



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A61K 35/745; C12N 1/20; A61P 13/12; (13) B
A61K 35/747; A61P 1/10



1-0048128

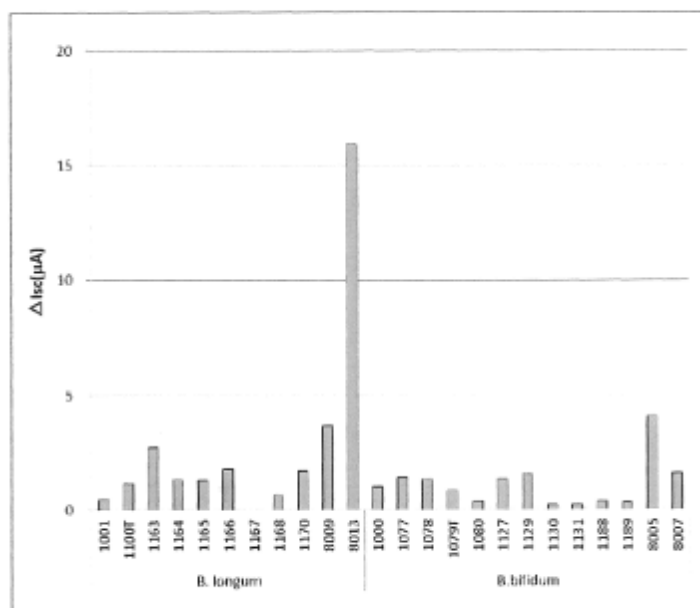
-
- (21) 1-2019-02576 (22) 18/10/2017
(86) PCT/JP2017/037698 18/10/2017 (87) WO 2018/074514 26/04/2018
(30) 2016-206422 20/10/2016 JP
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/07/2019 376A
(73) BIOFERMIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
3-4, Ibukidai Higashimachi 7-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2242 Japan
(72) MAEDA Ayako (JP); SHIMAKAWA Masaki (JP); OHNO Hiroshi (JP).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)
-

- (54) VI KHUẨN BIFIDOBACTERIUM LONGUM CLA8013, CHẾ PHẨM CHỨA
CHỨNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM VI KHUẨN ĐƯỢC XỬ
LÝ CỦA BIFIDOBACTERIUM LONGUM CLA8013

(21) 1-2019-02576

(57) Sáng chế đề cập đến tác nhân có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân này chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng, với điều kiện là trường hợp mà chất vận chuyển ion là kênh clorua và tác động là ức chế; trường hợp mà chất vận chuyển ion là chất đồng vận chuyển $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (NKCC1) và tác động là ức chế; trường hợp mà vi khuẩn là *Bifidobacterium infantis* 35624; và trường hợp mà vi khuẩn là *Lactobacillus salivarius* UCC118 được ngoại trừ. Tác nhân theo sáng chế là hữu dụng trong việc hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, và/hoặc xúc tiến việc đi tiêu, và do đó, sử dụng được làm thuốc, chất bổ trợ, v.v..

Fig.1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân để hoạt hóa kênh clorua, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu, chứa vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý nào đó của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ion clorua (Cl^-), ion canxi (Ca^{2+}), ion natri (Na^+), ion kali (K^+), v.v.. được biết đến là đáp ứng với vận chuyển nước/chất điện phân, việc tiết, điều chỉnh thể tích tế bào, hoặc tương tự, và còn được biết đến là đóng vai trò quan trọng làm yếu tố gây ảnh hưởng đến đáp ứng tế bào. Ví dụ, kênh clorua là protein ở màng vận chuyển ion để vận chuyển ion clorua. Đã có báo cáo rằng, các dạng khác nhau của chất vận chuyển ion xuyên bào có mặt trong màng tế bào của dây thần kinh, cơ, và biểu mô, và có liên quan trong các chức năng sinh lý khác nhau và các cơ chế bảo vệ tế bào.

Trong đường dạ dày ruột, ion clorua có liên quan sâu trong tình trạng bệnh, như là tiêu chảy và táo bón, và các ví dụ về bệnh được tạo ra bởi sự xáo trộn trong cân bằng ion clorua gồm có táo bón khó chữa, teo loạn trương lực cơ, bệnh kết hợp với tăng canxi niệu như là sỏi thận, loãng xương, mất ngủ, xơ nang, động kinh, không súc cảm, hen, viêm phế quản, bệnh thần kinh, v.v. (Tài liệu sáng chế 1).

Trong khi, các tế bào vi khuẩn của *Lactobacillus gasseri*, sản phẩm được xử lý của chúng, và hỗn hợp của chúng được biết đến là ức chế kênh clorua trong ruột lớn, dẫn đến ức chế tiết hơi ẩm và do đó làm giảm hàm lượng ẩm trong đường dạ dày ruột (Tài liệu sáng chế 2). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào về vi khuẩn hoặc tương tự mà hoạt hóa kênh clorua.

Các tài liệu tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Patent Nhật Bản số 4786866

Tài liệu sáng chế 2: JP 2014-101282 A

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là để tạo ra tác nhân mới tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân mới để hoạt hóa kênh clorua, tác nhân mới để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc tác nhân mới để thúc đẩy việc đi tiêu. Mục đích khác của sáng chế

là để tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý mới có khả năng tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, khả năng hoạt hóa kênh clorua, tác dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc có khả năng thúc đẩy việc đi tiêu; và phương pháp sản xuất sản phẩm vi khuẩn được xử lý.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu để đạt được các mục đích được nêu trên đây, và kết quả là đã phát hiện ra rằng, vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý nào đó của chúng tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, hoạt hóa kênh clorua, có hiệu quả trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc có khả năng thúc đẩy việc đi tiêu. Các tác giả sáng chế đã tiến hành kiểm nghiệm hơn nữa, đã thu được các phát hiện mới khác nhau, và đã hoàn thiện sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các dấu hiệu sau.

(1) tác nhân có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân này chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng, với điều kiện là trường hợp mà chất vận chuyển ion là kênh clorua và tác động là ức chế; trường hợp mà chất vận chuyển ion là chất đồng vận chuyển $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (NKCC1) và tác động là ức chế; trường hợp mà vi khuẩn là *Bifidobacterium infantis* 35624; và trường hợp mà vi khuẩn là *Lactobacillus salivarius* UCC118 được ngoại trừ.

(2) Tác nhân theo dấu hiệu (1) trên đây, trong đó tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào là việc hoạt hóa kênh clorua.

(3) Tác nhân theo theo dấu hiệu (1) hoặc dấu hiệu (2) trên đây, mà là tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu.

(4) Tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng, với điều kiện là sản phẩm được xử lý không chứa chất trao đổi lên men vi khuẩn bất kỳ và chó và mèo được ngoại trừ khỏi đối tượng dùng thuốc.

(5) Tác nhân theo dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu từ (1) đến (4) trên đây, trong đó vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* là *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium pseudolongum*, hoặc *Bifidobacterium thermophilum*.

(6) Tác nhân theo dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu từ (1) đến (5) trên đây, trong đó vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* là *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352) hoặc *Bifidobacterium longum* MM-2 (Số truy cập: NITE BP-818).

(7) Tác nhân theo dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu từ (1) đến (6) trên đây, trong đó vi khuẩn của chủng *Lactobacillus* là *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, hoặc *Lactobacillus brevis*.

(8) Tác nhân theo dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu từ (1) đến (6) trên đây, trong đó vi khuẩn của chủng *Lactobacillus* là *Lactobacillus acidophilus* JCM1132, *Lactobacillus johnsonii* JCM2012, hoặc *Lactobacillus gasseri* JCM5813.

(9) *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352).

(10) Phương pháp sản xuất sản phẩm vi khuẩn được xử lý của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, phương pháp này bao gồm các bước là

tạo huyền phù tế bào vi khuẩn trong dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc trong dung môi chứa Môi trường Đại bàng được biến đổi của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM) và Ham's F-12 để tạo ra huyền phù vi khuẩn;

để huyền phù vi khuẩn ở dưới điều kiện kỵ khí; và

tiếp theo là lọc dịch nổi của huyền phù vi khuẩn để tạo ra dịch lọc làm sản phẩm được xử lý;

và không bao gồm bước lên men bất kỳ.

(11) Dịch nổi của huyền phù chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus* và dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc dung môi chứa DMEM và Ham's F-12, với điều kiện là dịch nổi không chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất tác nhân mới có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột. Tác nhân theo sáng chế có tác dụng đặc biệt rõ rệt trong việc hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc có khả năng thúc đẩy việc đi tiêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện những thay đổi dòng đoạn mạch trong các tế bào biểu mô dạ dày ruột T84 với sự có mặt của sản phẩm vi khuẩn được xử lý của chủng *Bifidobacterium*.

Fig.2 là đồ thị thể hiện những thay đổi dòng đoạn mạch trong các tế bào biểu mô dạ dày ruột T84 với sự có mặt của sản phẩm vi khuẩn được xử lý của chủng *Lactobacillus*.

Fig.3 thể hiện quy trình thử nghiệm để đo urê nitơ huyết/ đo urê máu (blood urea nitrogen - BUN).

Fig.4 là đồ thị thể hiện các kết quả đo các giá trị BUN.

Fig.5 là đồ thị thể hiện các kết quả đo thời gian để loại trừ phân bị nhuộm màu đỏ.

Fig.6 là đồ thị thể hiện những thay đổi dòng đoạn mạch trong các tế bào biểu mô dạ dày ruột T84 với sự có mặt của sản phẩm được xử lý 8013E được xử lý với các dung môi khác nhau (nước tinh khiết, nước muối sinh lý, DMEM/F-12, và PBS(-)).

Fig.7 là đồ thị thể hiện các kết quả đo các giá trị BUN.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất tác nhân có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân này chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng. Cụ thể, sáng chế đề xuất, ví dụ, tác nhân để hoạt hóa kênh clorua, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu. Tác nhân theo sáng chế chỉ cần chứa vi khuẩn axit lactic được đề cập trên đây hoặc sản phẩm được xử lý của chúng, và còn có thể chứa thành phần khác. Để làm vi khuẩn, một chủng có thể được sử dụng riêng, và cả hỗn hợp của hai chủng hoặc nhiều chủng có thể được sử dụng.

