sử dụng ở đây là các danh pháp đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo sáng chế, chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số truy cập KCTC 13518BP) có hiệu quả tốt trong việc cải thiện chức năng của thận được chọn bằng cách xác nhận tác động đến ure huyết của vi sinh vật có nguồn gốc từ người, và 16S rADN

của chủng này được phân tích để xác nhận là chủng này là chủng mới chưa được biết đến trong tài liệu kỹ thuật trước đó.

Theo đó, sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số nộp lưu KCTC 13518BP), là probiotic mới từ một khía cạnh, trong đó chủng này được đặc trưng là bao gồm trình tự 16s rADN được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1 dưới đây.

<SEQ ID NO: 1> trình tự 16s rADN của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số nộp lưu KCTC 13518BP)

```
GGGAAAGTTGCGGGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAGATTCACCTTCGGTGAT
GACGTTGGGAACGCGAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGG
ATACCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAGG
CGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTAC
CAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCC
AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGT
AACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAA
GTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCG
AAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTG
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCTAGTGCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCTTCGGGGACACTAAGACAGGTGGT
GCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT
CATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGACAGTACA
ACGAGGAGCAAGCCTGCGAAGGCAAGCGAATCTCTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCT
GCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCT
AACCCTCGGGAAGGAGCCGTCTAAGCAGTCAGGTGTTCC
```

Do đó, theo sáng chế, thí nghiệm về hiệu lực trên chủng được tiến hành, và do đó, xác nhận là chủng không chỉ làm giảm viêm thận và có tác dụng thoái biến độc tố ure huyết gây ra bệnh suy thận mạn tính tốt, mà còn thể hiện tác dụng làm giảm protein niệu, phục hồi chức năng của ty thể thận và ức chế xơ hóa thận, và nhờ đó thể hiện tác dụng tốt trong việc tăng cường chức năng của thận để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh thận.

Cụ thể là, chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế thể hiện làm giảm đáng kể nồng độ độc tố ure huyết chẳng hạn như nitơ ure huyết, creatinin máu và/hoặc *p*-cresol máu, và protein niệu ở mô hình động vật mắc bệnh suy thận mạn tính.

Ngoài ra, chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế làm giảm đáng kể mức biểu hiện của mARN Procolla và Acta2, là chỉ thị của xơ hóa thận, và Collagen1, Fibronectin, α -SMA và Vimentin, và xác nhận rằng kiểm tra mô bệnh học cũng làm giảm bớt sự giãn nở ống thận, sự phẳng của tế bào ống thận, sự mở rộng và tích tụ chất nền của kẽ ống, và sự tăng đặc điểm xơ hóa thận của bệnh suy thận.

Ngoài ra, chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế được phát hiện là làm giảm đáp ứng viêm hệ thống ở mô hình bệnh suy thận mạn tính bằng cách không chỉ ức chế sự thâm nhiễm của đại thực bào ở kẽ ống và sự biểu hiện của inflammasom ở thận, mà còn phục hồi rối loạn chức năng ty thể xảy ra ở bệnh suy thận mạn tính và ức chế IL-6 và TNF- α .

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh, dược phẩm này chứa ít nhất một lượng có hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm khuẩn lạc của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này và phân chiết của chủng này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng dược phẩm trong đó khuẩn lạc của vi khuẩn sống, chủng sấy khô, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này, hoặc tổ hợp của chúng được kết hợp với chất mang hoặc môi trường dược dụng. Chất mang hoặc môi trường được sử dụng có thể bao gồm dung môi, chất phân tán, chất phủ, chất tăng cường hấp thụ, chất giải phóng có kiểm soát (tức là, chất giải phóng kéo dài), và một hoặc nhiều tá dược trợ (ví dụ, tinh bột, polyol, hạt, xenluloza siêu mịn (microfine), xenluloza vi tinh thể, chất pha loãng, chất bôi trơn, chất kết dính, chất gây phân rã, v.v.), v.v. Nếu muốn, dạng bào chế viên nén của chế phẩm được bọc lộ có thể được phủ bằng kỹ thuật trong nước hoặc không trong nước tiêu chuẩn. Ví dụ về chất mang và tá dược dược dụng và các thành phần bổ sung này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất kết dính, chất độn, chất gây phân rã, chất bôi trơn, chất kháng khuẩn và chất phủ.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo ra dạng giải phóng nhanh, kéo dài hoặc chậm của thành phần hoạt tính sau khi dùng cho động vật. Dạng bào chế có thể ở dạng bột, hạt, viên nén, nhũ tương, xirô, khí dung, viên nang gelatin mềm hoặc cứng, dung dịch tiêm được tiệt trùng, hoặc bột tiệt trùng. Ngoài ra, chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị

bệnh thận theo sáng chế có thể được dùng qua một số đường dùng bao gồm miệng, qua da, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ, và liều lượng của thành phần hoạt tính có thể được chọn thích hợp tùy vào các yếu tố khác nhau chẳng hạn như đường dùng, tuổi, giới tính, và cân nặng của bệnh nhân, và mức độ nghiêm trọng của bệnh nhân, và chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận theo sáng chế này có thể được dùng kết hợp với chất đã biết có hiệu quả cải thiện chức năng của thận hoặc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chẳng hạn như chất phong bế hệ renin-angiotensin.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng dạng bào chế bao tan trong ruột, cụ thể, dưới dạng dạng liều đơn vị để sử dụng qua đường miệng. Như được sử dụng ở đây, “lớp bao tan trong ruột” bao gồm tất cả các chất phủ được dụng đã biết mà không được phân hủy bởi axit dạ dày để duy trì lớp phủ, nhưng được phân hủy đủ trong ruột non để thành phần hoạt tính có thể được giải phóng vào trong ruột non. “Lớp bao tan trong ruột” theo sáng chế chỉ lớp phủ được duy trì nguyên trạng trong ít nhất 2 giờ khi nó được mang đến tiếp xúc với dịch vị nhân tạo, chẳng hạn như dung dịch HCl có độ pH 1, ở từ 36°C đến 38°C, và tốt hơn là sau đó, tan rã trong vòng 30 phút trong dịch ruột nhân tạo chẳng hạn như dung dịch đệm KH_2PO_4 có độ pH 6,8.

Lớp bao tan trong ruột theo sáng chế được phủ với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 16 đến 30, tốt hơn là từ 16 đến 20 hoặc không nhiều hơn 25 mg trên mỗi lõi. Khi độ dày của lớp bao tan trong ruột theo sáng chế nằm trong khoảng từ 5 đến 100 μm , tốt hơn là từ 20 đến 80 μm , thu được kết quả mong muốn là lớp bao tan trong ruột. Vật liệu của lớp bao tan trong ruột được chọn thích hợp từ vật liệu polyme đã biết. Vật liệu polyme thích hợp được mô tả trong nhiều công bố đã biết (L. Lachman et al., *Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd ed., 1986, pp. 365-H. Sucker et al., *Pharmazeutische Technologie*, Thieme, 1991, pp. 355-359; Hagers). *Handbuchder pharmazeutischen Praxis*, 4th ed., Vol. 7, pp. 739-742, và 766-778, (Springer Verlag, 1971); và Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 13th ed., pp. 1689-1691 (Mack Publ., Co., 1970))), mà có thể bao gồm dẫn xuất xenluloza este, xenluloza ete, metyl acrylat copolyme của nhựa acrylic và copolyme của axit maleic và dẫn xuất của axit phthalic.

Lớp bao tan trong ruột theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp bao tan trong ruột thông dụng trong đó dung dịch bao tan trong ruột được phun lên trên lõi. Dung môi thích hợp được sử dụng trong quy trình bao tan trong ruột bao gồm rượu chẳng hạn như etanol, keton chẳng hạn như axeton, và dung môi

hydrocacbon được halogen hóa chẳng hạn như diclometan (CH_2Cl_2), và dung môi hỗn hợp của các dung môi này có thể được sử dụng. Chất làm mềm chẳng hạn như di-n-butylphthalat hoặc triaxetin được bổ sung vào dung dịch phủ với tỷ lệ 1 trên khoảng 0,05 đến khoảng 0,3 (vật liệu phủ so với chất làm mềm). Thích hợp nếu thực hiện quy trình phun một cách liên tục, và có thể điều chỉnh lượng phun khi xét đến điều kiện phủ. Áp suất phun có thể được điều chỉnh khác nhau theo từng trường hợp, và nói chung, kết quả mong muốn là thu được với áp suất phun từ khoảng 1 đến khoảng 1,5 bar.

Theo sáng chế, “bệnh thận” chỉ tất cả tình trạng bệnh trong đó thận không thực hiện bài tiết, điều hòa, chuyển hóa và chức năng nội tiết theo cách bình thường, và trong đó nói chung chức năng bị suy giảm hoặc khác thường, và bao gồm tất cả bệnh thận mạn tính, bao gồm tất cả các bệnh mà không rõ ràng và có chức năng thay đổi chất nền và lọc tiểu cầu giảm. Chức năng suy giảm do tổn thương thận dẫn đến sự to lên của thận và cấu trúc liên quan, teo thận, thay đổi thể tích dịch cơ thể, mất cân bằng chất điện phân, nhiễm axit chuyển hóa, rối loạn trao đổi khí, chức năng chống nhiễm trùng suy giảm, và tích tụ độc tố ure huyết.

Theo sáng chế, bệnh thận chỉ bệnh có thể được cải thiện, điều trị hoặc ngăn ngừa nhờ giảm viêm thận, nitơ ure huyết, giảm nồng độ độc tố ure huyết trong máu chẳng hạn như nitơ ure huyết, creatinin hoặc *p*-cresol, giảm protein niệu, phục hồi chức năng của ty thể thận và/hoặc ức chế xơ hóa thận. Cụ thể là, bệnh thận bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ure huyết, bệnh suy thận mạn tính, bệnh suy thận cấp tính, bệnh suy thận bán cấp, xơ hóa thận, viêm thận tiểu cầu, viêm thận-bể thận, viêm thận kẽ, protein niệu, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh thận do huyết áp cao, chứng loạn thần kinh ác tính, viêm thận do luput, bệnh mao mạch huyết khối, thải ghép, bệnh tiểu cầu thận, chứng phì đại thận, chứng tăng sản thận, bệnh thận do chất cản quang gây ra, tổn thương thận do độc tố gây ra, bệnh thận do gốc oxy tự do, bệnh thận đa nang và viêm thận.

Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị”, trừ khi có quy định khác, có nghĩa là làm đảo ngược, làm giảm bớt, hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn mà thuật ngữ áp dụng vào, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “ngăn ngừa” đề cập đến ngăn chặn, làm chậm, ngăn cản, hoặc cản trở bệnh để làm giảm nhẹ bệnh.

Chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận theo sáng chế có thể bao gồm

lượng có hiệu quả được của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 một mình hoặc cùng với một hoặc nhiều chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dùng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “lượng hữu hiệu (hoặc lượng có hiệu quả được)” có nghĩa là lượng mà thực sự đủ để mang lại hiệu quả mong muốn mà đủ nhỏ để ngăn ngừa tác dụng phụ nghiêm trọng trong phạm vi đánh giá y học. Lượng vi sinh vật được dùng vào cơ thể bởi chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chỉnh thích hợp khi xét đến đường dùng và đối tượng dùng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng ít nhất một lần trên ngày. Liều đơn vị có nghĩa là đơn vị được tách riêng về mặt vật lý thích hợp cho liều lượng đơn vị cho đối tượng người và động vật có vú khác, mỗi đơn vị này bao gồm chất mang được thích hợp và *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế thể hiện hiệu quả trị liệu chứa lượng định trước của chủng này. Đơn vị liều để dùng qua đường miệng cho bệnh nhân trưởng thành tốt hơn là chứa 0,001 g hoặc hơn vi sinh vật theo sáng chế, và liều dùng qua đường miệng của chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,001 đến 10 g, tốt hơn là từ 0,01 đến 5 g một lần. Ví dụ, lượng có hiệu quả được của chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10 g/ngày, và có thể được dùng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 1×10^8 đến 1×10^{10} CFU/ngày. Tuy nhiên, liều lượng sẽ thay đổi phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh của bệnh nhân và vi sinh vật và thành phần hoạt tính bổ trợ được sử dụng cùng. Ngoài ra, tổng liều lượng hàng ngày có thể được chia thành một vài lần và được dùng liên tục nếu cần. Theo đó, khoảng liều lượng nêu trên không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm thực phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số nộp lưu KCTC 13518BP), khuẩn lạc của chủng này, giống nuôi cấy của chủng này, dịch tan của chủng này và phân chiết của chủng này.

Chế phẩm thực phẩm có thể là chế phẩm thực phẩm được sử dụng để cải thiện chức năng của thận, tốt hơn là thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe. Ngoài ra, sự cải thiện về chức năng của thận này có thể đạt được do sự giảm viêm thận, giảm nồng độ độc tố ure huyết trong máu, giảm protein niệu, phục hồi chức năng của ty thể thận và/hoặc giảm xơ hóa thận.

Chế phẩm thực phẩm có thể dễ dàng được sử dụng làm thức ăn hữu hiệu trong việc cải thiện chức năng của thận, ví dụ, nguyên liệu thô chính, nguyên liệu thô bổ sung, chất phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng cho sức khỏe hoặc đồ uống chức năng thuộc nhóm thực phẩm, nhưng không giới hạn ở đó.

Chế phẩm thực phẩm có nghĩa là sản phẩm tự nhiên hoặc sản phẩm chế biến chứa một hoặc nhiều chất dinh dưỡng, và tốt hơn là có nghĩa là trạng thái mà có thể được ăn trực tiếp qua lượng cụ thể của quy trình chế biến, và trong ý nghĩa thông thường, thức ăn, bao gồm tất cả phụ gia thực phẩm, thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe, và đồ uống chức năng.

Thực phẩm mà chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể được bổ sung vào bao gồm, ví dụ, các thực phẩm, đồ uống, gôm, trà, phức hợp vitamin, thực phẩm chức năng, v.v.. Ngoài ra, theo sáng chế, thực phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thực phẩm dinh dưỡng đặc biệt (ví dụ, sữa công thức, thực phẩm ăn liền, v.v.), sản phẩm thịt chế biến, sản phẩm thịt cá, đậu phụ, thạch, mì (ví dụ, ramen, mì, v.v.), bánh mì, thực phẩm bổ sung tốt cho sức khỏe, gia vị (ví dụ, xì dầu, tương đậu nành, tương tiêu đỏ, tương trộn, v.v.), nước sốt, bánh kẹo (ví dụ, bữa ăn nhẹ), kẹo, socola, gôm, kem, sản phẩm bơ sữa (ví dụ, sữa lên men, phomat, v.v.), thực phẩm chế biến khác, kimchi, thực phẩm muối (các loại kimchi, dưa muối, v.v.), đồ uống (ví dụ, nước trái cây, đồ uống rau củ, sữa đậu nành, đồ uống lên men, v.v.), gia vị tự nhiên (ví dụ, xúp ramen, v.v.). Thực phẩm, đồ uống hoặc phụ gia thực phẩm có thể được sản xuất bằng phương pháp sản xuất thông thường.

