



(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)



1-0053195

(51)^{2020.01} A61K 8/99; A61Q 19/08; A61K 8/73

(13) B

(21) 1-2021-08509

(22) 05/06/2020

(86) PCT/IB2020/055326 05/06/2020

(87) WO2020/245797 10/12/2020

(30) 102019000008097 05/06/2019 IT

(45) 25/11/2025 452

(43) 27/06/2022 411A

(73) LAC2BIOME S.R.L. (IT)

Via Ceresio, 7 20154 Milano, Italy

(72) BIFFI, Andrea (IT).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG VI KHUẨN LACTOBACILLUS PARACASEI VÀ
AXIT HYALURONIC

(21) 1-2021-08509

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm các lợi khuẩn (các chủng vi khuẩn sống và có thể sống được hoặc được làm bất hoạt) và axit hyaluronic hoặc muối của nó dùng để phòng ngừa, điều trị (trị liệu hoặc dùng trong thẩm mỹ) hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng kết hợp với, hoặc do chứng lão hoá da gây ra hoặc sự mức giảm khả năng bảo vệ miễn dịch của da hoặc viêm/nhiễm da gây ra, như viêm da do tia cực tím gây ra.

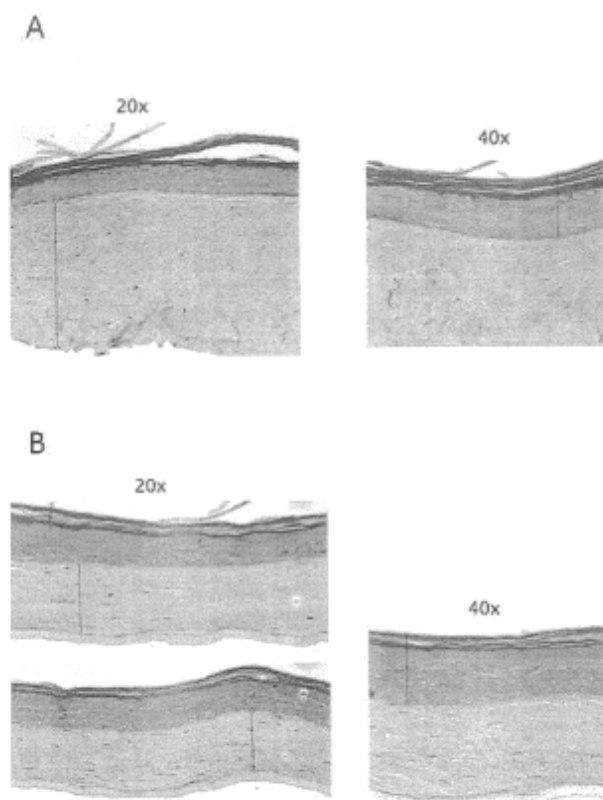


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm các lợi khuẩn (các chủng vi khuẩn sống và có thể sống được hoặc được làm bất hoạt) và axit hyaluronic hoặc muối của nó để sử dụng trong phòng ngừa, điều trị (trị liệu hoặc dùng trong thẩm mỹ) hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng kết hợp với, hoặc do chứng lão hoá da gây ra hoặc sự mức giảm khả năng bảo vệ miễn dịch của da hoặc viêm/nhiễm da gây ra, như viêm da do tia cực tím gây ra.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Da là lớp lót ngoài cùng của cơ thể người và nó tạo thành lớp lót bảo vệ thứ nhất của cơ thể chống lại sự xâm lấn bên ngoài, đã biết rằng da hoạt động dưới dạng hàng rào giải phẫu chống lại các mầm bệnh tiềm ẩn và các tác nhân gây hại có thể xảy ra. Các thay đổi của da có thể tạo thuận lợi cho việc khởi phát các bệnh về da, cụ thể là do mầm bệnh gây ra. Ví dụ, khi da lão hoá, da trở nên mỏng hơn và yếu hơn, điều này là do thực tế rằng sự tái tạo tế bào trở nên chậm hơn và thường là khoảng từ 3-4 tuần đến 4 tuần hoặc thậm chí 6 tuần. Da trải qua các thay đổi về cấu trúc theo thời gian, do một vài yếu tố có nguồn gốc khác nhau gây ra, mà xác định mức mất nước của da, gây ra các vi nếp nhăn, sự mất tính đàn hồi, tăng sừng hoá và hình thành các điểm tăng sắc tố.