Tác nhân theo sáng chế chứa vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*. Làm vi khuẩn axit lactic của chủng *Bifidobacterium*, được ưu tiên là *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium thermophilum*, v.v., và trong số các chủng này, được ưu tiên hơn là *Bifidobacterium longum* hoặc *Bifidobacterium bifidum*. Làm *Bifidobacterium longum* hoặc *Bifidobacterium bifidum*, được ưu tiên là *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352), *Bifidobacterium longum* ID8009, *Bifidobacterium longum* ID1163, *Bifidobacterium longum* MM-2: ID1001 (Số truy cập: NITE BP-818), hoặc *Bifidobacterium bifidum* ID8005, và được ưu tiên hơn là *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352) hoặc *Bifidobacterium longum* MM-2: ID1001 (Số truy cập: NITE BP-818). Làm vi khuẩn axit lactic của chủng *Lactobacillus*, được ưu tiên là *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*, v.v., và trong số các chủng này, được ưu tiên hơn là *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, hoặc *Lactobacillus johnsonii*. Làm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, hoặc *Lactobacillus johnsonii*, được ưu tiên là

Lactobacillus acidophilus JCM1132 (ID2152^T), *Lactobacillus gasseri* JCM5813 (ID2145), hoặc *Lactobacillus johnsonii* JCM2012 (ID2153^T), và được ưu tiên hơn là *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 (ID2152^T).

Các tế bào vi khuẩn này là có sẵn từ ATCC, IFO, và các tổ chức khác, hoặc Quỹ tài trợ Bifidus của Nhật Bản và các quỹ tài trợ khác. *Bifidobacterium longum* CLA8013 và *Bifidobacterium longum* MM-2 được ký gửi ở Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation, NITE Patent Microorganisms Depository, Room 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 Japan (Viện kỹ thuật và Đo lường Quốc gia Nhật Bản) theo các Số truy cập được thể hiện dưới đây. Tế bào vi khuẩn có trên thị trường cũng có thể được sử dụng như thích hợp.

Bifidobacterium longum CLA8013 (được ký gửi ngày 21 tháng 9 năm 2016, theo Số truy cập là NITE BP-02352)

Bifidobacterium longum MM-2 (được ký gửi ngày 17 tháng 9 năm 2009, theo Số truy cập là NITE BP-818)

Tác nhân theo sáng chế không chứa *Bifidobacterium infantis* 35624 cũng không chứa *Lactobacillus salivarius* UCC118.

Tác nhân theo sáng chế còn có thể chứa vi khuẩn hữu dụng khác với vi khuẩn axit lactic được đề cập trên đây. Các ví dụ về vi khuẩn hữu dụng khác này gồm có vi khuẩn đường hóa, như là *Bacillus subtilis* gồm có *Bacillus subtilis* 129 BIO H(α), *Bacillus mesentericus*, và *Bacillus polyfermenticus*; bào tử hình thành vi khuẩn axit lactic, như là *Bacillus coagulans*; vi khuẩn axit butyric, như là *Bacillus toyoi*, *Bacillus licheniformis*, và *Clostridium butyricum*; khuẩn cầu axit lactic, như là chủng *Leuconostoc* gồm có *Leuconostoc mesenteroides*, chủng *Lactococcus* gồm có *Lactococcus lactis* và *Lactococcus cremoris*, chủng *Tetragenococcus* gồm có *Tetragenococcus halophilus*, chủng *Pediococcus* gồm có *Pediococcus acidilactici* và *Pediococcus pentosaceus*, chủng *Oenococcus* gồm có *Oenococcus oeni*; và các chủng khác.

Các tế bào vi khuẩn này là có sẵn từ ATCC, IFO, và các tổ chức khác. Tế bào vi khuẩn có trên thị trường cũng có thể được sử dụng như thích hợp.

Tế bào vi khuẩn được đề cập trên đây có thể thu được bằng cách nuôi cấy ở các điều kiện đã được biết đến rộng rãi hoặc điều kiện tương tự. Ví dụ, thông thường một hoặc nhiều dạng của vi khuẩn axit lactic được đề cập trên đây được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy lỏng chứa glucoza, dịch chiết men, pepton, v.v.. ưa khí hoặc kỵ khí ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 45°C trong khoảng 4 đến 72 giờ. Bằng cách gom tế bào từ dịch nuôi cấy lỏng và tiếp theo là rửa, thu được tế bào vi khuẩn ướt.

Vi khuẩn được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là các tế bào sống, nhưng có thể là các tế bào chết, ví dụ, ở dạng khô (sản phẩm tế bào vi khuẩn khô) hoặc tương tự, và còn có thể là hỗn hợp của các tế bào sống và các tế bào chết v.v.. Sản phẩm tế bào vi khuẩn khô tốt hơn là sản phẩm tế bào vi khuẩn khô cỡ micron đơn. Sản phẩm tế bào vi khuẩn khô thường là có nghĩa là tế bào vi khuẩn khô riêng hoặc dạng kết tập của các tế bào vi khuẩn khô. “Micron đơn” có nghĩa là kích cỡ mà được làm tròn đến 1 đến 10 μ m bằng cách làm tròn đến số nguyên gần nhất.

Theo sáng chế, sản phẩm vi khuẩn được xử lý có nghĩa là sản phẩm vi khuẩn thu được bằng cách xử lý vi khuẩn theo cách nào đó, và việc xử lý là không bị giới hạn cụ thể. Sản phẩm vi khuẩn được xử lý có thể là, ví dụ, hỗn hợp lỏng của tế bào vi khuẩn và dung môi, dịch nổi hoặc dịch nổi ly tâm của chúng, dịch lọc thu được bằng cách lọc hỗn hợp lỏng hoặc dịch nổi sử dụng bộ lọc hoặc tương tự, v.v.. Hỗn hợp lỏng của tế bào vi khuẩn và dung môi có thể là huyền phù chỉ cần là tế bào vi khuẩn và dung môi được trộn. Hỗn hợp lỏng có thể được sử dụng ngay sau khi trộn, hoặc sau khi để lại đó, ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 45°C trong khoảng 30 phút đến khoảng 3 ngày dưới điều kiện ưa khí hoặc điều kiện kỵ khí. Sản phẩm vi khuẩn được xử lý còn có thể là dịch chiết hoặc tương tự từ đó. Trong bản mô tả này, sản phẩm vi khuẩn được xử lý này có thể được thể hiện đơn giản là “dịch chiết”. Sản phẩm vi khuẩn được xử lý còn có thể là sản phẩm thu được bằng cách, ví dụ, làm đặc, tạo bột, hoặc tạo đông khô cho dịch lọc, dịch chiết, hoặc hỗn hợp lỏng theo kỹ thuật đã được biết đến. Sản phẩm vi khuẩn được xử lý theo sáng chế không chứa chất trao đổi lên men vi khuẩn bất kỳ. Các ví dụ về dung môi gồm có dung môi không có đường, như là chất đệm phosphat (phosphate buffer - PBS); môi trường nuôi cấy, như là DMEM/F-12; v.v.. Chất đệm phosphat (PBS) có thể là chất đệm phosphat với muối canxi và magie (PBS (+)) hoặc chất đệm phosphat không có muối canxi và magie (PBS (-)). Điều kiện ly tâm không bị giới hạn cụ thể, và lực ly tâm có thể là 2.500 đến 10.000 x G. Kích cỡ mắt lưới của bộ lọc là không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là bộ lọc sử dụng được để lọc vi khuẩn, và ví dụ, bộ lọc có trên thị trường với cỡ mắt lưới nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 μ m (ví dụ, 0,22 μ m) có thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy, như là DMEM/F-12, có thể chứa đường nhưng không nhất thiết phải chứa đường. Dung môi theo sáng chế không gồm có nước tinh khiết hoặc nước muối sinh lý.

Theo sáng chế, chất trao đổi lên men vi khuẩn có nghĩa là, ví dụ, chất trao đổi lên men vi khuẩn ở dạng lỏng thu được bằng cách gieo chủng vi khuẩn trong môi trường tăng trưởng vi khuẩn chứa bột sữa không kem, lactoza, glucoza, pepton, dịch chiết men, v.v., và tiếp theo nuôi cấy ở nhiệt độ nào đó (ví dụ, từ 20 đến 40°C) trong khoảng thời gian nào đó (ví dụ, từ 2 đến 60 giờ).

Sản phẩm vi khuẩn được xử lý theo sáng chế có thể là sản phẩm chứa hoặc không chứa tế bào vi khuẩn, nhưng tốt hơn là sản phẩm không chứa tế bào vi khuẩn. Tuy nhiên, điều này không áp dụng cho sản phẩm vi khuẩn được xử lý theo sáng chế, được bào chế không có vi khuẩn lên men.

Theo sáng chế, đường dạ dày ruột có thể là ruột nhỏ, như là tá tràng, hỗng tràng/ruột chảy, hồi tràng/ruột hồi, hoặc tương tự; ruột lớn, như là manh tràng/ruột tịt, ruột kết lên/kết tràng lên, ruột kết ngang/kết tràng ngang, ruột kết xuống/kết tràng xuống, ruột kết xích ma/kết tràng xích ma, trực tràng/ruột thẳng, hoặc tương tự; v.v.. Hơn nữa, trong sáng chế, đường dạ dày ruột có thể được giữ ở trong thân, được cắt ra khỏi thân, hoặc được lấy ra một phần khỏi thân qua đường rạch ở bụng.

Theo sáng chế, chất vận chuyển ion xuyên bào có nghĩa là thực thể mà vận chuyển ion qua các tế bào, và còn để chỉ là thực thể vận chuyển ion xuyên bào. Các ví dụ về chất vận chuyển ion gồm có kênh ion, chất đồng vận chuyển ion, chất trao đổi ion, v.v.. Các ví dụ về kênh ion gồm có kênh clorua, kênh canxi, kênh natri, kênh kali, kênh cation, v.v.. Các ví dụ về kênh clorua gồm có kênh clorua CFTR v.v.. Các ví dụ về chất đồng vận chuyển ion gồm có chất đồng vận chuyển $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (NKCC1) v.v.. Các ví dụ về chất trao đổi ion gồm có chất trao đổi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (DRA) v.v..