Thuật ngữ “thực phẩm tốt cho sức khỏe” chỉ nhóm thực phẩm trong đó sản phẩm thực phẩm được mang thêm giá trị bổ sung để sử dụng chức năng hoặc biểu hiện chức năng của sản phẩm thực phẩm cho mục đích cụ thể bằng cách sử dụng kỹ thuật vật lý, sinh hóa, công nghệ sinh học hoặc kỹ thuật tương tự, và sản phẩm thực phẩm mà được thiết kế và chế biến để chúng biểu hiện đủ chức năng điều hòa in vivo liên quan đến điều hòa nhịp bảo vệ in vivo, ngăn ngừa bệnh, phục hồi và tương tự mà chế phẩm thực phẩm có. Thực phẩm chức năng có thể bao gồm chất phụ gia bổ sung thực phẩm mà có liên quan đến thực phẩm và có thể còn bao gồm chất mang, tá dược và chất pha loãng thích hợp thường được sử dụng trong sản xuất dược thực phẩm (neutraceuticals).

Theo sáng chế, đồ uống chức năng là thuật ngữ chung của đồ uống giải quyết sự

hóa nâu và hương vị, và không có giới hạn cụ thể về các thành phần khác khác với việc bao gồm chế phẩm ở trên để cải thiện chức năng của thận làm thành phần thiết yếu theo tỷ lệ xác định, và nó có thể chứa các hương vị khác nhau hoặc cacbohydrat tự nhiên và tương tự làm thành phần bổ sung chẳng hạn như đồ uống thông dụng.

Ngoài ra, ngoài các chất được mô tả ở trên, thực phẩm bao gồm chế phẩm thực phẩm theo sáng chế bao gồm các chất dinh dưỡng khác nhau, vitamin, chất khoáng (chất điện phân), chất tạo hương chẳng hạn như chất tạo hương tổng hợp hoặc nhân tạo, chất tạo màu và chất độn (phomat, socola, v.v.), axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm đặc bảo vệ dạng keo, chất điều chỉnh độ pH, chất làm ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất làm bão hòa khí cacbonic được sử dụng trong đồ uống có ga, v.v., trong đó các thành phần được sử dụng độc lập hoặc có thể kết hợp.

Trong thực phẩm chứa chế phẩm thực phẩm theo sáng chế, lượng của chế phẩm theo sáng chế có thể chiếm từ 0,001% đến 100% khối lượng so với tổng khối lượng thực phẩm, tốt hơn là từ 1% đến 99% khối lượng, và trong trường hợp đồ uống, nó có thể được chứa ở tỷ lệ từ 0,001 g đến 10 g, tốt hơn là từ 0,01 g đến 1 g, tính theo 100 mL. Tuy nhiên, trong trường hợp hấp thu trong thời gian dài cho sức khỏe và vệ sinh hoặc để kiểm soát sức khỏe, nó có thể không nhiều hơn khoảng nêu trên, và thành phần hoạt tính có thể được sử dụng với lượng không nhỏ hơn khoảng này bởi vì không có vấn đề về an toàn, và do đó, không giới hạn ở khoảng này.

Chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách bổ sung chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 độc lập hoặc vào chất mang có thể chấp nhận được, hoặc ở dạng của chế phẩm thích hợp cho sự tiêu hóa của người hoặc động vật. Tức là, nó có thể được bổ sung vào thực phẩm không chứa các vi khuẩn probiotic khác và thực phẩm đã chứa sẵn một số vi khuẩn probiotic nhất định. Ví dụ, để tạo ra thực phẩm theo sáng chế, các vi sinh vật khác sử dụng được với chủng theo sáng chế là vi khuẩn thích hợp để tiêu hóa bởi người hoặc động vật và có hoạt tính probiotic có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh có hại trong khi tiêu hóa hoặc cải thiện sự cân bằng của vi sinh vật trong đường ruột của động vật có vú, mà không giới hạn cụ thể. Ví dụ về vi sinh vật probiotic bao gồm nấm men bao gồm *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, nấm chẳng hạn như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* và vi khuẩn thuộc các chi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*,

Propionibacterium, *Enterococcus*, *Pediococcus*. Ví dụ cụ thể về vi sinh vật probiotic thích hợp bao gồm *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*, *Pediococcus acidilactici* v.v. Tốt hơn là, hiệu quả có thể được tăng cường hơn nữa bằng cách bao gồm thêm vi sinh vật probiotic có tác dụng tốt trong việc cải thiện chức năng của thận trong khi có hoạt tính probiotic tốt trong chế phẩm thực phẩm theo sáng chế. Ví dụ về chất mang có thể được sử dụng trong chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể là chất độn, chất phụ gia chất xơ cao, chất bao nang, lipit, v.v., và ví dụ về các chất mang này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Chẳng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế có thể là dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp hoặc bao nang, hoặc dạng hỗn dịch nuôi cấy hoặc bột khô.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được tạo ra ở dạng chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi chứa chủng hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa chúng.

Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể ở dạng bào chế khô hoặc lỏng, và có thể còn bao gồm vi sinh vật không gây bệnh khác ngoài chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409. Vi sinh vật có thể được bổ sung bao gồm, ví dụ, *Bacillus subtilis* có thể tạo ra enzym phân giải protein, enzym phân giải lipit và enzym chuyển hóa đường, lactoza có hoạt tính sinh lý và khả năng thoái biến chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí chẳng hạn như dạ dày của gia súc. Chủng *Lactobacillus*, nấm sợi chẳng hạn như *Aspergillus oryzae* thể hiện tác dụng làm tăng khối lượng của gia súc, tăng lưu lượng axit của sữa và tăng tốc độ hấp thụ tiêu hóa của thức ăn (Slyter, L. L. J. Animal Sci.1976, 43. 910-926) và nấm men chẳng hạn như *Saccharomyces cerevisiae* (Johnson, D. E et al. J. Anim. Sci.,1983, 56, 735-739; Williams, P. E. V. et al,1990, 211), v.v..

Chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chế phẩm enzym ngoài chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409. Chế phẩm enzym được bổ sung có thể ở cả trạng thái khô hoặc lỏng, và enzym phân giải lipit chẳng hạn như lipaza, phytaza mà phân hủy axit phytic để tạo thành phosphat và inositol phosphat, amylaza thủy phân liên kết α -1,4-glycosidic được chứa trong tinh bột,

glycogen, v.v., phosphatase là enzym thủy phân organophosphat este, carboxymethylxylanase phân hủy xenluloza, xylanase phân hủy xyloza, maltase thủy phân maltoza thành hai phân tử glucoza, convertase thủy phân sacaroza để tạo thành hỗn hợp glucoza-fructoza, v.v. có thể được sử dụng làm chế phẩm enzym.

Trong việc sử dụng chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 theo sáng chế làm chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, làm nguyên liệu thô cho thức ăn, cây lạc bao gồm các ngũ cốc và protein đậu nành, đậu, củ cải đường, thịt trái cây, sản phẩm phụ của lúa, bột từ động vật, bột cá, và tương tự có thể được sử dụng, và các nguyên liệu thô này có thể không được chế biến hoặc được chế biến mà không có giới hạn. Quy trình chế biến là, nhưng không nhất thiết giới hạn ở, ví dụ, quy trình trong đó nguyên liệu thức ăn được nạp và nén dưới áp suất đến công suất cố định, và trong trường hợp protein, ưu tiên là sử dụng quy trình ép đùn trong đó việc sử dụng được tăng lên do biến tính. Ép đùn có ưu điểm chẳng hạn như làm biến tính protein và phá hủy yếu tố kháng enzym qua quy trình xử lý bằng nhiệt. Ngoài ra, trong trường hợp protein đậu nành, giá trị dinh dưỡng của protein đậu nành có thể được tăng lên bằng cách tăng cường khả năng tiêu hóa được của protein qua quá trình ép đùn, bất hoạt chất kháng dinh dưỡng chẳng hạn như chất ức chế trypsin, là một trong số các chất ức chế proteaza có trong đậu nành, và làm tăng sự cải thiện khả năng tiêu hóa được cảm ứng bởi proteaza.

Mặt khác, dược phẩm, chế phẩm thực phẩm hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể còn bao gồm chủng probiotic bổ sung có khả năng tăng cường chức năng của thận, cải thiện hiệu quả của chủng KBL409, hoặc dược phẩm, chế phẩm thực phẩm hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi này có thể được dùng đồng thời cùng lúc hoặc liên tiếp với chế phẩm riêng biệt bao gồm chủng probiotic bổ sung.

Chủng probiotic bổ sung có khả năng tăng cường tác dụng cải thiện chức năng của thận của chủng KBL409 tốt hơn là bao gồm *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus plantarum*, tốt hơn nữa là, chủng probiotic bổ sung có thể là chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (số nộp lưu KCTC13509BP) có trình tự 16s rADN nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc *Lactobacillus plantarum* KBL396 (số nộp lưu KCTC13278BP) có trình tự 16s rADN nêu trong SEQ ID NO: 3 dưới đây.

<SEQ ID NO: 2> trình tự 16s rADN của chủng *Lactobacillus paracasei* KBL382 (số nộp lưu KCTC13509BP)

GCAGGTGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGA
 GATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGA
 AACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGA
 TGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACAGAGGTTG
 ATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA
 AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGG
 CAGAGTAACTGTTGTGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
 TCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCG
 GTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAA
 AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTC
 CGCCCTTCAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
 CTTTGTATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTG
 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAG
 TAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGA
 CTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGC
 GAGCGTCTAAGTGGCTCAGCCT

<SEQ ID NO: 3> trình tự 16s rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* KBL396
 (số nộp lưu KCTC13278BP)

TATCAGTACGTGCTATAATGCAGTCGACGACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTACATTTGA
 GTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT
 ACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGGGCG
 TATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTG
 GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC

AACGCCCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT
CAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGA
AGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGGAGCATGTGGGTTTAATTCAAAGCTACGCGAAGAAACCTTACCCAGGTTTTGACATACTAAT
GCAAATTCTAAAGAGATTAGAACGTTTCCCTTCGGGGACATGGGATACCGGGTGGGTGCATGGGTGGTTCGTCAGC
TTCGTGGTCGTGAGAAATGTTTGGGTTTAAGTTCCCGAAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGT
TGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCAT
TCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGG
TGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAAC
CTTTAGAACCAGCCGCTAATGGCACCACCATGCC

Lactobacillus paracasei KBL382 và *Lactobacillus plantarum* KBL396 có thể được dùng một lần đến một vài lần trên ngày ở liều lượng từ 0,001 đến 10 g/ngày, tốt hơn là 0,01 đến 5 g/ngày, tương ứng.

Từ quan điểm rằng một hoặc nhiều chủng probiotic được dùng dưới dạng hỗn hợp trong một chế phẩm, hoặc một hoặc nhiều chủng probiotic được dùng tách riêng trong các chế phẩm khác nhau, tỷ lệ thích hợp bất kỳ của chủng này có thể được sử dụng miễn là tác dụng probiotic hiệp đồng của chủng vẫn hữu ích. Các tỷ lệ này có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, hai chủng (chẳng hạn như KBL409:KBL382) theo tỷ lệ 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, hoặc 10:1 hoặc tỷ lệ bất kỳ nằm trong các giới hạn này, chẳng hạn như 1:1 có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng hoặc chế phẩm để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, và việc sử dụng chủng hoặc chế phẩm để bảo chế chất trị liệu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa hoặc điều

trị bệnh, bao gồm bước dùng lượng có hiệu quả được của chủng này hoặc chế phẩm cho đối tượng cần ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận.

Bởi vì được phẩm và phương pháp dùng được sử dụng trong phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đã được mô tả ở trên, phần mô tả nội dung chung giữa cả hai được bỏ qua để tránh gây phức tạp quá mức cho bản mô tả.

Mặt khác, đối tượng mà chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh có thể được dùng bao gồm tất cả động vật bao gồm người. Ví dụ, có thể là động vật chẳng hạn như chó, mèo hoặc chuột nhắt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Các ví dụ này chỉ nhằm minh họa sáng chế, và sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng phạm vi của sáng chế không được hiểu là bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1. Lựa chọn vi khuẩn axit lactic có khả năng thoái biến *p*-cresol

Tiền chất của *p*-cresol sulfat (PCS), indol sulfat (IS), và trimetylamin N-oxit (TMAO), mà là các độc tố ure huyết chính của thận, lần lượt là *p*-cresol, indol, trimetylamin (TMA), và trimetylamin, và là sản phẩm thải của phenylalanin (hoặc tyrosin), tryptophan, và cholin bởi vi sinh vật trong ruột. Sáng chế tập trung vào việc nhận biết vi sinh vật có khả năng chuyển hóa/phân hủy tiền chất của độc tố ure huyết của thận, và các tác giả sáng chế theo đuổi việc lựa chọn chủng probiotic thể hiện hiệu quả điều trị bệnh thận nhờ sự thoái biến độc tố ure huyết bằng cách chọn phân tích *p*-cresol là đối tượng lựa chọn chính. Do đó, khả năng thoái biến *p*-cresol của tổng 67 chủng *Lactobacillus* và *Lactococcus* có nguồn gốc từ người, và tổng 33 chủng *Bifidobacterium* được đánh giá. Tất cả các chủng đều kháng độ pH thấp và muối mật, nhờ đó chúng sống được trong ống dạ dày-ruột trong khoảng thời gian thực hiện. Khả năng thoái biến *p*-cresol được xác nhận bằng cách đo nồng độ *p*-cresol dư bằng kỹ thuật sắc ký khí sau khi nuôi cấy chủng trong môi trường MRS chứa *p*-cresol.