Hơn nữa, hệ vi sinh vật phong phú tạo khuẩn lạc trên da người, thực hiện các chức năng quan trọng và hữu ích để chống lại sự bám dính và phát triển của các mầm bệnh trên da, như bằng cách ví dụ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, có thể phải đối mặt với sự mất cân bằng hoặc rối loạn hệ vi sinh vật do các yếu tố khác nhau.

Khi xảy ra rối loạn hệ vi sinh vật trên da, các lợi khuẩn có thể hoạt động dưới dạng tác nhân điều biến, khôi phục sự cân bằng ở mức cho phép của hệ vi sinh vật trên da. Trong thập kỷ qua, việc sử dụng các kỹ thuật mới đã tạo thuận lợi cho việc phân tích danh pháp hệ vi sinh vật trên da, mà quần thể vi khuẩn trên da có thể lên đến

khoảng 1010 loài vi sinh vật, thuộc nhiều hơn 25 *phyla*, mà trong số chúng được đại diện nhiều nhất là *Actinobacteria*, *Firmicutes*, và *Proteobacteria*. Các bệnh khác nhau về da có liên quan đến các thay đổi của hệ vi sinh vật trên da, ví dụ *P. acnes* được xem là vi khuẩn gây bệnh kết hợp với mụn trứng cá trên da. Do đó, việc duy trì tình trạng nội cân bằng của hệ vi sinh vật trên da hoặc khôi phục tính nội cân bằng này sau rối loạn hệ vi sinh vật là cơ sở để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh trên da, cụ thể là nhiễm trùng da hoặc viêm da, cụ thể hơn nữa là nhiễm trùng da hoặc viêm da do các tác nhân gây bệnh, như vi khuẩn hoặc virus cũng như do bức xạ da với tia cực tím (ultraviolet ray-UV) hoặc do da tiếp xúc với các điều kiện không thuận lợi.

Theo kỹ thuật cổ điển, các vấn đề này được giải quyết bằng việc sử dụng các tác nhân kháng vi khuẩn, nghĩa là sử dụng các chất tẩy rửa và thuốc kháng sinh dùng khu trú. Một mặt, mặc dù chắc chắn hữu hiệu, bên cạnh việc loại bỏ vi khuẩn có lợi, thuốc kháng sinh có nguy cơ gây mất cân bằng và các sự kiện bất lợi tiềm ẩn, cụ thể là với việc sử dụng kéo dài các thuốc kháng sinh phổ rộng.

Hơn nữa, cách tiếp cận thông thường để ngăn ngừa các vấn đề tổn thương hoặc lão hoá da do bức xạ da bằng tia cực tím là sử dụng kem hoặc các sản phẩm dùng cho da mà phản xạ hoặc hấp thụ tia cực tím, thường được gọi là tác nhân lọc ánh nắng mặt trời. Các hoạt chất cũng được gọi là tác nhân lọc ánh nắng mặt trời “hoá học” (salixylat, xinamat, *oxybenzon*, *octylcrylen* và các tác nhân khác), nhờ cấu trúc của chúng, có thể hấp thụ ánh sáng tia cực tím. Mặt khác, titan dioxit và kẽm oxit là các chất khoáng trơ với khả năng che phủ mạnh, mà về mặt vật lý phản xạ ánh nắng mặt trời và do đó các tác nhân này cũng được gọi là tác nhân sàng lọc vật lý.

Tuy nhiên, các tác nhân lọc ánh nắng mặt trời chỉ cho phép ngăn ngừa sự tương tác của tia cực tím với da, trong khi chúng không kích thích việc duy trì tính nội cân bằng của hệ vi sinh vật trên da, cũng như không khôi phục tính nội cân bằng này trong trường hợp bị rối loạn hệ vi sinh vật hoặc nhiễm trùng da hoặc viêm da do tia cực tím gây ra mà có thể không được che chắn hoàn toàn bởi các tác nhân lọc ánh nắng mặt trời.