Theo sáng chế, “có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào” có nghĩa là thay đổi chức năng của chất vận chuyển ion xuyên bào, ví dụ, hoạt hóa hoặc ức chế chức năng. Cụ thể có nghĩa là, hoạt hóa kênh clorua, hoạt hóa kênh canxi, hoạt hóa kênh natri, hoạt hóa kênh kali, hoạt hóa kênh cation, hoạt hóa chất đồng vận chuyển $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (NKCC1), hoạt hóa chất trao đổi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (DRA), v.v.. Ngoài ra, có nghĩa cụ thể là ức chế kênh canxi, ức chế kênh natri, ức chế kênh kali, ức chế kênh cation, ức chế chất trao đổi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (DRA), v.v..

Tuy nhiên, sáng chế không gồm có trường hợp mà chất vận chuyển ion là kênh clorua và tác động là ức chế; trường hợp mà chất vận chuyển ion là chất đồng vận chuyển $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (NKCC1) và tác động là ức chế; trường hợp mà vi khuẩn là *Bifidobacterium infantis* 35624; hoặc trường hợp mà vi khuẩn là *Lactobacillus salivarius* UCC118.

Tiếp theo là phần mô tả từng dấu hiệu của tác nhân theo sáng chế có tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột. Cụ thể là mô tả tác nhân để hoạt hóa kênh clorua, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, và tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu.

Phương án theo sáng chế là, ví dụ, tác nhân để hoạt hóa kênh clorua. Theo sáng chế, việc hoạt hóa kênh clorua có nghĩa là, ví dụ, làm tăng khả năng vận chuyển ion xuyên bào khi được so sánh với khả năng đó trước khi dùng tác nhân theo sáng chế. Khả năng vận chuyển ion xuyên bào có thể được đo bằng, ví dụ, kỹ thuật dòng đoạn mạch (tham khảo tài liệu: Shinichiro Karaki

and Atsukazu Kuwahara, Electrophysiological measurement of transepithelial ion transport: short-circuit current technique, *Folia Pharmacol. Jpn.*, 123, 211-218, 2004).

Phương án theo sáng chế là, ví dụ, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận. Theo sáng chế, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận là hữu dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận. Theo sáng chế, “ngăn ngừa” bệnh thận có nghĩa là, ví dụ, ngăn ngừa sự phát triển bệnh thận bởi tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, ví dụ, trên kênh ion, và “điều trị” bệnh thận có nghĩa là, ví dụ, làm nhẹ bớt triệu chứng kết hợp với bệnh thận hoặc chữa bệnh. Các ví dụ về bệnh thận gồm có suy thận, urê-huyết, bệnh thần kinh do đái tháo đường, viêm thận tiểu cầu mạn tính, v.v.. Bệnh thận có thể là, ví dụ, mạn tính hoặc cấp tính. Các ví dụ về mạn tính bệnh thận gồm có mạn tính suy thận, viêm thận tiểu cầu mạn tính, bệnh thần kinh do đái tháo đường, hội chứng hư thận, v.v.. Các ví dụ về cấp tính bệnh thận gồm có viêm thận tiểu cầu cấp tính, suy thận cấp, hội chứng urê huyết tan máu, v.v..

Theo sáng chế, phương pháp để đánh giá sự tăng cường trong bệnh thận là không bị giới hạn cụ thể, và tăng cường có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi v.v.. Các ví dụ về phương pháp để đánh giá sự tăng cường trong bệnh thận làm kết quả của việc dùng vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng trong sáng chế hoặc dùng tác nhân theo sáng chế, bao gồm phương pháp đòi hỏi việc đo urê nitơ huyết (blood urea nitrogen - BUN) v.v.. Trong trường hợp mà phương pháp có liên quan đến việc đo BUN được sử dụng, khi BUN giảm so với giá trị đó trước khi dùng, ví dụ, vi khuẩn, sản phẩm vi khuẩn được xử lý, hoặc tác nhân vi khuẩn được xử lý, có thể đánh giá được rằng, vi khuẩn, sản phẩm vi khuẩn được xử lý, hoặc tác nhân vi khuẩn được xử lý có tăng cường tác dụng trên bệnh thận.

Phương án theo sáng chế là, ví dụ, tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu. Tác nhân theo sáng chế có tác động hoạt hóa kênh clorua, nhờ đó làm tăng hàm lượng ẩm trong đường dạ dày ruột, và đạt được khả năng thúc đẩy việc đi tiêu.

Theo sáng chế, tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu có thể, ví dụ, thúc đẩy sinh lý việc đi tiêu hoặc rút ngắn thời gian từ khi dùng đồ ăn cho đến khi đi tiêu.

Theo sáng chế, phương pháp để đánh giá tác dụng trong thúc đẩy việc đi tiêu là không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ, tác dụng có thể được đánh giá dựa trên tần suất đi tiêu, thời điểm từ khi dùng đồ ăn cho đến khi đi tiêu, hoặc hàm lượng ẩm trong phân.

Tác nhân theo sáng chế, mà chứa vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng riêng hoặc hỗn hợp của vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý và các thành phần khác, có thể được sử dụng làm vật liệu thô để sản xuất dược phẩm, tủa dược phẩm, đồ ăn hoặc đồ uống, phụ gia đồ ăn, đồ ăn, hoặc tương tự; hoặc được sử dụng trực tiếp ở dạng dược phẩm, tủa dược phẩm, đồ ăn hoặc đồ uống, phụ gia đồ ăn, đồ ăn, hoặc tương tự. Chế phẩm theo sáng chế không cần chứa

coenzym Q₁₀. Cụ thể, dược phẩm, tựa dược phẩm, đồ ăn hoặc đồ uống chế phẩm, phụ gia đồ ăn chế phẩm, đồ ăn chế phẩm, hoặc tương tự là các dấu hiệu của sáng chế. Dược phẩm chứa tác nhân theo sáng chế cũng là một trong các phương án được ưu tiên của sáng chế.

Dạng phân liều của dược phẩm theo sáng chế có thể được xác định như thích hợp để dùng thuốc khi cân nhắc các đặc tính lý hóa và sinh học của từng thành phần, v.v.. Dược phẩm thích hợp để dùng theo đường miệng, và tốt hơn là ở dạng tác nhân bên trong. Dạng phân liều của dược phẩm theo sáng chế còn có thể là chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa. Các ví dụ về dạng phân liều của tác nhân bên trong gồm có chế phẩm rắn, như là viên nén (gồm có viên nén được bao đường),片片, hạt mịn, bột, hạt, viên tròn, viên nén để nhai, viên thuốc hình thoi, và viên nang; chế phẩm lỏng, như là dung dịch, huyền phù, nhũ tương, xi-rô, và cốm ngọt; và chế phẩm bán rắn, như là chế phẩm dạng gel; v.v.. Trong số các loại này, dạng viên nén, dạng bột, dạng lỏng, hoặc dạng huyền phù được ưu tiên. Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa một cách thích hợp, ngoài vi khuẩn axit lactic, các chất phụ trợ đã được biết đến rộng rãi hoặc tương tự được sử dụng trong ngành, như là tá dược (ví dụ, sacaroza, lactoza, tinh bột, tinh thể xenluloza, natri phosphat, magie cacbonat, pectin, dextrin, tragacan, hoặc tương tự), chất kết dính (ví dụ, tinh bột, gelatin, carmelloza natri, metylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, polyvinyl pyrrolidon, pectin, tragacan, hoặc tương tự), chất gây rã (ví dụ, tinh bột, carmelloza natri, tragacan, hoặc tương tự), chất làm trơn (ví dụ, đá tan, magie stearat, canxi stearat, macrogol, este axit béo sucroza, hoặc tương tự), chất ổn định (natri hydrosulfit, natri thiosulfat, natri edetat, natri xitrat, axit ascorbic, dibutyl hydroxytoluen, hoặc tương tự), chất làm đặc (natri carboxymetylxenluloza hoặc tương tự), chất mang (sáp có điểm nóng chảy thấp, bơ cacao, hoặc tương tự), chất tạo màu, tác nhân tạo hương (chất tạo hương), chất tạo sáng, chất pha loãng, chất đệm, tác nhân tạo nhũ tương, tác nhân tạo phân tán, tác nhân tạo huyền phù, chất khử trùng, chất tăng cường hấp thụ, chất cải biến, hoặc tương tự. Tổng lượng của vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng trong toàn bộ chế phẩm cuối thường được chọn như thích hợp là nằm trong khoảng từ 0,000001 đến 99% theo khối lượng. Lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 50% theo khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 25% theo khối lượng.

Theo sáng chế, chế phẩm rắn dùng theo đường miệng (viên nén (gồm có viên nén được bao đường), viên tròn, viên nang, dạng bột, dạng hạt, hoặc tương tự) được ưu tiên, mà có thể được bào chế bằng cách trộn thành phần hoạt tính với chất phụ trợ, ví dụ, tá dược (lactoza, manitol, glucoza, vi tinh thể xenluloza, tinh bột, hoặc tương tự), chất kết dính (hydroxypropylxenluloza, polyvinyl pyrrolidon, magie aluminometasilicat, hoặc tương tự), chất gây rã (canxi xenluloza glycolat, hoặc tương tự), chất làm trơn (magie stearat, hoặc tương tự),

chất ổn định, tác nhân hòa tan (axit glutamic, axit aspartic, hoặc tương tự), hoặc tương tự, theo phương pháp thông thường. Như cần thiết, chế phẩm này còn có thể được bao với tác nhân bao (sacaroza, gelatin, hydroxypropylxenluloza, hydroxypropylmethylxenluloza phtalat, hoặc tương tự), và lớp bao có thể gồm có hai hoặc nhiều lớp.

