



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

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

(11)



1-0049053

(51)^{2022.01} C12N 1/20; A61K 31/732; A61K
31/733; C12R 1/225; A61K 35/747;
C12R 1/01; A61K 31/722; A61K 35/745

(13) B

(21) 1-2023-06748

(22) 31/01/2018

(62) 1-2019-04561

(86) PCT/KR2018/001359 31/01/2018

(87) WO2018/143678 09/08/2018

(30) 10-2017-0013632 31/01/2017 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/03/2024 432

(73) 1. University-Industry Cooperation Group Of Kyung Hee University (KR)
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu Yongin-si Gyeonggi-do 17104 Republic of
Korea

2. NAVIPHARM CO, LTD (KR)

5, Jangan-ro 448beon-gil, Jangan-gu Suwon-si Gyeonggi-do 16209, Republic of
Korea

(72) KIM, Dong-Hyun (KR); HAN, Myung Joo (KR).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) CHỦNG VI KHUẨN LACTOBACILLUS PLANTARUM IM76 KCCM11962P,
DƯỢC PHẨM VÀ THỰC PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY

(21) 1-2023-06748

(57) Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được phân lập từ phân người hoặc kim chi bắp cải, vì vậy an toàn cao và có hoạt tính sinh lý như tác dụng điều hòa miễn dịch và tác dụng ức chế phản ứng viêm. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm và thực phẩm chứa chủng *Lactobacillus* spp. theo sáng chế có thể được sử dụng làm vật liệu để điều hòa miễn dịch và ức chế phản ứng viêm, và cũng có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng và dược liệu hữu ích để phòng ngừa, giảm nhẹ hoặc điều trị các bệnh dị ứng như viêm mũi, dị ứng, hen suyễn, v.v...

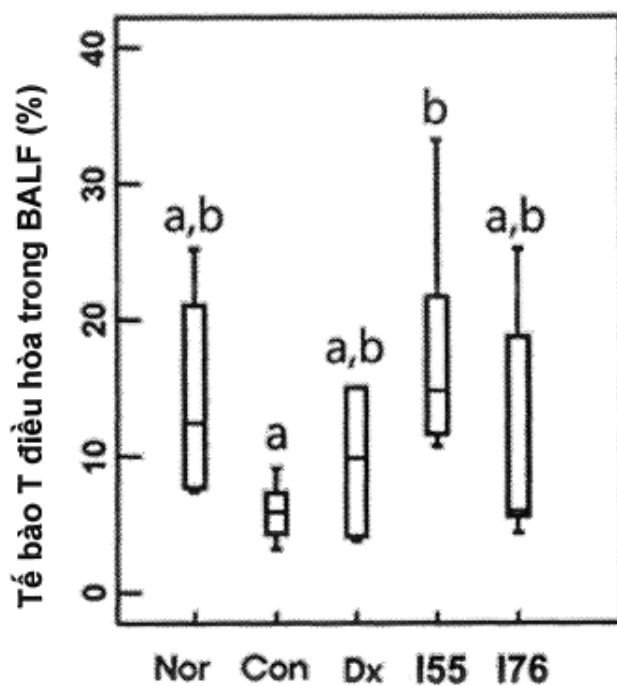


Fig.17

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn lactic, cụ thể hơn là vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P và các loại thực phẩm, được phẩm sử dụng vi khuẩn này, có tác dụng ức chế các phản ứng dị ứng nhờ các hoạt tính sinh lý khác nhau như tác dụng điều hòa miễn dịch, tác dụng ức chế phản ứng viêm, v.v...

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phản ứng quá mẫn là phản ứng có hại cho cơ thể vì nó gây ra phản ứng miễn dịch quá mức đối với các tác nhân không gây bệnh thay vì dẫn đến sự dung nạp miễn dịch trong cơ thể người. Phản ứng quá mẫn được chia làm 4 tuýp theo cơ chế tác dụng của nó. Phản ứng quá mẫn tuýp 1 xảy ra khi kháng nguyên đặc hiệu gắn với kháng thể, mà chủ yếu là phản ứng liên kết với thụ thể Fc của một dưỡng bào. Phản ứng như vậy được gọi là phản ứng quá mẫn tức thì vì nó xuất hiện ngay sau khi xảy ra tiếp xúc với kháng nguyên. Phản ứng quá mẫn tuýp 1 thông thường gây ra bởi kháng nguyên dạng hạt được hít vào qua đường thở. Kháng nguyên dạng hạt điển hình như phấn hoa, v.v... Các bệnh hoặc các triệu chứng gây nên bởi phản ứng quá mẫn tuýp 1 có phát ban cấp tính như viêm da dị ứng, viêm mũi dị ứng, hen phế quản, v.v... Phản ứng quá mẫn tuýp 2 gây ra bởi các phân tử nhỏ liên kết cộng hóa trị với thành phần bề mặt của tế bào người, tạo ra cấu trúc biến đổi mà hệ thống miễn dịch nhận diện là vật liệu dị thể. Trong phản ứng quá mẫn tuýp 2, các tế bào B sản sinh ra IgG kháng lại quyết định kháng nguyên (epitop) mới, sau đó IgG liên kết với tế bào biến đổi dẫn đến sự phá vỡ tế bào thông qua hoạt động bổ trợ và thực bào. Phản ứng quá mẫn tuýp 3 gây ra bởi phức hợp miễn dịch hòa tan được hình thành bởi liên kết giữa kháng nguyên protein hòa tan và IgG vốn được tạo ra để kháng lại kháng nguyên protein hòa tan. Trong phản ứng quá mẫn tuýp 3, một phần của phức hợp miễn dịch được gắn vào thành mạch máu hoặc phế nang phổi, do đó kích ứng phụ, gây ra phản ứng viêm làm tổn thương mô và suy giảm chức năng sinh lý của mô. Phản ứng quá mẫn tuýp 4 gây ra bởi các sản phẩm của tế bào T tác dụng đặc hiệu kháng nguyên, và còn được gọi là phản ứng quá mẫn muộn do xuất hiện chậm sau một đến ba ngày phơi nhiễm với kháng nguyên.

Phản ứng quá mẫn tuýp 1 là phản ứng tức thời qua trung gian IgE. Kháng thể IgE được tạo ra bởi tương bào có trong màng nhầy của cơ quan hô hấp và tiêu hóa. Các kháng thể IgE được tạo ra có ái lực rất cao với các thụ thể bề mặt của dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm, vì vậy chúng liên kết hầu hết với các tế bào này. Đây là trạng thái nhạy cảm trong đó hầu hết các thụ thể bề mặt của dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm đều liên kết với các kháng thể IgE. Nếu phơi nhiễm với chất gây dị ứng ở trạng thái nhạy cảm thì chất gây dị ứng sẽ liên kết với IgE gây ra phản ứng giữa các thụ thể, các hạt trong dưỡng bào sau đó sẽ hợp nhất với màng tế bào để tiết ra các chất hóa học trung gian như histamin, xysteinyl leukotrien, prostaglandin và thromboxan. Các chất hóa học trung gian này là nguyên nhân gây ra phản ứng dị ứng sớm bằng cách làm tăng tính thấm của thành mạch, làm giãn mạch máu, co bóp cơ trơn và thúc đẩy các chức năng của tuyến bài tiết.

Viêm mũi dị ứng (AR) là bệnh gây ra bởi phản ứng quá mẫn tuýp 1, dùng để chỉ rối loạn triệu chứng, dẫn đến các triệu chứng ở mũi, mắt, tai và họng tương tự như phản ứng viêm qua trung gian IgE sau khi tiếp xúc với chất dị gây ứng. Viêm mũi dị ứng được chia thành AR gián đoạn hoặc AR kéo dài dựa vào thời gian xuất hiện triệu chứng theo tổ chức nghiên cứu về Viêm mũi dị ứng và tác dụng của nó đối với bệnh hen suyễn (ARIA), và được chia thành các thể nhẹ, trung bình và nặng. Tỷ lệ mắc viêm mũi dị ứng thường là khoảng 10 - 30% ở người lớn và khoảng 40% ở trẻ nhỏ với một chút khác biệt tùy thuộc vào các báo cáo ở các nước khác nhau. Các yếu tố gây viêm mũi dị ứng có cả ở trong nhà và ngoài trời, khi nồng độ IgE trong huyết thanh lên đến 100 IU/ml hoặc hơn trước sáu tuổi. Viêm mũi dị ứng là nguyên nhân gây viêm xoang, viêm tai giữa hoặc viêm kết mạc. Nếu bệnh kéo dài có thể tiến triển nặng thêm thành hen suyễn và viêm xoang, gây rối loạn giấc ngủ, khó ý thức hoặc điều chỉnh được trong cuộc sống. Hen suyễn, một trong các bệnh gây ra bởi phản ứng quá mẫn tuýp 1, với các triệu chứng như suy hô hấp, ho, thở khò khè, v.v..., xảy ra lặp đi lặp lại hoặc co thắt, cũng được biết đến là do sự kết hợp của các yếu tố di truyền và môi trường. Nói cách khác, bệnh hen suyễn là dạng bệnh dị ứng mà trong đó sự di truyền từ cha mẹ và các yếu tố gây hen suyễn từ môi trường xung quanh có liên quan với nhau, gây ra sự xáo trộn cho hệ thống miễn dịch, chủ yếu là mãn tính và tái phát.

Nhiều phương pháp trị liệu khác nhau đã được nghiên cứu để điều trị các bệnh dị ứng do phản ứng quá mẫn tuýp 1 gây ra. Cụ thể như thuốc chống dị ứng, thuốc kháng thụ

thể histamin (thuốc kháng histamin), steroid, v.v..., đã được sử dụng để điều trị. Tuy nhiên, thuốc gây ra tác dụng phụ đáng kể được biết đến như: thuốc kháng histamin ức chế sự dẫn truyền xung thần kinh ngoại biên do cạnh tranh với histamin để gắn vào các thụ thể histamin; thuốc chống dị ứng làm giảm các triệu chứng bằng cách làm suy yếu khả năng tạo các chất hóa học trung gian của tế bào; steroid, làm giảm viêm bằng cách làm suy yếu khả năng đáp ứng miễn dịch, hầu hết đều không có tác dụng điều trị đáng kể.

Mặt khác, vi khuẩn lactic là sản phẩm đã được Metchnikoff phát hiện lần đầu tiên, có khả năng axit hóa các chất trong ruột giúp ngăn chặn các vi khuẩn gây thối phát triển và đạt được hiệu quả điều trị. Hiện nay, đã có hơn 165 loài thuộc chi *Lactobacillus* (một đại diện của vi khuẩn lactic) đã được phát hiện. *Lactobacillus acidophilus* L-92 là chủng vi khuẩn lactic có lợi được sử dụng để điều trị bệnh dị ứng do phấn hoa tuyết tùng Himalayan ở Nhật Bản gây ra.

Vô số vi khuẩn lactic có lợi sống trong hệ tiêu hóa của con người được nghiên cứu phân lập để bào chế thuốc hoặc thực phẩm chức năng. Cụ thể là thuốc điều trị các bệnh dị ứng cần được thực hiện trong một thời gian dài, do đó đòi hỏi các đặc tính như hấp thu dễ dàng và độ an toàn cao. Vi khuẩn lactic là nhóm phù hợp và đáp ứng tốt yêu cầu điều trị các bệnh nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được thực hiện dựa trên các vấn đề kỹ thuật còn tồn tại nêu trên, mục tiêu của sáng chế là đề xuất vi khuẩn lactic có tác dụng điều hòa miễn dịch và ức chế phản ứng viêm.

Ngoài ra, mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất các loại thực phẩm và dược phẩm khác nhau sử dụng vi khuẩn lactic.

Cụ thể là, mục tiêu của sáng chế là đề xuất vi khuẩn lactic *Bifidobacterium longum* IM55 hoặc *Lactobacillus plantarum* IM76.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất thực phẩm thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm nhẹ các bệnh dị ứng, thực phẩm bao gồm *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh miễn dịch hoặc viêm, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng.

Mục tiêu khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng để sử dụng trong phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng.

Để đạt được các mục tiêu nói trên, sáng chế đề xuất sử dụng *B. longum* IM55 (tổ chức lưu ký: Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), ngày đăng ký: 20 tháng 1 năm 2017 và số đăng ký: KCCM11961P).

Bifidobacterium longum IM55 theo sáng chế được đặc trưng bởi, là vi khuẩn lactic *B. longum* được phân lập và định dạng từ phân người.

Trình tự rADN 16S để định danh và phân loại *B. longum* IM55 của sáng chế tương ứng với ID SEQ NO: 1 kèm theo. Do đó, *B. longum* IM55 KCCM11961P của sáng chế có thể bao gồm trình tự rADN 16S của SEQ ID NO: 1.

Kết quả phân tích trình tự rADN 16S của SEQ ID NO: 1 cho thấy trình tự này tương đồng 99% với các chủng *B. longum* đã biết, do đó cho thấy mối quan hệ phát sinh di truyền phân tử cao nhất với *B. longum*. Vi khuẩn lactic được xác định là *B. longum*, đặt tên là *B. longum* IM5, và sau đó được gửi đến KCCM vào ngày 20 tháng 1 năm 2017 (số đăng ký: KCCM11961P).

Theo sáng chế, *B. longum* IM55 có thể sử dụng nguồn cacbon D-glucoza, D-manitol, D-lactoza, D-sucroza, D-maltoza, salixin, D-xyloza, L-arabinoza, esculin sắt xitrat, D-rafinoza và D-sorbitol.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất sử dụng *L. plantarum* IM76 (tổ chức lưu ký: Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), ngày đăng ký: 20 tháng 1 năm 2017 và số đăng ký: KCCM11962P).

Lactobacillus plantarum IM76 theo sáng chế được đặc trưng bởi, là vi khuẩn lactic *L. plantarum* được phân lập và định danh từ kim chi, là loại thực phẩm lên men truyền thống.

Trình tự rADN 16S để định danh và phân loại *L. plantarum* IM76 của sáng chế tương ứng với ID SEQ NO: 2 kèm theo. Do đó, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P của sáng chế có thể bao gồm trình tự rADN 16S của SEQ ID NO: 2.

Kết quả phân tích trình tự rADN 16S của SEQ ID NO: 2 cho thấy trình tự này tương đồng 99% với các chủng *L. plantarum* đã biết, do đó cho thấy mối quan hệ phát sinh di truyền phân tử cao nhất với *L. plantarum*. Vi khuẩn lactic được xác định là *L. plantarum*, được đặt tên là *L. plantarum* IM76, và sau đó được gửi đến KCCM vào ngày 20 tháng 1 năm 2017 (số đăng ký: KCCM11962P).

Theo sáng chế, *L. plantarum* IM76 có thể sử dụng nguồn cacbon L-arabinoza, D-riboza, D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-manoza, manitol, sorbitol, N-acetylglucosamin, arbutin, esculin, salixin, xelobioza, maltoza, lactoza, melibioza, sucroza, trehaloza, rafinoza, gentiobioza, D-turanoza và gluconat.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ xác định nồng độ IL-10 tăng lên khi xử lý đại thực bào bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 (NOR là nhóm đối chứng thông thường; LPS là nhóm được gây phản ứng viêm; I55 là nhóm được gây phản ứng viêm + được xử lý bằng *B. longum* IM55 với liều 1×10^5 CFU/ml; và I76 là nhóm được gây phản ứng viêm + được xử lý bằng *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^5 CFU/ml, tương tự như vậy đối với Fig.2-Fig.4);

Fig.2 là biểu đồ xác định nồng độ IL-12 giảm đi khi xử lý đại thực bào bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76;

Fig.3 là biểu đồ xác định nồng độ IL-10 tăng lên khi xử lý các tế bào tua bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76;

Fig.4 là biểu đồ xác định nồng độ TNF- α giảm đi khi xử lý các tế bào tua bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76;

Fig.5 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của GATA3 bị ức chế do xử lý bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 khi gây cảm ứng biệt hóa tế bào T thành tế bào Th2 (NOR là nhóm đối chứng thông thường; ThI là nhóm được điều trị bằng chất cảm ứng biệt hóa tế bào Th2; I55 là nhóm được gây biệt hóa tế bào Th2 + được xử lý bằng *B. longum* IM55 với liều 1×10^5 CFU/ml, và I76 là nhóm được gây biệt hóa tế bào Th2 + được xử lý bằng *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^5 CFU/ml, tương tự như vậy đối với Fig.6);

Fig.6 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của IL-5 bị ức chế do xử lý bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 khi gây cảm ứng biệt hóa tế bào T thành tế bào Th2;

Fig.7 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của FOXP3 tăng lên do xử lý bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 khi gây cảm ứng biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg (NOR là nhóm đối chứng thông thường; TrI là nhóm được điều trị bằng chất cảm ứng biệt hóa tế bào Treg; I55 là nhóm được gây biệt hóa tế bào Treg + được xử lý bằng *B. longum* IM55 với liều 1×10^5 CFU/ml, và I76 là nhóm được gây biệt hóa tế bào Treg + được xử lý bằng *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^5 CFU/ml, tương tự như vậy đối với Fig.8);

Fig.8 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của IL-10 tăng lên do xử lý bằng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 khi gây cảm ứng biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg;

Fig.9 là biểu đồ xác định nồng độ IL-5 trong huyết thanh giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen

suyễn (NOR là nhóm đối chứng thông thường (chỉ dùng PBS); CON hoặc AR là nhóm được gây bệnh; DX là nhóm được gây bệnh + được điều trị bằng dexametason với liều 1 mg/kg thể trọng; I55 là nhóm được gây bệnh + được cho uống *B. longum* IM55 với liều 1×10^9 CFU/con chuột; và I76 là nhóm được gây bệnh + được cho uống *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^9 CFU/con chuột, tương tự như vậy đối với Fig.10- Fig.17);

Fig.10 là biểu đồ xác định nồng độ IgE trong huyết thanh giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.11 là biểu đồ xác định nồng độ IL-4 trong huyết thanh giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.12 là biểu đồ xác định nồng độ IL-5 trong dịch phế quản phế nang (BALF) giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.13 là biểu đồ xác định nồng độ IL-4 trong BALF giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.14 là biểu đồ xác định tỷ lệ phân phối của các tế bào Th2 trong BALF giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.15 là biểu đồ xác định tỷ lệ phân phối của các tế bào bạch cầu ưa axit trong BALF giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.16 là biểu đồ xác định nồng độ IL-10 trong BALF tăng lên khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.17 là biểu đồ xác định tỷ lệ phân phối các tế bào Treg trong BALF tăng lên khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.18 là biểu đồ xác định số lần triệu chứng viêm mũi (hắt hơi và dị mũi) giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn (NOR là nhóm đối chứng thông thường (chỉ dùng PBS); AR là nhóm được gây bệnh; DX là nhóm được gây bệnh + được sử dụng dexametason với liều 1 mg/kg thể trọng; I55 là nhóm được gây bệnh + được sử dụng *B. longum* IM55 với liều 1×10^9 CFU/con chuột; và I76 là nhóm được gây bệnh + được sử dụng *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^9 CFU/con chuột tương tự như vậy với Fig.19-Fig.19 là biểu đồ xác định nồng độ IL-4 trong khoang mũi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.20 là biểu đồ xác định nồng độ IL-5 trong khoang mũi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.21 là biểu đồ xác định sự phá hủy khoang mũi và lan rộng đến các tế bào biểu mô trong khoang mũi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.22 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của GATA3 trong mô phổi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.23 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của IL-10 trong mô phổi tăng lên khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.24 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của FOXP3 trong mô phổi tăng lên khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.25 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của IL-5 trong mô phổi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.26 là biểu đồ xác định mức độ gây viêm và phù các mô phổi giảm đi khi sử dụng *B. longum* IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.27 là biểu đồ xác định số lần triệu chứng viêm mũi (hắt hơi và dụi mũi) và nồng độ của IL-5 trong khoang mũi giảm đi khi sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 (theo tỉ lệ 1:1, 1:3 và 1:9) cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn (NOR là nhóm đối chứng thông thường (chỉ dùng PBS); AR là nhóm được gây bệnh; DX là nhóm được gây bệnh + được sử dụng dexametason với liều 1 mg/kg thể trọng; 1:1 là nhóm được sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 với tỉ lệ 1:1; 1:3 là nhóm được sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 với tỉ lệ 1:3; và 1:9 là nhóm được sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 với tỉ lệ 1:9 (tổng 1×10^9 CFU/con chuột), tương tự như vậy đối với Fig.28);