1-1. Nuôi cấy chủng và chuẩn bị mẫu

Chủng được sử dụng trong thử nghiệm này được nuôi cấy trong môi trường MRS chứa *p*-cresol 200 μ M trong 24 giờ. Bổ sung 2,5 μ L axit sulfuric đặc vào 50 μ L mỗi

mẫu, gia nhiệt ở 90°C trong 30 phút, bổ sung 2,5 µL nội chuẩn được chuẩn bị (2,6-dimethylphenol 0,2 mg/mL, Sigma-Aldrich), và bổ sung 50 µL ethyl axetat làm dung môi phân tích và được trộn bằng cách trộn xoáy trong 1 phút. Sau khi quay ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 2 phút, dịch nổi được đặt vào trong lọ GC (với ống lồng thủy tinh 250 µL).

1-2. Lựa chọn chủng bằng cách đo nồng độ *p*-cresol

Kỹ thuật sắc ký khí được sử dụng để xác định lượng *p*-cresol trong dịch nổi nuôi cấy. Thiết bị phân tích là GC-EI-MS (Agilent 5985) ở lưu lượng 1,3 mL/phút, và phép phân tích được tiến hành bằng cách tăng nhiệt độ lò từ nhiệt độ ban đầu 75°C đến 150°C (tốc độ 20°C) và 250°C (tốc độ 25°C) (sau khi chạy 75°C trong 3 phút). Cột mao dẫn DB-5 30 m X 0,25 mm A, df=0,25 (Agilent) được sử dụng làm cột.

Kết quả là, mặc dù hầu hết các chủng *Lactobacillus* và *Lactococcus* không có khả năng thoái biến cao, 10 chủng thể hiện khả năng thoái biến *p*-cresol tốt đáng kể trước tiên được chọn (FIG. 1). Xác nhận là hầu hết các chủng *Bifidobacterium* không thoái biến *p*-cresol (FIG. 2).

1-3. Chọn các chủng lần thứ hai

Kết quả của việc thực hiện thí nghiệm đánh giá sự thoái biến *p*-cresol lần thứ hai đối với 10 chủng *Lactobacillus* mà có khả năng thoái biến *p*-cresol được xác nhận trong ví dụ 1-2, xác nhận là KBL402 và KBL409 thuộc loài *Lactobacillus acidophilus* có khả năng thoái biến *p*-cresol cao nhất (FIG. 3). Hai chủng này được đánh giá là gần tương tự về trình tự 16s rADN, và chủng KBL409 được chọn và các thí nghiệm sâu hơn nữa được thực hiện.

1-4. Đo khả năng thoái biến *p*-cresol của chủng KBL409

Kết quả của việc đo khả năng thoái biến *p*-cresol theo thời gian bằng cách giống như trong ví dụ 1-2 đối với KBL409, xác nhận là KBL409 có thể làm giảm *p*-cresol trong môi trường nuôi cấy 95% sau 12 giờ xử lý và 85% sau 36 giờ (FIG. 4). Do đó, đã nhận thấy rằng, cụ thể, KBL409 thể hiện khả năng thoái biến *p*-cresol tốt, làm giảm bớt một cách hiệu quả bệnh thận do sự tích tụ *p*-cresol quá mức gây ra.

Ví dụ 2. Xác nhận hiệu quả kháng viêm của KBL409

Bởi vì sự chết tế bào theo chương trình liên quan đến phản ứng viêm (pyroptosis),

một trong những cơ chế chết tế bào quan trọng ở bệnh thận, xảy ra cùng với đáp ứng viêm, nên cần kiểm tra hiệu quả bảo vệ thận nhờ sự cải thiện của đáp ứng viêm. Để xác nhận hiệu quả kháng viêm cũng như khả năng thoái biến *p*-cresol của KBL409, mức biểu hiện của chất đánh dấu viêm và kháng viêm được xác nhận bằng cách sử dụng tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC).

2-1. Chuẩn bị PBMC và xử lý chủng

PBMC có nguồn gốc từ người (Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC, USA) được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 (Gibco, Paisley) chứa 1% penixilin/streptomycin, 1% gentamixin và 10% FBS. UK). PBMC được nuôi cấy (2×10^5 tế bào) được đặt trong đĩa 96 giếng và được xử lý bằng kháng thể kháng CD3 1 $\mu\text{g/mL}$ mà hoạt hóa tế bào T (OKT3; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), và sau đó chủng KBL409 hoặc *Escherichia coli* với tỷ lệ 1 : 100 được bổ sung và nuôi cấy ở 37°C trong 72 giờ.

2-2. Đo xytokin viêm và kháng viêm

Sau khi xử lý chủng, chỉ thu dịch nổi của tế bào PBMC được nuôi cấy và lượng của mỗi xytokin được đo. Bộ kit xytoxin Th1/Th2/Th17 của người dầy hạt từ đo tế bào BD (CBA) (BD Biosciences) được sử dụng để đo IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , và IL-17A, và IL-13. Đối với phép đo, và bộ kit thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym IL-13 người (ELISA) (BMS231-3; Thermo Fisher Scientific) được sử dụng để đo IL-13.

Kết quả trong nhóm điều trị KBL409 (CD3/KBL409) xác nhận là xytokin viêm Th1 IL-2, xytokin viêm Th2 IL-4 và IL-13, và xytokin viêm Th17 IL-17A được duy trì thấp hơn đáng kể so với nhóm điều trị *E. coli* (CD3/*E.coli*) và nhóm điều trị PBS (CD3/PBS) (FIG. 5). Mặt khác, IFN- γ , xytokin viêm Th1 khác, không khác đáng kể với nhóm điều trị PBS (CD3/PBS), nhưng xác nhận là nó được duy trì thấp hơn đáng kể so với mức của nhóm điều trị *E. coli* (CD3/*E.coli*) (FIG. 6). Ngoài ra, kết quả của việc xác nhận mức biểu hiện của xytokin kháng viêm IL-10 sau khi điều trị bằng KBL409 ở PBMC, xác nhận là sự biểu hiện của IL-10 trong nhóm điều trị KBL409 (CD3/KBL409) là cao hơn đáng kể so với mức của nhóm điều trị PBS (CD3/PBS) (FIG. 7). Do đó, nhận thấy rằng KBL409 có thể ức chế đáp ứng viêm của thận và hệ thống đi cùng với bệnh suy thận mạn tính bằng cách ức chế đáng kể sự biểu hiện tổng thể của xytokin viêm ở

tế bào T và làm tăng sự biểu hiện của xytokin kháng viêm IL-10.

Ví dụ 3. Xác nhận hiệu quả của KBL409 ở mô hình chuột nhắt được gây bệnh suy thận mạn tính

Phương pháp gây bệnh suy thận bằng cách cho ăn thức ăn chứa adenin (0,2% adenin) được sử dụng phổ biến làm mô hình gây bệnh suy thận mạn tính bởi vì nó không cần đến phẫu thuật, không gây chết, tương đối dễ để lấy thức ăn, có thể được quan sát trong khoảng thời gian dài, không cần phải cắt thận, có thể quan sát toàn bộ suy thận ở cả hai thận, và có thể đảm bảo đủ mô (Jia T et al. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. BMC Nephrol 2013; 14:116). Theo sáng chế, bằng cách sử dụng mô hình bệnh suy thận do adenin gây ra, hiệu quả cải thiện sự thay đổi của chức năng của thận, xơ hóa thận và tương tự và viêm trong khi dùng KBL409 được xác nhận. Ngoài ra, hiệu quả làm giảm độc tố ure huyết trong máu do sự giảm chức năng của thận cũng được xác nhận.

3-1. Tạo ra mô hình chuột nhắt được gây bệnh suy thận mạn tính và dùng chúng

Trong thí nghiệm này, chuột nhắt C57BL/6 7 tuần tuổi có trọng lượng cơ thể trung bình khoảng 20 g được chia thành nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm. Như được thể hiện trên FIG. 8, nhóm đối chứng còn được chia thành hai nhóm, nhóm dùng chủng KBL409 (Đối chứng+KBL409; n = 10) và nhóm không được dùng (Đối chứng; n = 10). Nhóm thử nghiệm được dùng thức ăn adenin để gây bệnh suy thận mạn tính, và nó được chia thành nhóm mà chủng KBL409 được dùng (CKD+KBL409; n = 10) và nhóm không được dùng (CKD; n = 10), và thí nghiệm được thực hiện với tổng số 4 nhóm chuột nhắt. Thức ăn adenin được tạo ra là chế độ ăn trong đó 0,2% adenin được bổ sung vào chế độ ăn thông thường, và chủng KBL409 với lượng 1×10^9 CFU được dùng qua đường miệng hàng ngày. Chuột nhắt trong tất cả các nhóm được gây chết không đau sau khi nuôi 6 tuần và thận được lấy đi (FIG. 8).

3-2. Kiểm tra sự thay đổi về chức năng của thận

Nitơ ure huyết (BUN) là giá trị thu được bằng cách đo nitơ được chứa trong ure trong máu, creatinin là giấy lọc in vivo mà là sản phẩm thải của creatin, một loại protein, và được lọc qua cầu thận, và albumin niệu, cũng được gọi là protein niệu, là hỗn hợp của protein trong nước tiểu. Hàm lượng albumin niệu, BUN và creatinin cao chỉ ra rằng chức năng của thận bị suy giảm. Do đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với bệnh

suy thận mạn tính, lượng albumin niệu, BUN và creatinin được đo bằng cách sử dụng thiết bị phân tích sinh hóa (Automated Chemistry Analyzer, Roche, HITACHI7600) trong nước tiểu và máu thu được trước khi gây chết không đau đối với mỗi nhóm chuột.

Kết quả là, như có thể thấy trên FIG. 9, nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) thể hiện sự tăng đáng kể nồng độ BUN và creatinin so với nhóm đối chứng (Đối chứng), xác nhận là bệnh suy thận mạn tính được gây thành công. Ngoài ra, nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) thể hiện nồng độ BUN và creatinin thấp hơn đáng kể so với nhóm chỉ nhận thức ăn adenin (FIG. 9). Trong trường hợp albumin niệu, lượng albumin niệu được tăng đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) so với nhóm đối chứng (Đối chứng), trong khi nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) giảm đáng kể lượng albumin niệu so với nhóm đối chứng (FIG. 10). Do đó, xác nhận là việc dùng KBL409 theo sáng chế thể hiện hiệu quả cải thiện chức năng của thận bằng cách làm giảm lượng albumin niệu, BUN, và nồng độ creatinin, mà là các chỉ thị đặc trưng của bệnh suy thận.

3-3. Kiểm tra sự thay đổi của xơ hóa thận

Xơ hóa thận chỉ triệu chứng trong đó chức năng của thận bị suy giảm do xơ hóa mô thận vì các nguyên nhân khác nhau chẳng hạn như phản ứng viêm quá mức, mất cân bằng oxy hóa, và xơ hóa biểu mô xảy ra ở mô thận. Đây là một chỉ thị quan trọng của bệnh thận và là một trong số triệu chứng thường gặp nhất của bệnh suy thận giai đoạn cuối. Theo đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với xơ hóa thận theo bệnh suy thận mạn tính, việc kiểm tra mô bệnh học mẫu mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1, mức biểu hiện của mARN Procoll1a và Acta2, và mức biểu hiện của Collagen1, Fibronectin, α -SMA và Vimentin được phân tích.

3-3-1. Kiểm tra mô bệnh học

Mẫu mô thận thu được trong ví dụ 3-1 được tạo ra dưới dạng lát cắt mô có độ dày 4 μ m thông qua cố định formalin thông thường và ngâm trong parafin (FFPE). Việc nhuộm Axit Periodic-Schiff (PAS) để mở rộng mạch kẽ và nở cầu thận trong mô thận và nhuộm ba màu Masson đối với xơ hóa kẽ được thực hiện. Sau khi nhuộm, lát cắt mô của mỗi nhóm được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Do đó, ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD, FIG. 11C) so với nhóm đối chứng (Đối chứng, FIG. 11A), sự mở rộng ống thận, là đặc điểm của bệnh suy thận, biểu mô

phẳng, và sự mở rộng ống kẽ và tích tụ chất nền được quan sát, và tăng xơ hóa thận được quan sát thông qua nhuộm ba màu Masson. Ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409, FIG. 11D), sự thay đổi mô học nêu trên được quan sát rõ ràng, và cụ thể, xác nhận là xơ hóa được giảm đi đáng kể.

3-3-2. Nhận biết chỉ thị của xơ hóa thận (1)

Để xác định mức biểu hiện của gen *Procoll1a* và *Acta2* trong mô thận, là các chỉ thị của xơ hóa, mARN được phân lập từ mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1 ở trên, và mức biểu hiện mARN của gen *Procoll1a* và *Acta2* được phân tích bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR).

Kết quả là, xác nhận là mức biểu hiện mARN của gen *Procoll1a* và *Acta2* tăng lên đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) so với nhóm đối chứng (Đối chứng), trong khi sự giảm đáng kể được quan sát ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 12).

3-3-3. Nhận biết chỉ thị của xơ hóa thận (2)

Sự biểu hiện của Collagen1, Fibronectin, α -SMA và Vimentin, là chỉ thị protein liên quan đến xơ hóa thận, từ mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1 được xác nhận bằng kỹ thuật nhuộm tách Tây.

Kết quả là, xác nhận là mức biểu hiện của Collagen1, Fibronectin, α -SMA, và Vimentin tăng lên đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD), trong khi mức này giảm đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 13).

Do đó, nhận thấy rằng KBL409 theo sáng chế là hữu ích để ức chế sự tiến triển của bệnh suy thận mạn tính do tổn thương thận gây ra bằng cách ức chế một cách hiệu quả xơ hóa thận.

3-4. Kiểm tra sự thay đổi của đại thực bào ở thận

Số lượng của đại thực bào dương tính với F4/80 thâm nhiễm vào kẽ thận đóng vai trò là chất đánh dấu của tổn thương thận. Theo đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với mức thâm nhiễm của đại thực bào, là chất đánh dấu đại diện của bệnh suy thận mạn tính, sự thay đổi của đại thực bào được quan sát bằng cách sử dụng mẫu mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1.

3-4-1. Phân tích mức biểu hiện F4/80, Cd68 và Mcp1

Sự biểu hiện mRNA của chemokin ở thận, Mcp1, và F4/80, Cd68 ở bạch cầu đơn nhân to, là các chỉ số của phạm vi thâm nhiễm của đại thực bào, từ mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1 được xác nhận bằng phân tích phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR).

Kết quả là, xác nhận là mức biểu hiện mRNA của F4/80, Cd68 và Mcp1 được tăng đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD), nhưng giảm đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 14).