Sau khi nghiên cứu chuyên sâu và hoạt động phát triển, các tác giả sáng chế đã giải quyết được và khắc phục được các vấn đề kỹ thuật nêu trên bằng cách tạo ra các chế phẩm sáng tạo (gọi tắt là (các) chế phẩm của sáng chế) chứa hỗn hợp (gọi tắt là

hỗn hợp của sáng chế) bao gồm hoặc theo cách khác, có chủng vi khuẩn sống và sống được hoặc được làm bất hoạt, thuộc các loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết dưới dạng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó (gọi tắt là HA).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm bao gồm lợi khuẩn và axit hyaluronic hoặc muối của nó để ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị chứng lão hoá da tự nhiên hoặc chứng lão hoá da do tiếp xúc với các yếu tố bên ngoài gây ra, như ví dụ tia cực tím (UV).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm bao gồm lợi khuẩn và axit hyaluronic hoặc muối của nó để ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng kết hợp với hoặc sự mức giảm khả năng bảo vệ miễn dịch của da gây ra.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm bao gồm lợi khuẩn và axit hyaluronic hoặc muối của nó để ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc do viêm/nhiễm da gây ra.

Theo mục đích của sáng chế, các lợi khuẩn đặc biệt hữu ích là vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*, tốt hơn là thuộc loài *Lactobacillus paracasei*, như chủng *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

Trên thực tế, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chế phẩm bao gồm các lợi khuẩn, tốt hơn là vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và axit hyaluronic có thể làm tăng khả năng bảo vệ miễn dịch bằng cách kích thích giải phóng các peptit kháng vi sinh vật và các chemokin của da, làm tăng quá trình phân hoá thông thường và thay thế tế bào biểu bì và tăng cường cấu trúc của lớp biểu bì.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng việc sử dụng chế phẩm bao gồm axit hyaluronic và lợi khuẩn, tốt hơn là là vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*, có khả năng thực hiện hoạt động chống viêm và ngăn ngừa hoạt hoá viêm do tia cực tím kích ứng hoặc gây ra.

Cụ thể, chế phẩm và hỗn hợp của sáng chế có khả năng:

- gây ra các cơ chế bảo vệ và/hoặc chữa lành vết thương của da, cụ thể là các cơ chế điều biến miễn dịch;
- phòng ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng viêm hoặc nhiễm trùng da, cụ thể là các tình trạng do bức xạ tia cực tím, cả UV-A và UV-B kích ứng;
- chống lại sự tăng sinh của mầm bệnh vi khuẩn đối với da;
- duy trì hoặc khôi phục tình trạng nội cân bằng của da và/hoặc mức cân bằng của hệ vi sinh vật trên da;
- kích thích, tạo thuận lợi, thúc đẩy và/hoặc làm tăng tốc quy trình chữa lành vết thương và/hoặc quy trình tái tạo biểu mô và/hoặc quy trình liền sẹo;
- chống lại và/hoặc làm chậm sự lão hoá da.

Hơn nữa, chế phẩm của sáng chế có khả năng kích ứng và/hoặc thúc đẩy hiệu quả tích cực cả trong ngắn hạn và dài hạn.

Ngoài ra, hỗn hợp và dược phẩm của sáng chế không có các tác dụng bất lợi đáng kể và chúng có thể được dùng cho tất cả các đối tượng, đặc biệt là cho các đối tượng là trẻ nhỏ và phụ nữ mang thai hoặc cho con bú.

Cuối cùng, hỗn hợp và/hoặc chế phẩm của sáng chế dễ bào chế và tiết kiệm chi phí.

Các mục đích này và các mục đích khác, mà sẽ trở nên rõ ràng khi đọc phần mô tả chi tiết sau đây, thu được bởi hỗn hợp và chế phẩm (chứa hỗn hợp này) của sáng chế nhờ các đặc tính kỹ thuật được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết và được minh hoạ dưới đây có dựa vào các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện hình ảnh có độ phóng đại 20x và 40x của các phần mô lần lượt được xử lý bằng dung dịch nước muối (A) và bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 (B), được đánh dấu bằng thuốc nhuộm tricrom Masson;

Fig.2 thể hiện hình ảnh có độ phóng đại 20x và 40x của các phần mô được đánh dấu bằng thuốc nhuộm tricrom Masson, lần lượt được xử lý bằng chế phẩm bao gồm axit hyaluronic (A) và bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 + axit hyaluronic (B);