Fig.28 là biểu đồ xác định mức độ biểu hiện của IL-5 trong huyết thanh giảm đi khi sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 (theo tỉ lệ 1:1, 1:3 và 1:9) cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn;

Fig.29 là biểu đồ xác định nồng độ của IL-4 và IL-5 trong đại tràng giảm đi và nồng độ IL-10 tăng lên khi sử dụng *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn (NOR là nhóm đối chứng thông thường (chỉ dùng PBS); AR là nhóm được gây bệnh; DX là nhóm được gây bệnh + được sử dụng dexametason với liều 1 mg/kg thể trọng; I55 là nhóm được gây bệnh + được sử dụng *B. longum* IM55 với liều 1×10^9 CFU/con chuột; và I76 là nhóm được gây bệnh + được sử dụng *L. plantarum* IM76 với liều 1×10^9 CFU/con chuột; và PM là nhóm được gây bệnh + được sử dụng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 với liều 5×10^8 CFU/con chuột, tương tự như vậy đối với Fig.30);

Fig.30 là biểu đồ xác định thành phần của vi khuẩn đường ruột bị thay đổi khi sử dụng *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng cho mẫu động vật bị viêm mũi dị ứng và hen suyễn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh dị ứng” có nghĩa là bệnh, rối loạn hoặc trạng thái bất thường, gây ra bởi chứng tăng sản xuất đối vật chất nhất định của cơ thể người, cụ thể là, bằng cách gây ra phản ứng quá mức của hệ thống miễn dịch đối với vật liệu được đưa từ bên ngoài vào. Các vật liệu được đưa vào từ bên ngoài có thể là chất gây dị ứng, cụ thể là, kháng nguyên trở thành nguyên nhân gây ra bệnh dị ứng. Dị ứng có nghĩa là phản ứng quá mẫn gây ra theo cách mà chất trung gian gây viêm như histamin được giải phóng do vật liệu được đưa từ bên ngoài vào và do đó dẫn đến bệnh. Phản ứng quá mẫn có thể là phản ứng quá mẫn tuýp 1, phản ứng quá mẫn tuýp 2, phản ứng quá mẫn tuýp 3 hoặc phản ứng quá mẫn tuýp 4. Theo sáng chế, bệnh dị ứng có thể là bệnh do phản ứng quá mẫn tuýp 1 liên quan đến IgE, và cụ thể có thể là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: viêm mũi, dị ứng, hen suyễn, viêm da dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, viêm tai giữa dị ứng, viêm tai giữa dị ứng, phát ban và sốc phản vệ. Cụ thể hơn là, bệnh dị ứng theo sáng chế là viêm mũi, dị ứng hoặc hen suyễn.

Ngoài tác dụng kiểm soát, phòng ngừa, giảm bớt và điều trị các bệnh dị ứng nói trên, chế phẩm theo sáng chế cũng cho thấy hiệu quả trong kiểm soát, phòng ngừa, giảm bớt và điều trị các bệnh dị ứng và biến chứng của chúng bằng cách cân bằng lại hệ vi sinh vật đường ruột bị rối loạn do các bệnh dị ứng.

Chủng “*B. longum* IM55” của sáng chế giống như được mô tả ở trên.

Cụ thể là, *B. longum* IM55 có trong dược phẩm của sáng chế có thể là dạng tế bào sống, tế bào đã chết, sản phẩm nuôi cấy của chúng, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng, nhưng dạng bất kỳ của *B. longum* IM55 đều có thể được sử dụng mà không giới hạn, miễn là nó có thể đạt được hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng.

Chủng *L. plantarum* IM76 của sáng chế giống như mô tả ở trên.

Cụ thể là, *L. plantarum* IM76 có trong được phẩm của sáng chế có thể là dạng tế bào sống, tế bào đã chết, sản phẩm nuôi cấy của chúng, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng, nhưng dạng bất kỳ của *L. plantarum* IM76 đều có thể được sử dụng mà không giới hạn, miễn là nó có thể đạt được hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng.

Theo sáng chế, hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có thể được trộn với nhau theo khoảng tỷ lệ nhất định để đạt được hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng, tỷ lệ trộn có thể là 10:1-1:10, nhưng không giới hạn. Cụ thể là, tỷ lệ *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có thể là 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 hoặc 1:10. Hỗn hợp của chúng cho thấy tác dụng đáng kể trong phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng thông qua tác dụng cộng gộp theo cách trộn các vi khuẩn lactic với nhau.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tế bào sống” có nghĩa là bản thân vi khuẩn lactic của sáng chế; “tế bào chết” có nghĩa là vi khuẩn lactic, được khử trùng bằng phương pháp gia nhiệt, điều áp, xử lý bằng thuốc hoặc cách tương tự khác; “sản phẩm nghiền” có nghĩa là vi khuẩn lactic, được nghiền bằng phương pháp xử lý enzym, đồng nhất hóa, xử lý siêu âm hoặc tương tự. Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “chất chiết” có nghĩa là sản phẩm thu được bằng cách thực hiện quá trình chiết xuất vi khuẩn lactic với dung môi chiết đã biết.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sản phẩm nuôi cấy” có nghĩa là sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường đã biết và sản phẩm có thể bao gồm các vi khuẩn lactic. Môi trường có thể được chọn từ nhóm bao gồm môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, cụ thể như: môi trường lỏng MRS, môi trường lỏng GAM, môi trường thạch MRS, môi trường thạch GAM hoặc môi trường thạch BL, nhưng không giới hạn.

Theo sáng chế, thuật ngữ “phòng”, có nghĩa là tất cả tác dụng ức chế triệu chứng của bệnh dị ứng hoặc trì hoãn sự tiến triển bệnh bằng cách sử dụng được phẩm của sáng chế.

Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” có nghĩa là tác dụng giúp cải thiện hoặc thay đổi triệu chứng các bệnh dị ứng trở nên tốt hơn bằng cách sử dụng dược phẩm của sáng chế.

Hàm lượng vi khuẩn lactic, là thành phần hữu hiệu của dược phẩm, có thể được điều chỉnh trong phạm vi khác nhau tùy thuộc vào dạng cụ thể của chế phẩm và mục đích hoặc khía cạnh sử dụng của chúng. Trong dược phẩm của sáng chế, hàm lượng thành phần hữu hiệu không giới hạn nhiều, có thể chiếm 0,01-99% trọng lượng, cụ thể là 0,1-75% khối lượng, và cụ thể hơn 0,5-50% khối lượng trên tổng trọng lượng của chế phẩm.

Dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm ít nhất một thành phần hữu hiệu đã biết có tác dụng điều hòa miễn dịch, ức chế phản ứng viêm và phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng (cụ thể như: hen suyễn, viêm mũi, viêm da dị ứng, v.v...).

Cụ thể là, dược phẩm của sáng chế còn có thể bao gồm thêm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chitosan, inulin và pectin cam quýt.

Chitosan, inulin, pectin cam quýt hoặc hỗn hợp ít nhất hai loại trong chúng có trong dược phẩm của sáng chế, và do đó có thể đóng vai trò là prebiotic khi vi khuẩn lactic đạt được hiệu quả phòng và điều trị các bệnh dị ứng.

Ngoài ra, dược phẩm của sáng chế còn có thể bao gồm thêm các chất phụ gia như chất mang dược dụng ngoài vi khuẩn lactic vốn là một thành phần hữu hiệu. Chất mang trong dược phẩm của sáng chế bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su keo, alginat, gelatin, canxi photphat, canxi metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, Talc, magie stearat, dầu khoáng và các loại tương tự, nhưng không giới hạn.

Dược phẩm của sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều sử dụng qua đường uống hoặc dạng liều sử dụng qua đường tiêm bằng phương pháp thông thường, và có thể được tạo thành dạng phức hợp bằng cách sử dụng các chất pha loãng hoặc tá dược như chất độn, chất bổ sung, chất kết dính, chất làm ẩm, chất làm phân rã, chất hoạt động bề mặt, v.v..., thường được sử dụng để bào chế thành chế phẩm.

Nếu bào chế thành chế phẩm dạng rắn để uống, dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm viên nén, viên, dạng bột, dạng hạt, dạng viên nang, v.v... Chế phẩm rắn có thể bao gồm ít nhất một tá dược như tinh bột, canxi cacbonat, sucroza, lactoza, gelatin hoặc tương tự trong thành phần hữu hiệu của nó. Ngoài các tá dược đơn giản, chế phẩm rắn có thể chứa chất bôi trơn, v.v..., cụ thể như magie stearat và talc, nhưng không giới hạn.

Nếu bào chế thành chế phẩm dạng lỏng để uống, dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm các chất huyền phù, chất lỏng để sử dụng nội bộ, nhũ tương, xi-rô và các loại tương tự, và cũng có thể chứa các tá dược khác nhau, cụ thể như, chất làm ẩm, chất tạo ngọt, chất tạo hương, chất bảo quản, v.v... ngoài nước và parafin lỏng, vốn thường được sử dụng làm các chất pha loãng đơn giản, nhưng không giới hạn.

Nếu bào chế thành chế phẩm để dùng để tiêm, dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm nước tiệt trùng, dung môi không chứa nước, chất huyền phù, nhũ tương, chế phẩm đông khô hoặc thuốc đạn. Dung môi không chứa nước và dung môi huyền phù có thể bao gồm các chất sau, nhưng không giới hạn: propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, este tiêm được như etyl oleat, v.v... Thuốc đạn, có thể sử dụng: witepsol, macrogol, tween 61, bơ cacao, laurinum, glyxerogelatin, v.v...

Dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng qua đường uống hoặc đường tiêm cho động vật có vú, bao gồm con người, theo phương pháp thông thường. Đối với phương pháp tiêm, có thể tiêm trong màng bụng, tiêm trực tràng, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm lồng ngực, hoặc tương tự. Miễn là có hiệu quả về mặt dược lý, liều lượng của dược phẩm không giới hạn nhiều, và phạm vi của chúng thay đổi tùy theo cân nặng, tuổi, giới tính, tình trạng sức khỏe, chế độ ăn uống, thời gian dùng thuốc, cách dùng, tốc độ bài tiết và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Liều dùng thông thường hàng ngày của chế phẩm không giới hạn nhiều, cụ thể là 0,1-3.000 mg/kg và cụ thể hơn 0,5-2.000 mg/kg tính theo thành phần hữu hiệu, có thể dùng mỗi ngày một lần hoặc chia thành nhiều lần trong ngày.

Thuật ngữ “lượng hiệu quả về mặt dược lý” có nghĩa là lượng đủ để điều trị bệnh theo tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý cho điều trị bệnh và có thể được xác định theo các yếu tố bao gồm loại bệnh, mức độ nghiêm trọng, hoạt lực của thuốc, độ mẫn cảm với thuốc, thời

gian dùng thuốc, lộ trình điều trị, tốc độ bài tiết, thời gian điều trị và loại thuốc sử dụng đồng thời, cũng như các yếu tố khác được biết đến trong lĩnh vực dược phẩm.

Thuật ngữ “sử dụng” có nghĩa là cung cấp dược phẩm xác định cho cá thể bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Ở đây, cá thể dùng để chỉ động vật, điển hình là động vật có vú, trong đó việc điều trị bằng cách sử dụng vi khuẩn lactic cho thấy lợi ích rõ rệt. Ví dụ ưu tiên về cá thể có thể bao gồm linh trưởng cũng như con người. Ngoài ra, cá thể có thể bao gồm tất cả các cá thể được đề cập có triệu chứng của bệnh dị ứng, hoặc có nguy cơ triệu chứng đó.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*B. longum* IM55”, “*L. plantarum* IM76”, “bệnh dị ứng” được mô tả tương tự như đã đề cập ở trên.

Thực phẩm của sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe. Thuật ngữ “thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe” có nghĩa là thực phẩm được chế biến và xử lý bằng cách sử dụng nguyên liệu hoặc thành phần thô, có chức năng hữu ích cho cơ thể người theo Hiệp hội Thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe Hàn Quốc (HFF) và thuật ngữ “chức năng” có nghĩa là dùng thực phẩm cho mục đích điều chỉnh các chất dinh dưỡng liên quan đến cấu trúc và chức năng của cơ thể người hoặc đạt được giá trị hữu hiệu cho sức khỏe như hoạt động sinh lý, v.v...

Thực phẩm của sáng chế có thể bao gồm chất phụ gia thực phẩm thông thường, và mục nhất định có phải là thành phần thích hợp làm “phụ gia thực phẩm” hoặc không được quyết định dựa trên thông số kỹ thuật và tiêu chuẩn của thành phần đó theo quy định chung, phương pháp thử nghiệm chung, giống như theo Mã phụ gia thực phẩm được Bộ An toàn Thực phẩm và Dược phẩm Hàn Quốc (MFDS) phê duyệt, trừ khi có các quy định khác.

Các mặt hàng được liệt kê trong “Mã phụ gia thực phẩm” có thể kể đến như hợp chất hóa học keton, glyxin, kali xitrat, axit nicotinic, axit xinamic, v.v.; các chất phụ gia tự nhiên như chất màu từ quả hồng, chất chiết cam thảo, xenluloza tinh thể, màu cao

lượng, gồm gua, v.v...; các công thức hỗn hợp như L-natri glutamat, phụ gia kiềm cho mì, công thức bảo quản, công thức màu hắc ín, v.v...

Thực phẩm của sáng chế có thể bao gồm *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng với hàm lượng 0,01-99% trọng lượng, cụ thể là 0,1-75% trọng lượng và cụ thể hơn là 0,5-50% trọng lượng của chế phẩm.

Thực phẩm của sáng chế có thể được chế biến và xử lý thành dạng viên nén, viên nang, dạng bột, dạng hạt, chất lỏng, viên, v.v..., dùng để phòng và/hoặc giảm bớt các bệnh dị ứng.

Cụ thể là, thực phẩm dạng viên nén được bào chế bằng cách tạo hạt *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng với hỗn hợp tá dược, chất kết dính, chất làm phân rã và các chất phụ gia khác bằng phương pháp thông thường; tiếp đó tạo keo, rồi thực hiện ép khuôn, hoặc có thể bào chế bằng cách đưa thẳng hỗn hợp vào ép khuôn. Ngoài ra, thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe dạng viên nén nói trên có thể chứa chất giảm nhẹ, và một số chất khác nếu cần thiết, và được bọc bằng chất phù thích hợp, nếu cần.

Trong số các thực phẩm ở dạng viên nang, chế phẩm viên nang cứng được bào chế bằng cách nạp *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng; và hỗn hợp các chất phụ gia như tá dược, v.v...; hoặc hạt hay hạt được bọc vào viên nang cứng thông thường. Chế phẩm viên nang mềm được bào chế bằng cách nạp *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng; và hỗn hợp các chất phụ gia như tá dược, v.v... vào viên nang gelatin, v.v... Chế phẩm viên nang mềm có thể chứa chất hóa dẻo, chất tạo màu, chất bảo quản, v.v..., như glycerin, sorbitol hoặc chất tương tự khác, nếu cần.

Thực phẩm dạng viên được bào chế bằng cách ép khuôn *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng với hỗn hợp tá dược, chất kết dính, chất làm phân rã, v.v... bằng phương pháp thích hợp và bọc ngoài bằng đường trắng hoặc các chất bọc thích hợp khác, hoặc có thể phủ bằng tinh bột, talc hoặc vật liệu thích hợp, nếu cần.

Thực phẩm dạng hạt được bào chế bằng cách tạo hạt *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng với hỗn hợp tá dược, chất kết dính, chất làm

phân rã, v.v... bằng phương pháp thích hợp, có thể bao gồm chất tạo hương, thuốc giảm nhẹ, v.v..., nếu cần. Khi thực hiện thử nghiệm độ kết hạt đối với thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe ở dạng hạt đi qua sàng có kích thước lỗ số 12 (1680 μm), số 14 (1410 μm) và số 45 (350 μm), toàn bộ hạt đi qua sàng số 12, 5% tổng số hạt trở xuống vẫn còn trên sàng số 14, và 15,0% tổng số hạt trở xuống vẫn còn trên sàng số 45.

Định nghĩa các thuật ngữ như tá dược, chất kết dính, chất làm phân rã, chất keo, thuốc giảm nhẹ, chất tạo mùi, v.v..., bao gồm tính năng giống hoặc tương tự như mô tả trong các tài liệu đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ấn bản diễn giải của Dược điển Hàn Quốc, Nhà xuất bản Munseong, Hiệp hội Cao đẳng Dược Hàn Quốc, phiên bản sửa đổi lần thứ 5, trang 33-48, 1989).

Loại thực phẩm nói trên không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về thực phẩm chức năng, mà chất chiết của sáng chế có thể được bổ sung, gồm có đồ uống, kẹo cao su, phức hợp vitamin, đồ uống, v.v..., bao gồm thực phẩm theo nghĩa thông thường, cụ thể là tất cả các loại thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo sáng chế, thuật ngữ liên quan đến dược phẩm, bao gồm “*B. longum* IM55”, “*L. plantarum* IM76”, được mô tả tương tự như đã đề cập ở trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh miễn dịch” có nghĩa là bệnh do phản ứng miễn dịch nhất định, cụ thể là bệnh tự miễn, thải ghép hoặc bệnh bộ phận ghép phản ứng lại vật chủ, nhưng không giới hạn. Bệnh tự miễn có thể là bệnh Crohn, ban đỏ, viêm khớp dạng thấp, viêm tuyến giáp Hashimoto, thiếu máu ác tính, bệnh Addison, bệnh tiểu đường tuýp 1, bệnh lupus, hội chứng mệt mỏi mãn tính, hội chứng đau cơ xơ hóa, bệnh suy giáp và cường giáp, xơ cứng bì, bệnh Behcet, bệnh viêm ruột, đa xơ cứng, nhược cơ, hội chứng Meniere, hội chứng Guillain-Barre, hội chứng Sjogren, bệnh bạch cầu, lạc nội mạc tử cung, bệnh vẩy nến, xơ cứng hệ thống, hen suyễn, viêm loét đại tràng hoặc bệnh tương tự khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh viêm” dùng để chỉ chung các bệnh mà tổn thương chính là viêm. Bệnh viêm theo sáng chế có thể là ít nhất một bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: viêm khớp, bệnh gút, viêm gan, béo phì, viêm giác mạc, viêm dạ dày, viêm ruột, viêm thận, viêm đại tràng, tiểu đường, lao, viêm phế quản, viêm màng phổi, viêm phúc mạc, viêm cột sống, viêm tụy, đau viêm, viêm niệu đạo, viêm bàng quang, viêm âm đạo, xơ cứng động mạch, nhiễm trùng máu, bỏng, viêm da, viêm nha chu và viêm lợi. Cụ thể, bệnh viêm có thể là viêm đại tràng.