Trong các trường hợp mà tác nhân theo sáng chế được sử dụng ở dạng chế phẩm rắn, phụ thuộc vào phương pháp làm khô, bột có thể đơn giản được trộn hoặc được ép thành hạt hoặc viên nén. Trong trường hợp mà phương pháp được dùng để thu được hạt hoặc viên nén, tiến hành ngào trộn với việc sử dụng dung dịch làm chất kết dính và tiến hành làm khô để tạo ra chế phẩm rắn mong muốn. Hơn nữa, bột hoặc hạt thu được như trên có thể được bao nang để tạo ra viên nang.

Ví dụ, để bào chế viên nén, tốt hơn là sử dụng máy tạo viên nén đã được biết đến. Các ví dụ về máy tạo viên nén gồm có máy tạo viên nén dập đơn và máy tạo viên nén quay. Ngoài ra, viên tròn, viên nén để nhai, hoặc viên thuốc hình thoi có thể được chuẩn bị theo các phương pháp đã được biết đến rộng rãi, ví dụ, bằng cùng phương cách như các phương cách để tạo ra viên nén.

Để thu được hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn lượng nhỏ thành phần hoạt tính (vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng) với lớn lượng bột khác, được gọi là phương pháp trộn dần dần tốt hơn là được dùng. Ví dụ, bằng cách trộn kỹ thành phần hoạt tính với bột khác ở lượng từ 100 đến 200 lần thể tích của nó và tiếp theo là trộn hỗn hợp bột đồng nhất thu được với bột còn lại, có thể thu được hỗn hợp bột pha loãng đồng nhất.

Để làm khô chất nền trong nước, phun làm khô, làm khô L, làm khô lạnh, hoặc phương cách khác có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, chế phẩm lỏng dùng theo đường miệng (dung dịch, huyền phù, nhũ tương, xi-rô, cồn ngọt, hoặc tương tự) được bào chế bằng cách hòa tan, tạo huyền phù, hoặc tạo nhũ tương thành phần hoạt tính trong chất pha loãng thường được sử dụng (nước tinh khiết, etanol, hoặc hỗn hợp của chúng, hoặc tương tự). Chế phẩm lỏng còn có thể bao gồm tác nhân làm ướt, tác nhân tạo huyền phù, tác nhân tạo nhũ tương, chất tạo ngọt, chất tạo hương, chất tạo mùi thơm, chất bảo quản, chất đệm, hoặc tương tự.

Các ví dụ về chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm có tiêm (ví dụ, tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, và tiêm trong màng bụng), dạng lỏng dùng trong tĩnh mạch, chế phẩm dùng ngoài (ví dụ, chế phẩm dùng trong mũi, chế phẩm dùng qua da, và thuốc mỡ), và viên thuốc đạn (ví dụ, viên thuốc đặt trực tràng và viên thuốc đặt trong âm đạo). Các chế phẩm này có thể được bào chế với việc sử dụng chất phụ trợ được dùng như được mô tả trên đây bằng phương pháp thường được sử dụng trong ngành. Tổng lượng của vi khuẩn hoặc sản phẩm được

xử lý của chúng trong toàn bộ chế phẩm cuối thường được chọn như thích hợp là nằm trong khoảng từ 0,000001 đến 99% theo khối lượng. Lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 50% theo khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 25% theo khối lượng.

Theo sáng chế, các ví dụ về chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm có chế phẩm để tiêm. Chế phẩm để tiêm gồm có chế phẩm ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, và dạng rắn để được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trước sử dụng. Chế phẩm để tiêm được bảo chế bằng cách hòa tan, tạo huyền phù, hoặc tạo nhũ tương thành phần hoạt tính trong dung môi. Làm dung môi, ví dụ, nước cất để tiêm; nước muối sinh lý; dầu thực vật; rượu, như là propylen glycol, polyetylen glycol, etanol, và dạng kết hợp của chúng có thể được sử dụng. Chế phẩm tiêm còn có thể bao gồm chất ổn định, tác nhân hòa tan (axit glutamic, axit aspartic, Polysorbat 80 (nhãn hiệu đã được đăng ký), hoặc tương tự), tác nhân tạo huyền phù, tác nhân tạo nhũ tương, tác nhân làm trơn, chất đệm, chất bảo quản, hoặc tương tự. Các chế phẩm để tiêm này được khử trùng trong bước cuối hoặc được sản xuất ra bằng cách xử lý vô trùng. Chế phẩm tiêm có thể được sản xuất ra ở dạng chế phẩm rắn vô trùng, ví dụ sản phẩm được tạo đông khô, mà được hòa tan trong nước được khử trùng hoặc nước chưng cất vô trùng để tiêm hoặc trong dung môi khác ngay trước khi sử dụng.

Các ví dụ khác về chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm có viên thuốc đạn. Dạng này của chế phẩm có thể được sản xuất ra bằng phương pháp thông thường.

Vi khuẩn được sử dụng trong sáng chế thường là kỵ khí và có chịu đựng được kém đối với không khí hoặc oxy ở điều kiện khô và đối với nhiệt độ cao và độ ẩm cao. Do đó, việc bảo chế chế phẩm này tốt hơn là được thực hiện với sự có mặt của khí tro hoặc trong chân không ở nhiệt độ thấp. Nhiệt độ ở thời điểm bảo chế của chế phẩm là không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là có được tác dụng theo sáng chế, và có thể được chọn theo phương pháp đã được biết đến.

Theo sáng chế, lượng phân liều của vi khuẩn cho động vật gồm có con người, mỗi lần dùng thuốc cho người lớn, tốt hơn là khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^{11} tế bào, tốt hơn nữa là khoảng 1×10^6 đến 1×10^{11} tế bào, và tốt hơn nữa là khoảng 1×10^9 đến 1×10^{11} tế bào.

Theo sáng chế, lượng phân liều của sản phẩm vi khuẩn được xử lý cho động vật gồm có con người, mỗi lần dùng thuốc cho người lớn, tốt hơn là lượng của sản phẩm thu được bằng cách xử lý khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^{14} tế bào vi khuẩn, tốt hơn nữa là lượng của sản phẩm thu được bằng cách xử lý khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{14} tế bào vi khuẩn, và tốt hơn nữa là lượng của sản phẩm thu được bằng cách xử lý khoảng từ 1×10^9 đến 1×10^{14} tế bào vi khuẩn.

Theo sáng chế, khoảng cách thời gian giữa các lần sử dụng của chế phẩm biến thiên phụ thuộc vào đối tượng (ví dụ, chuột), đường dùng (ví dụ, dùng theo đường miệng), dạng phân liều

(ví dụ, lỏng), v.v.. Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, 1 đến 5 lần trong một ngày, 1 đến 5 lần trong một tuần, 1 đến 5 lần trong một tháng, v.v..

Theo sáng chế, quãng thời gian sử dụng chế phẩm biến thiên phụ thuộc vào đối tượng (ví dụ, chuột nhắt), đường dùng (ví dụ, dùng theo đường miệng), dạng phân liều (ví dụ, lỏng), khoảng cách thời gian giữa các lần sử dụng, v.v.. Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, trong từ 1 đến 6 ngày, 1 đến 4 tuần, 1 đến 12 tháng, v.v.. Ngoài ra, chế phẩm có thể, ví dụ, được sử dụng liên tục.

Theo sáng chế, đối tượng của việc dùng tác nhân có thể là, ví dụ, động vật (ví dụ, con người, chuột, chuột nhắt, thỏ, cừu, lợn, bò, mèo, chó, khỉ, v.v..).

Theo sáng chế, đối tượng của việc dùng tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận tốt hơn là động vật khác với chó hoặc mèo (ví dụ, con người, chuột, chuột nhắt, thỏ, cừu, lợn, bò, khỉ, v.v..).

Các ví dụ về bệnh mà được phẩm theo sáng chế có thể áp dụng được gồm có bệnh viêm ruột, viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, bệnh lao dạ dày ruột, viêm ruột non nhiễm khuẩn, viêm ruột non không nhiễm khuẩn, viêm ruột non cấp tính, viêm dạ dày - ruột cấp tính, viêm ruột non mạn tính, hội chứng ruột bị kích thích (IBS), ung thư ruột kết, tắc ruột, táo bón, viêm thận, suy thận, hội chứng hư thận, bệnh thần kinh do đái tháo đường, viêm thận tiểu cầu, sỏi thận, thận đa u nang, thiếu máu thận, xơ cứng thận, ứ nước thận, v.v..

Tác nhân theo sáng chế có thể được sử dụng làm vật liệu thô của chế phẩm khác với được phẩm, và chế phẩm khác này có thể được sản xuất ra sử dụng, ví dụ, vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng được mô tả trên đây, theo phương pháp đã được biết đến. Lượng của vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng trong toàn bộ chế phẩm khác với được phẩm được chọn như thích hợp, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,000001 đến 99% theo khối lượng.

Theo sáng chế, các ví dụ về đồ ăn hoặc đồ uống gồm có đồ uống có ga, đồ uống lactic, sữa lên men, sữa chua, đồ uống *Lactobacillus*, chất bổ trợ, v.v..

Sáng chế bao gồm phương pháp sản xuất sản phẩm vi khuẩn được xử lý của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, phương pháp này bao gồm các bước là:

 tạo huyền phù tế bào vi khuẩn trong dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc trong dung môi chứa DMEM và Ham's F-12 để tạo ra huyền phù vi khuẩn;

 để huyền phù vi khuẩn ở dưới điều kiện kỵ khí; và

 tiếp theo là lọc dịch nổi của huyền phù vi khuẩn để tạo ra dịch lọc làm sản phẩm được xử lý;

 và không bao gồm bước lên men bất kỳ.

Theo sáng chế, các ví dụ về dung môi không có đường gồm có dung dịch chứa axit phosphoric, chất đệm phosphat (PBS), hoặc tương tự, nhưng không gồm có nước tinh khiết hoặc nước muối sinh lý. Dung dịch chứa axit phosphoric có thể là dung dịch bất kỳ chứa ít nhất axit phosphoric. Chất đệm phosphat (PBS) có thể là chất đệm phosphat với muối canxi và magie (PBS(+)) hoặc chất đệm phosphat không có muối canxi và magie (PBS(-)). Ở khả năng vận chuyển ion xuyên bào cao hơn, PBS(-) tốt hơn là được sử dụng. Các ví dụ về đường gồm có lactoza, sucroza, oligosacarit, rượu đường, v.v..