3-4-3. Kiểm tra mô bệnh học

Bằng cách giống như trong ví dụ 3-3-1, sau khi mẫu mô thận thu được trong ví dụ 3-1 được tạo thành lát cắt mô có độ dày 4 μ m thông qua cố định bằng formalin, ngâm trong parafin thông thường (FFPE), và nhuộm hóa học mô miễn dịch nhờ sử dụng kháng thể F4/80 và CD68, là chỉ thị của mức thâm nhiễm của đại thực bào, được quan sát bằng kính hiển vi quang học.

Kết quả là, ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD), sự lắng của đại thực bào ở kẽ ống được tăng lên đáng kể so với nhóm đối chứng (Đối chứng), nhưng ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409), xác nhận là mức thâm nhiễm được giảm đi đáng kể (FIG. 15).

Do đó, nhận thấy rằng việc dùng KBL409 có hiệu quả ức chế sự thâm nhiễm của đại thực bào ở bệnh suy thận mạn tính.

3-5. Xác nhận sự thay đổi của mức biểu hiện inflammasom ở thận

Inflammasom là phức hợp protein nhận biết các tổ hợp của kích thích gây viêm và điều hòa sự sản sinh xytokin tiền viêm quan trọng, chẳng hạn như IL-1 β và IL-18, nhờ hoạt hóa caspaza-1, và chết tế bào theo chương trình liên quan đến phản ứng viêm, một trong cơ chế chính của chết tế bào ở bệnh suy thận mạn tính, đã biết là do inflammasom gây ra. Do đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với sự biểu hiện của inflammasom ở thận, việc phân tích sự biểu hiện của Tlr4, Asc, Nlrp3, IL-18 và NRLP3 và phân tích sự biểu hiện của inflammasom được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1.

3-5-1. Phân tích mức biểu hiện Tlr4, Asc, Nlrp3 và IL-18

Từ mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1, chủ yếu là lipopolysacarit

hoặc chất tương tự được phát hiện, và sự biểu hiện mRNA của gen Tlr4 mà cảm ứng sự hoạt hóa inflammasom, Asc và Nlrp3 là thành phần của inflammasom, và IL-18 là cytokin chính của quá trình phản ứng viêm bởi inflammasom được xác nhận bằng phân tích phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR).

Kết quả là, xác nhận là mức biểu hiện mRNA của Tlr4, Asc, Nlrp3 và IL-18 tăng lên đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) so với nhóm đối chứng (Đối chứng), nhưng giảm đi đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 16). Theo đó, nhận thấy rằng việc dùng KBL409 theo sáng chế có hiệu quả ức chế sự biểu hiện của Tlr4, Asc, Nlrp3, và IL-18 ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra.

3-5-2. Kiểm tra mô bệnh học

Sau khi mẫu mô thận được tạo ra bằng cách giống như trong ví dụ 3-3-1 được tạo thành lát cắt mô có độ dày bằng 4 μ m thông qua cố định bằng formalin, ngâm trong parafin thông thường (FFPE), và nhuộm hóa học mô miễn dịch sử dụng kháng thể NRLP3, thành phần của inflammasom, mẫu được quan sát bằng kính hiển vi quang học.

Kết quả là, sự biểu hiện của NRLP3 ở mô thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra được tăng lên đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) so với nhóm đối chứng (Đối chứng), nhưng xác nhận là sự biểu hiện này được giảm đi đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin và KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 17). Theo đó, nhận thấy rằng việc dùng KBL409 có hiệu quả ức chế sự biểu hiện của NRLP3 được tăng lên khi gây bệnh suy thận mạn tính.

3-6. Kiểm tra sự thay đổi của đại thực bào ở thận

Một trong số chức năng quan trọng của ty thể là thực hiện phosphoryl hóa oxy hóa, mà chuyển hóa năng lượng từ chất chuyển hóa nhiên liệu chẳng hạn như glucoza hoặc axit béo thành ATP. Đã biết rằng rối loạn chức năng ty thể có liên quan đến sự phát sinh bệnh của bệnh thận. Theo đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với sự thay đổi hình thái của ty thể ở thận do bệnh suy thận mạn tính gây ra, mẫu mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 3-1 được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua.

Kết quả là, như có thể thấy từ FIG. 18, ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD), kích thước của ty thể ở thận được giảm đi và màng bên trong bị phá hủy, do đó có thể xác nhận được rằng nếp màng trong ty thể bị mất đi. Mặt khác, ở nhóm dùng thức ăn adenin

và KBL409 (CKD+KBL409), xác nhận là cấu trúc ty thể được khôi phục (FIG. 18). Do đó, nhận thấy rằng việc dùng KBL409 có hiệu quả phục hồi rối loạn chức năng ty thể mà xảy ra khi khởi phát bệnh suy thận mạn tính.

3-7. Sự thay đổi của đáp ứng viêm hệ thống

Khi đại thực bào và tế bào lympho được hoạt hóa do viêm mạn tính ở thận, các xytokin khác nhau chẳng hạn như IL-1 β TNF- α được tiết ra, xơ hóa thận được thúc đẩy, và xảy ra sự tích tụ collagen, dẫn đến bệnh suy thận. Do đó, để xác nhận hiệu quả của KBL409 đối với đáp ứng viêm hệ thống ở mô hình chuột được gây bệnh suy thận mạn tính, nồng độ IL-6 và TNF- α , các xytokin mà gây ra đáp ứng viêm hệ thống được đo bởi thử nghiệm kết tủa miễn dịch được liên kết enzym (ELISA).

Do đó, xác nhận là nồng độ cả IL-6 và TNF- α được tăng lên đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin (CKD) so với nhóm đối chứng (Đối chứng), nhưng giảm đi đáng kể ở nhóm dùng thức ăn adenin và nhóm dùng KBL409 (CKD+KBL409) (FIG. 19). Do đó, xác nhận là chủng KBL409 có hiệu quả trong việc làm giảm bớt đáp ứng viêm hệ thống bằng cách ức chế IL-6 và TNF- α ở mô hình bệnh suy thận mạn tính.

Ví dụ 4. Thí nghiệm so sánh sự thay đổi của nồng độ độc tố ure huyết trong máu

4-1. So sánh sự thay đổi của nồng độ *p*-cresol máu

p-cresol đã phát hiện trong máu được thấy là có nồng độ nằm trong khoảng từ 3 đến 300 μ M phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh thận, và đường cong hiệu chuẩn được lấy theo khoảng nồng độ. Nồng độ *p*-cresol được đo bằng cách sử dụng mẫu máu được thu gom trước khi gây chết không đau. Thử nghiệm động vật. Bổ sung 2,5 μ L axit sulfuric đặc vào 50 μ L huyết thanh chuột nhắt, gia nhiệt ở 90°C trong 30 phút, bổ sung 2,5 μ L nội chuẩn được chuẩn bị (2,6-dimetylphenol 0,2 mg/mL, Sigma-Aldrich), và bổ sung 50 μ L etyl axetat làm dung môi phân tích và trộn bằng cách trộn xoáy trong 1 phút. Sau khi quay ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 2 phút, dịch nổi được đặt trong lọ GC (với ống lồng thủy tinh 250 μ L). Việc định lượng GC-MS được thực hiện bằng cách giống như quy trình phân tích được sử dụng để chọn chủng trong ví dụ 1.

Nồng độ *p*-cresol của mỗi mẫu được đo dựa trên đường cong hiệu chuẩn, và như có thể thấy từ FIG. 20, nhận thấy rằng ở chuột nhắt thông thường (Đối chứng+PBS), *p*-cresol được phát hiện ở nồng độ rất thấp không kể có dùng chủng hay không, trong khi

tổng nồng độ *p*-cresol trong mẫu chuột nhất được gây CKD (CKD+PBS) thì tăng lên. Khi so sánh nồng độ *p*-cresol giữa nhóm dùng *E. coli* (CKD+đương) và nhóm dùng chủng KBL409 (CKD+KBL409), quan sát được rằng nồng độ *p*-cresol được đo thấp ở nhóm dùng chủng KBL409 (FIG. 20A). Khi nồng độ trong máu của chuột nhất được dùng chủng KBL409 và hai chủng *Lactobacillus acidophilus* khác (ATCC832 và ATCC4357) được so sánh, xác nhận là nồng độ *p*-cresol máu được giảm đi khi chủng KBL409 được dùng (CKD+KBL409) khi so với nồng độ *p*-cresol ở nhóm không dùng chủng (CKD+PBS) tại thời điểm gây bệnh suy thận mạn tính, và chuột nhất được dùng hai loại chủng *Lactobacillus acidophilus* khác (CKD+ATCC832 và CKD+ATCC4357) không có hiệu quả đáng kể trong việc làm giảm nồng độ *p*-cresol máu: CKD+PBS: 19,8 μ M; CKD+KBL409: 15,9 μ M; CKD+ATCC832: 18,2 μ M; CKD+ATCC4357: 23,7 μ M (FIG. 20B). Do đó, xác nhận là chủng KBL409 theo sáng chế vượt trội hơn đáng kể khi xét đến hiệu quả làm giảm *p*-cresol so với các chủng *Lactobacillus acidophilus* khác.

4-2. So sánh sự thay đổi của nồng độ TMAO máu

TMAO máu được nhận thấy là có nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 90 μ M phụ thuộc vào mức độ của bệnh thận, và đường cong hiệu chuẩn được lấy theo khoảng nồng độ. Nồng độ TMAO máu được đo bằng cách sử dụng mẫu máu được thu gom trước khi gây chết không đau. Thử nghiệm động vật. Bổ sung 120 μ L MeOH rất lạnh (loại LC) vào 30 μ L huyết thanh chuột nhất và trộn xoáy trong 1 phút. Sau khi quay ly tâm ở 20.000 g, 4°C trong 20 phút, 100 μ L dịch nổi được nạp vào vivaspın 500, 3KDa, và phân lọc thu được sau khi quay ly tâm ở 15.000 g, 4°C, 30 phút được đặt trong lọ thu hồi tổng thể và được sử dụng làm mẫu để phân tích TMAO.

Kỹ thuật sắc ký lỏng được sử dụng để đo TMAO trong huyết thanh. UPLC-qTOF được sử dụng làm thiết bị phân tích, và phép phân tích được thực hiện ở ion hóa ESI dương và chế độ nhảy. (A) 0,045% amoni hydroxit, 0,025% axit formic (độ pH 8,1), và (B) axetonitril tinh khiết được sử dụng làm pha động, ở điều kiện ban đầu 95% (B), 45% (B) trong 2,5 phút, 95% B một lần nữa trong 5 phút, và 95% B được duy trì cho đến 5,5 phút và được phân tích ở lưu lượng bằng 0,4 mL/phút. Cột amit ACQUITY UPLC BEH 130 Å, 1,7 μ m, 2,1 mm (186004801, waters) được sử dụng làm cột phân tích. Điện áp mao dẫn 2KV, nón lấy mẫu 15, độ lệch nguồn 10, nhiệt độ nguồn 150°C, nhiệt độ loại dung môi 200°C, máy xông khí 7 được sử dụng làm các thông số MS.

Tác dụng của nồng độ TMAO và KBL409 trong máu được xác nhận trong mỗi nhóm thử nghiệm. Đầu tiên, nồng độ TMAO máu của mẫu thử nghiệm động vật được dùng KBL409 ở nồng độ cao và thấp được xác nhận. Sự tăng nồng độ TMAO được xác nhận trong khi gây bệnh suy thận mạn tính (CKD+PBS), và cụ thể, sự giảm rõ ràng của nồng độ TMAO trong máu được xác nhận ở chuột nhất được dùng KBL409 với nồng độ cao (CKD + KBL409 cao) (FIG. 21A). Tiếp theo, nồng độ TMAO trong máu được xác nhận ở chuột nhất được gây bệnh suy thận mạn tính được dùng ba loại *L. acidophilus* bao gồm KBL409. Sự tăng nồng độ TMAO được xác nhận do gây bệnh suy thận mạn tính, và nồng độ TMAO được giảm đi trong tất cả ba nhóm dùng chủng *L. acidophilus*, nhưng cụ thể, xác nhận là nồng độ TMAO máu giảm nhiều nhất ở chuột nhất được dùng chủng KBL409 (FIG. 21B).

Ví dụ 5. Dùng kết hợp KBL409 và chủng probiotic bổ sung

5-1. Tạo ra mô hình chuột nhất được gây bệnh suy thận mạn tính và dùng chủng

Trong thí nghiệm này, thí nghiệm được tiến hành bằng cách chia chuột nhất C57BL/6 7 tuần tuổi có khối lượng cơ thể trung bình 20 g thành tổng 6 nhóm gồm 10 chuột nhất trên mỗi nhóm, 6 nhóm này là nhóm đối chứng dương (Đối chứng), nhóm gây suy thận mạn tính (CKD), nhóm đối chứng dương dùng Renadyl™ (KIBOW BIOTECH, US) (CKD+đối chứng dương), nhóm dùng KBL409 một mình (CKD+KBL409), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL382 (CKD+KBL409+kết hợp1(382)), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL396 (CKD+KBL409+kết hợp2(396)). Nhóm thí nghiệm gây suy thận mạn tính được dùng thức ăn adenin để gây bệnh suy thận mạn tính, và thức ăn adenin tạo thành chế độ ăn trong đó 0,2% adenin được bổ sung vào chế độ ăn bình thường. Chủng KBL409 được dùng qua đường miệng 1×10^9 CFU hàng ngày. Trong trường hợp chủng kết hợp (KBL409+KBL382 hoặc KBL409+KBL396), KBL409 được dùng ở 7×10^8 CFU và KBL382 hoặc KBL396 được dùng đồng thời ở 3×10^8 CFU, và 1×10^9 CFU được dùng hàng ngày cho tổng số lượng của vi khuẩn. Renadyl, đối chứng dương, cũng được dùng qua đường miệng hàng ngày làm chủng phức hợp để cho tổng số lượng tế bào bằng 1×10^9 CFU. Tất cả các chủng được dùng được chuẩn bị bằng cách tạo huyền phù trong PBS chứa 0,05% L-cystein. Chuột nhất trong tất cả các nhóm được gây chết không đau sau khi nuôi 6 tuần và thận được lấy đi.

5-2. Xác nhận sự thay đổi mức biểu hiện của các chất đánh dấu bệnh thận

5-2-1. Phân tích mức biểu hiện của Nlrp3, Pre-IL18, Ppargc1a, Tfam và Mfn1

Từ mô thận của mỗi nhóm thu được trong ví dụ 5-1, mức biểu hiện mRNA của Nlrp3, thành phần của phức hợp inflammasom mà có tác động chính đến sự khởi phát bệnh suy thận mạn tính, và tiền chất Pre-IL18 của IL-18, cytokin chính trong quy trình đáp ứng viêm bởi inflammasom được phân tích bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR).