Ngoài tác dụng kiểm soát, phòng ngừa, giảm bớt và điều trị các bệnh viêm ở trên, chế phẩm theo sáng chế cũng cho thấy hiệu quả tốt trong kiểm soát, phòng ngừa, giảm bớt và điều trị các bệnh viêm và biến chứng của chúng bằng cách cân bằng lại hệ vi sinh vật đường ruột bị rối loạn do các bệnh viêm.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm bớt bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm, chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo sáng chế, thuật ngữ liên quan đến thực phẩm, bao gồm “*B. longum* IM55”, “*L. plantarum* IM76”, được mô tả tương tự như đã đề cập ở trên.

Bên cạnh đó, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng, phương pháp bao gồm bước sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng cho cá thể.

Theo sáng chế, các thuật ngữ như “*B. longum* IM55”, “*L. plantarum* IM76”, “sử dụng”, “cá thể”, “bệnh dị ứng” và các thuật ngữ tương tự khác giống như được mô tả trên đây.

Ngoài ra, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng trong để phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế cũng đề xuất sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng trong sản xuất thuốc dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng để sử dụng trong phòng hoặc điều trị các bệnh dị ứng.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp phòng hoặc điều trị các bệnh miễn dịch hoặc viêm, phương pháp bao gồm bước sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng cho cá thể.

Theo sáng chế, các thuật ngữ bao gồm “*B. longum* IM55”, “*L. plantarum* IM76”, “sử dụng”, “cá thể”, “bệnh miễn dịch”, “bệnh viêm” được mô tả tương tự như đã đề cập ở trên.

Hơn nữa, Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng trong phòng hoặc điều trị các bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm.

Bên cạnh đó, theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất sử dụng *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng trong sản xuất thuốc dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm.

Theo khía cạnh khác nữa, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm *B. longum* IM55 KCCM11961P, *L. plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc hỗn hợp của chúng để sử dụng trong phòng hoặc điều trị các bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm.

B. longum IM55 hoặc *L. plantarum* IM76 theo sáng chế an toàn, không độc hại với cơ thể người; có hoạt tính sinh lý tốt, cụ thể như tác dụng điều hòa miễn dịch và ức chế phản ứng viêm; và có tác dụng cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột. Do đó, *B. longum* IM55, *L. plantarum* IM76 hoặc hỗn hợp của chúng có thể được sử dụng làm nguyên liệu

để phòng ngừa, giảm bớt hoặc điều trị không chỉ các bệnh dị ứng mà cả các bệnh miễn dịch và bệnh viêm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các phương án thực hiện mẫu. Tuy nhiên, các phương án thực hiện mẫu chỉ mang tính minh họa để làm rõ hơn các tính năng kỹ thuật của sáng chế, mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Phân lập và xác định vi khuẩn lactic

(1) Phân lập vi khuẩn lactic

Phân của người khỏe mạnh ở độ tuổi 20 sống ở Seoul hoặc của người khỏe mạnh ở độ tuổi 60 sống ở Gurye, tỉnh Jeollanam-do, hoặc kim chi cải thảo được muối tại nhà được lấy và tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy GAM (Dược phẩm Nissui, Nhật Bản). Sau đó, dịch nổi được lấy và cấy chuyển vào môi trường thạch MRS (Difco, Mỹ) hoặc môi trường thạch GAM (Dược phẩm Nissui, Nhật Bản). Môi trường nuôi cấy được giữ ở 37°C trong 48 giờ, sau đó phân lập được các chủng *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacterium* spp. từ các khuẩn lạc được tạo thành.

(2) Định danh vi khuẩn lactic được phân lập

Đối với các chủng vi khuẩn được phân lập từ phân người hoặc kim chi cải thảo, các loài đã được xác định và đặt tên theo phương pháp nhuộm gram, đặc tính sinh lý, trình tự rADN 16S và tương tự tên của các chủng này. Số quản lý và tên của các vi khuẩn này được trình bày trên bảng 1 và 2. Vi khuẩn lactic phân lập từ phân người được chia thành 15 chủng *B. longum* (số quản lý từ 51 đến 65 trên bảng 1), 10 chủng *B. adolescentis* (số quản lý từ 66 đến 75 trên bảng 1) và 10 chủng *L. acidophilus* (số quản lý từ 90 đến 99 trên bảng 2), trong khi đó vi khuẩn lactic phân lập từ kim chi cải thảo được chia thành 14 chủng *L. plantarum* (số quản lý từ 76 đến 89 trên bảng 2).

Bảng 1

Số quản lý	Tên chủng	Số quản lý	Tên chủng
------------	-----------	------------	-----------

51	<i>B. longum</i> IM51	64	<i>B. longum</i> IM64
52	<i>B. longum</i> IM52	65	<i>B. longum</i> IM65
53	<i>B. longum</i> IM53	66	<i>B. adolescentis</i> IM66
54	<i>B. longum</i> IM54	67	<i>B. adolescentis</i> IM67
55	<i>B. longum</i> IM55	68	<i>B. adolescentis</i> IM68
56	<i>B. longum</i> IM56	69	<i>B. adolescentis</i> IM69
57	<i>B. longum</i> IM57	70	<i>B. adolescentis</i> IM70
58	<i>B. longum</i> IM58	71	<i>B. adolescentis</i> IM71
59	<i>B. longum</i> IM59	72	<i>B. adolescentis</i> IM72
60	<i>B. longum</i> IM60	73	<i>B. adolescentis</i> IM73
61	<i>B. longum</i> IM61	74	<i>B. adolescentis</i> IM74
62	<i>B. longum</i> IM62	75	<i>B. adolescentis</i> IM75
63	<i>B. longum</i> IM63		

Bảng 2

Số quản lý	Tên chủng	Số quản lý	Tên chủng
76	<i>L. plantarum</i> IM76	88	<i>L. plantarum</i> IM88
77	<i>L. plantarum</i> IM77	89	<i>L. plantarum</i> IM89
78	<i>L. plantarum</i> IM78	90	<i>L. acidophilus</i> IM90
79	<i>L. plantarum</i> IM79	91	<i>L. acidophilus</i> IM91
80	<i>L. plantarum</i> IM80	92	<i>L. acidophilus</i> IM92
81	<i>L. plantarum</i> IM81	93	<i>L. acidophilus</i> IM93
82	<i>L. plantarum</i> IM82	94	<i>L. acidophilus</i> IM94
83	<i>L. plantarum</i> IM83	95	<i>L. acidophilus</i> IM95

84	<i>L. plantarum</i> IM84	96	<i>L. acidophilus</i> IM96
85	<i>L. plantarum</i> IM85	97	<i>L. acidophilus</i> IM97
86	<i>L. plantarum</i> IM86	98	<i>L. acidophilus</i> IM98
87	<i>L. plantarum</i> IM87	99	<i>L. acidophilus</i> IM99

Trong số các chủng được mô tả trên bảng 1, *B. longum* IM55 được xác định là vi khuẩn gram dương, không có hoạt tính catalaza cũng như không tạo bào tử. Trình tự rADN 16S của *B. longum* IM55 có một chuỗi SEQ ID NO: 1. Kết quả so sánh trình tự rADN 16S của *B. longum* IM55 bằng tìm kiếm trên BLAST đã chứng minh rằng *B. longum* hoàn toàn không có trình tự tương đồng rADN 16S nào khác và 99% trình tự rADN 16S tương đồng với một *B. longum* đã biết. Ngoài ra, phân tích thử nghiệm lên men đường bằng cách sử dụng bộ kit API đã chứng minh tính khả dụng trên nguồn cacbon là một trong số các đặc tính sinh lý của *B. longum* IM55 (tên mẫu: liên cầu khuẩn API 20; nhà sản xuất: BioMerieux's, Mỹ), kết quả phân tích của vi khuẩn này được thể hiện trên bảng 3. Trên bảng 3 dưới đây, “+” cho thấy tính khả dụng của vi khuẩn này trên nguồn cacbon là dương tính, “-” cho thấy tính khả dụng trên nguồn cacbon là âm tính.

Bảng 3

Nguồn Cacbon	Tên chủng	Nguồn Cacbon	Tên chủng
	<i>B. longum</i> IM55		<i>B. longum</i> IM55
L-tryptophan	-	Gelatin	-
Ure	-	Esculin sắt xitrat	+
D-glucoza	+	Glyxerol	-
D-manitol	+	D-xelobioza	-
D-lactoza	+	D-manoza	-
D-sucroza	+	D-melezitoza	-
D-maltoza	+	D-rafinoza	+

Salixin	+	D-sorbitol	+
D-xyloza	+	D-rhamnoza	-
L-arabinoza	+	D-trehaloza	-

Trong số các chủng được mô tả trên bảng 2, *L. plantarum* IM76 được xác định là vi khuẩn gram dương. Trình tự rADN 16S của *L. plantarum* IM76 có một chuỗi SEQ ID NO: 2. Kết quả so sánh trình tự rADN 16S của *L. plantarum* IM76 bằng tìm kiếm trên BLAST đã chứng minh rằng *L. plantarum* hoàn toàn không có trình tự tương đồng rADN 16S nào khác và 99% trình tự rADN 16S tương đồng với một *L. plantarum* đã biết. Ngoài ra, phân tích thử nghiệm lên men đường bằng cách sử dụng bộ kit API đã chứng minh tính khả dụng trên nguồn cacbon là một trong số các đặc tính sinh lý của *L. plantarum* IM76 (tên mẫu: API 50 CHL; nhà sản xuất: BioMerieux's, Mỹ), kết quả phân tích của vi khuẩn này được thể hiện trên bảng 4. Trên bảng 4 dưới đây, “+” cho thấy tính khả dụng của vi khuẩn này trên nguồn cacbon là dương tính, “-” cho thấy tính khả dụng trên nguồn cacbon là âm tính.

Bảng 4

Nguồn Cacbon	Tên chủng	Nguồn Cacbon	Tên chủng
	<i>L. plantarum</i> IM76		<i>L. plantarum</i> IM76
Glyxerol	-	Salixin	+
Erythritol	-	Xelobioza	+
D-arabinoza	-	Maltoza	+
L-arabinoza	+	Lactoza	+
D-riboza	+	Melibioza	+
D-xyloza	-	Sucroza	+
L-xyloza	-	Trehaloza	+
D-adonitol	-	Inulin	-

Metyl- β -D-xylopyranozit	-	Melezitoza	-
D-galactoza	+	Rafinoza	+
D-glucoza	+	Tinh bột	-
D-fructoza	+	Glycogen	-
D-manoza	+	Xylitol	-
L-sorboza	-	Gentiobioza	+
L-rhamnoza	-	D-turanoza	+
Dulcitol	-	D-lyxoza	-
Inositol	-	D-tagatoza	-
Manitol	+	D-fucoza	-
Sorbitol	+	L-fucoza	-
α -metyl-D-manozit	-	D-arabitol	-
α -methly-D-glucozit	-	L-arabitol	-
N-axetyl-glucosamin	+	Gluconat	+
Amygdalin	+	2-keto-gluconat	-
Arbutin	+	5-keto-gluconat	-
Esculin	+		

Ví dụ 2. Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của vi khuẩn lactic

(1) Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của vi khuẩn lactic trên đại thực bào

Tiêm màng bụng 2 ml thioglycolat 4% đã khử trùng vào chuột đực C57BL/6J (20-23 g) sáu tuần tuổi được mua từ công ty Raonbio, sau đó gây mê trong 96 giờ. Tiếp đó, tiêm màng bụng 8ml môi trường RPMI 1640 vào chuột. Sau 5 đến 10 phút, ly tâm môi trường RPMI (bao gồm cả đại thực bào) chất chiết từ chuột với tốc độ 1000 vòng/phút

trong 10 phút, sau đó rửa lại 2 lần bằng môi trường RPMI 1640. Đại thực bào được đưa vào đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng, nuôi cấy trong 24 giờ, và loại bỏ các tế bào không liên kết. Chất lỏng chứa môi trường nuôi cấy đại thực bào được xử lý bằng vật liệu thử là vi khuẩn lactic cũng như chất gây phản ứng viêm như lipopolysaccharit (LPS) trong 90 phút hoặc 24 giờ, thu phân dịch nổi và tế bào. Khi đó, nồng độ xử lý của vi khuẩn lactic là 1×10^4 CFU/ml. Ngoài ra, để so sánh hiệu quả của vi khuẩn lactic, nhiều loại prebiotic khác nhau cũng được sử dụng làm vật liệu thử.

Mức độ biểu hiện của TNF- α thu được từ dịch nổi được đo bằng bộ kit ELISA. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của p65 (NF- κ B), p-p65 (phospho-NF- κ B) và β -actin thu được từ các tế bào nói trên được đo bằng phương pháp mô phỏng miễn dịch. Cụ thể là, 50 μ g dịch nổi được điện di trên gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong 1 giờ 30 phút. Chuyển mẫu điện di lên trên giấy nitroxenluloza với dòng điện 100 V và 400 mA trong 1 giờ 10 phút. Giấy nitroxenluloza đã chuyển mẫu điện di được cố định bằng sữa tách béo 5% trong 30 phút, được rửa bằng PBS-Tween 3 lần, mỗi lần 5 phút, sau đó để phản ứng qua đêm bằng việc bổ sung kháng thể sơ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) với tỷ lệ 1:100. Giấy nitroxenluloza tiếp tục được rửa 3 lần, mỗi lần 10 phút, phản ứng với kháng thể thứ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) với tỷ lệ 1:1000 trong 1 giờ 20 phút. Giấy này tiếp tục được rửa 3 lần, mỗi lần 15 phút, được đưa vào nhuộm màu huỳnh quang, rửa, sau đó đo cường độ bằng nhiễm sắc thể. Kết quả thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của vi khuẩn lactic trên đại thực bào được thể hiện trên bảng 5-7.

Bảng 5

Vật liệu thử trong xử lý đại thực bào	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của TNF- α
Không được xử lý	-	-
<i>B. longum</i> IM51	+	+
<i>B. longum</i> IM52	++	++
<i>B. longum</i> IM53	++	++
<i>B. longum</i> IM54	++	+

<i>B. longum</i> IM55	+++	+++
<i>B. longum</i> IM56	++	++
<i>B. longum</i> IM57	+	+
<i>B. longum</i> IM58	+	+
<i>B. longum</i> IM59	+	+
<i>B. longum</i> IM60	+	+
<i>B. longum</i> IM61	+	+
<i>B. longum</i> IM62	+	+
<i>B. longum</i> IM53	+	+
<i>B. longum</i> IM64	+	+
<i>B. longum</i> IM65	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM66	+++	+
<i>B. adolescentis</i> IM67	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM68	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM69	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM70	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM71	+	+

Bảng 6

Vật liệu thử trong xử lý đại thực bào	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của TNF- α
<i>B. adolescentis</i> IM72	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM73	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM74	+	+

<i>B. adolescentis</i> IM75	+	+
<i>L. plantarum</i> IM76	+++	+++
<i>L. plantarum</i> IM77	+	++
<i>L. plantarum</i> IM78	+	+
<i>L. plantarum</i> IM79	+	++
<i>L. plantarum</i> IM80	+	+
<i>L. plantarum</i> IM81	+++	+++
<i>L. plantarum</i> IM82	+	+
<i>L. plantarum</i> IM83	+	+
<i>L. plantarum</i> IM84	+	+
<i>L. plantarum</i> IM85	+	+
<i>L. plantarum</i> IM86	+	+
<i>L. plantarum</i> IM87	++	++
<i>L. plantarum</i> IM88	+	+
<i>L. plantarum</i> IM89	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM90	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM91	+++	+++
<i>L. acidophilus</i> IM92	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM93	+	+

Bảng 7

Vật liệu thử trong điều trị đại thực bào	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của TNF- α
<i>L. acidophilus</i> IM94	+	+

<i>L. acidophilus</i> IM95	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM96	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM97	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM98	+	+
<i>L. acidophilus</i> IM99	+	+
Inulin	++	++
Pectin cam quýt	++	+
Carageenan	+	-
Trehaloza	+	-
Lactuloza	+	-
Xyclodextrin	+	-
Carboxymetyl xenluloza	+	+
Gelatin	+	+
Chitosan	++	++
Axit alginic	+	+
Fructo-oligosacarit	+	+
Protein đậu nành tách béo	+	+
Pectin táo	+	++
Arabino-galactan	+	++
Xylan	+	-

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60%

Kết quả thử nghiệm trên các bảng 5-7 cho thấy tác dụng ức chế phản ứng viêm trên đại thực bào phụ thuộc vào từng loại vi khuẩn lactic khác nhau. Cụ thể là, đối với vi khuẩn lactic *Bifidobacterium spp.* và vi khuẩn lactic *Lactobacillus spp.*, tác dụng ức chế

phản ứng viêm được xác định rằng không chỉ khác nhau tùy thuộc vào loài mà còn phụ thuộc cả vào chủng, ngay cả khi chúng thuộc cùng một loài. Trong số đó, *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 được xác định là có tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF- κ B và tỷ lệ ức chế mức độ biểu hiện của TNF- α đồng thời ở mức cao.

Ngoài ra, chitosan, inulin và pectin từ cam quýt cũng là các prebiotic được xác định có tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF- κ B và tỷ lệ ức chế biểu hiện của TNF- α cao hơn hẳn các loại prebiotic khác.

(2) Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của vi khuẩn lactic trên tế bào tua

Các tế bào miễn dịch phân lập từ tủy xương của chuột C57BL/6 (chuột đực, 20-23 g) bằng cách sử dụng RPMI 1640 chứa 10% FBS, 1% kháng sinh, 1% glutamax và 0,1% mercaptoetanol, sau đó được xử lý bằng dung dịch đệm RBC, và rửa sạch. Các tế bào này được chia vào các giếng của đĩa 24 giếng, được xử lý bằng GM-CSF và IL-4 theo tỷ lệ 1:1000, và nuôi cấy. Vào ngày nuôi cấy thứ 5, môi trường nuôi cấy tế bào được thay mới và tế bào được thu nhận vào ngày thứ 8 và được sử dụng làm tế bào tua. Sau đó, các tế bào tua được đưa vào đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng, sau đó xử lý bằng vật liệu thử là vi khuẩn lactic cũng như chất gây phản ứng viêm như lipopolysaccharit trong 90 phút hoặc 24 giờ, thu được phần dịch nổi và tế bào. Khi đó, mật độ xử lý của vi khuẩn lactic là 1×10^4 CFU/ml. Ngoài ra, để so sánh hiệu quả của vi khuẩn lactic, nhiều loại prebiotic khác nhau cũng được sử dụng làm vật liệu thử.

Mức độ biểu hiện của IL-10 và IL-12 thu được từ dịch nổi được đo bằng bộ kit ELISA. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của p65 (NF- κ B), p-p65 (photpho-NF- κ B) và β -actin thu được từ các tế bào nói trên, sau khi xử lý bằng vật liệu thử trong 90 phút, được đo bằng phương pháp mô phỏng miễn dịch như trong ví dụ 2.(1) ở trên. Kết quả thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của vi khuẩn lactic trên tế bào tua được thể hiện trên bảng 8-10.