Theo sáng chế, DMEM được sử dụng có thể chứa, ví dụ, glyxin, L-arginin hydroclorua, L-xystin dihydroclorua, L-glutamin, L-histidin monohydroclorua monohydrat, L-isoleuxin, L-leuxin, L-lysin monohydroclorua, L-metionin, L-phenylalanin, L-serin, L-treonin, L-tryptophan, L-tyrosin dinatri hydrat, L-valin, canxi D-pantothenat, cholin clorua, axit folic, i-inositol, nicotinamit, pyridoxin hydroclorua, riboflavin, thiamin hydroclorua, canxi clorua khan, sắt (III) nitrat enneahydrat, magie sulfat khan, kali clorua, natri clorua, natri hydrocacbonat, natri phosphat khan monobazơ, D-glucoza, phẩm đỏ phenol, v.v..

Theo sáng chế, Ham's F-12 được sử dụng có thể chứa, ví dụ, glyxin, L-alanin, L-arginin hydroclorua, L-asparagin monohydrat, axit L-aspartic, L-xystein hydroclorua monohydrat, axit L-glutamic, L-glutamin, L-histidin monohydroclorua monohydrat, L-isoleuxin, L-leuxin, L-lysin monohydroclorua, L-metionin, L-phenylalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tryptophan, L-tyrosin dinatri hydrat, L-valin, biotin, cholin clorua, canxi D-pantothenat, axit folic, nicotinamit, pyridoxin hydroclorua, riboflavin, thiamin hydroclorua, vitamin B12, i-inositol, canxi clorua khan, đồng (II) sulfat pentahydrat, sắt (II) sulfat heptahydrat, kali clorua, magie clorua khan, natri clorua, natri hydrocacbonat, natri phosphat khan monobazơ, kẽm sulfat heptahydrat, D-glucoza, hypoxantin, axit linoleic, axit lipoic, putresxin dihydroclorua, thymidin, phẩm đỏ phenol, natri pyruvat, v.v..

Theo sáng chế, các ví dụ về dung môi chứa DMEM và Ham's F-12 gồm có hỗn hợp dung môi của DMEM và Ham's F-12, dung dịch chứa DMEM và Ham's F-12, môi trường chứa DMEM và Ham's F-12, v.v..

Theo sáng chế, môi trường chứa DMEM và Ham's F-12 được sử dụng có thể là hỗn hợp của các sản phẩm có trên thị trường hoặc tương tự, sản phẩm có trên thị trường đã được trộn (môi trường DMEM/F-12 là sản phẩm của Thermo Fisher Scientific), sản phẩm không có đường có trên thị trường, v.v..

Môi trường DMEM/F-12 được sử dụng trong sáng chế có thể được chuẩn bị bằng cách, ví dụ, trộn các thành phần có mặt trong sản phẩm có trên thị trường hoặc tương tự, như là L-glutamin, phẩm đỏ phenol, natri pyruvat, canxi clorua khan, kali clorua, magie clorua khan,

magie sulfat khan, natri clorua, natri hydrocacbonat, dinatri hydro phosphat khan, natri phosphat khan monobazo, đồng (II) sulfat pentahydrat, sắt (III) nitrat enneahydrat, sắt (II) sulfat heptahydrat, kẽm sulfat heptahydrat, L-alanin, L-arginin hydroclorua, L-asparagin monohydrat, axit L-aspartic, L-xystin dihydroclorua, L-xystein hydroclorua monohydrat, axit L-glutamic, L-glutamin, glyxin, L-histidin monohydroclorua monohydrat, L-isoleuxin, L-leuxin, L-lysin monohydroclorua, L-metionin, L-phenylalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tryptophan, L-tyrosin dinatri hydrat, L-valin, D-biotin, D- pantothenat, cholin clorua, axit folic, i-inositol, nicotinamit, pyridoxin hydroclorua, riboflavin, thiamin hydroclorua, vitamin B12, D-glucoza, hypoxantin, axit linoleic, axit lipoic, putresxin dihydroclorua, thymidin, v.v..

Để thuận tiện, việc sử dụng môi trường DMEM/F-12 có trên thị trường được ưu tiên.

Theo sáng chế, “để ở dưới điều kiện kỵ khí” có nghĩa là, ví dụ, để ở trong điều kiện nơi mà mức oxy trong khoảng trống ở đầu giảm tới zero bằng cách thay thế nitơ, hoặc để ở trong bể nuôi cấy nơi mà mức oxy hòa tan (D. O.) trong huyền phù vi khuẩn bằng 1,0ppm hoặc nhỏ hơn. Đặc biệt tốt là, huyền phù vi khuẩn được để ở dưới điều kiện kỵ khí nơi mà mức oxy hòa tan (D. O.) trong huyền phù vi khuẩn được điều chỉnh đến 0,5ppm hoặc nhỏ hơn bằng cách thay thế nitơ, nhưng đây chỉ là ví dụ không giới hạn.

Theo sáng chế, “để đó huyền phù vi khuẩn” có nghĩa là, sau khi trộn vi khuẩn với dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc dung môi chứa DMEM và Ham's F-12, để hỗn hợp ở đó không có tác động bất kỳ đến huyền phù vi khuẩn và/hoặc vật chứa chứa huyền phù vi khuẩn. Thời gian để đó không bị giới hạn cụ thể, và có thể là, ví dụ, 30 phút hoặc hơn, 1 giờ hoặc hơn, 6 giờ hoặc hơn, v.v., và ngoài ra có thể là 24 giờ hoặc ít hơn, 3 ngày hoặc nhỏ hơn, v.v.. Nhiệt độ ở thời điểm để đó huyền phù vi khuẩn là không bị giới hạn cụ thể, chỉ cần là nhiệt độ cho phép vi khuẩn phát triển. Điều kiện mà huyền phù vi khuẩn được để đó phụ thuộc vào bản chất của vi khuẩn, và có thể là, ví dụ, điều kiện ưa khí hoặc điều kiện kỵ khí.

Theo sáng chế, bộ lọc không chỉ được yêu cầu là có khả năng lọc vi khuẩn, và ví dụ, bộ lọc có trên thị trường với cỡ mắt lưới nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 μ m (ví dụ, 0,22 μ m) có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, các bước là, ví dụ, làm đặc, bột, tạo đông khô, v.v.. của sản phẩm được xử lý của dịch lọc cũng có thể có mặt.

Theo sáng chế, “không bao gồm bước lên men bất kỳ” có nghĩa là, ví dụ, không xuất hiện lên men axit lactic, sản phẩm được xử lý thu được sau tất cả các bước sản xuất trong phương pháp sản xuất không chứa chất trao đổi bất kỳ dẫn đến từ việc lên men axit lactic, v.v..

Theo sáng chế, phương pháp để đánh giá xem có hay không việc lên men axit lactic là không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, trong trường hợp mà pH của huyền phù vi khuẩn được tạo ra được đo sau khi để đó huyền phù vi khuẩn được hạ thấp so với giá trị đó được đo trước khi để đó (được thay đổi theo hướng tạo axit), lên men axit lactic được đánh giá là có xuất hiện, mà là không trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế bao gồm phương pháp hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc thúc đẩy việc đi tiêu, phương pháp bao gồm việc dùng, cho động vật, vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng.

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng để sản xuất tác nhân hoạt hóa kênh clorua, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu.

Sáng chế còn bao gồm vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng để sử dụng cho việc hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc thúc đẩy việc đi tiêu.

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus*, hoặc sản phẩm được xử lý của chúng cho việc hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, hoặc thúc đẩy việc đi tiêu ở động vật.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế sẽ được minh họa chi tiết thông qua các ví dụ, nhưng phạm vi kỹ thuật của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ đó. Các biến đổi khác nhau có thể được tạo trong phạm vi ý tưởng kỹ thuật của sáng chế bởi chuyên gia trong ngành.

Ví dụ 1: Tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý

Vi khuẩn của chủng *Bifidobacterium* hoặc chủng *Lactobacillus* được sử dụng là *Bifidobacterium longum* (*B. longum*): ID1001 (MM-2, Số truy cập: NITE BP-818), JCM1217 (ID1100^T), ID1163, ID1164, ID1165, ID1166, ID1167, ID1168, ID1170, ID8009, CLA8013 (Số truy cập: NITEBP-02352),

Bifidobacterium bifidum (*B. bifidum*): ID1000, ID1077, ID1078, JCM1255 (ID1079^T), ID1080, ID1127, ID1129, ID1130, ID1131, ID1188, ID1189, ID8005, ID8007,

Lactobacillus gasseri (*L. gasseri*): ID2000, JCM1131 (ID2151^T), ID2089, ID2092, ID2093, ID2100, ID2101, ID2124, ID2144, JCM5813 (ID2145), ID2146,

Lactobacillus johnsonii (*L. johnsonii*): JCM2012 (ID2153^T), ID2091, ID2095, ID2096, ID2126, ID2142, ID2143, ID2154,

Lactobacillus acidophilus (*L. acidophilus*): JCM1132 (ID2152^T), ID2073, ID2107, ID2109, ID2110, và

Lactobacillus paracasei loài phụ *paracasei* (*L. paracasei* subsp. *paracasei*): JCM8130 (ID2148^T), ID2003, ID2004, ID2005, ID2012, ID2013, ID2014, ID2019, ID2031, ID2032, ID2033. *B. longum* JCM1217 (ID1100^T), *B. bifidum* JCM1255 (ID1079^T), *L. gasseri* JCM5813 (ID2145), *L. gasseri* JCM1131 (ID2151^T), *L. johnsonii* JCM2012 (ID2153^T), *L. acidophilus* JCM1132 (ID2152^T), và *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM8130 (ID2148^T) là các chủng tiêu chuẩn của từng chủng.