Fig.3 thể hiện việc định lượng chuyển đoạn trong nhân của NFκB trong mô được phơi trần với bức xạ tia cực tím và được xử lý bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 (P1), bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 + axit hyaluronic (P2) và bằng chế phẩm bao gồm axit hyaluronic (P3);

Fig.4 thể hiện ảnh chụp có độ phóng đại 20x của các phần mô lần lượt được xử lý bằng dung dịch nước muối (A), bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 (B), bằng chế phẩm bao gồm axit hyaluronic (C) và bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 và axit hyaluronic (D), 4 giờ sau khi bức xạ tia cực tím, được đánh dấu bằng cách nhuộm haematoxylin-eozin;

Fig.5 thể hiện ảnh chụp có độ phóng đại 20x của các phần mô lần lượt được xử lý bằng dung dịch nước muối (A), bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 (B), bằng chế phẩm bao gồm axit hyaluronic (C) và bằng chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 và axit hyaluronic (D), sau 24 giờ bức xạ tia cực tím, được đánh dấu bằng cách nhuộm haematoxylin-eozin.

Các hình vẽ Fig.6a, Fig.6b, Fig.6c, Fig.6d: các hình ảnh thu được dưới kính hiển vi của phép phân tích mô học bằng cách nhuộm H&E trong mô hình nội cân bằng ở 24 giờ (Fig.6a: NC ở 24 giờ, Fig.6b: P3-i ở 24 giờ) và ở 48 giờ (Fig.6c: NC ở 48 giờ, Fig.6d: P3-i ở 48 giờ).

Fig.7: các kết quả biểu hiện gen (qRT-PCR) ở 24 giờ (RQ được tính toán bằng NC ở 24 giờ =1; $RQ < 0,5$ điều chỉnh giảm, $RQ > 2$ điều chỉnh tăng) trong mô hình nội cân bằng đối với các sản phẩm P1-i, P2-i, P3-i.

Fig.8: giao thức xử lý sơ bộ tương ứng với bức xạ tia cực tím trên mô “được cạo” bằng chế phẩm của sáng chế chứa chủng được làm bất hoạt.

Fig.9: giao thức sau xử lý tương ứng với bức xạ tia cực tím trên mô “được cạo” bằng chế phẩm của sáng chế chứa chủng bất hoạt.

Các hình vẽ Fig.10 và Fig.11 thể hiện mức giảm khả năng sống của mầm bệnh *C. acnes* DMS1897 được tính theo Log10 CFU trên phần da lông vào *in vitro* trong các điều kiện thử nghiệm: lần lượt là mô hình loại trừ và mô hình cạnh tranh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Theo sáng chế, thuật ngữ “da” được dùng để chỉ lớp lót bảo vệ thứ nhất đối với môi trường bên ngoài; cụ thể, việc bảo vệ được thực hiện thông qua sự hoạt động của tế bào biểu mô sừng được phân tán trong lớp da bên ngoài (biểu bì) mà ở đó chúng có thể gây tiết xytokin và chemokin để truyền thông tin cảnh báo đến các lớp da sâu hơn, tạo ra đáp ứng viêm.

Theo sáng chế, thuật ngữ “lão hoá da” được dùng để chỉ quy trình tiến hoá không thuận nghịch; nó được biểu hiện trong nhóm các thay đổi sinh lý mà xác định mức mất nước của da, về bên ngoài của các vi nếp nhăn, mức mất tính đàn hồi, tăng sừng hoá và hình thành các điểm tăng sắc tố, được gọi là “tàn nhang do tuổi già”.