Bảng 8

Vật liệu thử trong xử lý tế bào tua	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF-κB (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của IL-12	Tỷ lệ tăng biểu hiện của IL-10
Không được xử lý	-	-	-
<i>B. longum</i> IM51	+	+	+
<i>B. longum</i> IM52	++	-	-
<i>B. longum</i> IM53	+	-	-
<i>B. longum</i> IM54	+	+	+
<i>B. longum</i> IM55	+++	++	+++
<i>B. longum</i> IM56	++	++	++
<i>B. longum</i> IM57	+	+	+
<i>B. longum</i> IM58	+	+	-
<i>B. longum</i> IM59	+	+	-
<i>B. longum</i> IM60	+	+	-
<i>B. longum</i> IM61	+	+	-
<i>B. longum</i> IM62	+	+	-
<i>B. longum</i> IM53	+	+	-
<i>B. longum</i> IM64	+	+	+
<i>B. longum</i> IM65	+	+	-
<i>B. adolescentis</i> IM66	+++	++	-
<i>B. adolescentis</i> IM67	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM68	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM69	+	+	-
<i>B. adolescentis</i> IM70	+	+	-

<i>B. adolescentis</i> IM71	+	+	-
-----------------------------	---	---	---

Bảng 9

Vật liệu thử trong xử lý tế bào tua	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF-κB (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của IL-12	Tỷ lệ tăng biểu hiện của IL-10
<i>B. adolescentis</i> IM72	+	+	-
<i>B. adolescentis</i> IM73	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM74	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> IM75	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM76	++	++	++
<i>L. plantarum</i> IM77	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM78	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM79	+	+	-
<i>L. plantarum</i> IM80	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM81	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM82	+	+	-
<i>L. plantarum</i> IM83	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM84	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM85	+	+	+
<i>L. plantarum</i> IM86	+	+	-
<i>L. plantarum</i> IM87	++	++	+
<i>L. plantarum</i> IM88	+	+	-
<i>L. plantarum</i> IM89	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM90	+	+	+

<i>L. acidophilus</i> IM91	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM92	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM93	+	+	+

Bảng 10

Vật liệu thử trong xử lý tế bào tua	Tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF-κB (p-p65/p65)	Tỷ lệ ức chế biểu hiện của IL-12	Tỷ lệ tăng biểu hiện của IL-10
<i>L. acidophilus</i> IM94	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM95	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM96	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM97	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM98	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> IM99	+	+	+
Inulin	++	+	+
Pectin cam quýt	++	++	++
Carrageenan	+	+	-
Trehaloza	+	+	+
Lactuloza	+	+	-
Xyclodextrin	+	+	-
Carboxymetyl xenluloza	+	+	-
Gelatin	+	+	+
Chitosan	++	+	++
Axit alginic	+	+	+
Fructo-oligosacarit	+	+	-

Protein đậu nành tách béo	+	+	+
Pectin táo	+	+	-
Arabino-galactan	+	+	+
Xylan	+	+	++

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60%

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

Kết quả thử nghiệm trên các bảng 8-10 cho thấy tác dụng ức chế phản ứng viêm trên tế bào tua phụ thuộc vào từng loại vi khuẩn lactic khác nhau. Cụ thể là, đối với vi khuẩn lactic *Bifidobacterium spp.* và vi khuẩn lactic *Lactobacillus spp.*, tác dụng ức chế phản ứng viêm được xác định rằng không chỉ khác nhau tùy thuộc vào loài mà còn phụ thuộc cả vào chủng, ngay cả khi chúng thuộc cùng một loài. Cụ thể, một chủng số cho thấy biểu hiện của IL-12 tăng lên. Trong khi hầu hết các chủng khác cho thấy biểu hiện của IL-10 giảm đi. Trong số các đó, chủng *B. longum* IM55 và chủng *L. plantarum* IM76 được xác định là có tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF-kB, tỷ lệ ức chế mức độ biểu hiện của IL-12 và tỷ lệ tăng mức độ biểu hiện của IL-10 đồng thời ở mức cao nhất.

Ngoài ra, chitosan, inulin và pectin từ cam quýt cũng là các prebiotic được xác định có tỷ lệ ức chế hoạt tính của NF-kB, tỷ lệ ức chế biểu hiện của IL-12 và tỷ lệ tăng mức độ biểu hiện của IL-10 cao hơn hẳn các loại prebiotic khác.

Từ ví dụ 2 cho thấy, trong số các vi khuẩn lactic, *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có tác dụng ức chế phản ứng viêm tốt nhất. Ngoài ra, trong số các prebiotic khác nhau, chitosan, inulin và pectin từ cam quýt có tác dụng ức chế phản ứng viêm tốt nhất.

Ví dụ 3. Đánh giá tác dụng điều hòa miễn dịch của vi khuẩn lactic

(1) Tốc độ biệt hóa tế bào

Để kiểm soát, phòng ngừa, giảm thiểu hoặc điều trị các bệnh dị ứng, cụ thể là các bệnh do phản ứng quá mẫn tuýp 1 gây ra, điều quan trọng là phải giảm IgE và tăng tế bào

T (tế bào Treg) khi giải phóng IL-10 trong phản ứng miễn dịch với chất gây dị ứng. Phản ứng dị ứng trở nên phức tạp không chỉ bởi các chất trung gian của dưỡng bào, bạch cầu ưa kiềm hoặc tương tự mà còn bởi xytokin tiết ra từ các tế bào đó, một phần triệu chứng của phản ứng dị ứng là kết quả từ hoạt động của các xytokin. Các xytokin như TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, v.v..., được tạo ra từ dưỡng bào đóng vai trò liên kết các bạch cầu trung tính và bạch cầu ưa axit. Ngoài ra, IL-4 và IL-13 được tiết ra từ dưỡng bào kích hoạt các tế bào B để tạo kháng thể IgE, và IL-5 đóng vai trò liên kết và hoạt hóa bạch cầu ưa axit. Các Xytokin như IL-4 và IL-5 thường được phân loại thành xytokin Th2 vì phần nhiều các xytokin này được tiết ra từ tế bào Th2, xytokin được tiết ra từ dưỡng bào và tế bào Th2 liên kết với các thụ thể tương ứng, tạo ra sự tương tác giữa các tế bào và khuếch đại một phản ứng dị ứng. Ngoài ra, triệu chứng sốc phản vệ có thể xảy ra khi TNF- α , một xytokin tiền viêm, được sản xuất với số lượng lớn trong tình trạng dị ứng.

Do đó, để đánh giá tác dụng điều hòa miễn dịch của vi khuẩn lactic phân lập từ phân hoặc kim chi cải thảo, và ảnh hưởng của vi khuẩn lactic đến phản ứng miễn dịch của tế bào lách, tỷ lệ ức chế biệt hóa thành tế bào tiết xytokin và tỷ lệ tăng cường biệt hóa thành các tế bào Treg đã được đo.

Cụ thể, lá lách tách ra từ chuột C56BL/6J được nghiền nát, tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS, và sau đó phân lập các tế bào T CD4 bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức). Các tế bào T CD4 phân lập được đưa vào đĩa 12 giếng với mật độ 5×10^5 tế bào/giếng. Sau đó, các tế bào trong mỗi giếng được bổ sung các chất: kháng CD3, kháng CD28, IL-2 và IL-12 để kích thích biệt hóa tế bào T thành tế bào Th1; với việc bổ sung các chất kháng CD3, kháng CD28, IL-2 và IL-4 đã biệt hóa tế bào T thành tế bào Th2; với việc bổ sung các chất kháng CD3, kháng CD28, IL-6 và TGF- β đã biệt hóa tế bào T thành tế bào Th17; và với việc bổ sung chất kháng CD3 và kháng CD28 đã biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg, và vật liệu thử, ví dụ, vi khuẩn lactic được đưa vào các giếng với mật độ 1×10^5 CFU/giếng, nuôi cấy trong bốn ngày. Ngoài ra, để so sánh ảnh hưởng của vi khuẩn axit lactic, nhiều loại prebiotic khác nhau đã được sử dụng làm vật liệu thử.

Sau đó, khả năng biệt hóa các tế bào T được phân lập từ lá lách thành các tế bào Th1, Th2, Th17 và Treg đã được xác định. Cụ thể là, dịch nuôi cấy tế bào được nhuộm bằng kháng thể kháng FOXP3 và IL-17A, sau đó sự phân phối các tế bào Th1, Th2, Th17

và Treg được phân tích bằng thiết bị FACS (thiết bị phân loại tế bào bằng hoạt hóa huỳnh quang) (hệ thống C6 Flow Cytometer®, San Jose, CA, Mỹ). Kết quả được thể hiện trên bảng 11-13. Trên các bảng 11-13 dưới đây, vi khuẩn lactic không được hiển thị tên loài mà tên được đặt bởi các tác giả của sáng chế.

Bảng 11

Vật liệu thử trong xử lý tế bào T	Tỷ lệ ức chế biệt hóa tế bào			Tỷ lệ tăng cường biệt hóa tế bào
	Tế bào Th1	Tế bào Th2	Tế bào Th17	Tế bào Treg
Không được xử lý	-	-	-	-
IM51	+	+	+	+
IM52	++	-	-	-
IM53	+	-	+	+
IM54	+	+	+	+
IM55	+++	+++	+++	+++
IM56	++	+	+	+
IM57	++	-	+	+
IM58	++	-	+	-
IM59	+	+	+	-
IM60	+	+	+	-
IM61	++	+	++	+
IM62	++	+	++	+
IM63	+	+	+	+
IM64	++	++	+	+
IM65	+	+	+	+

IM66	+++	+	++	+
IM67	++	+	++	+
IM68	++	+	++	+
IM69	+	+	+	+
IM70	++	+	++	+
IM71	++	+	++	+

Bảng 12

Vật liệu thử trong xử lý tế bào T	Tỷ lệ ức chế biệt hóa tế bào			Tỷ lệ tăng cường biệt hóa tế bào
	Tế bào Th1	Tế bào Th2	Tế bào Th17	Tế bào Treg
IM72	+	+	+	+
IM73	++	+	+	+
IM74	+	+	+	+
IM75	+++	+	+	++
IM76	++	+++	+++	+++
IM77	+	+	+	+
IM78	+	+	++	++
IM79	+	+	++	+
IM80	+	++	+	+
IM81	+	+	++	+
IM82	+	+	+	+
IM83	+	++	++	+
IM84	+	+	++	+

IM85	+	+	+	+
IM86	+	+	+	+
IM87	+	+	++	+
IM88	+	+	+	+
IM89	++	+	++	+
IM90	+	+	+	+
IM91	+	+	+	+
IM92	+	+	+	+
IM93	++	+	++	+

Bảng 13

Vật liệu thử trong xử lý tế bào T	Tỷ lệ ức chế biệt hóa tế bào			Tỷ lệ tăng cường biệt hóa tế bào
	Tế bào Th1	Tế bào Th2	Tế bào Th17	Tế bào Treg
IM94	+	+	+	+
IM95	+	+	+	+
IM96	++	++	++	+
IM97	+	+	+	+
IM98	+	+	+	-
IM99	+	+	+	+
P1	+	+	+	+
P2	+	+++	++	++
P3	+++	++	+	+
P4	+	+	+	+

P5	+	++	-	++
P6	++	+	++	+
P7	++	++	++	-
P8	+	++	+	+
P9	+	++	+	+
P10	+	+	++	+
P11	+	+	+	++
P12	+	+	+	+
P13	+	+	+	-
P14	+	+	+	-
P15	++	+	++	-

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60%

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

* P1: inulin; P2: pectin cam quýt; P3: carageenan; P4: trehaloza; P5: Lactuloza; P6: xyclodextrin; P7: carboxymetyl xenluloza; P8: gelatin; P9: chitosan; P10: axit alginic; P11: fructooligosacarit; P12: protein đậu nành khử béo; P13: pectin táo; P14: arabino-galactan; và P15: xylan.

Kết quả thử nghiệm trên các bảng 11-13 cho thấy tỷ lệ biệt hóa tế bào T phụ thuộc vào từng loại vi khuẩn lactic khác nhau. Cụ thể là, đối với vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp., tỷ lệ ức chế biệt hóa thành tế bào Th1, Th2 và Th17 và tăng cường biệt hóa thành tế bào Treg phụ thuộc vào các loại vi khuẩn lactic khác nhau. Một số cho kết quả tỷ lệ ức chế tế bào Th2 và tăng cường tế bào Treg trong khi một số vi khuẩn lactic cho kết quả ngược lại. Trong số đó, *B. longum* IM55 được xác định là có tỷ lệ ức chế biệt hóa thành tế bào Th1, Th2 và Th17 và tăng cường biệt hóa thành tế bào Treg đồng thời ở mức cao nhất. Tương tự như *Bifidobacterium* spp., vi khuẩn lactic *Lactobacillus* spp. cũng cho thấy tỷ lệ ức chế và tăng cường biệt hóa tế bào phụ thuộc vào các loại vi khuẩn lactic

khác nhau. Trong số đó, *L. plantarum* IM76 được xác định là có tỷ lệ ức chế biệt hóa thành tế bào Th1, Th2 và Th17 và tăng cường biệt hóa thành tế bào Treg đồng thời ở mức cao nhất.

(2) Tốc độ biểu hiện Xytokin

Tốc độ biểu hiện của các yếu tố phiên mã và xytokin của các tế bào Th1, Th2, Th17 và Treg so với các tế bào lách T đã được đo. Cụ thể, mức biểu hiện được phân tích tương ứng bằng phương pháp qRT-PCR nhờ các yếu tố T-bet, IFN- γ và IL-12 từ dịch nuôi cấy để gây cảm ứng biệt hóa tế bào Th1; GATA3 và IL-5 từ dịch nuôi cấy để gây cảm ứng biệt hóa tế bào Th2; ROR γ t và IL-17 từ dịch nuôi cấy để gây cảm ứng biệt hóa tế bào Th17; và Foxp3 và IL-10 từ dịch nuôi cấy để gây cảm ứng biệt hóa tế bào Treg. Bảng 14 sau đây cho thấy đoạn mồi được sử dụng cho qRT-PCR tương ứng với đoạn mục tiêu khuếch đại. Ngoài ra, kết quả đo tốc độ biểu hiện của các yếu tố phiên mã và xytokin của các tế bào Th1, Th2, Th17 và Treg so với các tế bào lách T được trình bày trên bảng 15 và 16. Trên bảng 15 và 16 dưới đây, các vi khuẩn lactic không được hiển thị tên loài mà tên được đặt bởi các tác giả sáng chế.

Bảng 14

Đoạn mục tiêu khuếch đại	Đoạn mồi	Trình tự đoạn mồi
T-bet	Mồi xuôi (SEQ ID NO: 3)	5'-CCTCTTCTATCCAACCAGTATC-3'
	Mồi ngược (SEQ ID NO: 4)	5'-CTCCGCTTCATAACTGTGT-3'
IFN- γ	Mồi xuôi (SEQ ID NO: 5)	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'
	Mồi ngược (SEQ ID NO: 6)	5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
GATA3	Mồi xuôi (SEQ ID NO: 7)	5'-GAAGGCATCCAGACCCGAAAC-3'

	Mũi ngược (SEQ ID NO: 8)	5'-ACCCATGGCGGTGACCATGC-3'
IL-5	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 9)	5'-AAAGAGAAGTGTGGCGAGGAGAGAC-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 10)	5'-CCTTCCATTGCCCACTCTGTACTCATC-3'
ROR γ t	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 11)	5'-ACAGCCACTGCATTCCCAGTTT-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 12)	5'-TCTCGGAAGGACTTGCAGACAT-3'
IL-17	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 13)	5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 14)	5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3'
FOXp3	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 15)	5'-CCCATCCCCAGGAGTCTT-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 16)	5'-ACCATGACTAGGGGCACTGTA-3'
IL-10	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 17)	5'- ATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 18)	5'- CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTGC-3'
GAPDH	Mũi xuôi (SEQ ID NO: 19)	5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT-3'
	Mũi ngược (SEQ ID NO: 20)	5'-TTTGCCGTGAGTGGAGTCAT-3'

Bảng 15

Vật liệu thử trong xử lý tế bào lách T	Tỷ lệ ức chế biểu hiện						Tỷ lệ tăng biểu hiện	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXp3	IL-10

Không được xử lý	-	-	-	-	-	-	-	-
IM51	+	++	+	+	+	+	+	+
IM52	++	+	-	+	-	+	-	-
IM53	+	+	-	+	+	++	+	-
IM54	+	+	+	++	+	+	++	+
IM55	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IM56	++	+	+	++	+	++	+	++
IM57	++	++	-	+	+	+	+	+
IM58	++	++	-	++	+	+	-	-
IM59	+	+	+	+	+	+	-	+
IM60	+	++	+	++	+	+	-	-
IM61	++	+	+	++	++	++	+	-
IM62	++	+	+	++	++	++	+	+
IM63	+	++	+	+	+	+	+	-
IM64	++	+	++	++	+	+	+	+
IM65	+	+	+	+	+	+	+	-
IM66	++	+	+	+	++	++	+	+
IM67	+	+	+	+	++	+	+	+
IM68	++	++	+	+	++	++	+	+
IM69	+	+	+	+	+	+	+	-
IM70	++	+	+	+	++	++	+	+
IM71	++	+	+	+	++	++	+	+
IM72	+	++	+	+	+	+	+	+

IM73	++	+	+	+	+	+	+	+
IM74	+	+	+	+	+	+	+	+

Bảng 16

Vật liệu thử trong xử lý tế bào lách T	Tỷ lệ ức chế biểu hiện						Tỷ lệ tăng biểu hiện	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXP3	IL-10
IM75	++	+	+	+	+	+	++	+
IM76	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IM77	+	+	+	++	+	+	+	+
IM78	+	+	+	+	++	++	++	+
IM79	+	+	+	++	++	++	+	-
IM80	+	+	++	+	+	+	+	+
IM81	+	+	+	+	++	++	+	+
IM82	+	+	+	+	+	+	+	+
IM83	+	++	++	++	++	++	+	+
IM84	+	+	+	+	++	++	+	+
IM85	+	++	+	++	+	+	+	+
IM86	+	+	+	+	+	+	+	-
IM87	+	+	+	+	++	++	+	+
IM88	+	++	+	+	+	++	+	-
IM89	++	+	+	+	++	+	+	-
IM90	+	+	+	++	+	+	+	+
IM91	+	+	+	++	+	+	+	-
IM92	+	+	+	+	+	+	+	-

IM93	++	+	+	++	++	+	+	+
IM94	+	+	+	+	+	+	+	+
IM95	+	+	+	+	+	+	+	-
IM96	++	+	++	++	++	++	+	-
IM97	+	+	+	+	+	+	+	+
IM98	+	+	+	+	+	+	-	-
IM99	+	+	+	+	+	+	+	+

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60%

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

Kết quả đo trên bảng 15 và 16 cho thấy tốc độ biểu hiện của xytokin khác nhau tùy thuộc vào từng loại vi khuẩn lactic. Cụ thể là, đối với vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp., kết quả cho thấy tỷ lệ ức chế biểu hiện của GATA3 và IL-5 trái ngược với các vi khuẩn lactic khác. Trong số các vi khuẩn lactic đó, *B. longum* IM55 được xác định là có tỷ lệ ức chế biểu hiện của T-bet, IFN- γ , GATA3, IL-5, ROR γ t và IL-17 và tăng biểu hiện của FOXP3 và IL-10 đồng thời ở mức cao nhất. Tương tự như *Bifidobacterium* spp., vi khuẩn lactic *Lactobacillus* spp. cũng cho thấy tỷ lệ thay đổi mức độ biểu hiện của xytokin cũng khác nhau như vậy. Trong số đó, *L. plantarum* IM76 được xác định là có tỷ lệ ức chế biểu hiện của T-bet, IFN- γ , GATA3, IL-5, ROR γ t và IL-17 và tăng biểu hiện của FOXP3 và IL-10 đồng thời ở mức cao nhất.

Ví dụ 4. Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của IM55 hoặc IM76

Trong số các vi khuẩn lactic được phân lập trong ví dụ 1 nêu trên, một thử nghiệm đã được thực hiện về tác dụng ức chế phản ứng viêm của *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76.