Các tế bào được bảo quản lạnh của từng chủng (khoảng 1×10^6 đến 1×10^8 tế bào) được nuôi cấy kỵ khí sử dụng 10mL môi trường GAM (Nissui Pharmaceutical) chứa 1% glucoza và 0,1% Polysorbat 80 ở 37°C trong 18 đến 30 giờ. Tiếp theo là ly tâm dịch nuôi cấy ($3.000 \times G$, 10 phút, ở nhiệt độ trong phòng) và loại bỏ dịch nổi. Rửa các tế bào với PBS(-), tạo lại huyền phù trong 10mL DMEM/F-12 (là sản phẩm của Thermo Fisher Scientific), và để ở dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau ly tâm, lọc dịch nổi qua bộ lọc ($0,22\mu\text{m}$) để chuẩn bị dịch lọc làm sản phẩm vi khuẩn được xử lý (Dịch chiết: dưới đây có thể được viết tắt là E).

Môi trường nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào biểu mô ruột kết ở người T84 được nuôi cấy trong DMEM/F-12 chứa 10% FBS và penixilin/streptomycin. Các tế bào được gieo hạt ở 4×10^4 tế bào/cm², và để trôi qua mỗi 5 đến 7 ngày. Các tế bào được gieo hạt ở 5×10^5 tế bào/giếng trên bộ lọc Snapwell (Corning, Costar, $1,13\text{cm}^2$), và môi trường được thay 3 ngày một lần. Sau khi được nuôi cấy trong từ 5 đến 7 ngày, các tế bào được sử dụng trong thử nghiệm.

Kỹ thuật dòng đo mạch

Sử dụng hệ buồng Ussing (là sản phẩm của Physiologic Instruments) để đo với việc sử dụng kỹ thuật dòng đo mạch. Snapwell có các tế bào T84 ở dạng đơn lớp được đặt nằm thẳng đứng trong buồng Ussing, và bên trái và bên phải của Snapwell có các tế bào T84 được gắn kèm được nạp với 5mL dung dịch Krebs-Ringer được giữ ở 37°C. Để hệ thống ở trạng thái này trong 20 phút hoặc lâu hơn, và sau khi giá trị dòng điện ngang qua màng tế bào T84 (Isc) được ổn định, thì bắt đầu thử nghiệm. Bổ sung 100 μL sản phẩm vi khuẩn được xử lý vào phía trên là phía màng nhầy của tế bào T84 (phía đối diện với bề mặt nơi mà các tế bào bám dính vào Snapwell), và quan sát những thay đổi tiếp theo trong Isc (ΔIsc) để so sánh những thay đổi trong việc tiết ion xuyên bào. ΔIsc là sự chênh lệch tối đa giữa giá trị Isc sau khi bổ sung mẫu và giá trị Isc ở thời điểm bổ sung mẫu (0 giờ).

Khả năng của sản phẩm vi khuẩn được xử lý để vận chuyển ion xuyên bào

Hàm lượng ẩm trong đường dạ dày ruột tạo ra ảnh hưởng đến độ cứng và chuyển dịch của những thứ có trong dạ dày ruột, và là một trong các nguyên nhân gây ra táo bón hoặc tiêu chảy. Do việc tiết và hấp thụ nước trong đường dạ dày ruột xuất hiện song song với việc chuyển

dịch của ion clorua qua kênh clorua có mặt trong biểu mô dạ dày ruột, chuyển dịch của ion clorua dùng làm chỉ số của chuyển dịch nước. Do đó, sử dụng các tế bào biểu mô dạ dày ruột (tế bào T84), kiểm nghiệm khả năng của vi khuẩn để vận chuyển ion xuyên bào bằng kỹ thuật dòng đoản mạch với buồng Ussing. Các kết quả về khả năng của từng nhóm sản phẩm vi khuẩn được xử lý để vận chuyển ion xuyên bào được đo bằng kỹ thuật dòng đoản mạch sử dụng tế bào T84 được thể hiện trên Fig.1 (*Bifidobacterium*) và Fig.2 (*Lactobacillus*). Sản phẩm được xử lý của *B. longum* CLA8013 thể hiện ΔI_{sc} tối đa.

Áp dụng 10mM (hòa tan trong DMSO) CFTRinh172 (Sigma C992-25MG), mà là chất ức chế kênh clorua, trong dung dịch Krebs-Ringer (5 μ L/5mL, nồng độ cuối: 10 μ M) vào phía màng nhầy của tế bào T84, và sau 2 phút, bổ sung 100 μ L sản phẩm được xử lý của *B. longum* CLA8013 vào phía màng nhầy của tế bào T84. Trong khi ΔI_{sc} của sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *B. longum* CLA8013 không có xử lý CFTRinh172 (được xử lý với DMSO) bằng 11,38 μ A, ΔI_{sc} của sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *B. longum* CLA8013 với xử lý CFTRinh172 bằng 3,50 μ A. Tức là, chất ức chế kênh clorua làm giảm khả năng của sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *B. longum* CLA8013. Các kết quả thể hiện rằng, sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *B. longum* CLA8013 đã hoạt hóa kênh clorua trong đường dạ dày ruột. Kết quả còn thể hiện rằng, sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *B. longum* CLA8013, mà có khả năng hoạt hóa kênh clorua, có khả năng thúc đẩy việc tiết nước và nhờ đó thúc đẩy việc đi tiêu.

Ví dụ 2: Tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý

Phương pháp tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*Bifidobacterium longum* CLA8013)

Các tế bào được bảo quản lạnh của *B. longum* CLA8013 (khoảng 1×10^8 tế bào) được nuôi cấy kỵ khí sử dụng 10mL môi trường GAM (Nissui Pharmaceutical) chứa 1% glucoza và 0,1% Polysorbat 80 ở 37°C trong 30 giờ. Tiếp theo là ly tâm dịch nuôi cấy (3.000 x G, 10 phút, ở nhiệt độ trong phòng) và loại bỏ dịch nổi. Rửa các tế bào với PBS(-), tạo lại huyền phù trong 10mL PBS(-), và để ở dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau ly tâm, lọc dịch nổi qua bộ lọc (0,22 μ m) để chuẩn bị dịch lọc làm sản phẩm được xử lý (8013E) của vi khuẩn (*B. longum* CLA8013).

Dịch pha loãng thu được bằng cách pha loãng 8013E với PBS(-) do vậy mà có độ hấp thụ bằng 33 ở 260nm là để chỉ 8013E(10), và dịch pha loãng thu được bằng cách pha loãng 8013E với PBS(-) do vậy mà có độ hấp thụ bằng 3,3 ở 260nm là để chỉ 8013E(1).

(Tăng cường khả năng ở sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*B. longum* CLA8013) ở chuột nhắt thuộc mô hình bệnh thận mạn tính)

1. Dùng sản phẩm vi khuẩn được xử lý cho chuột nhắt thuộc mô hình bệnh thận mạn tính

Tiến hành thử nghiệm theo thủ tục được thể hiện trên Fig.3. Chuột nhắt đực C57BL/6 chuột (CLEA Japan, Inc.) được cho ăn với chế độ ăn thông thường (CE-2, CLEA Japan, Inc.) cho đến 6 tuần tuổi. Ở mức độ 7 tuần tuổi, chuột nhắt được chia thành nhóm dùng chế độ ăn thông thường (Bình thường) để cho ăn với chế độ ăn thông thường và nhóm dùng chế độ ăn có adenin (Chế độ ăn có adenin) để cho ăn với chế độ ăn thông thường chứa 0,2% adenin (là sản phẩm của Wako). Sáu tuần sau đó, thực hiện cho nhóm thông thường, dùng theo đường ống vào dạ dày 0,2mL/chuột nhắt của PBS(-) sử dụng ống dạ dày ngày một lần trong 12 ngày.

Nhóm dùng chế độ ăn có adenin, mà được cho ăn với chế độ ăn có adenin trong 6 tuần tuổi và sau đó quay trở về chế độ ăn thông thường, được chia thành PBS(-) dùng thuốc nhóm (RF) và các nhóm dùng sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*B. longum* CLA8013) (RF+8013E(1), RF+8013E(10)). Cho nhóm RF, nhóm RF+8013E(1), và nhóm RF+8013E(10), dùng theo đường ống vào dạ dày 0,2mL/chuột nhắt của PBS(-), 8013E(1), và 8013E(10), tương ứng, được thực hiện sử dụng ống dạ dày ngày một lần trong 12 ngày.

18 giờ sau lần dùng thuốc cuối, tiến hành phẫu tích chuột.

2. Đo urê nitơ huyết (BUN)

Các kết quả về BUN ở chuột nhắt trong từng nhóm được đo sử dụng Kit phát hiện DetectX Urea Nitro Colorimetric Detection (là sản phẩm của ARBOR ASSAYS) được thể hiện trên Fig.4. Đối với từng nhóm, 5 hoặc 6 chuột nhắt được đưa vào đo. Các kết quả thu được được thể hiện ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (*: $p < 0,05$ đối lại với Bình thường, #: $p < 0,05$ đối lại với RF, thử nghiệm Steel-Dwass). Khi được so sánh với nhóm thông thường, việc nâng lên của mức BUN làm chỉ số của chức năng thận quan sát thấy được ở nhóm RF. Ở nhóm RF+8013E(1) và nhóm RF+8013E(10), mức BUN được hạ thấp khi được so sánh với nhóm RF. Hiệu quả phụ thuộc liều của 8013E quan sát thấy được, và có sự khác nhau đáng kể giữa nhóm RF+8013E(10) và nhóm RF. Các kết quả thể hiện rằng, 8013E đã cải thiện chức năng thận. Trong quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể là giảm do chế độ ăn có adenin, và được phục hồi sau khi chế độ ăn được quay trở về bình thường ở thời điểm bắt đầu dùng thuốc thử nghiệm. Việc dùng 8013E không tác động đến việc phục hồi trọng lượng, và thể hiện cùng xu hướng như ở nhóm RF.