Theo sáng chế, thuật ngữ “lợi khuẩn” được dùng để chỉ theo định nghĩa do FAO và WHO đưa ra: “*vi sinh vật sống mà khi được dùng với lượng thích hợp tạo ra lợi ích sức khỏe cho vật chủ*”. Nói cách khác, lợi khuẩn là các vi sinh vật (chủng vi khuẩn) mà chúng tỏ bản thân có khả năng, một khi được dùng với lượng thích hợp, tạo ra các chức năng có lợi cho sinh vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ “axit hyaluronic” được dùng để chỉ glycosaminoglycan có các đơn vị lặp lại của glucosamin và axit glucuronic, được liên kết với nhau, theo cách khác, bằng các liên kết glycosidic $\beta 1 \rightarrow 4$ và $\beta 1 \rightarrow 3$, cũng như bằng các liên kết hydro nội phân tử, mà làm ổn định các cấu hình của chúng.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm (gọi tắt là chế phẩm của sáng chế hoặc chế phẩm) chứa (I) hỗn hợp M chứa, hoặc theo cách khác, chỉ chứa chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết và được lưu trữ dưới dạng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (dẫn xuất sống và sống được hoặc được làm bất hoạt của nó) và axit hyaluronic hoặc muối của nó; và (II) ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dùng hoặc loại dùng trong mỹ phẩm hoặc thực phẩm.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế, bao gồm hoặc theo cách khác, có chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết và được lưu trữ dưới dạng chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó (theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả), để sử dụng làm thuốc.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm (chế phẩm của sáng chế) chứa lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống được, được làm bất

hoạt hoặc dẫn xuất của nó), tốt hơn là là vi khuẩn lợi khuẩn và axit hyaluronic hoặc muối của nó để sử dụng trong việc điều trị (chữa bệnh hoặc mỹ phẩm), để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc do lão hoá da gây ra (lão hoá do yếu tố nội tại hoặc lão hoá do yếu tố bên ngoài, như được xác định dưới đây).

Các dấu hiệu hoặc triệu chứng lão hoá da có liên quan đến một loạt các cải biến mà thường dẫn đến việc mỏng và/hoặc tạo ra cấu trúc da.

Tốt hơn, nếu lão hoá là do yếu tố nội tại hoặc theo thời gian, lão hoá mà về cơ bản phụ thuộc vào các yếu tố di truyền (hoặc nội tại). Về nguyên tắc, lão hoá do yếu tố nội tại thường bắt đầu sau 25 tuổi. Tốt hơn, nếu dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc do lão hoá da do yếu tố nội tại gây ra được chọn từ: nếp nhăn, yếu da, mất hoặc giảm tính nguyên vẹn của da, thiếu tính đàn hồi của da, thiếu màu da, da mỏng, tróc da và mất nước ở da, hình thành các đốm đen hoặc tăng sắc tố da, cũng được gọi là “đốm do tuổi tác”.

Do đó, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế cho mục đích thẩm mỹ, bao gồm hoặc theo cách khác, có chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết và được lưu trữ dưới dạng chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó và, tùy ý, cơ chất thứ nhất và/hoặc cơ chất thứ hai (theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả), để duy trì tính nội cân bằng của da và/hoặc làm tác nhân chống lão hoá da, ví dụ để điều trị nếp nhăn cho mục đích thẩm mỹ, sự mất tính đàn hồi của da (bệnh sợi đàn hồi do ánh nắng mặt trời), da khô hoặc da mất nước, da thô ráp, lão hoá do ánh sáng, đỏ da, sự xuất hiện của các mao mạch co giãn trên má, mũi và/hoặc tai, đốm đen do ánh nắng mặt trời, tạo sắc tố khác thường hoặc không đồng đều hoặc tăng sắc tố da hoặc làm cho da sáng hơn và tự nhiên hơn.

Theo cách khác, lão hoá da do yếu tố bên ngoài, nghĩa là do các yếu tố môi trường bên ngoài (yếu tố bên ngoài) gây ra. Ví dụ, lão hoá da do yếu tố bên ngoài do sự xâm lấn của các tác nhân bên ngoài và/hoặc các yếu tố bên ngoài như bức xạ tia cực tím (gây ra lão hoá do ánh sáng), khói thuốc lá, lạm dụng bia rượu, ô nhiễm, tiếp xúc liên tục với chất kích thích, thời tiết lạnh, gió và tổ hợp của chúng. Lão hoá do ánh

sáng là vấn đề quan tâm đặc biệt vì nó liên quan đến các bệnh khác nhau hoặc tổn thương da mà cũng có thể dẫn đến các bệnh trầm trọng, như khối u da.