(1) Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của IM55 hoặc IM76 trên đại thực bào

Chuột cái BALB/c bảy tuần tuổi (20-22 g) được mua từ công ty Raonbio được nuôi bảy ngày trước khi thí nghiệm. Tiêm màng bụng 2ml thioglycolat 4% vào chuột, sau đó gây mê trong 96 giờ. Thu nhận dịch màng bụng với 10ml môi trường RPMI 1640, ly tâm với tốc độ 300 xg trong 10 phút, rửa lại bằng RPMI 1640. Các tế bào được đưa vào đĩa 12 giếng với nồng độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng, nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 1% kháng sinh-kháng nấm và 10% FBS ở 37°C trong 20 giờ, sau đó rửa ba lần. Các tế bào bám dính được sử dụng làm đại thực bào. Để đo tác dụng biểu hiện của IM55 hoặc IM76 trên xytokin, đại thực bào với mật độ 1×10^6 tế bào/giếng được xử lý với vi khuẩn lactic ở mật độ 1×10^5 CFU/ml hay chất gây phản ứng viêm, như LPS trong 20 giờ. Mức độ biểu hiện của xytokin được đo bằng bộ kit ELISA như trong Ví dụ 2. (1) ở trên. Kết quả là biểu hiện của IL-10 được tăng lên và biểu hiện của IL-12 bị giảm đi khi sử dụng IM55 hoặc IM76 (Fig.1 và 2).

(2) Thử nghiệm tác dụng ức chế phản ứng viêm của IM55 hoặc IM76 trên các tế bào tua

Tế bào tủy của chuột cái BALB/c bảy tuần tuổi (20-22 g) được thu nhận bằng môi trường RPMI 1640 theo phương pháp đã biết (Immunopharmacol. Immunotoxicol., 2016, 38, 447-454). Các tế bào được đưa vào đĩa 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng, nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 1% rGM-CSF nồng độ 20 ng/ml, 10% FBS, 1% kháng sinh-kháng nấm và gentamycin nồng độ 150 µg/ml.

Để đo tác dụng biểu hiện của IM55 hoặc IM76 trên xytokin, tiến hành thay thế môi trường nuôi cấy tế bào trên bằng môi trường điều kiện vào ngày nuôi cấy thứ 3 và thứ 6 để loại bỏ bạch cầu hạt, sau đó xử lý với vi khuẩn lactic ở mật độ 1×10^5 CFU/ml và LPS nồng độ 100 ng/ml vào ngày nuôi cấy thứ 8. Mức độ biểu hiện của xytokin được đo bằng bộ kit ELISA như trong Ví dụ 2. (1) ở trên. Kết quả là biểu hiện của IL-10 được tăng lên và biểu hiện của TNF-α bị giảm đi khi sử dụng IM55 hoặc IM76 (Fig.3 và 4).

Từ kết quả của Ví dụ 4 ở trên, có thể thấy rằng vi khuẩn lactic, cụ thể là *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có tác dụng ức chế phản ứng viêm hiệu quả, và do đó có tác dụng tốt trong phòng ngừa, giảm thiểu và điều trị các bệnh viêm.

Ví dụ 5. Đánh giá tác dụng điều hòa miễn dịch của IM55 và IM76

Để đánh giá hiệu quả điều hòa miễn dịch của *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 trong số các vi khuẩn lactic phân lập từ Ví dụ 1 ở trên, tỷ lệ biệt hóa tế bào T được phân tích bằng phương pháp tương tự như Ví dụ 3 nêu trên.

Cụ thể là, lá lách của chuột cái BALB/c bảy tuần tuổi (20-22 g) được thu nhận vô trùng, nghiền nát, và xử lý bằng đệm tris amoni clorua. Tạo huyền phù tế bào trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS, sau đó phân lập các tế bào T bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào Pan T II. Các tế bào được nuôi cấy tương ứng trong môi trường có bổ sung chất kháng CD28 (1 μ g/ml), kháng CD3 (1 μ g/ml), rIL-4 (10 μ g/ml) và rIL-2 (10 μ g/ml) để biệt hóa tế bào T (1x10⁵ tế bào/giếng) thành tế bào Th2; bổ sung chất kháng CD28 (1 μ g/ml) và kháng CD3 (1 μ g/ml) để biệt hóa tế bào T (1x10⁵ tế bào/giếng) thành tế bào Treg, và các tế bào này cũng được nuôi cấy tương ứng trong bốn ngày với việc bổ sung IM55 hoặc IM76 ở mật độ 1x10⁵ CFU/ml mỗi giếng. Thu nhận RNA từ các tế bào đó, phân tích mức độ biểu hiện của IL-10, GATA3, FOXP3 và IL-5 bằng cách thực hiện qRT-PCR. Thực hiện qRT-PCR tương tự như Ví dụ 3 nêu trên bằng cách sử dụng cùng một đoạn mồi như trên bảng 14.

Kết quả cho thấy việc xử lý bằng IM55 hoặc IM 76, mức độ biểu hiện của GATA3 và IL-5 bị giảm để ức chế sự biệt hóa thành các tế bào Th2 (Hình 5 và 6), trong khi mức độ biểu hiện của FOXP3 và IL-10 tăng lên để thúc đẩy sự biệt hóa thành các tế bào Treg (Fig.7 và 8).

Từ kết quả của Ví dụ 5 ở trên, có thể thấy rằng các vi khuẩn lactic, cụ thể là *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có tác dụng điều hòa miễn dịch hiệu quả, và do đó có tác dụng tốt trong việc phòng, giảm thiểu và điều trị các bệnh viêm.

Ví dụ 6. Đánh giá tác dụng giảm nhẹ các triệu chứng bệnh viêm mũi và hen suyễn của vi khuẩn lactic (1)

Rửa phế quản (BAL), cùng với nội soi phế quản, thường được sử dụng để thu nhận tế bào và các thành phần hòa tan khác từ lớp nhầy biểu mô của đường hô hấp và phế nang phổi. Dịch rửa phế quản phế quản (BALF) không chỉ bao gồm các protein khác nhau trong dòng máu, mà còn là các protein được tiết ra từ các loại tế bào khác nhau bao gồm tế bào biểu mô và tế bào viêm. BALF thường được dùng để chẩn đoán hen phế quản,

viêm phế quản hoặc viêm phổi, hoặc phân tích các tình trạng bệnh lý của chúng. Do đó, để xác định tác dụng giảm viêm mũi và hen suyễn, các chỉ số liên quan đến tác dụng chống viêm mũi và chống hen suyễn đã được phân tích từ huyết thanh và mô phổi cũng như BALF.

(1) Phương pháp thí nghiệm

Chuột cái BALB/C bảy tuần tuổi (21-23 g) được cho thích nghi một tuần trong điều kiện môi trường được kiểm soát với độ ẩm 50%, nhiệt độ 25°C và chu kỳ sáng/tối là 12:12 giờ. Sau đó, huyền phù 20µg ovalbumin gây dị ứng (OVA) và 2 mg nhôm hydroxit (Alum) trong 0,2 ml muối đệm photphat (PBS: pH 7,4) và tiêm màng bụng vào từng con chuột thí nghiệm và vào ngày thí nghiệm thứ 14. Hòa tan 100 µg OVA trong 10 µl nước cất và bôi vào từng con chuột để gây viêm mũi dị ứng và hen suyễn vào ngày 26, 27 và 28 của thí nghiệm. Trong khi đó, thuốc thử nghiệm, cụ thể là vi khuẩn lactic được sử dụng bằng đường uống cho từng con chuột mỗi ngày một lần trong tổng cộng năm ngày từ ngày 26 đến ngày 30 của thí nghiệm. Ngoài ra, dexametason, được sử dụng làm thuốc đối chứng dương thay vì vi khuẩn lactic, được tiêm với liều 1 mg/kg trọng lượng. Hơn nữa, trong nhóm chuột bình thường, viêm mũi dị ứng và hen suyễn còn sử dụng muối đệm photphat (PBS: pH 7,4) thay vì OVA và thuốc thử nghiệm. Trong nhóm chuột đối chứng, viêm mũi dị ứng và hen suyễn, muối đệm photphat (PBS: pH 7,4) được dùng như thuốc thử nghiệm. Sau khi kết thúc thí nghiệm, những con chuột được gây mê, thu nhận máu, mô phổi và BALF. Huyết thanh từ máu được thu nhận bằng phương pháp ly tâm và được sử dụng làm mẫu xét nghiệm.

Các chỉ số liên quan đến tác dụng chống viêm mũi và chống hen suyễn được phân tích từ huyết thanh, BALF và mô phổi bằng các phương pháp phân tích khác nhau. Mỗi phương pháp phân tích và các chỉ số phân tích được thể hiện như sau.

* Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA): IL-10, IL-5, IL-6, IL-4, IgE, v.v...

* FACS (phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang): Phân loại các tế bào T (Th1: CD4⁺/IFN-γ⁺; Th2: CD4⁺/IL-4⁺; Treg: CD4⁺/FOXP3⁺; Th17: CD4⁺/IL-17⁺), phân loại bạch cầu ưa axit (CD11b⁺, Siglec-F⁺)

(2) Kết quả thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm cho thấy mức độ biểu hiện của IL-5, IgE và IL-4, cụ thể là các chỉ số liên quan đến viêm mũi và hen suyễn, bị ức chế đáng kể trong huyết thanh của nhóm sử dụng IM55 hoặc IM76 (bảng 17 và Fig.9-11). Ngoài ra, một lượng IL-5 và IL-4, cụ thể là các chỉ số liên quan đến viêm mũi và hen suyễn, đã giảm đáng kể và tỷ lệ tế bào Th2 và bạch cầu ưa axit cũng giảm đáng kể trong BALF (bảng 18 và Fig.12-15). Hơn nữa, mức độ biểu hiện của IL-10, liên quan đến tác dụng phòng ngừa và điều trị viêm mũi và hen suyễn, đã tăng lên cùng với tỷ lệ tăng của tế bào Treg trong BALF (bảng 18 và Fig.16 và 17).

Bảng 17

Phân loại nhóm thử nghiệm	Tỷ lệ ức chế		
	IL-5	IgE	IL-4
Đối chứng	-	-	-
IM55	+++	++	+++
IM76	++	+	++
Dx	++	+++	+++

Bảng 18

Phân loại nhóm thử nghiệm	Tỷ lệ ức chế				Tỷ lệ tăng	
	IL-5	IL-4	Tế bào Th2	Bạch cầu ưa axit	IL-10	Tế bào Treg
Đối chứng	-	-	-	-	-	-
IM55	+++	+++	++	+++	+++	+++
IM76	++	+++	+++	+++	+++	+
Dx	+++	+++	+++	+++	++	-

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60%

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

Ví dụ 7. Đánh giá tác dụng giảm thiểu các triệu chứng bệnh viêm mũi và hen suyễn của vi khuẩn lactic (2)

(1) Phương pháp thí nghiệm

Mô hình viêm mũi dị ứng do OVA gây ra được chuẩn bị bằng cách tham khảo các phương pháp đã biết (Oh và cộng sự, Immunopharmacol. Immunotoxicol., 2013, 35, 678-686). Cụ thể là, chuột được chia ngẫu nhiên thành sáu nhóm (mỗi nhóm gồm 8 con). Trong năm nhóm, pha loãng OVA (20 µg) trong dung dịch kali nhôm sunfat, sử dụng dung dịch này để tiêm màng bụng vào chuột vào ngày thứ 1 và 14 của thí nghiệm. Hòa tan 100 µg OVA trong 10 µl nước cất và bôi vào từng con chuột để gây viêm mũi dị ứng và hen suyễn vào ngày 26, 27 và 28 của thí nghiệm. Trong khi đó, vật liệu thử là IM55 (1×10^9 CFU/con chuột), IM76 (1×10^9 CFU/con chuột), dexametason (1 mg/kg) hoặc dung dịch muối được dùng bằng đường uống cho từng con chuột mỗi ngày một lần trong tổng cộng năm ngày từ ngày 26 đến ngày 30 của thí nghiệm. Trong nhóm chuột bình thường, viêm mũi dị ứng và hen suyễn không được gây cảm ứng, mà chỉ dung dịch muối được sử dụng. Những con chuột bị kích thích bằng cách nhỏ OVA (10 µl/lỗ mũi, hòa tan trong 10 µg/ml dung dịch muối) vào cả hai khoang mũi của chúng, sau đó số lần hắt hơi và dụi mũi (số lần triệu chứng viêm mũi) được đếm trong 10 phút vào ngày thứ 31 của thí nghiệm.

Sinh thiết để thu nhận mô phổi và khoang mũi, được cố định bằng đệm formalin trung tính 4%, sau đó đem đông lạnh. Bằng cách sử dụng chất làm lạnh, mô đông lạnh được cắt thành một mặt cắt ngang 10 µm, nhuộm màu bằng hematoxylin, eosin (H&E) và phản ứng axit periodic Schiff (PAS).

Ngoài ra, các chỉ số liên quan đến tác dụng chống viêm mũi và chống hen suyễn được phân tích từ khoang mũi, huyết thanh, BALF và mô phổi bằng các phương pháp phân tích khác nhau ở Ví dụ 3 nêu trên, v.v... Cụ thể là các chỉ số của khoang mũi và huyết thanh được đo bằng bộ kit ELISA, các chỉ số liên quan đến viêm mũi và hen suyễn của BALF và mô phổi được đo bằng phương pháp qRT-PCR, sử dụng các đoạn mồi của bảng 14 ở trên.

(2) Kết quả thí nghiệm

Với những con chuột được xử lý bằng OVA, một số triệu chứng viêm mũi (số lần hắt hơi và dụi mũi) và các triệu chứng viêm mũi dị ứng bao gồm biểu hiện IL-4 và IL-5 trong khoang mũi tăng đáng kể. Tuy nhiên, khi điều trị bằng IM55 hoặc IM76, mức độ của các triệu chứng viêm mũi dị ứng và IL-4 và IL-5 trong khoang mũi do OVA gây ra đã giảm đáng kể (Hình 18 đến 20). Ngoài ra, khi điều trị bằng IM55 hoặc IM76, sự phá hủy khoang mũi gây ra bởi OVA đã được giảm bớt và sự mở rộng của các tế bào biểu mô trong khoang mũi cũng đã thuyên giảm (Fig.21).

Hơn nữa, theo kết quả kiểm tra mô học, trong trường hợp mô hình động vật bị viêm mũi, viêm phổi và phù do các nguyên nhân trên; biểu hiện của IL-5 và GATA3 tăng lên; và biểu hiện của IL-10 và FOXP3 giảm đi. Tuy nhiên, khi điều trị bằng IM55 hoặc IM76, sự phá hủy mô phổi và sự mở rộng các tế bào biểu mô gây ra bởi OVA đã bị ức chế; biểu hiện của GATA3 và IL-5 cũng bị ức chế; biểu hiện của FOXP3 và IL-10 được tăng lên (Fig.22-26).

Ví dụ 8. Đánh giá tác dụng giảm thiểu các triệu chứng bệnh viêm mũi và hen suyễn của vi khuẩn lactic (3)

Đánh giá được thực hiện không chỉ đối với tác dụng của IM55 hoặc IM76 mà còn đối với tác dụng của hỗn hợp IM55 và IM76 trong việc giảm thiểu viêm mũi và hen suyễn. Cụ thể là, tỷ lệ triệu chứng viêm mũi, tỷ lệ phân phối (%) của các tế bào bạch cầu ưa axit trong BALF và mức độ biểu hiện của xytokin trong máu được phân tích bằng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 3 ở trên, v.v...

Kết quả cho thấy nhóm dùng hỗn hợp IM55 và IM76 theo tỷ lệ 1: 1, 1: 3 và 1: 9, tỷ lệ các triệu chứng viêm, được kiểm tra bằng số lần hắt hơi và dụi mũi, giảm đi và mức độ biểu hiện của IL-5 trong khoang mũi giảm đi (Fig.27). Ngoài ra, mức độ biểu hiện của IL-5 trong huyết thanh cũng giảm đi (Fig.28).

Từ thí nghiệm trên mô hình viêm mũi trong các ví dụ 6-8 ở trên, có thể thấy rằng hỗn hợp *B. longum* IM55 và *L. plantarum* IM76 có tác dụng phòng ngừa, giảm bớt và điều trị hen suyễn và viêm mũi.

Ví dụ 9. Tác dụng cân bằng và giảm viêm đại tràng của vi khuẩn đường ruột

Ảnh hưởng của các vi khuẩn đường ruột đến sự xuất hiện và suy giảm các bệnh dị ứng, là yếu tố quan trọng trong sự xuất hiện của các bệnh dị ứng. Do đó, để xác định sự thay đổi của vi khuẩn trong đại tràng như vi khuẩn lactic, biểu hiện của xytokin và sự thay đổi vi khuẩn đường ruột trong đại tràng đã được phân tích liên quan đến mô hình viêm mũi dị ứng của Ví dụ 7 ở trên.

Cụ thể là, phân lập 2 μ g RNA từ mô đại tràng của mô hình động vật nói trên bằng cách sử dụng chu trình nhiệt Takara và SYBR. Phản ứng qPCR được thực hiện đối với RNA đã biết và đoạn mồi sử dụng cho qPCR như trên bảng 14 ở trên.

Kết quả phân tích cho thấy biểu hiện của IL-4 và IL-5 tăng lên và biểu hiện của IL-10 ở đại tràng giảm đi khi điều trị bằng OVA. Tuy nhiên, khi điều trị bằng IM55, IM76 hoặc hỗn hợp của chúng, biểu hiện của IL-4 và IL-5 giảm đi và biểu hiện của IL-10 tăng lên (Fig.29).

Ngoài ra, sau khi thu nhận đại tràng từ mô hình động vật nói trên, phân lập 100 ng DNA từ dịch đại tràng của mô hình động vật nói trên bằng cách sử dụng tổng hợp chu trình nhiệt Takara và SYBER. Phản ứng qPCR được thực hiện đối với RNA đã biết và đoạn mồi sử dụng cho qPCR như trên bảng 19 sau đây.

Bảng 19

Loại vi khuẩn	Loại mồi	Đoạn trình tự mồi (5'-3')
Firmicutes	Mồi xuôi (SEQ ID NO: 21)	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	Mồi ngược (SEQ ID NO: 22)	AGCTGACGACAACCATGCAC
Bacteroidetes	Mồi xuôi (SEQ ID NO: 23)	AACGCGAAAAACCTTACCTACC
	Mồi ngược (SEQ ID NO: 24)	TGCCCTTTCGTAGCAACTAGTG

Actinobacteria	Mỗi xuôi (SEQ ID NO: 25)	TGTAGCGGTGGAATGCGC
	Mỗi ngược (SEQ ID NO: 26)	AATTAAGCCACATGCTCCGCT
δ/γ - proteobacteria	Mỗi xuôi (SEQ ID NO: 27)	GCTAACGCATTAAGTRYCCCG
	Mỗi ngược (SEQ ID NO: 28)	GCCATGCRGCACCTGTCT
TM7	Mỗi xuôi (SEQ ID NO: 29)	GCAACTCTTTACGCCCAGT
	Mỗi ngược (SEQ ID NO: 30)	GAGAGGATGATCAGCCAG

Kết quả phân tích cho thấy sau khi điều trị bằng OVA, quần thể Firmicutes, Proteobacteria và TM7 tăng lên, quần thể Bacteroidetes và Actinobacteria giảm đi, và do đó tỷ lệ của Firmicutes/Bacteroides (F/B) và Proteobacteria/Bacteroidetes (P/B) tăng lên. Tuy nhiên, khi điều trị bằng IM55, IM76 hoặc hỗn hợp của chúng, nhóm Proteobacteria tăng lên bởi OVA bị ức chế đáng kể, còn nhóm Bacteroidetes và Actinobacteria giảm đi do sự xuất hiện của viêm mũi được phục hồi (Fig.30).