Ví dụ 3: Tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý

Phương pháp tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*Bifidobacterium longum* CLA8013)

Các tế bào được bảo quản lạnh của *B. longum* CLA8013 (khoảng 1×10^8 tế bào) được nuôi cấy kỵ khí sử dụng 10mL môi trường GAM (Nissui Pharmaceutical) chứa 1% glucoza và 0,1% Polysorbat 80 ở 37°C trong 30 giờ. Tiếp theo là ly tâm dịch nuôi cấy ($3.000 \times G$, 10 phút, ở nhiệt độ trong phòng) và loại bỏ dịch nổi. Rửa các tế bào với PBS (-), tạo lại huyền phù trong 10mL PBS (-), và để ở dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau ly tâm, lọc dịch nổi qua

bộ lọc (0,22 μ m) để chuẩn bị dịch lọc làm sản phẩm được xử lý (8013E) của vi khuẩn (*B. longum* CLA8013).

Khả năng của sản phẩm vi khuẩn được xử lý để vận chuyển qua toàn bộ ruột

1. Dùng sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*Bifidobacterium longum* CLA8013) cho chuột SD

Chuột nhắt SD đực (Japan SLC) ở mức độ 6 tuần tuổi được thụ tinh riêng rẽ từ trước trong tuần. Sau thụ tinh sơ bộ, chuột được chia thành nhóm thông thường và nhóm 8013E. Cho nhóm thông thường và nhóm 8013E, dùng theo đường ống vào dạ dày ở mức 0,5mL/chuột của PBS(-) và 8013E, tương ứng, được thực hiện một lần. Sau đó, thực hiện, một lần, dùng theo đường ống vào dạ dày ở mức 1mL/chuột của dung dịch màu đỏ son (Wako) (3g/50mL, 0,5% carboxymethylxenuloza).

2. Đo khả năng vận chuyển qua toàn bộ ruột ở chuột (Fig.5)

Sau khi dùng dung dịch màu đỏ son, thời gian để loại phân có màu đỏ được đo đối với 8 chuột trong từng nhóm

(*: $p < 0,05$ đối lại kiểm soát (thử nghiệm Mann-Whitney's U)). Các kết quả thu được được thể hiện ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. Nhóm 8013E thể hiện thời gian để loại phân có màu đỏ là ngắn hơn đáng kể, mà có nghĩa là 8013E có tác dụng thúc đẩy việc đi tiêu.

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của dạng dung môi trên khả năng vận chuyển ion xuyên bào

Tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý

Phương pháp tạo ra sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*Bifidobacterium longum* CLA8013)

Các tế bào được bảo quản lạnh của *B. longum* CLA8013 được nuôi cấy kỵ khí sử dụng 10mL môi trường GAM (Nissui Pharmaceutical) chứa 1% glucoza và 0,1% Polysorbat 80 ở 37°C trong 30 giờ. Tiếp theo là ly tâm dịch nuôi cấy (3.000 x G, 10 phút, ở nhiệt độ trong phòng) và loại bỏ dịch nổi. Rửa các tế bào với PBS (-), tạo lại huyền phù trong 10mL từng nhóm dung môi (nước tinh khiết, nước muối sinh lý, DMEM/F-12, hoặc PBS (-)), và để ở dưới điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau ly tâm, lọc dịch nổi qua bộ lọc (0,22 μ m) để chuẩn bị dịch lọc làm sản phẩm được xử lý (8013E) của vi khuẩn (*B. longum* CLA8013).

Môi trường nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào biểu mô ruột kết ở người T84 được nuôi cấy trong DMEM/F-12 chứa 10% FBS và penixilin/streptomycin. Các tế bào được gieo hạt ở 4×10^4 tế bào/cm², và để trôi qua mỗi 5 đến 7 ngày. Các tế bào được gieo hạt ở 5×10^5 tế bào/giếng trên bộ lọc Snapwell (Costar, 1,13cm²), và môi trường được thay 3 ngày một lần. Sau khi được nuôi cấy trong từ 5 đến 7 ngày, các tế bào được sử dụng trong thử nghiệm.

Kỹ thuật dòng đo mạch

Δ Isc được xác định theo cùng cách như được mô tả trong kỹ thuật dòng đoản mạch ở Ví dụ 1.

Khả năng ở sản phẩm vi khuẩn được xử lý (*B. longum* CLA8013) để vận chuyển ion xuyên bào

Các kết quả được thể hiện trên Fig.6. Sản phẩm vi khuẩn được xử lý được chuẩn bị sử dụng PBS (-) làm dung môi có khả năng vận chuyển ion xuyên bào cao nhất, và trong trường hợp mà dung môi là DMEM/F-12, khả năng của sản phẩm vi khuẩn được xử lý để vận chuyển ion xuyên bào cao thứ hai. Các kết quả thể hiện rằng, bằng cách tạo huyền phù tế bào vi khuẩn trong PBS(-), sản phẩm vi khuẩn được xử lý có hiệu quả cao hơn có thể được chuẩn bị. Huyền phù của tế bào vi khuẩn trong DMEM/F-12 thể hiện không có thay đổi về độ pH trong khi để lại đó. Các kết quả bộc lộ rằng, việc tăng về khả năng của sản phẩm vi khuẩn được xử lý để vận chuyển ion xuyên bào là không liên quan đến việc lên men bởi vi khuẩn.

Còn khẳng định được rằng, trong trường hợp mà tế bào vi khuẩn được tạo huyền phù trong DMEM/F-12 không có đường, sản phẩm vi khuẩn được xử lý có khả năng vận chuyển ion xuyên bào cao.

Ví dụ 5: Tạo ra vi khuẩn

Phương pháp tạo ra vi khuẩn (*B. longum* MM-2: ID1001)

Theo cùng cách như ở Ví dụ 2, vi khuẩn (*B. longum* MM-2) được nuôi cấy kỵ khí trong 12 đến 18 giờ. Sau đó, tế bào vi khuẩn được gom và được chuẩn bị ở mức là 5×10^9 tế bào/mL trong PBS(-) để sử dụng sau đó.

Tăng cường khả năng của tế bào vi khuẩn (*B. longum* MM-2) ở chuột nhắt thuộc mô hình bệnh thận mạn tính

Theo thủ tục và phương pháp tương tự như thủ tục và phương pháp ở Ví dụ 2, tế bào vi khuẩn đã được chuẩn bị được dùng ở liều dùng bằng 1×10^9 tế bào/0,2mL/chuột nhắt. 18 giờ sau lần dùng thuốc cuối, tiến hành phẫu tích chuột. Sau đó, theo cách thức tương tự như cách thức được mô tả ở Ví dụ 2, đo BUN với việc sử dụng 5 hoặc 10 chuột nhắt đối với từng nhóm. Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.7. Các kết quả thu được được thể hiện ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (**: $p < 0,01$ đối lại với nhóm Bình thường, #: $p < 0,05$ đối lại với RF). Khi được so sánh với nhóm Bình thường, việc nâng lên của mức BUN làm chỉ số của chức năng thận quan sát thấy được ở nhóm RF. Ở nhóm RF+ MM-2, mức BUN là giảm khi được so sánh với nhóm RF. Các kết quả thể hiện rằng, tế bào vi khuẩn MM-2 đã cải thiện chức năng thận. Trong quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể là giảm do chế độ ăn có adenin, và được phục hồi sau khi chế độ ăn được quay trở về bình thường ở thời điểm bắt đầu dùng thuốc thử nghiệm. Việc dùng tế bào vi

khuẩn MM-2 không tác động đến việc phục hồi trọng lượng, và có cùng xu hướng như ở nhóm RF được thể hiện.

Theo sáng chế, ví dụ, khi vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng để được dùng có khả năng vận chuyển ion xuyên bào tương đương với khả năng đó của chủng vi khuẩn MM-2, việc dùng vi khuẩn hoặc sản phẩm được xử lý của chúng có thể tăng cường chức năng thận.

Theo sáng chế, ví dụ, khi vi khuẩn không có vi khuẩn lên men được sử dụng, việc dùng sản phẩm được xử lý chứa vi khuẩn còn có thể tăng cường chức năng thận.

Dưới đây là phần trình bày về cách thức bào chế đặc hiệu của dược phẩm, sản phẩm đồ ăn hoặc đồ uống, và đồ ăn chứa tác nhân tác động trên chất vận chuyển ion xuyên bào trong đường dạ dày ruột, tác nhân để hoạt hóa kênh clorua, tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, và/hoặc tác nhân để thúc đẩy việc đi tiêu. Giá trị bằng số ở đầu bên phải ở từng ví dụ bào chế nghĩa là % theo khối lượng của từng thành phần.

Ví dụ bào chế 1: Thuốc (viên nén)

Tinh bột ngô	21,7%
Bột đường phèn	27,1%
Dextrin	29,4%
Canxi cacbonat kết tủa	13,4%
Đá tan	3,0%
Sacaroza	2,2%
Magie stearat	0,5%
Sản phẩm vi khuẩn được xử lý	2,7%

(*Bifidobacterium longum* CLA8013)

Ví dụ bào chế 3: Sản phẩm đồ ăn hoặc đồ uống (đồ uống có lợi cho sức khỏe)

Đường	13,3%
Axit xitric	0,1%
Các vitamin	1,0%
Chất tạo hương	0,2%
Sản phẩm vi khuẩn được xử lý	14,8%

(*Bifidobacterium longum* CLA8013)

Nước	70,6%
------	-------

Ví dụ bào chế 6: Thức ăn (thức ăn cho vật nuôi)

Hỗn hợp đồ ăn	97,5%
Sản phẩm vi khuẩn được xử lý (<i>Bifidobacterium longum</i> CLA8013)	2,5%

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Tác nhân theo sáng chế là hữu dụng trong việc hoạt hóa kênh clorua, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thận, và/hoặc thúc đẩy việc đi tiêu, và do đó, sử dụng được làm thuốc, chất bổ trợ, v.v..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa vi khuẩn *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352).
2. Vi khuẩn *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352).
3. Phương pháp sản xuất sản phẩm vi khuẩn được xử lý của *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352), phương pháp bao gồm các bước
tạo huyền phù các tế bào vi khuẩn trong dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc trong dung môi chứa môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) và Ham's F-12 để tạo ra huyền phù vi khuẩn;
để huyền phù vi khuẩn dưới các điều kiện kỵ khí; và
tiếp theo lọc dịch nổi của huyền phù vi khuẩn để tạo ra dịch lọc làm sản phẩm được xử lý;
và không bao gồm bước lên men.
4. Dịch nổi của huyền phù chứa vi khuẩn *Bifidobacterium longum* CLA8013 (Số truy cập: NITE BP-02352) và dung môi không có đường (ngoại trừ nước tinh khiết và nước muối sinh lý) hoặc dung môi chứa DMEM và Ham's F-12.