Tốt hơn, nếu dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc do lão hoá da do yếu tố bên ngoài gây ra được chọn từ: ban đỏ, sắc tố hoá do ánh nắng mặt trời hoặc đốm đen do ánh nắng mặt trời, dày sừng, cụ thể là tăng dày sừng, đỏ da, cháy nắng, bỏng, lão hoá do ánh nắng mặt trời, bệnh sởi đàn hồi do ánh nắng mặt trời, đục vò thủy tinh thể, mộng thịt, phản ứng của bệnh hecpet môi, tổn thương da có bản chất bất kỳ (loét, vết thương hoặc vết thâm tím), cụ thể là tổn thương môi và/hoặc mô tiếp hợp, khối u ác tính da, ung thư biểu mô vảy da, ung thư biểu mô tế bào gốc (ung thư tế bào đáy), ung thư biểu mô tế bào vảy hoặc ung thư biểu mô màng kết.

Lão hoá da có liên quan đến sự thay đổi về cấu trúc của da, mà chắc chắn dẫn đến tăng khả năng mắc các bệnh viêm và/hoặc nhiễm trùng.

Theo một phương án, chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế chứa lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống và sống được hoặc được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó) và axit hyaluronic hoặc muối của nó được sử dụng để điều trị (phương pháp trị liệu), để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc do việc giảm hệ thống miễn dịch của da gây ra hoặc các bệnh viêm và/hoặc nhiễm trùng da. Nói cách khác, chế phẩm được sử dụng để làm tăng khả năng bảo vệ miễn dịch của da.

Ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến hoặc sự mức giảm khả năng bảo vệ miễn dịch của da hoặc do các tình trạng viêm da gây ra được chọn từ: chứng viêm da, cụ thể là có liên quan đến sự kích thích hoặc trầy da, mụn trứng cá, viêm da cấp tính hoặc mạn tính (ví dụ trứng cá đỏ hoặc mũi đỏ), nhiễm trùng da, viêm da, ban đỏ, loét, bệnh vẩy nến, viêm da dị ứng, viêm tai, nứt nẻ, ống dò và bệnh trĩ.

Các tình trạng hoặc bệnh về da có thể liên quan đến, hoặc do mầm bệnh gây ra. Trong trường hợp này, các mầm bệnh có thể là vi khuẩn, nấm, nấm men, virus và tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế chứa lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống được hoặc được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó) và axit hyaluronic hoặc muối của nó được sử dụng để điều trị (phương pháp trị liệu), để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có

liên quan đến hoặc do viêm/nhiễm da gây ra, ví dụ có liên quan đến hoặc do mầm bệnh gây ra.

Tốt hơn, nếu mầm bệnh là vi khuẩn, tốt hơn là vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium*, tốt hơn là thuộc loài *acnes* (*Propionibacterium acnes* hoặc *Cutibacterium acnes*, viết tắt là *C. acnes*); *Staphylococcus*, tốt hơn là thuộc các loài *epidermidis*, *aureus*, *warneri*, *pyogenes*, *mitis*; *Corynebacterium ssp*; *Pseudomonas*, tốt hơn là thuộc các loài *aeruginosa*; *Acinetobacter*, tốt hơn là thuộc các loài *johnsonii*; *Streptococcus*, tốt hơn là thuộc các loài *pyogenes*; *Micrococcus ssp.*, *Brevibacterium ssp.*

Dữ liệu thử nghiệm được các tác giả sáng chế báo cáo cho biết rằng chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế chứa axit hyaluronic và lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống và sống được hoặc được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó) có khả năng tạo ra tác dụng chống viêm và/hoặc điều biến miễn dịch ở mức độ tế bào biểu mô sừng và do đó có khả năng tạo ra tác dụng chống viêm và/hoặc điều biến miễn dịch cho da.

Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, việc sử dụng chế phẩm là do khả năng chống viêm, điều biến miễn dịch, tái tạo tế bào biểu bì, phân hoá biểu bì và tăng cường cấu trúc da nhờ lợi khuẩn và nhờ axit hyaluronic có trong chế phẩm.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã cho biết rằng khi da tiếp xúc với chế phẩm bao gồm axit hyaluronic và lợi khuẩn, nó có khả năng làm tăng quy trình phân hoá biểu bì, cụ thể là lớp sừng trở nên dày hơn. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã quan sát được rằng sợi collagen dày đặc hơn và nhỏ gọn hơn.