Từ kết quả trên cho thấy IM55, IM76 và hỗn hợp của chúng không chỉ cân bằng lại hệ vi sinh vật đường ruột bị rối loạn, mà còn có tác dụng kiểm soát, phòng ngừa, giảm bớt và điều trị viêm đại tràng.

Ví dụ 10. Sản xuất dược phẩm chứa vi khuẩn lactic

Để sản xuất các dược phẩm sau đây, sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 có thể được thay thế bởi chính chủng *B. longum* IM55, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng. Ngoài ra, để sản xuất dược phẩm sau đây, sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 có thể được thay thế bởi chính chủng *L. plantarum* IM76, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng. Hơn nữa, dược phẩm sau đây còn có thể bao gồm thêm chitosan.

<10-1> Bào chế dạng bột

Sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 20 mg

Lactoza	100 mg
---------	--------

Bột tan (Talc)	10 mg
----------------	-------

Các thành phần trên được trộn đều và được nạp vào gói kín để bào chế bột.

<10-2> Bào chế dạng viên nén

Sản phẩm nuôi cấy <i>B. longum</i> IM55	10 mg
---	-------

Tinh bột ngô	100 mg
--------------	--------

Lactoza	100 mg
---------	--------

Magie stearat	2 mg
---------------	------

Các thành phần trên được trộn đều và được ép thành viên nén theo phương pháp sản xuất viên nén thông thường.

<10-3> Bào chế dạng viên nang

Sản phẩm nuôi cấy <i>B. longum</i> IM55	10 mg
---	-------

Xenluloza tinh thể	3 mg
--------------------	------

Lactoza	15 mg
---------	-------

Magie stearat	0,2 mg
---------------	--------

Các thành phần trên được trộn đều và được nạp vào viên nang gelatin để bào chế viên nang theo phương pháp sản xuất viên nang thông thường.

<10-4> Bào chế dạng viên

Sản phẩm nuôi cấy <i>B. longum</i> IM55	10 mg
---	-------

Lactoza	150 mg
---------	--------

Glyxerin	100 mg
----------	--------

Xylitol	50 mg
---------	-------

Các thành phần trên được trộn đều và được bào chế thành viên, mỗi viên 4g, theo phương pháp thông thường.

<10-5> Bào chế dạng hạt nhỏ

Sản phẩm nuôi cấy <i>B. longum</i> IM55	15 mg
Chất chiết đậu nành	50 mg
Glucoza	200 mg
Tinh bột	600 mg

Các thành phần trên được trộn đều, sau đó thêm vào 100 mg etanol 30%, hỗn hợp được sấy khô ở 60°C, tiếp đó tạo thành dạng hạt, sau đó cho vào gói.

<10-6> Bào chế dạng tiêm

Sản phẩm nuôi cấy <i>B. longum</i> IM55	10 mg
Natri metabisunfit	3,0 mg
Metylparaben	0,8 mg
Propylparaben	0,1 mg

Lượng thích hợp nước cất vô trùng để tiêm

Các thành phần trên được trộn đều, sau đó nạp 2ml hỗn hợp vào ống, sau đó khử trùng, và tạo thành chế phẩm dạng tiêm.

Ví dụ 11. Sản xuất thực phẩm chức năng chứa vi khuẩn lactic

Để sản xuất các loại thực phẩm chức năng, sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 có thể được thay thế bởi chính *B. longum* IM55, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng. Ngoài ra, sản xuất các loại thực phẩm chức năng, sản phẩm nuôi cấy từ *B. longum* IM55 có thể được thay thế bởi chính *L. plantarum* IM76, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết của chúng. Hơn nữa, các loại thực phẩm chức năng sau đây còn có thể bao gồm thêm chitosan.

<11-1> Bào chế thực phẩm dạng bột

Lấy 0,5 phần trọng lượng sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 trộn vào 100 phần trọng lượng bột, sau đó hỗn hợp được sử dụng để tạo bánh mì, bánh ngọt, bánh quy, bánh quy giòn và mì sợi.

<11-2> Bào chế sản phẩm dạng sữa

Lấy 0,5 phần trọng lượng sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 trộn vào 100 phần trọng lượng sữa, sau đó hỗn hợp được sử dụng để tạo các sản phẩm dạng sữa như bơ và kem.

<11-3> Bào chế bột ngũ cốc hỗn hợp

Gạo lứt, lúa mạch, gạo nếp và ý dĩ, được sơ chế và sấy khô bằng phương pháp đã biết, rang, sau đó dùng máy xay nghiền thành bột có kích thước hạt 60 mesh.

Đậu đen, vừng đen và hạt tía tô, được hấp và sấy khô bằng phương pháp đã biết, được rang, sau đó dùng máy xay nghiền thành bột có kích thước hạt 60 mesh.

Ngũ cốc và các loại hạt nói trên, cùng với sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 được trộn theo tỷ lệ sau để tạo ra dạng bột ngũ cốc hỗn hợp.

Ngũ cốc (30 phần trọng lượng gạo lứt, 17 phần trọng lượng ý dĩ và 20 phần trọng lượng lúa mạch);

Các loại hạt (7 phần trọng lượng hạt tía tô, 8 phần trọng lượng đậu đen và 7 phần trọng lượng vừng đen);

Sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 (1 phần trọng lượng);

Nấm linh chi (0,5 phần trọng lượng); và

Địa hoàng (0,5 phần trọng lượng)

<11-4> Sản xuất đồ uống dinh dưỡng

Trộn đều các thành phần nhỏ như xi-rô ngô giàu fructoza (0,5 g), oligosacarit (4 g), đường (2 g), muối ăn (0,5 g) và nước (77 g) với 1 g sản phẩm nuôi cấy từ *B. longum*

IM55 thành hỗn hợp đồng nhất, tiệt trùng, đóng gói vào chai thủy tinh, chai PET, v.v..., để tạo ra đồ uống dinh dưỡng.

<11-5> Sản xuất đồ uống rau quả

Cho 2 g sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 vào 1.000 ml nước ép cà chua hoặc cà rốt để tạo ra đồ uống rau quả.

<11-6> Sản xuất nước ép trái cây

Cho 1 g sản phẩm nuôi cấy *B. longum* IM55 vào 1.000 ml nước ép táo hoặc nho để tạo ra nước ép trái cây.

6. Thông tin đăng ký cho vi khuẩn lactic

Các tác giả sáng chế ký gửi *B. longum* IM55 với mục đích sáng chế cho Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc, tổ chức lưu ký được chứng nhận (địa chỉ: Yulim Building, 45, Hongjengae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc) vào ngày 20 tháng 1 năm 2017, với số đăng ký KCCM11961P. Ngoài ra, Các tác giả sáng chế ký gửi *L. plantarum* IM76 với mục đích sáng chế cho Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc, tổ chức lưu ký được chứng nhận (địa chỉ: Yulim Building, 45, Hongjengae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc) vào ngày 20 tháng 1 năm 2017, với số đăng ký KCCM11962P. Việc ký gửi vi khuẩn lactic đã được thực hiện phù hợp với Hiệp ước Budapest về Công nhận quốc tế đối với ký gửi vi sinh vật cho mục đích của thủ tục sáng chế.

Như đã trình bày trên đây, sáng chế được mô tả thông qua các ví dụ, nhưng không giới hạn, và nhiều cải biến khác nhau có thể được thực hiện mà không rời khỏi phạm vi và tinh thần của sáng chế. Phạm vi của sáng chế chỉ được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Bản dịch

**Hiệp ước Budapest sự công nhận quốc tế đối với việc nộp lưu chủng vi sinh nhằm
tiến tới các thủ tục Patent**

MẪU QUỐC TẾ

Gửi tới. KIM DONG HYUN

92-24, Seonjam-ro,

Seongbuk-gu,

Seoul, Korea

NHẬN BẢN GỐC

Phát thành theo Rule 7.1 bởi

CƠ QUAN LƯU TRỮ QUỐC TẾ

Xác định ở cuối trang này

I. NHẬN BIẾT CHỦNG VI SINH VẬT

Ký hiệu nhận biết được cung cấp bởi
người lưu trữ:

***Bifidobacterium longum* IM55**

Số truy cập được cấp bởi Cơ quan lưu trữ
quốc tế:

KCCM11961P

**II. PHẦN MÔ TẢ VỀ MẶT KHOA HỌC VÀ/HOẶC CHỈ DẪN ĐỀ XUẤT VỀ PHÂN
LOẠI HỌC**

Chủng vi sinh vật được xác định dưới mục I được đính kèm cùng với:

☐ một phần mô tả về mặt khoa học

☐ một chỉ dẫn đề xuất về mặt phân loại học

(Đánh dấu chéo ở ô mô tả chính xác)

III. TIẾP NHẬN VÀ CHẤP NHẬN

Cơ quan lưu trữ Quốc tế chấp nhận chủng vi sinh vật được xác định dưới mục I nêu
trên, đã được tiếp nhận ngày 20 tháng 01 năm 2017 (ngày mẫu gốc được lưu trữ)¹

IV. CƠ QUAN LƯU TRỮ QUỐC TẾ

Tên: Trung tâm nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc

Địa chỉ: Yurim B/D

45, Hongjenae-2ga-gil

Seodaemun-gu

SEOUL 120-861

Republic of Korea

Chữ ký của người đại diện của cơ
quan lưu trữ Quốc tế hoặc của
chuyên viên:

Ngày 20 tháng 01 năm 2017.

¹ Quy định tại Rule 6.4(d) được áp dụng, ngày này là ngày Cơ quan lưu trữ quốc tế xác nhận tình trạng mẫu: tại đó mẫu lưu trữ không theo Hiệp ước Budapest sau khi tình trạng mẫu thu nhận được của cơ quan lưu trữ quốc tế được chuyển thành mẫu lưu trữ theo Hiệp ước Budapest, ngày này là ngày mà mẫu lưu trữ được tiếp nhận bởi Cơ quan lưu trữ quốc tế.

Bản dịch

**Hiệp ước Budapest sự công nhận quốc tế đối với việc nộp lưu chủng vi sinh nhằm
tiến tới các thủ tục Patent**

MẪU QUỐC TẾ

Gửi tới. KIM DONG HYUN

92-24, Seonjam-ro,

Seongbuk-gu,

Seoul, Korea

NHẬN BẢN GỐC

Phát thành theo Rule 7.1 bởi

CƠ QUAN LƯU TRỮ QUỐC TẾ

Xác định ở cuối trang này

I. NHẬN BIẾT CHỦNG VI SINH VẬT

Ký hiệu nhận biết được cung cấp bởi
người lưu trữ:

Lactobacillus plantarum IM76

Số truy cập được cấp bởi Cơ quan lưu trữ
quốc tế:

KCCM11962P

**II. PHẦN MÔ TẢ VỀ MẶT KHOA HỌC VÀ/HOẶC CHỈ DẪN ĐỀ XUẤT VỀ PHÂN
LOẠI HỌC**

Chủng vi sinh vật được xác định dưới mục I được đính kèm cùng với:

☐ một phần mô tả về mặt khoa học

☐ một chỉ dẫn đề xuất về mặt phân loại học

(Đánh dấu chéo ở ô mô tả chính xác)

III. TIẾP NHẬN VÀ CHẤP NHẬN

Cơ quan lưu trữ Quốc tế chấp nhận chủng vi sinh vật được xác định dưới mục I nêu
trên, đã được tiếp nhận ngày 20 tháng 01 năm 2017 (ngày mẫu gốc được lưu trữ)¹

IV. CƠ QUAN LƯU TRỮ QUỐC TẾ

Tên: Trung tâm nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc

Địa chỉ: Yurim B/D

45, Hongjena-e-2ga-gil

Seodaemun-gu

SEOUL 120-861

Republic of Korea

Chữ ký của người đại diện của cơ
quan lưu trữ Quốc tế hoặc của
chuyên viên:

Ngày 20 tháng 01 năm 2017.

¹ Quy định tại Rule 6.4(d) được áp dụng, ngày này là ngày Cơ quan lưu trữ quốc tế xác nhận tình trạng mẫu: tại đó mẫu lưu trữ không theo Hiệp ước Budapest sau khi tình trạng mẫu thu nhận được của cơ quan lưu trữ quốc tế được chuyển thành mẫu lưu trữ theo Hiệp ước Budapest, ngày này là ngày mà mẫu lưu trữ được tiếp nhận bởi Cơ quan lưu trữ quốc tế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.
2. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P theo điểm 1, trong đó *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P bao gồm trình tự 16S rADN là SEQ ID NO: 2.
3. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P theo điểm 1, được đặc trưng bởi chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P sử dụng nguồn cacbon L-arabinoza, D-riboza, D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-manoza, manitol, sorbitol, N-axetyl-glucosamin, amygdalin, arbutin, esculin, salixin, xelobioza, maltoza, lactoza, melibioza, sucroza, trehaloza, rafinoza, gentiobioza, D-turanoza và gluconat.
4. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng, dược phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.
5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P là tế bào sống của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, tế bào chết của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, sản phẩm nuôi cấy của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, sản phẩm nghiền của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc chất chiết của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.
6. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh dị ứng ít nhất là một bệnh được chọn từ nhóm bao gồm viêm mũi, tạng dị ứng, hen suyễn, viêm da dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, viêm tai giữa dị ứng, nổi mề đay và sốc phản vệ, dược phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.
7. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm còn bao gồm thêm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chitosan, inulin và pectin cam quýt.
8. Thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm nhẹ bệnh dị ứng, thực phẩm này bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.

9. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P là tế bào sống của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, tế bào chết của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, sản phẩm nuôi cấy của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P, sản phẩm nghiền của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P hoặc chất chiết của chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.

10. Thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm nhẹ bệnh dị ứng ít nhất là một bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm mũi, tạng dị ứng, hen suyễn, viêm da dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, viêm tai giữa dị ứng, nổi mề đay và sốc phản vệ, thực phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.

11. Thực phẩm theo điểm 8, trong đó thực phẩm còn bao gồm thêm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chitosan, inulin và pectin cam quýt.

12. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm, được phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.

13. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh miễn dịch hoặc bệnh viêm, trong đó bệnh viêm là viêm đại tràng, dược phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* IM76 KCCM11962P.