Kết quả là, xác nhận là sự biểu hiện mRNA của Nlrp3 và Pre-IL18 tăng ở nhóm gây suy thận mạn tính (CKD) so với nhóm đối chứng, trong khi sự biểu hiện được giảm đi trong nhóm đối chứng dương (CKD+đối chứng dương), nhóm dùng KBL409 một mình (CKD+KBL409), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL382 (CKD+KBL409+kết hợp1(382)), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL396 (CKD+KBL409+kết hợp2(396)) (FIG. 22). Trong số chúng, nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL382 (CKD+KBL409+kết hợp1 (382)) thể hiện hiệu quả vượt trội trong việc làm tăng sự biểu hiện của Ppargc1a, Tfam và Mfn1 so với các nhóm khác (FIG. 23). Theo đó, việc dùng kết hợp KBL409 và KBL382 theo sáng chế làm tăng sự biểu hiện của Ppargc1a, Tfam và Mfn1 ở thận được gây bởi mô hình bệnh suy thận mạn tính hiệu quả hơn so với khi chúng được dùng một mình, và nhận thấy rằng sự hiệp đồng này có thể ngăn ngừa hoặc điều trị một cách hiệu quả bệnh thận do tổn thương chức năng ty thể gây ra.

5-2-2. Phân tích mức biểu hiện Fn và Procoll và tỷ lệ Bax/Bcl2

Đã biết rằng sự chết theo chương trình gây ra rối loạn chức năng thận do thiếu máu, và thiếu máu thận gây ra chết theo chương trình bởi sự tăng tỷ lệ Bax/Bcl2 bởi sự hoạt hóa Bax và làm giảm Bcl2. Tức là, trong tế bào biểu mô thận, Bax là protein tiền chết theo chương trình mà làm tăng tính thấm của màng, Bcl-2 là protein kháng chết theo chương trình mà đối kháng “sự tấn công màng” bởi Bax, và tỷ lệ Bax/Bcl2 là yếu tố quyết định chính của sự chết tế bào. Trong thí nghiệm này, mức biểu hiện mRNA của Fn (fibronectin) và Procoll, và mức biểu hiện của Bax và Bcl2, mà là các chất đánh dấu sinh học đại diện của bệnh xơ hóa, từ mô thận của mỗi nhóm được phân tích và xác nhận bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza định lượng (qPCR).

Kết quả là, xác nhận là mức biểu hiện mRNA của Fn và Procoll và tỷ lệ Bax/Bcl2 được tăng lên ở nhóm gây suy thận mạn tính (CKD) so với nhóm đối chứng, trong khi mức biểu hiện này được giảm đi đáng kể ở nhóm đối chứng dương (CKD+đối chứng

dương), nhóm dùng KBL409 một mình (CKD+KBL409), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL382 (CKD+KBL409+kết hợp1(382)), nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL396 (CKD+KBL409+kết hợp2(396)). Trong số chúng, ở nhóm dùng kết hợp KBL409+KBL382 (CKD+KBL409+kết hợp1 (382)), hiệu quả ức chế Fn, Procoll và Bax/Bcl2 được quan sát vượt trội hơn so với các nhóm khác (FIG. 24). Do đó, nhận thấy rằng việc dùng kết hợp KBL409 và KBL382 theo sáng chế ở mô hình động vật được gây bệnh suy thận mạn tính ức chế sự biểu hiện của Fn, Procoll và Bax hiệu quả hơn so với khi chúng được dùng một mình, và làm tăng sự biểu hiện của Bcl2, nhờ đó ngăn ngừa hoặc điều trị hiệu quả bệnh thận bằng sự hiệp đồng này.

Do đó, đã được mô tả chi tiết trong các phần của sáng chế, sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng phần mô tả cụ thể này chỉ là phương án được ưu tiên và không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Theo đó, phạm vi thực tế của sáng chế sẽ được định nghĩa bằng yêu cầu bảo hộ đi kèm và các dạng tương đương của chúng.

Tên cơ quan nộp lưu: Viện nghiên cứu Sinh học và Công nghệ sinh học Hàn Quốc (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)

Số nộp lưu: KCTC13518BP

Ngày nộp lưu: 20180427

Tên cơ quan nộp lưu: Viện nghiên cứu Sinh học và Công nghệ sinh học Hàn Quốc

Số nộp lưu: KCTC13509BP

Ngày nộp lưu: 20180417

Tên cơ quan nộp lưu: Viện nghiên cứu Sinh học và Công nghệ sinh học Hàn Quốc

Số nộp lưu: KCTC13278BP

Ngày nộp lưu: 20170529

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 (số nộp lưu KCTC 13518BP) theo sáng chế làm giảm viêm thận, làm giảm nồng độ độc tố ure huyết chẳng hạn như nito ure huyết, creatinin và *p*-cresol để bảo vệ thận, và nhờ đó có thể sử dụng hữu ích cho các ứng dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thận bao gồm cải thiện chức năng của thận

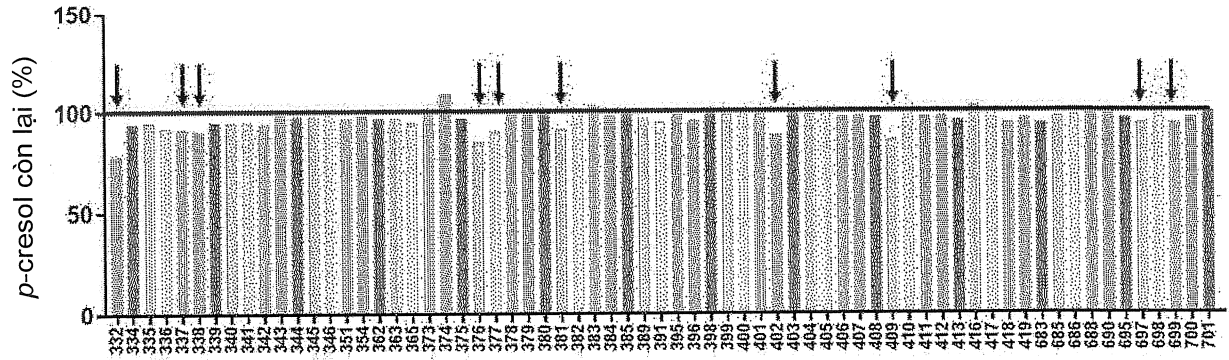
và bệnh suy thận mạn tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Lactobacillus acidophilus* KBL409 có số nộp lưu KCTC 13518BP, trong đó chủng này có trình tự 16s rADN nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Chế phẩm thực phẩm chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng theo điểm 1 và dịch tan của chủng này.
3. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng theo điểm 1 và dịch tan của chủng này.
4. Dược phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng theo điểm 1 và dịch tan của chủng này.
5. Dược phẩm theo điểm 4, còn chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chủng probiotic bổ sung, và dịch tan của chủng này.
6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó chủng probiotic bổ sung là ít nhất một chủng được chọn từ *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus plantarum*.
7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó *Lactobacillus paracasei* là *Lactobacillus paracasei* KBL382 (số nộp lưu KCTC13509BP), và *Lactobacillus plantarum* là *Lactobacillus plantarum* KBL396 (số nộp lưu KCTC13278BP).

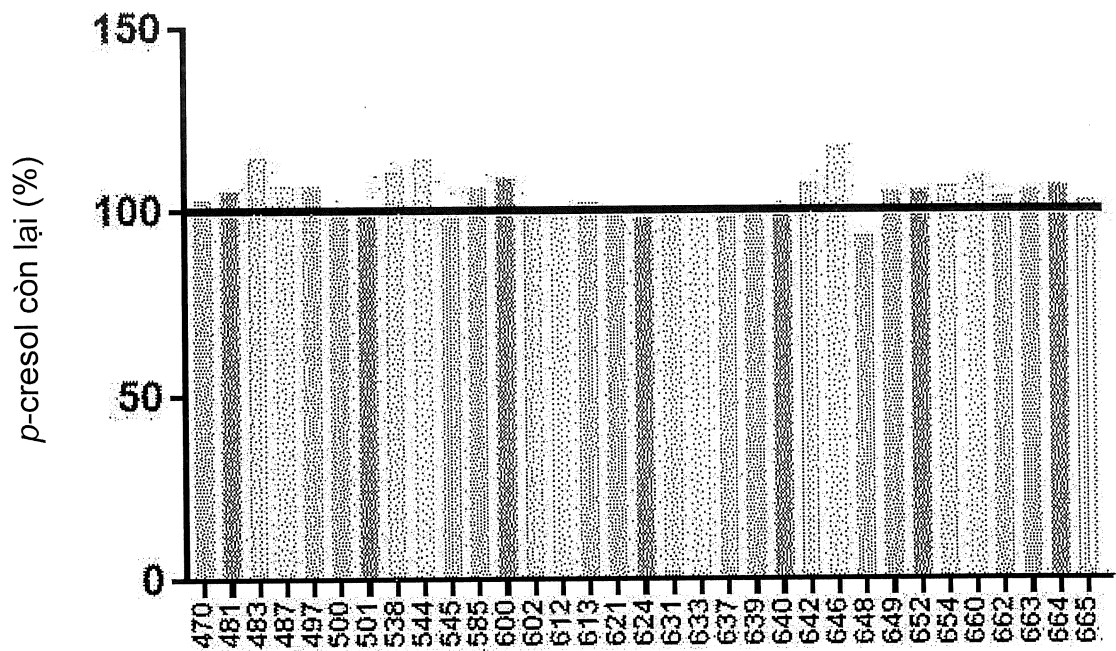
[FIG. 1]

Hiệu quả loại bỏ *p*-cresol của *Lactobacillus* và *Lactococcus*

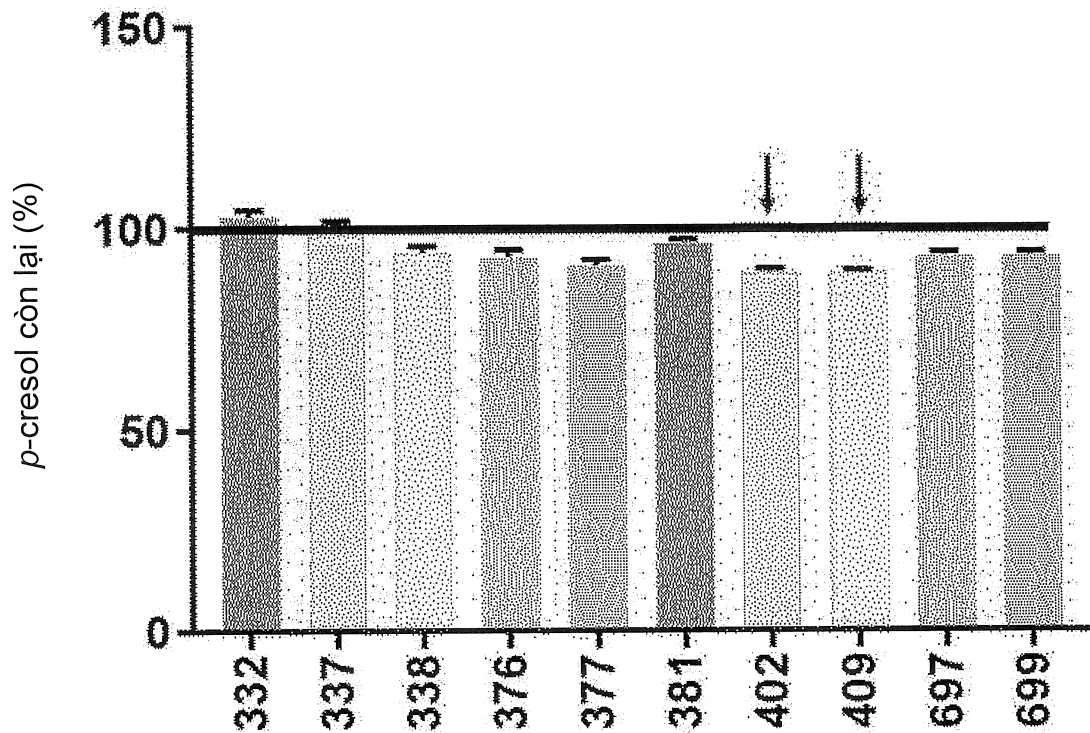


[FIG. 2]

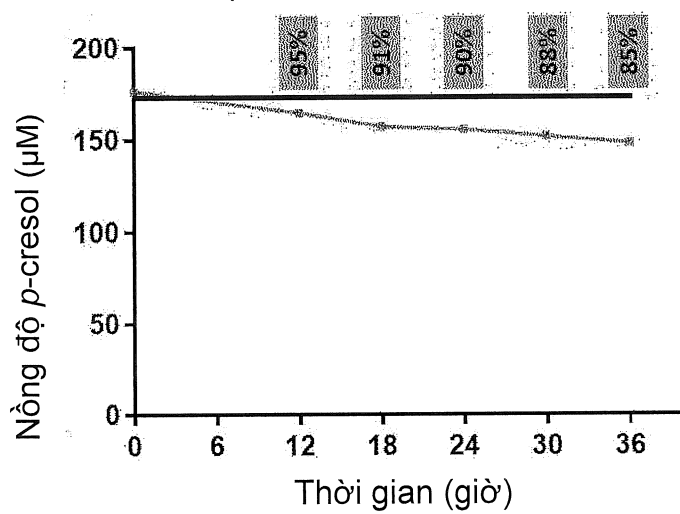
Hiệu quả loại bỏ *p*-cresol của *Bifidobacterium*



[FIG. 3]