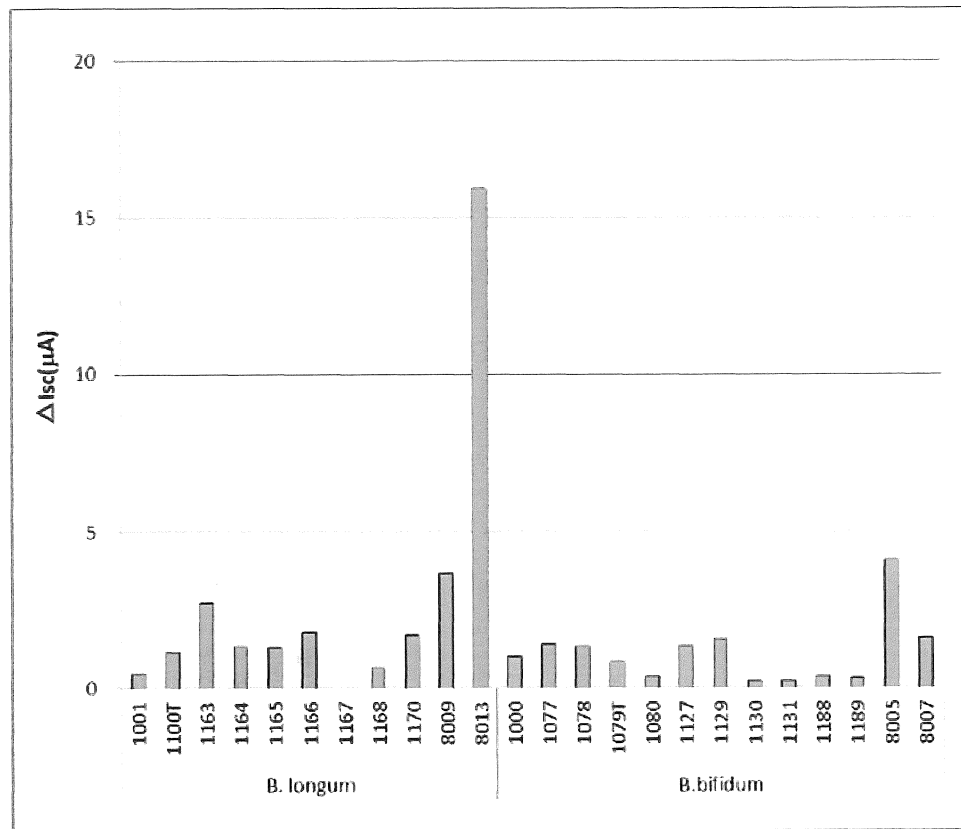
Fig.1

Fig.2

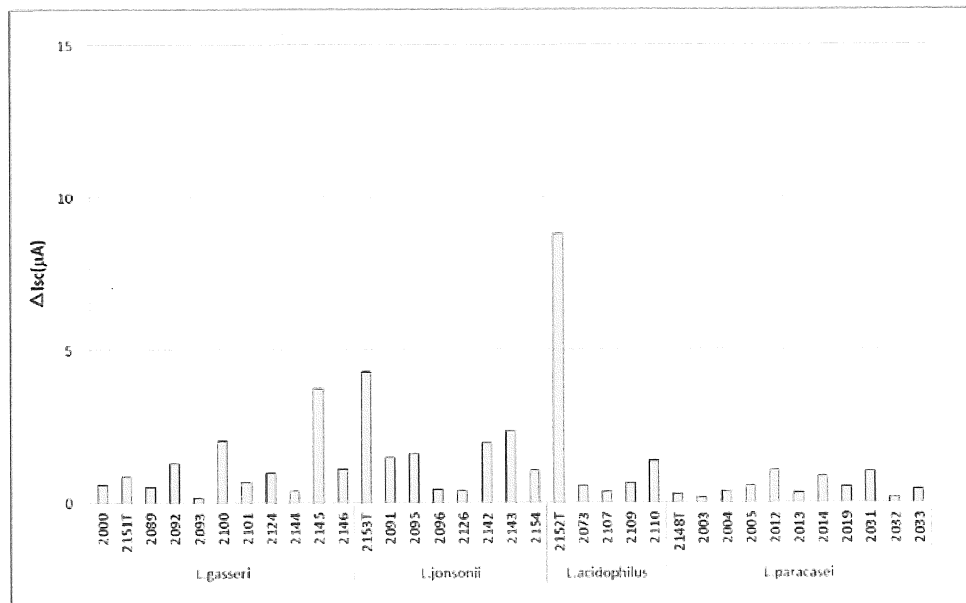


Fig.3

	Tuổi theo tuần							12 ngày	Phẫu tích
	6T	7T	8T	9T	10T	11T	12T	CE-2 +	
Bình thường	Thụ tinh sơ bộ	CE-2						Mẫu thử nghiệm	
Suy thận		Thức ăn hỗn hợp CE-2 chứa 2% adelin						dùng theo đường	
RF + 8013E (1)								miệng (12 ngày)	
RF + 8013E (10)									

Fig.4

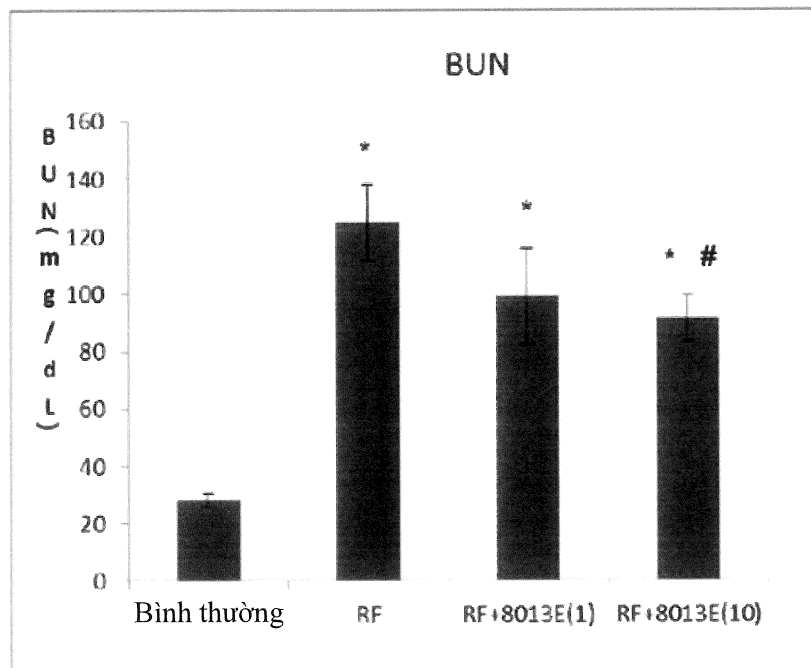


Fig.5

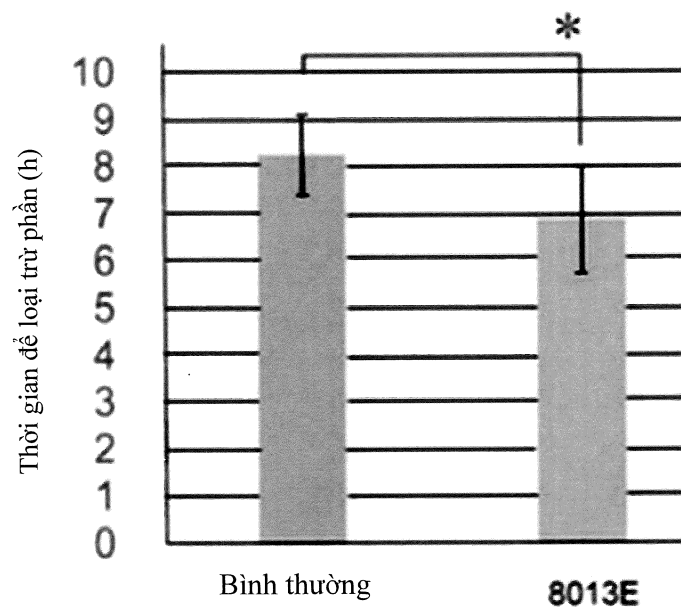


Fig.6

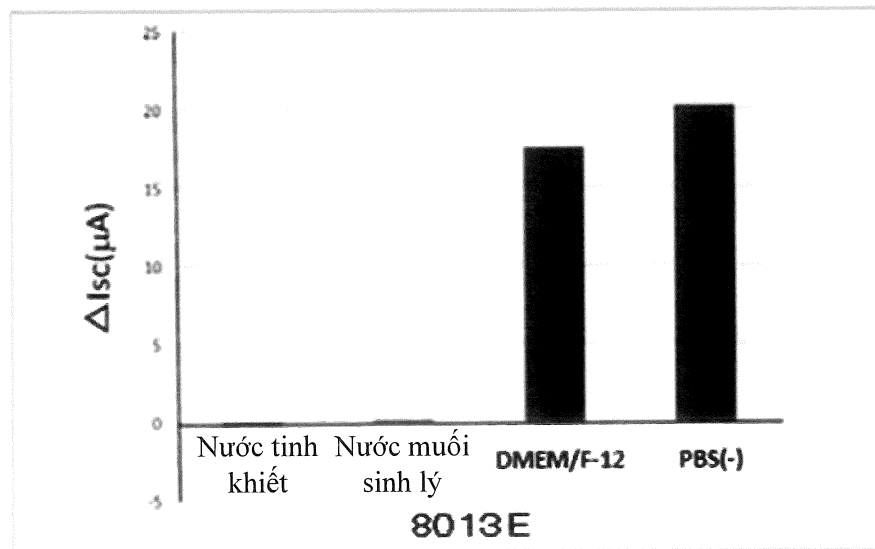


Fig.7