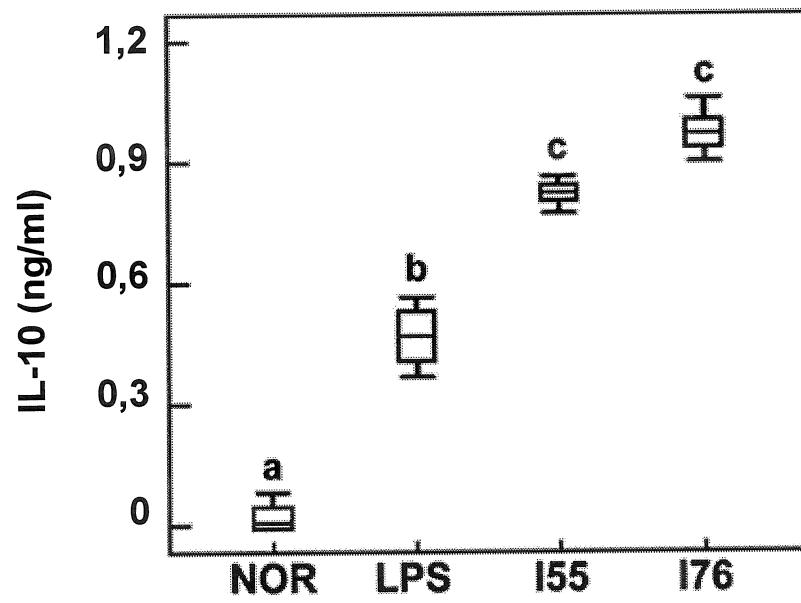


Fig.1

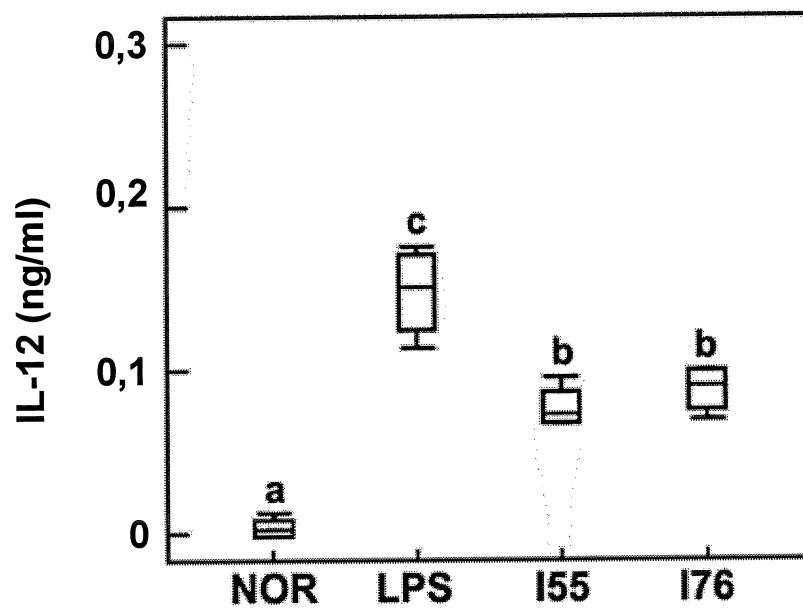


Fig.2

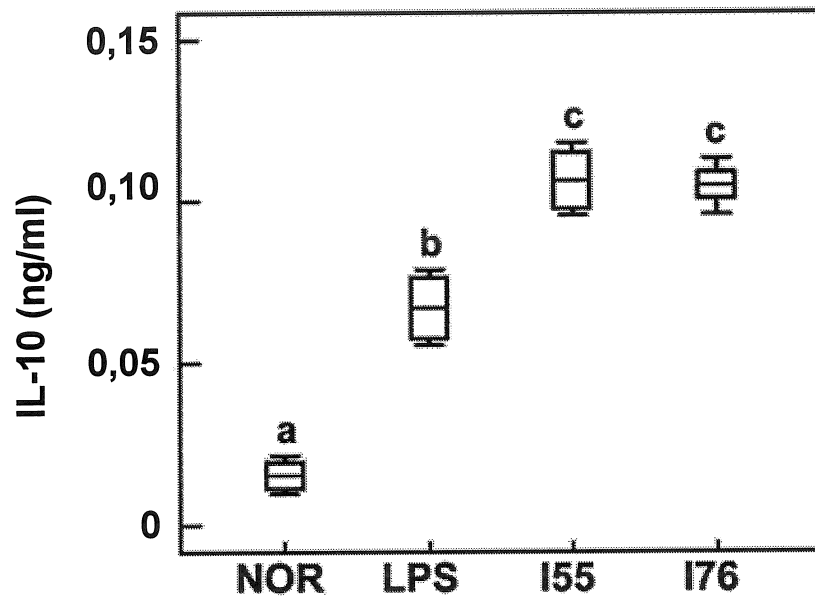


Fig.3

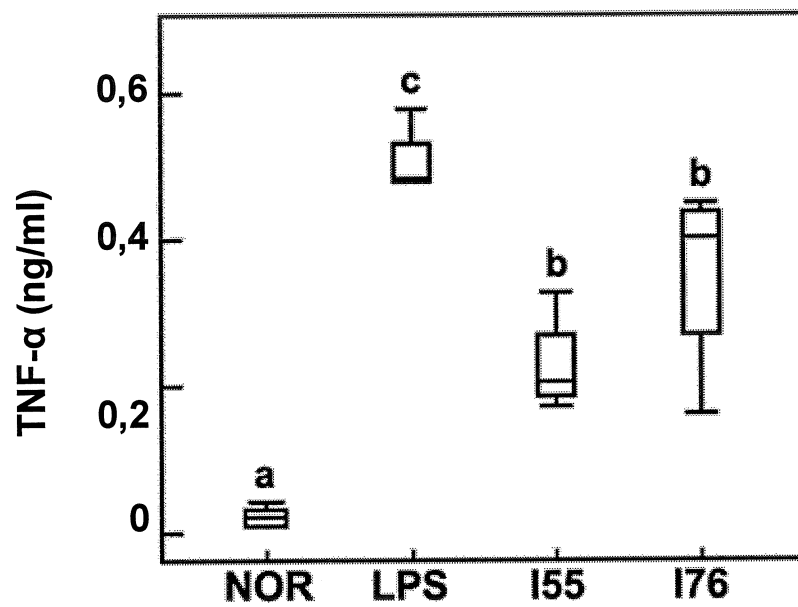


Fig.4

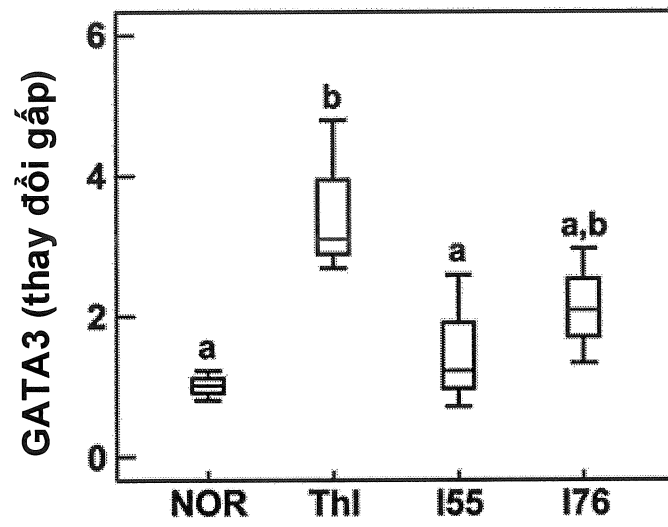


Fig.5

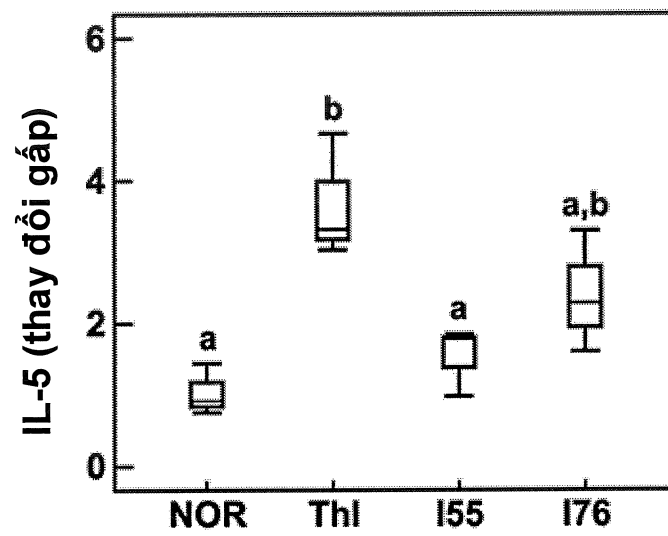


Fig.6

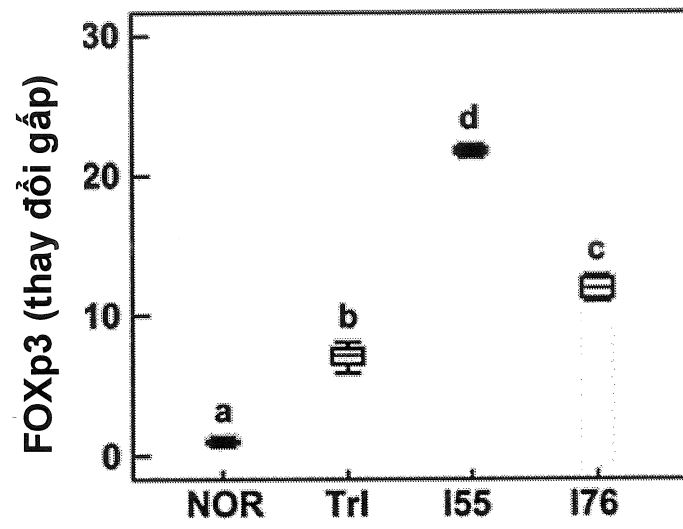


Fig.7

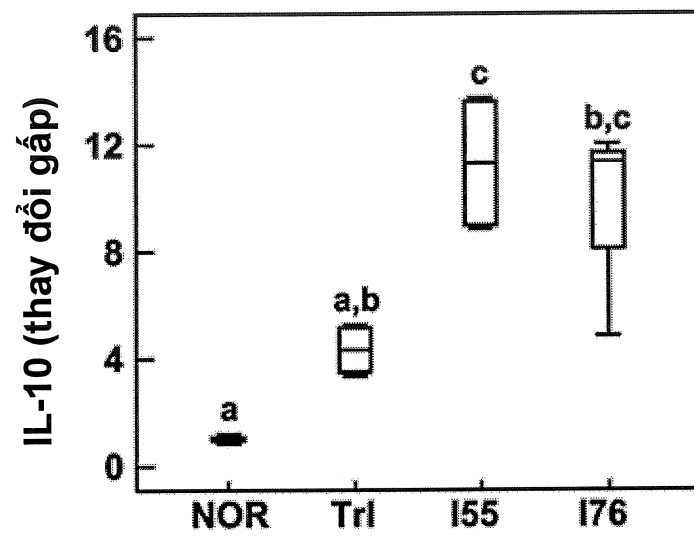


Fig.8

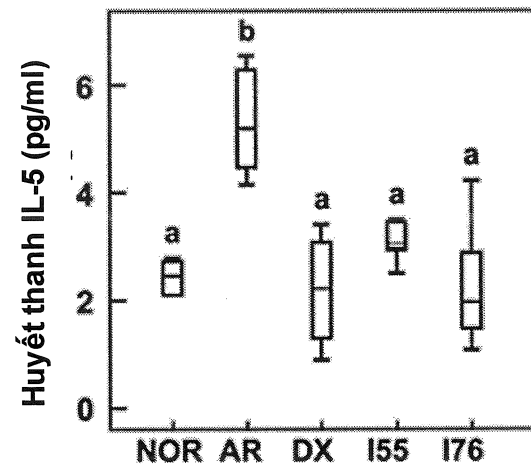


Fig.9

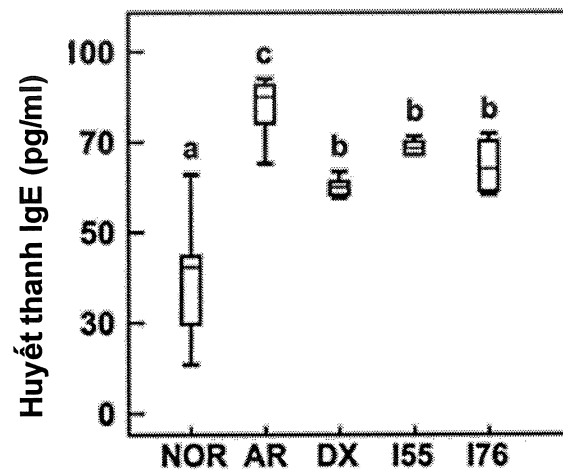


Fig.10

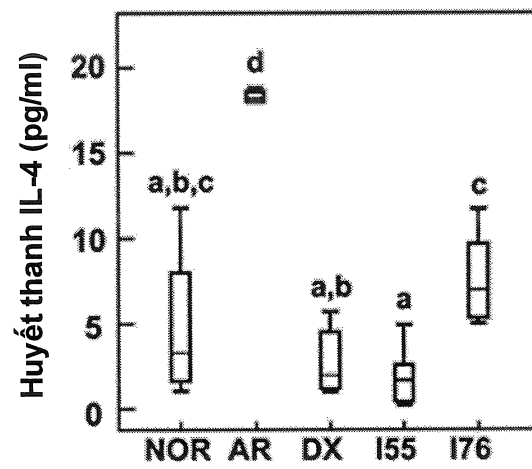


Fig.11

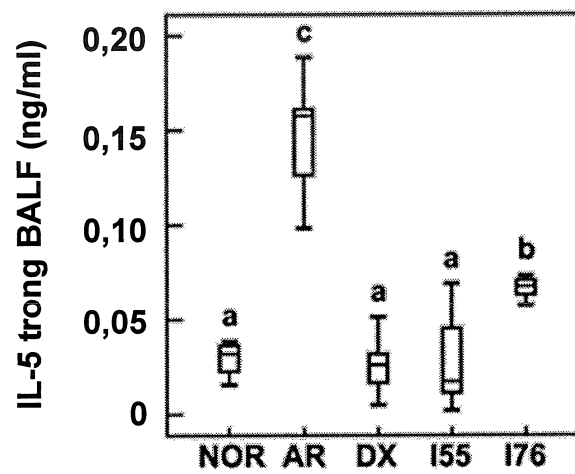


Fig.12

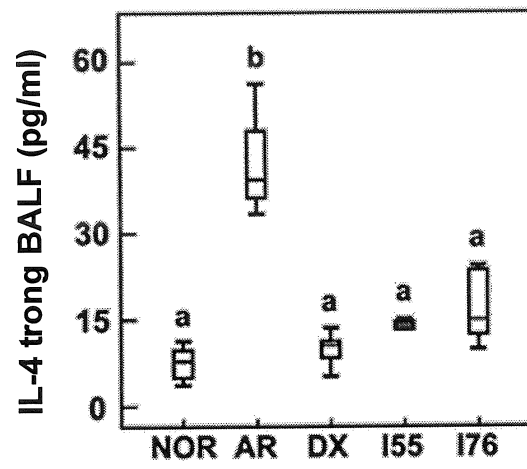


Fig.13

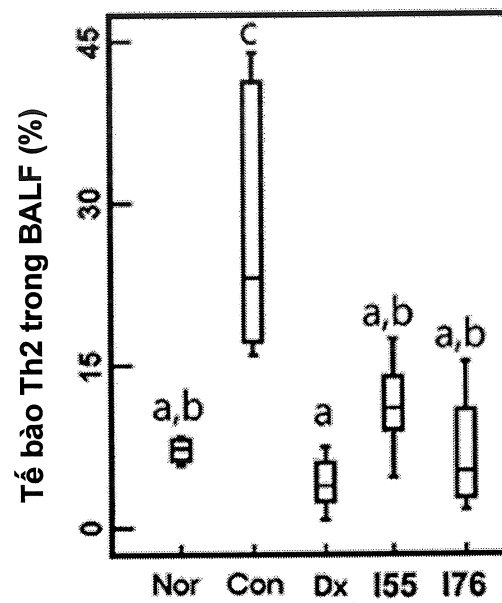


Fig.14

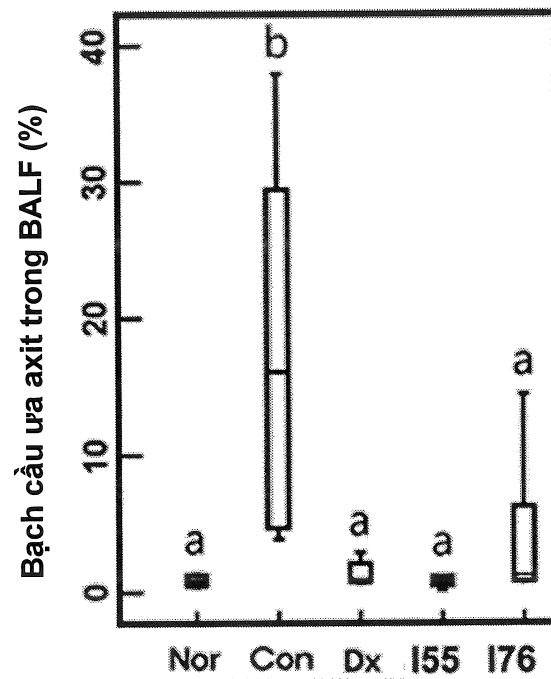


Fig.15

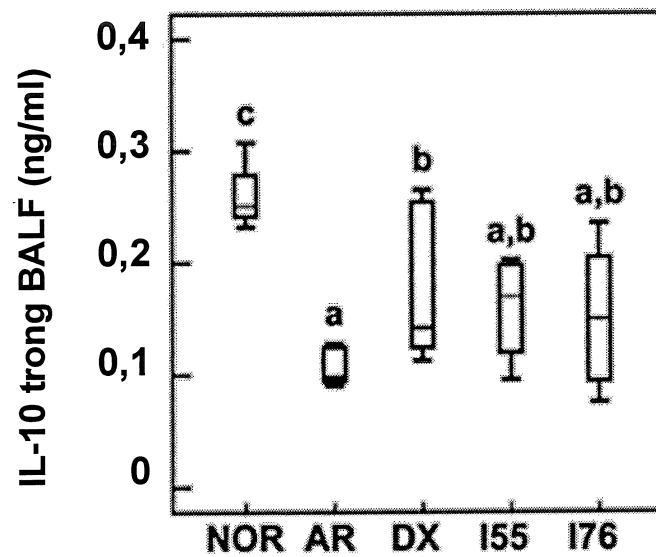


Fig.16

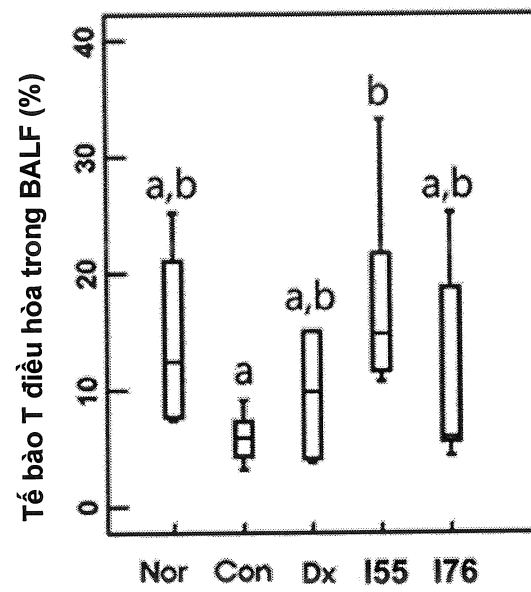


Fig.17

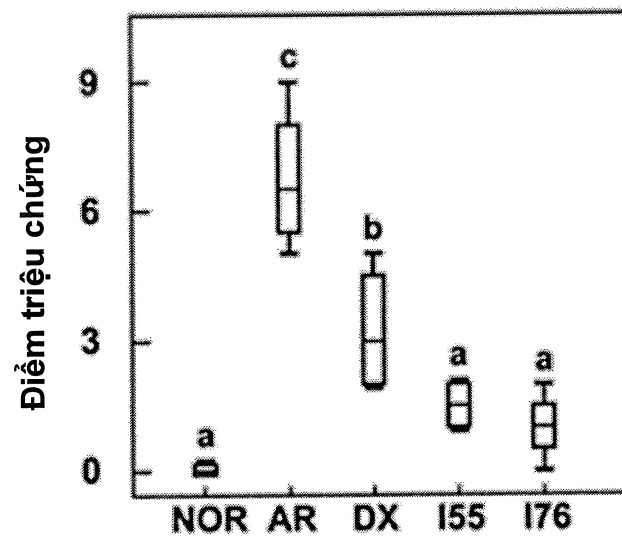


Fig.18

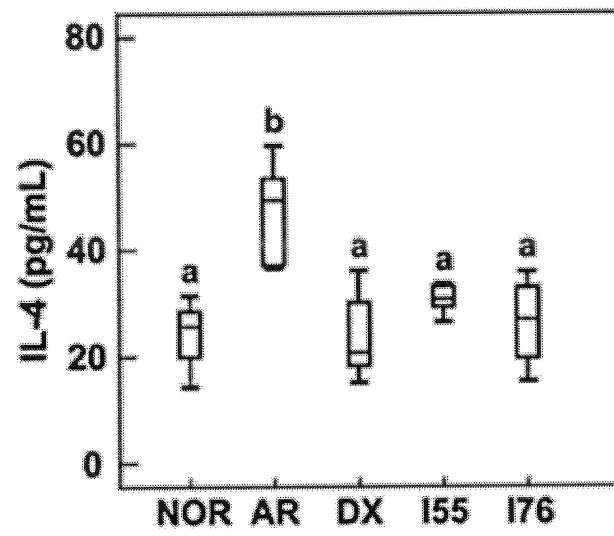


Fig.19

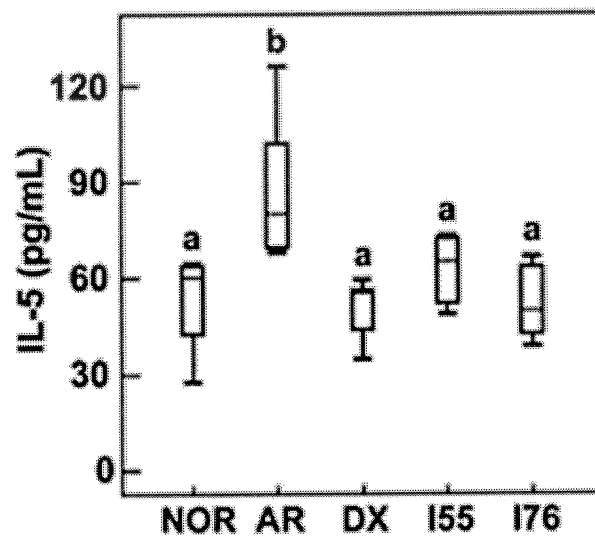


Fig.20

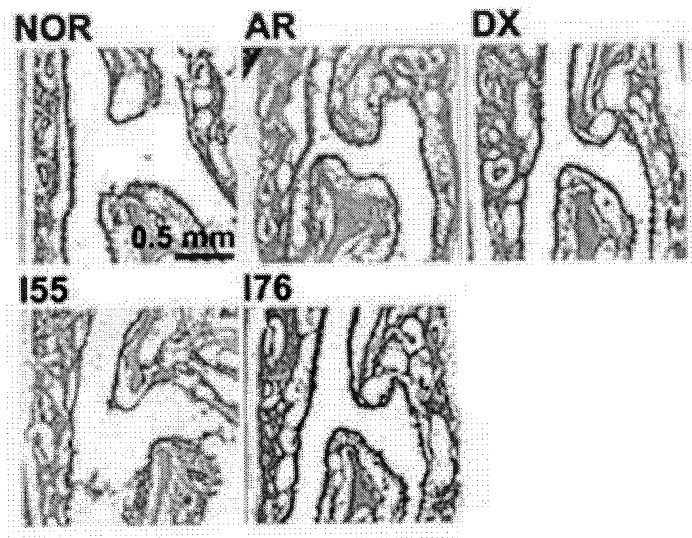


Fig.21

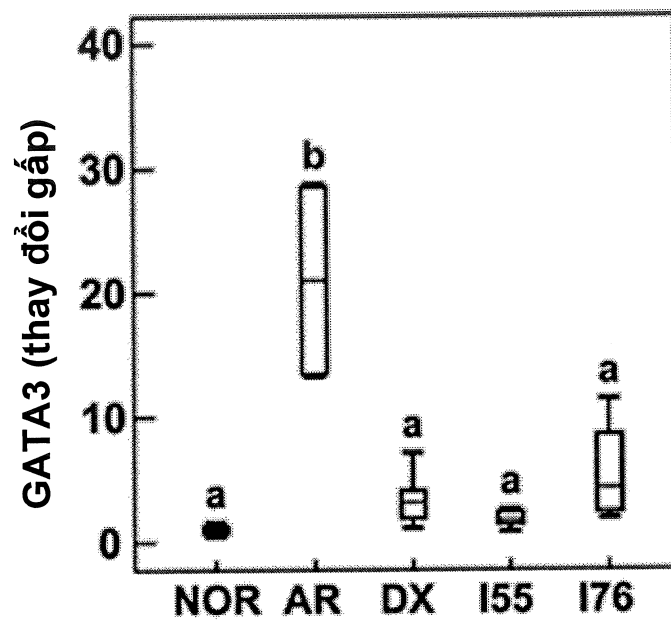


Fig.22

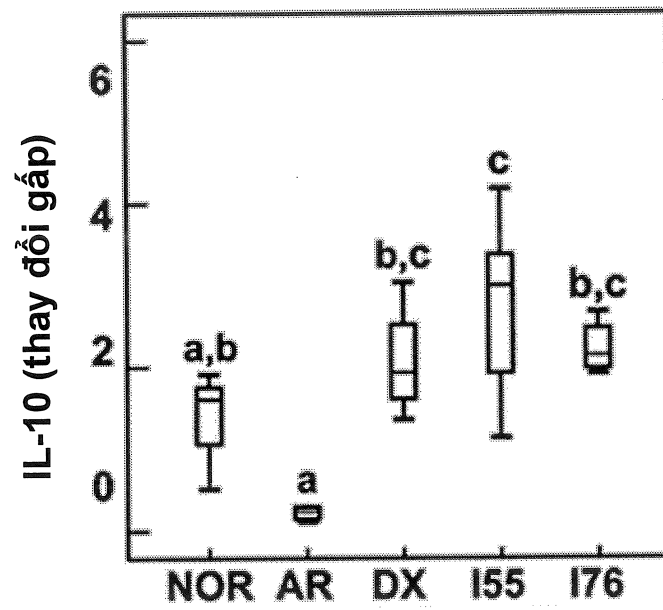


Fig.23

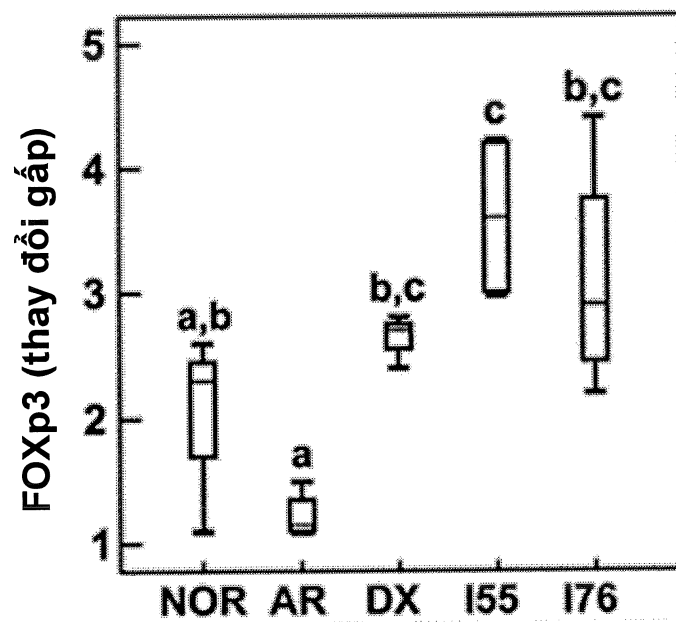


Fig.24

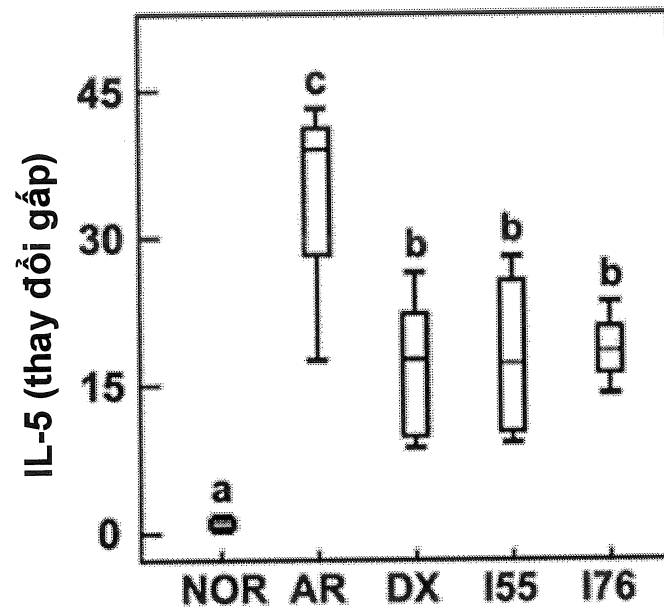


Fig.25

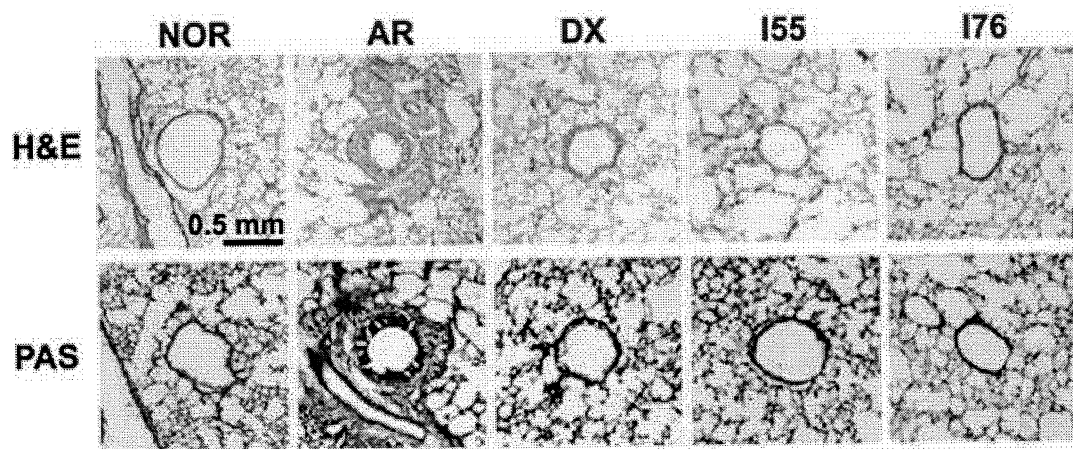


Fig.26

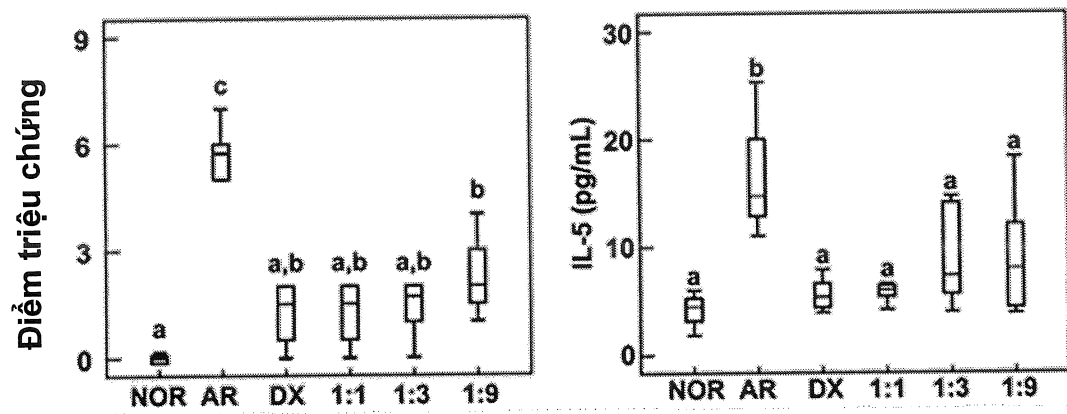


Fig.27

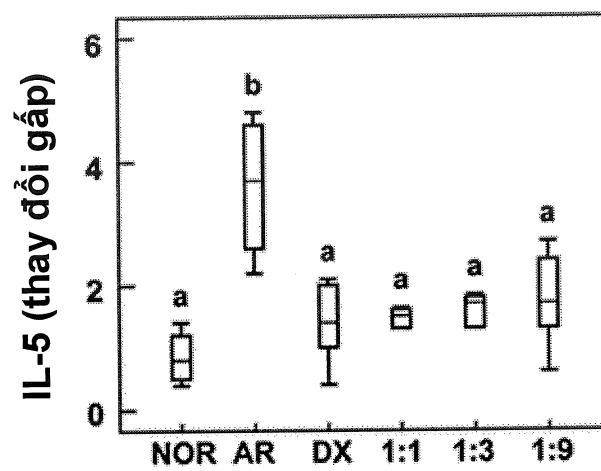


Fig.28

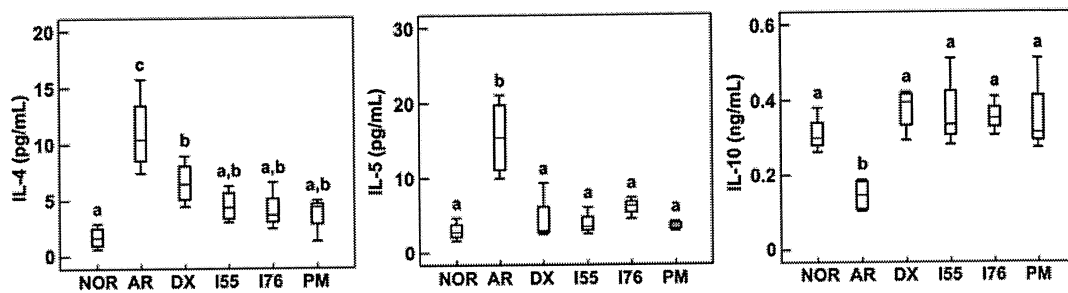


Fig.29

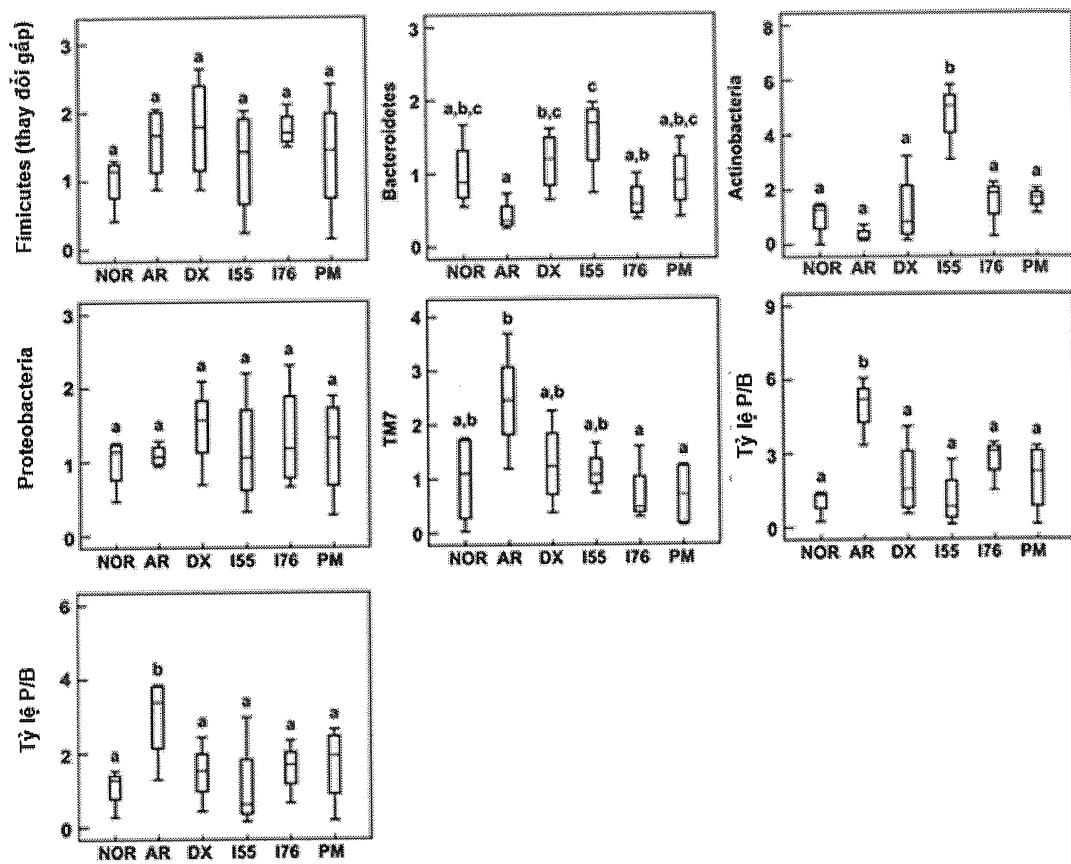


Fig.30

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG
HEE UNIVERSITY NAVIPHARM CO, LTD

<120> CHỦNG VI KHUẨN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IM76
KCCM11962P, DUỢC PHẨM VÀ THỰC PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY

<130> P17045-NVP

<150> KR 10-2017-0013632

<151> 2017-01-31

<160> 30

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Bifidobacterium longum* IM55

<400> 1

gacttgacgg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaaacgcat tcaccgcgac gttgctgatt	60
cgcgattact agcgactcgc ccttcacgca gtcgagttgc agactgcgat ccgaactgag	120
accggttttc agggatccgc tccgcgtcgc cgcgtcgcac cccgttgtac cggccattgt	180
agcatgcgtg aagccctgga cgtaaggggc atgatgatct gacgtcatcc ccaccttct	240

ccgagttaac cccggcggtc ccccgtagt tcccggcata atccgctggc aacacggggc 300
 gagggttgcg ctggttgcg gacttaacc aacatctcac gacacgagct gacgacgacc 360
 atgcaccacc tgtgaaccg ccccggaagg aagccgtatc tctacgaccg tcgggaacat 420
 gtcaagccca ggtaagggtc ttgcggtgc atcgaattaa tccgcatgct ccgccgcttg 480
 tgcgggcccc cgtcaatttc ttgagtttt agccttgccg ccgtactccc caggcgggat 540
 gcttaacgcg ttagctccga cacggaacc gtggaacggg ccccatcc agcatccacc 600
 gtttacggcg tggactacca gggatatctaa tctgttcgc tccccacgct ttcgtctc 660
 agcgtcagta acggcccaga gacctgcctt cgccattggt gttcttccg atatctacac 720
 attccaccgt tacaccggga attccagtct cccctaccgc actcaagccc gcccgtaacc 780
 ggcgcggatc caccgttaag cgatggactt tcacaccgga cgcgacgaac cgcctacgag 840
 ccctttacgc ccaataattc cggataacgc ttgcacccta cgtattaccg cggctgctgg 900
 cacgtagtta gccggtgctt attcaacggg taaactcact ctgcttgct ccccgataaa 960
 agaggtttac aaccggaagg cctccatccc tcacgcggcg tcgctgcac aggcttgcg 1020
 ccattgtgca atattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggccgta tctcagtccc 1080
 aatgtggccg gtcgccctct caggccggt acccgtcgaa gccacggtgg gccgttacc 1140
 cgccgtcaag ctgataggac gcgaccccat ccataccgc gaaagcttc ccagaagacc 1200
 atgcgatcaa ctggagcatc cggcattacc accggttcc aggagctatt ccggtgtatg 1260
 gggcaggtcg gtcacgcatt actcaccgt tcgccactct caccaccaag caaagccga 1320
 tggatcccgt tcgacttgca tgtgttaagc acgccgccag cgttcactct gagccat 1377

<210> 2

<211> 1421

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* IM76

<400> 2

ctggtattga ttggtgcttg catcatgatt tacatttgag tgagtggcga actggtgagt	60
aacacgtggg aaacctgccc agaagcgggg gataacacct ggaaacagat gctaataccg	120
cataacaact tggaccgcat ggtccgagct tgaaagatgg cttcggctat cacttttgga	180
tggtcccgcg gcgtattagc tagatggtgg ggtaacggct caccatggca atgatacgta	240
gccgacctga gagggtaatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg	300
aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag	360
tgaagaaggg ttccggctcg taaaactctg ttgttaaaga agaacatac tgagagtaac	420
tggtcaggta ttgacggat ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc	480