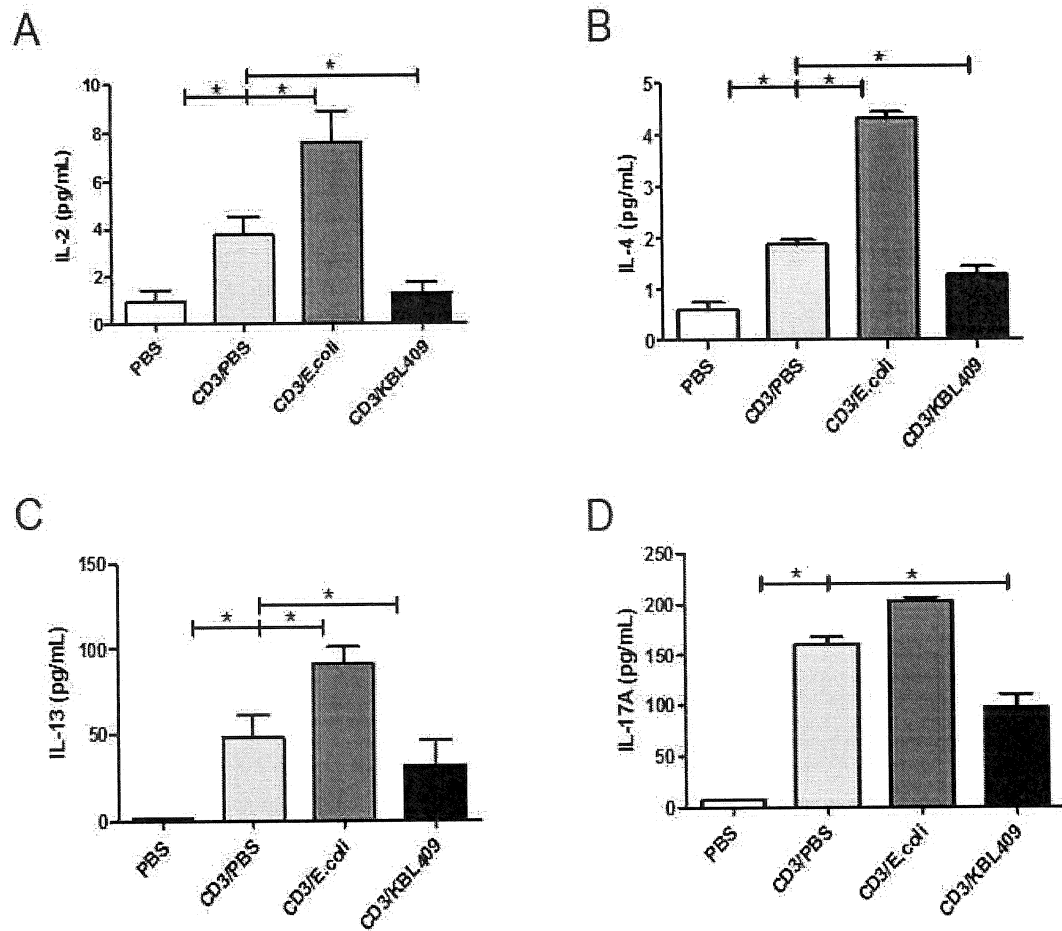
Hiệu quả loại bỏ *p*-cresol của *Lactobacillus*

[FIG. 4]

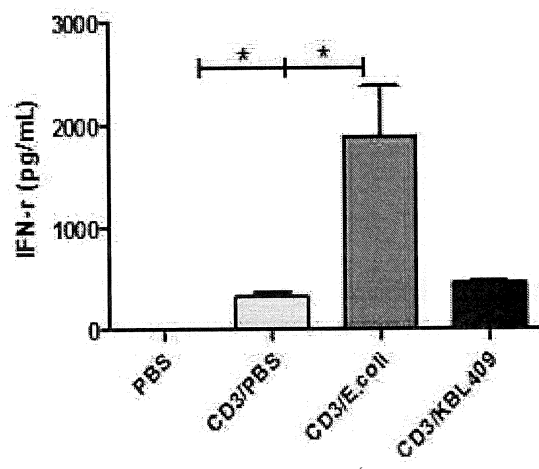
Hiệu quả loại bỏ *p*-cresol của KBL409

3/12

[FIG. 5]

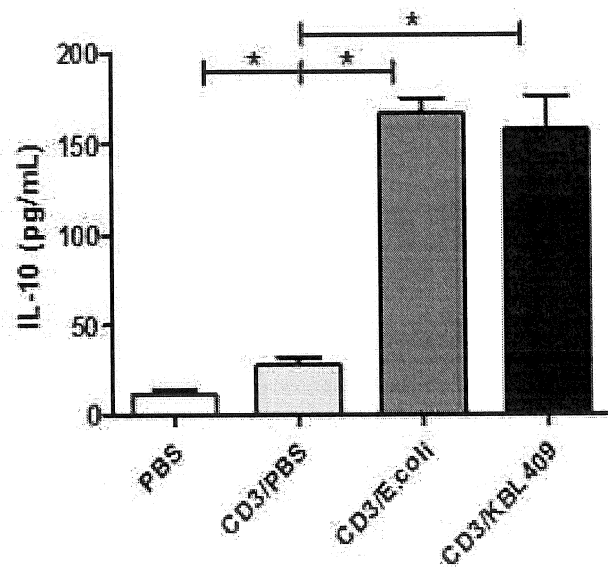


[FIG. 6]

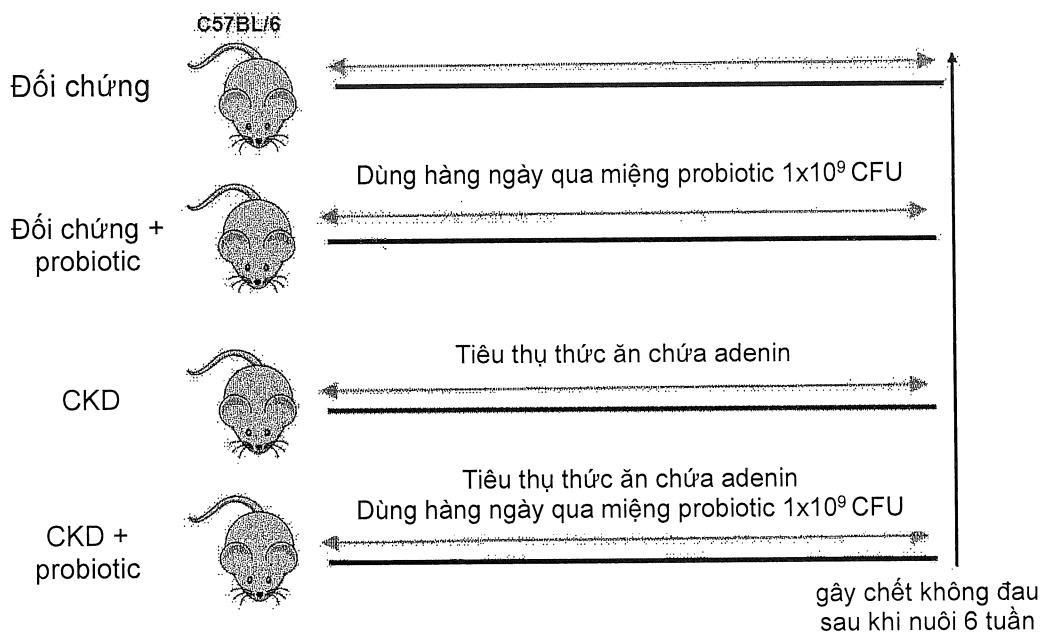


4/12

[FIG. 7]

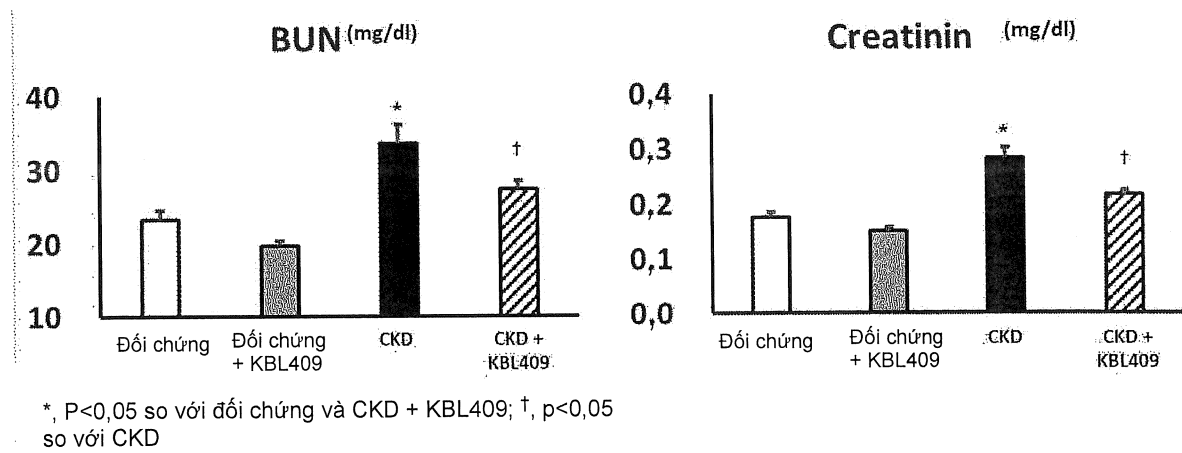


[FIG. 8]

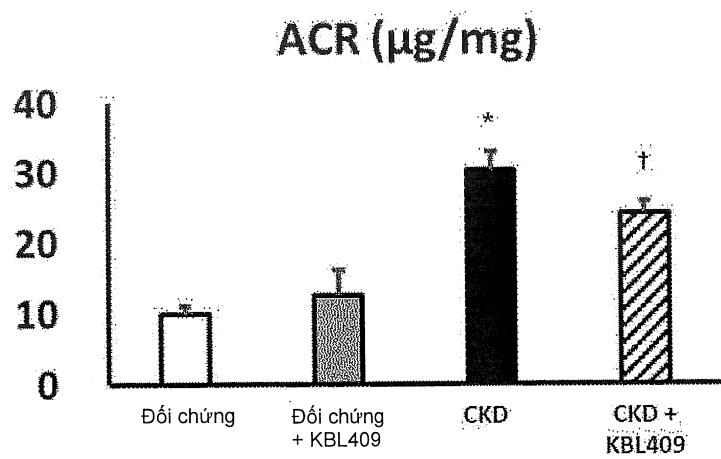


5/12

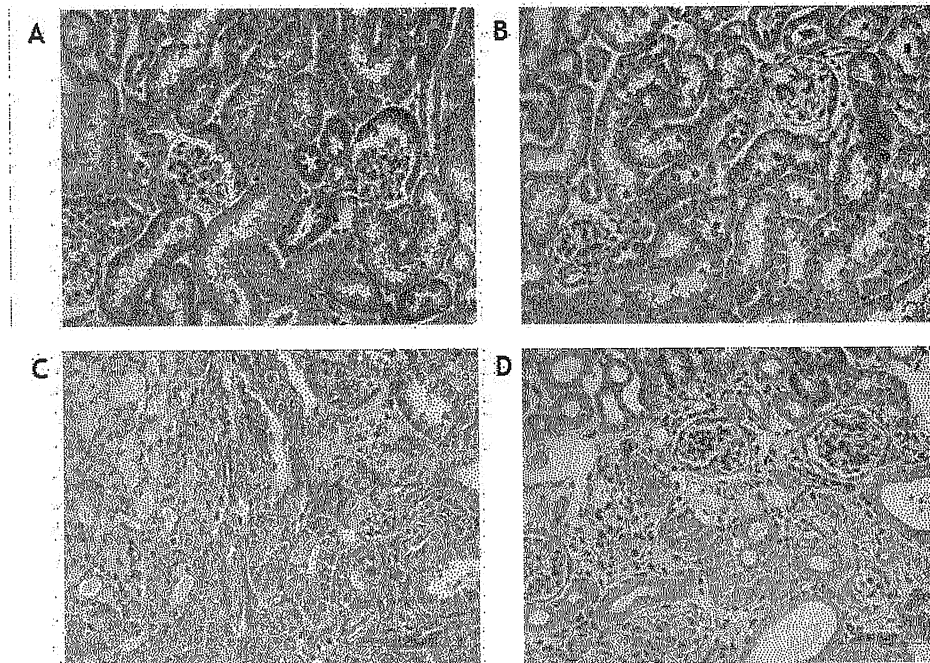
[FIG. 9]



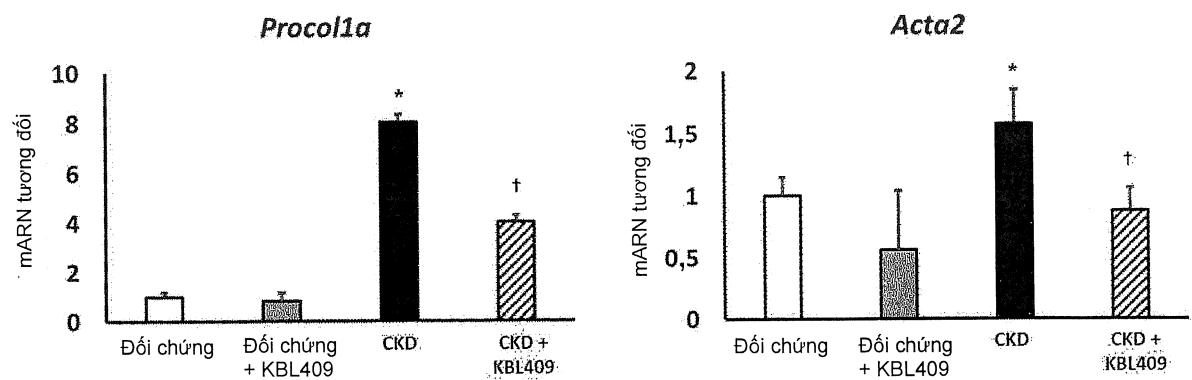
[FIG. 10]



[FIG. 11]



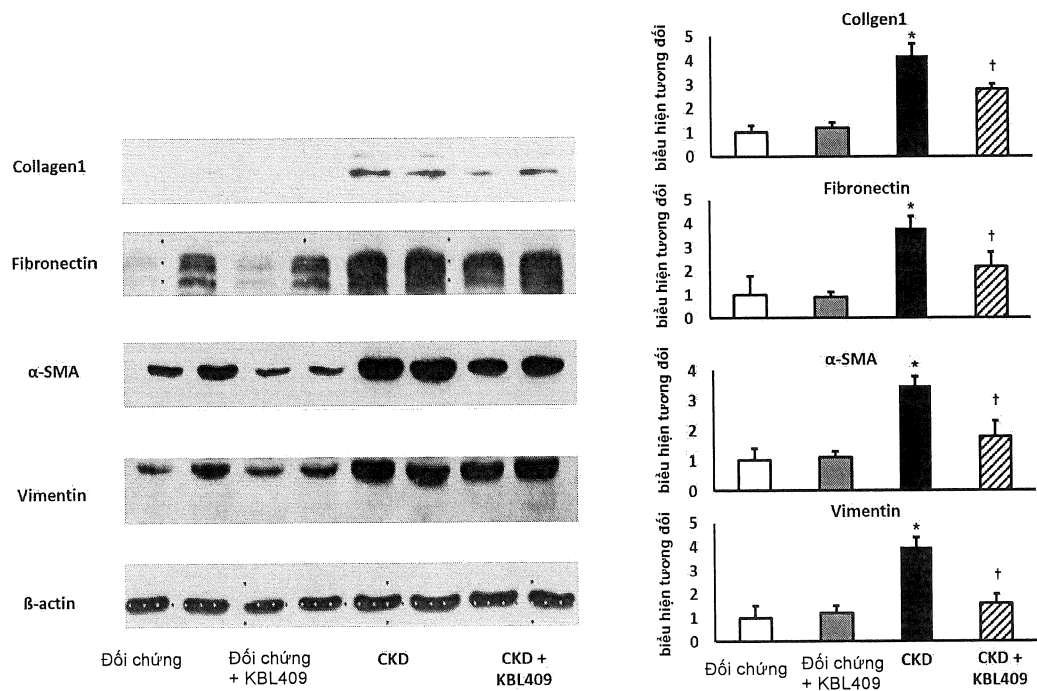
[FIG. 12]



*, $P < 0,05$ so với đối chứng và CKD + KBL409; †, $p < 0,05$ so với CKD

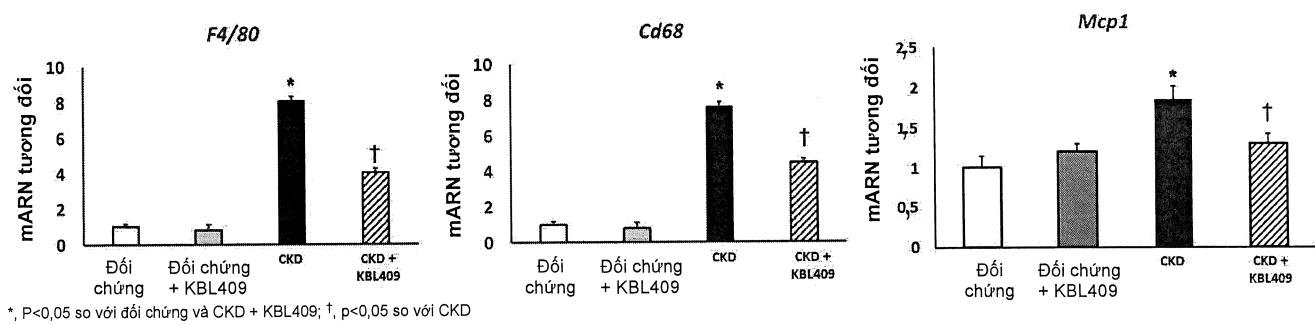
7/12

[FIG. 13]



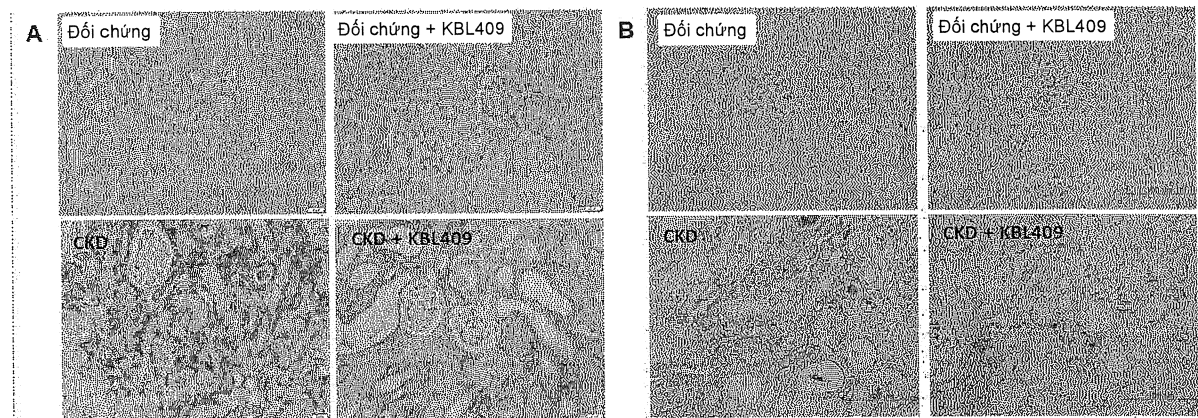
*, P<0,05 so với đôi chứng và CKD + KBL409; †, p<0,05 so với CKD

[FIG. 14]

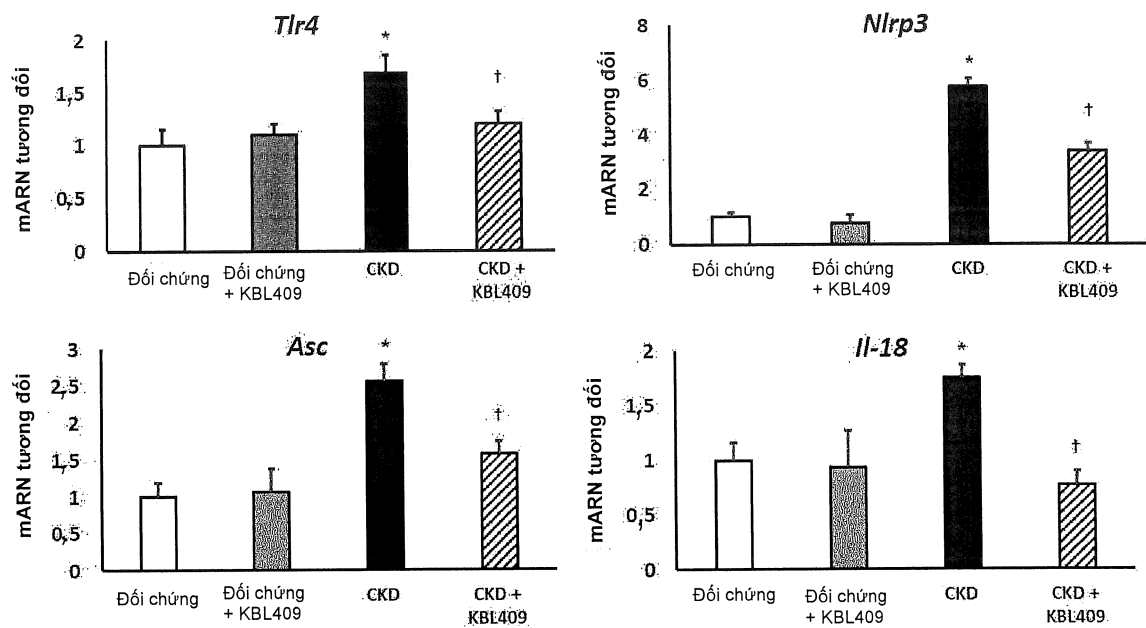


*, P<0,05 so với đôi chứng và CKD + KBL409; †, p<0,05 so với CKD

[FIG. 15]



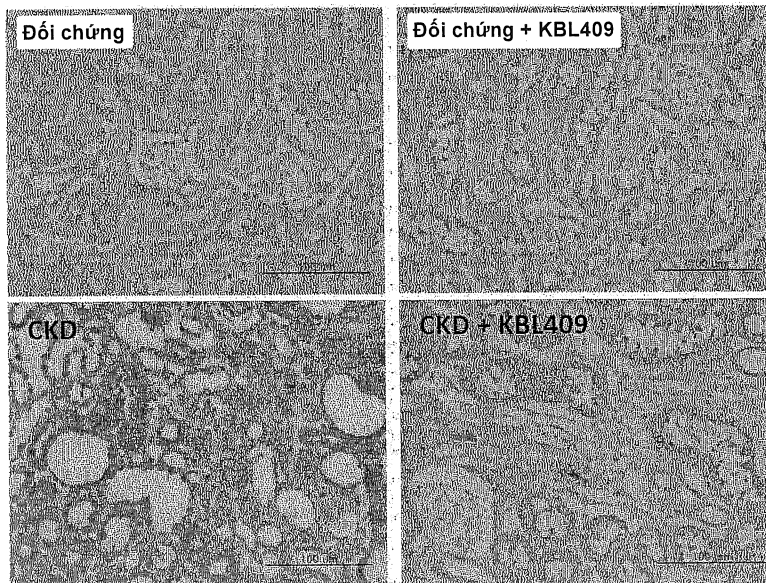
[FIG. 16]



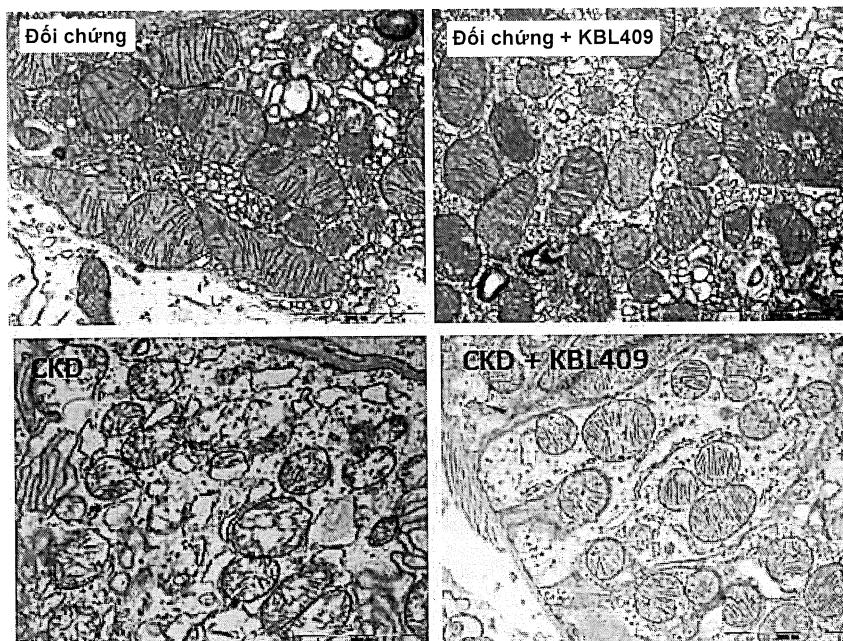
*, $P < 0,05$ so với đôi chứng và CKD + KBL409; †, $p < 0,05$ so với CKD

9/12

[FIG. 17]

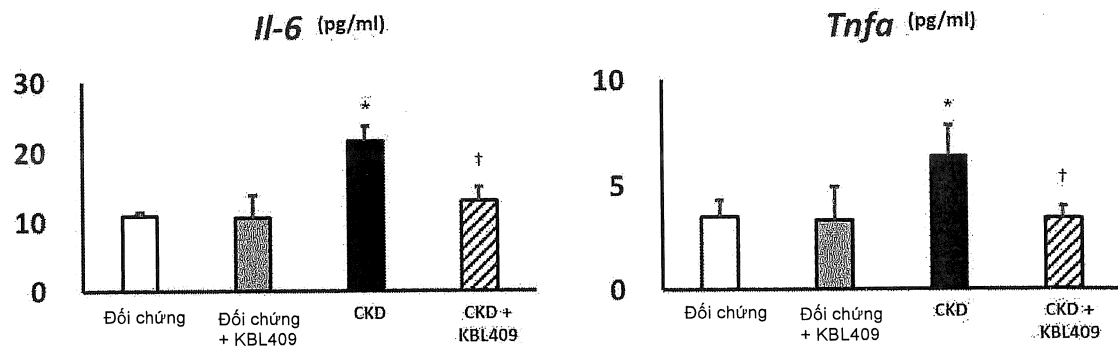


[FIG. 18]



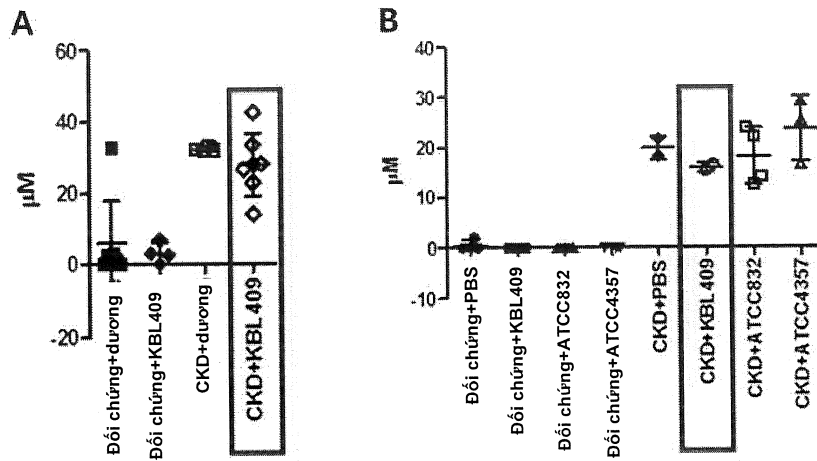
10/12

[FIG. 19]

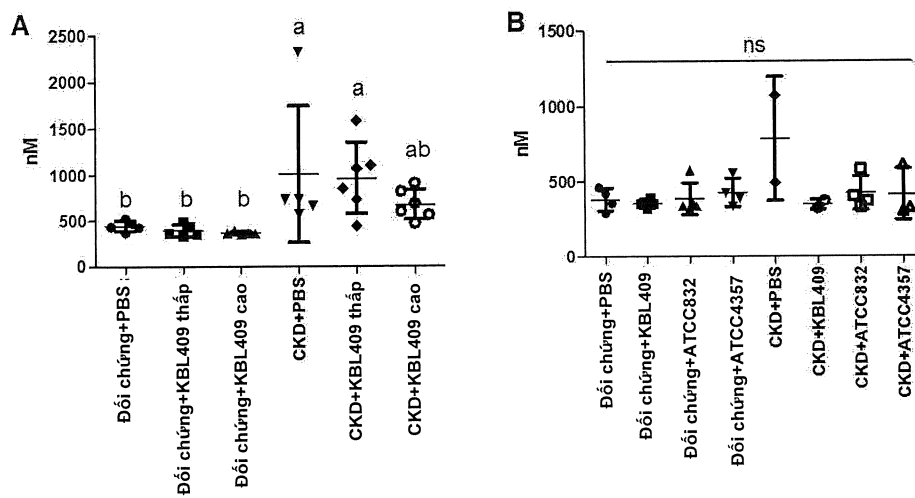


*, $P < 0,05$ so với đối chứng và CKD + KBL409; †, $p < 0,05$ so với CKD

[FIG. 20]