ggtaatacgt aggtggcaag cgtgtgccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg	540
gtttttaag tctgatgtga aagccttcgg ctcaaccgaa gaagtgcac ggaaactggg	600
aaacttgagt gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat	660
atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgt aactgacgct gaggctcgaa	720
agtatgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca taccgtaaac gatgaatgct	780
aagtgttgga gggttccgc cttcagtgc tgcagctaac gcattaagca ttccgcctgg	840
ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgac aagcggtgga	900

gcatgtggtt taattcgaag ctacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tactatgcaa 960
 atctaagaga ttagacgttc ccttcgggga catggataca ggtggtgcat ggtgtcgtc 1020
 agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt attatcagtt 1080
 gccagcatta agttgggcac tctggtgaga ctgccggtga caaacggag gaagggtggg 1140
 atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggatggt 1200
 acaacgagtt gcgaactcgc gagagtaagc taatctctta aagccattct cagttcggat 1260
 tgtaggctgc aactcgccta catgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1320
 gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccatgag agtttgaac 1380
 acccaaagtc ggtggggtaa ccttttagga accagccgcc t 1421

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> T-bet F mỗi

<400> 3

cctcttctat ccaaccagta tc 22

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> T-bet R mỗi

<400> 4

ctccgcttca taactgtgt

19

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FN-gamma F mỗi

<400> 5

tcaagtgga tagatgtgga agaa

24

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FN-gamma R mỗi

<400> 6

tggtctgca ggatttcat g

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GATA3 F môi

<400> 7

gaaggcatcc agaccgaaa c

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GATA3 R môi

<400> 8

acccatggcg gtgaccatgc

20

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-5 F môi

<400> 9

aaagagaagt gtggcgagga gagac

25

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-5 R môi

<400> 10

ccttcattg cccactctgt actcatc

27

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ROR gamma t F môi

<400> 11

acagccactg cattccagtt

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ROR gamma t R mỗi

<400> 12

tctcggaagg acttgcagac at

22

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-17 F mỗi

<400> 13

tttaactccc ttggcgcaaa a

21

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-17 R mỗi

<400> 14

ctttccctcc gcattgacac

20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FOXp3 F môi

<400> 15

cccatcccca ggagtctt

18

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FOXp3 R môi

<400> 16

accatgacta ggggcactgt a

21

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-10 F mỗi

<400> 17

atgctgcctg ctcttactga ctg

23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-10 R mỗi

<400> 18

cccaagtaac ccttaaagtc ctgc

24

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GAPDH F mỗi

<400> 19

tgcagtgga aagtggagat

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GAPDH R môi

<400> 20

ttgccgtga gtggagtcac

20

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Firmicutes F môi

<400> 21

ggagyatgtg gtttaattcg aagca

25

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Firmicutes R môi

<400> 22

agctgacgac aacctatgcac

20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bacteroidetes F môi

<400> 23

aacgcgaaaa accttaccta cc

22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bacteroidetes R môi

<400> 24

tgccctttcg tagcaactag tg

22

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Actinobacteria F môi

<400> 25

tgtacggtg gaatgcgc

18

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Actinobacteria R môi

<400> 26

aattaagcca catgctccgc t

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> delta/gamma-proteobacteria F môi

<400> 27

gctaacgcat taagtryccc g

21

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> delta/gamma-proteobacteria R môi

<400> 28

gccatgcr gc acctgtct

18

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TM7 F môi

<400> 29

gcaactcttt acgcccagt

19

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TM7 R mỗi

<400> 30

gagaggatga tcagccag

18