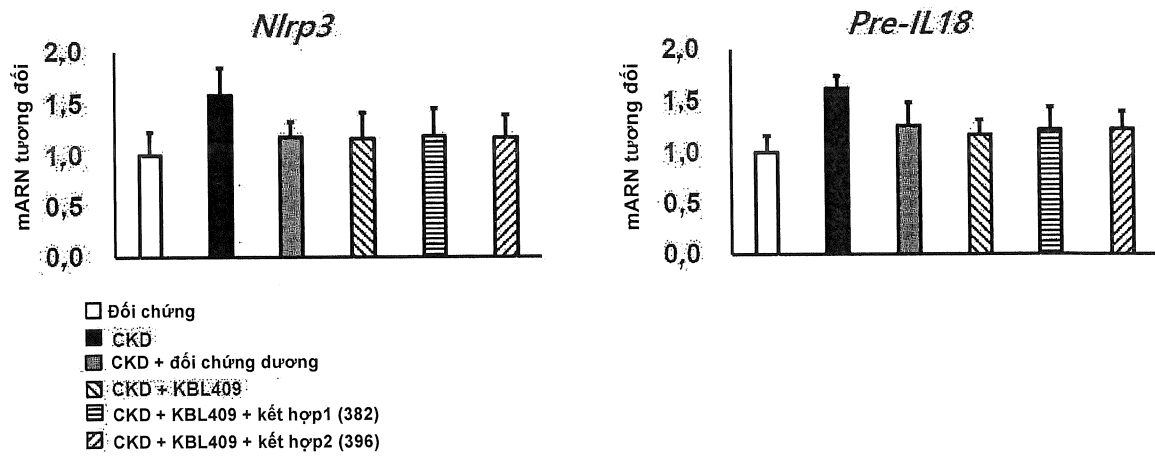


[FIG. 21]

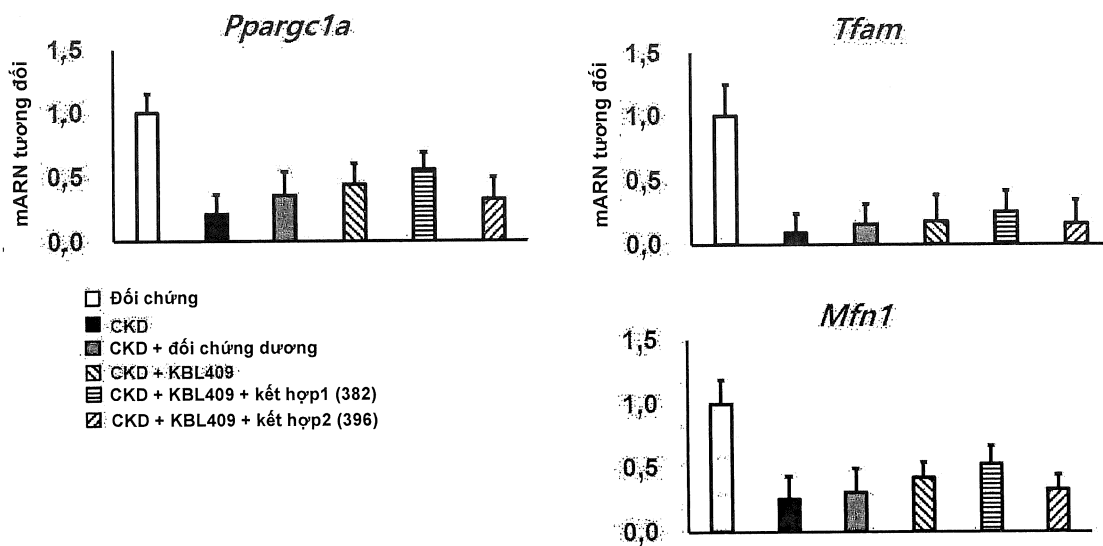


11/12

[FIG. 22]

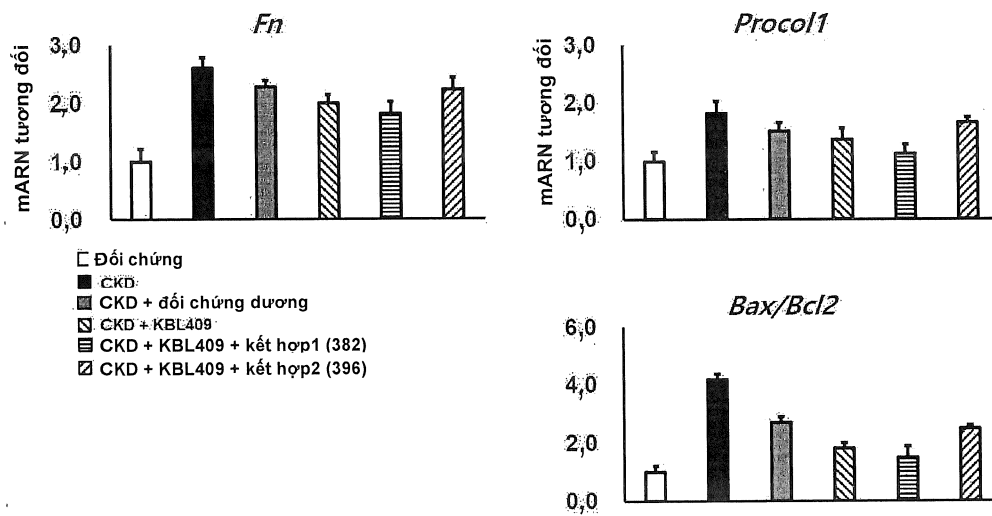


[FIG. 23]

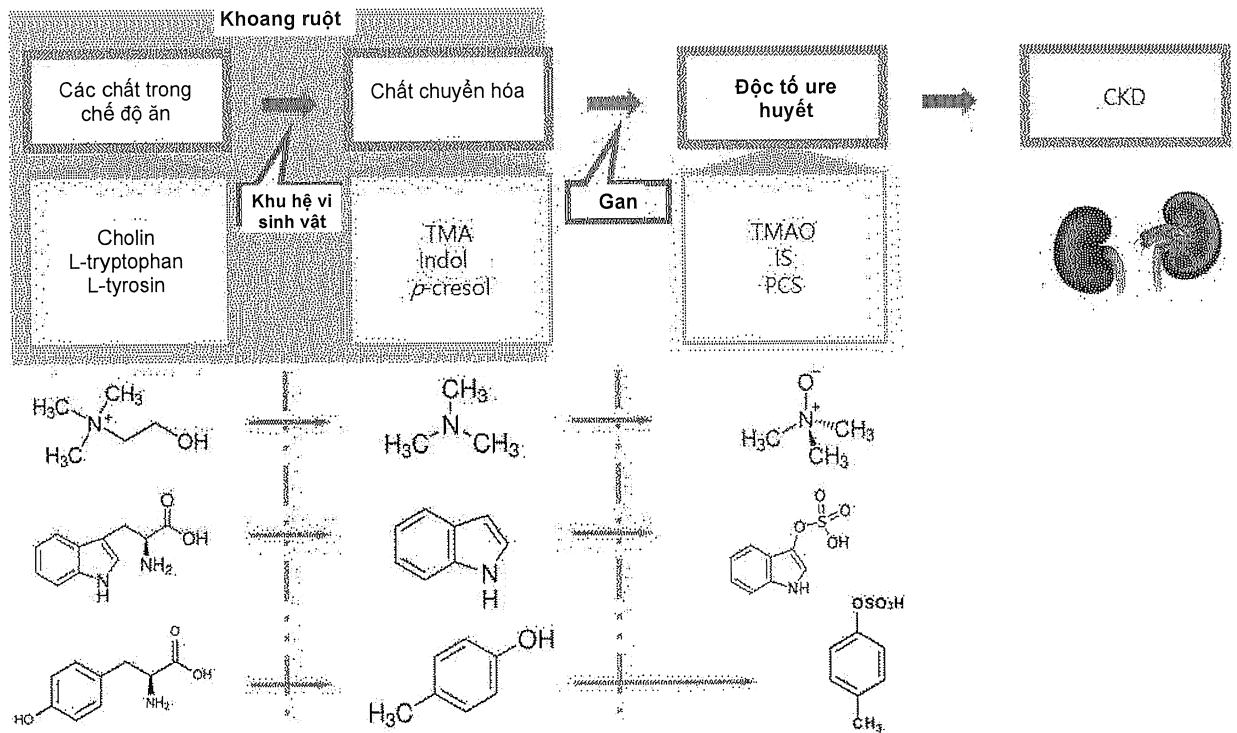


12/12

[FIG. 24]



[FIG. 25]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ko BioLabs, Inc.

<120> Lactobacillus Acidophilus KBL409, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi và dược phẩm chứa chủng này

<130> KPCA190833

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1475

<212> ADN

<213> Lactobacillus acidophilus

<400> 1

gggaaagtgtg cggggtgcta tacatgcagt cgagcgagct gaaccaacag attcacttcg	60
gtgatgacgt tgggaacgcg agcggcggat gggtagtaaa cacgtgggga acctgccccca	120
tagtctggga taccacttgg aaacaggtgc taataccgga taagaaagca gatcgcatga	180
tcagcttata aaaggcggcg taagctgtcg ctatgggatg gcccgcggt gcattagcta	240
gttggtaggg taacggccta ccaaggcaat gatgcatagc cgagttgaga gactgatcgg	300
ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc	360
acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaaggttt tcggatcgta	420
aagctctgtt gttggtgaag aaggatagag gtagtaactg gcctttatct gacggtaatc	480
aaccagaaag tcacggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag gtggcaagcg	540
ttgtccggat ttattgggcg taaagcgagc gcagggcgaa gaataagtct gatgtgaaag	600
ccctcggctt aaccgaggaa ctgcatcgga aactgttttt cttgagtgca gaagaggaga	660
gtggaactcc atgtgtagcg gtggaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag	720
gcggctctct ggtctgcaac tgacgtgag gctcgaaagc atgggtagcg aacaggatta	780
gataccctgg tagtccatgc cgtaaacgat gtagtctaag tggtaggagg tttccgcctc	840
tcagtgtgct agctaacgca ttaagcactc cgctggggg agtacgaccg caaggttgaa	900
actcaaagga attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca	960
acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc tagtgcaatc cgtagagata cggagttccc	1020
ttcggggaca ctaagacagg tgggtgcatg ctgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg	1080
gttaagtccc gcaacgagcg caacccttgt cattagttgc cagcattaag ttgggcactc	1140

taatgagact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatgccc	1200
cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacagtac aacgaggagc aagcctgcga	1260
aggcaagcga atctcttaaa gctgttctca gttcggactg cagtctgcaa ctcgactgca	1320
cgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcacgccgc ggtgaatacg ttcccggggc	1380
ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tctgcaatgc ccaaagccgg tggcctaacc	1440
ttcggaagg agccgtctaa gcagtcaggt gttcc	1475

<210> 2
 <211> 1472
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus paracasei*

<400> 2	
gcaggtggcg ggtgctatac atgcagtcga cgagttctcg ttgatgatcg gtgcttgcac	60
cgagattcaa catggaacga gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta	120
agtgggggat aacatttgga aacagatgct aataccgcat agatccaaga accgcatggt	180
tcttggtgta aagatggcgt aagctatcgc ttttgatgg acccgcgcg tattagctag	240
ttggtgaggt aatggctcac caaggcgatg atacgtagcc gaactgagag gttgatcggc	300
cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca	360
caatggacgc aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggcttt cgggtcgtaa	420
aactctgttg ttggagaaga atggtcggca gagtaactgt tgtcggcgtg acggtatcca	480
accagaaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt	540
tatccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt tttaagtctg atgtgaaagc	600
cctcggctta accgaggaag cgcacggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag	660
tggaaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg	720
cggctgtctg gtctgtaact gacgtgagg ctcgaaagca tgggtagcga acaggattag	780
ataccctggt agtccatgcc gtaaaccgat aatgctaggt gttggagggt ttccgccctt	840
cagtgccgca gctaaccgat taagcattcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac	900
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac	960
gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ttgatcacct gagagatcag gtttcccctt	1020
cgggggcaaa atgacagggt gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttggt	1080
taagtccgc aacgagcgca acccttatga ctagttgcc gcathtagtt gggcactcta	1140

gtaagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtgggggatga cgtcaaatca tcatgccctt 1200
 tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa cgagttgcga gaccgcgagg 1260
 tcaagctaatt ctcttaaagc cattctcagt tcggactgta ggctgcaact cgcctacacg 1320
 aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag cacgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1380
 gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacaccc gaagccggtg gcgtaaccct 1440
 ttagggagcg agcgtctaag tggctcacgc ct 1472

<210> 3
 <211> 1492
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus plantarum

<400> 3
 tatcagtacg tgctataatg cagtcgacga ctctggtatt gattggtgct tgcattcatga 60
 tttacatttg agtgagtggc gaactggtga gtaacacgtg ggaaacctgc ccagaagcgg 120
 gggataaacac ctggaaacag atgctaatac cgcataacaa cttggaccgc atggtccgag 180
 cttgaaagat ggcttcggct atcacttttg gatggtcccg cggcgtatta gctagatggt 240
 ggggtaacgg ctccacctgg caatgatacg tagccgacct gagagggtaa tcggccacat 300
 tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg 360
 gacgaaagtc tgatggagca acgccgcgtg agtgaagaag ggtttcggct cgtaaaactc 420
 tgttggttaa gaagaacata tctgagagta actgttcagg tattgacggt atttaaccag 480
 aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc ggttttttaa gtctgatgtg aaagccttcg 600
 gctcaaccga agaagtgcatt cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa 660
 ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct 720
 gtctggtctg taactgacgc tgaggctcga aagtatgggt agcaaacagg attagatacc 780
 ctggtagtcc ataccgtaaa cgatgaatgc taagtgttg agggtttccg cccttcagtg 840
 ctgcagctaa cgcattaagc attccgcctg ggggagtagc gcccgcaagg ctgaaactca 900
 aaggaattga cggggggccc gcacaagcgg tgggagcatg tgggtttaat tcaaagctac 960
 gcgaagaaac cttaccacag ttttgacata ctaatgcaaa ttctaaagag attagaacgt 1020
 ttcccttccg gggacatggg ataccgggtg ggtgcatggg ttggtcgtca gcttcgtggt 1080
 cgtgagaatg tttgggttta agttccccga aacgagcgca acccttatta tcagttgcc 1140

gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga	1200
cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa	1260
cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaata ctcttaaagc cattctcagt tcggattgta	1320
ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg	1380
tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacaccc	1440
aaagtcggtg gggtaacctt tagaaccagc cgcctaattg caccaccatg cg	1492