Hơn nữa, chế phẩm của sáng chế chứa lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống được hoặc được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó) và axit hyaluronic hoặc muối của nó có khả năng tạo ra tác dụng điều biến miễn dịch (hoặc kích thích miễn dịch) của hệ miễn dịch của da, là bằng chứng thu được từ việc đánh giá sự biểu hiện của gen mã hoá đối với chemokin và defensin. Cụ thể, việc gia tăng mức biểu hiện của defensin $\beta 2$ đã được quan sát cả bởi lợi khuẩn và bởi chế phẩm của sáng chế chứa axit hyaluronic và lợi khuẩn.

Theo phương án của sáng chế, tốt hơn là các lợi khuẩn (có mặt trong chế phẩm của sáng chế cùng với axit hyaluronic hoặc muối của nó) được chọn từ: vi khuẩn, nấm,

nấm men và tổ hợp của chúng; tốt hơn là là vi khuẩn, tốt hơn nữa nếu là chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* và được nhận biết dưới dạng *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (sống, được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó).

Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc ít nhất một chi được chọn từ: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* và *Enterococcus*.

Tốt hơn nữa, nếu vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranoferiens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* và tổ hợp của chúng.

Tốt hơn nữa, nếu lactobacilli thuộc loài *Lactobacillus paracasei*, tốt hơn là là chủng *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 và/hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760.

Cả hai chủng này được phân lập và được lưu trữ bởi SOFAR S.p.A.; cụ thể, chủng vi khuẩn *L. casei* DG[®] (nhãn hiệu hàng hoá đã được đăng ký bởi Sofar, Italy) được lưu trữ bởi SOFAR S.p.A. vào ngày 5 tháng 5 năm 1995 ở Bộ sưu tập quốc gia về nuôi cấy vi sinh vật của viện Pasteur ở Paris dưới số lưu trữ CNCM I-1572. Ban đầu, chủng này có tên *Lactobacillus casei* DG sub. casei (được phân loại lại thành *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572).

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 được lưu trữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen dưới số truy cập DSM 26760 vào

ngày 15 tháng 05 năm 2017 bởi SOFAR S.p.A. (ngày nộp đơn chuyển đổi lưu trữ theo hiệp ước Budapest; ngày lưu trữ ban đầu: ngày 11 tháng 01 năm 2013).

Các chủng *Lactobacillus paracasei* được phân loại lại thành *Lacticaseibacillus paracasei*.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm bao gồm *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 và axit hyaluronic hoặc muối của nó.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Bifidobacterium* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* e *B. tsurumiense*; tốt hơn nữa nếu được chọn từ: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* e *Bacillus marinus*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* và *P. thoenii*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Streptococcus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*,

Streptococcus vestibularis, *Streptococcus viridans* và *Streptococcus zooepidemicus*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Lactococcus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* và *L. taiwanensis*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Aerococcus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaequi* và *A. urinaehominis*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, vi khuẩn thuộc chi *Enterococcus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* và *Enterococcus solitarius*.

Theo khía cạnh khác được ưu tiên của sáng chế, nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, tốt hơn nữa nếu thuộc các loài *Saccharomyces cerevisiae* và/hoặc *Saccharomyces boulardii*.

Trong hỗn hợp hoặc chế phẩm của sáng chế, lợi khuẩn, tốt hơn là là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, được sử dụng (cùng với axit hyaluronic hoặc muối của nó) sống, tức là chúng được sử dụng làm lợi khuẩn.

Theo cách khác, các lợi khuẩn này, tốt hơn là là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572, và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 chết và/hoặc được làm bất hoạt và/hoặc được thanh trùng nhiệt theo phương pháp Tyndall.

Ví dụ, chủng vi khuẩn sống được (lợi khuẩn) của sáng chế (ví dụ *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) có thể được làm bất hoạt bằng cách gia nhiệt hoặc bất hoạt bằng phương pháp tyndall hoặc chiếu xạ gama hoặc siêu âm. Việc bất hoạt bằng cách gia nhiệt hoặc bằng phương pháp tyndall có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 120°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 65°C đến 105°C, tốt hơn nữa nếu từ 75°C đến 95°C, ví dụ khoảng 85°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 30

phút đến 120 phút, tốt hơn là từ 45 phút đến 85, ví dụ khoảng 60 phút; hoặc, theo cách khác bằng phương pháp tyndall. Việc gia nhiệt hoặc phương pháp tyndall hoặc chiếu xạ gama hoặc quy trình siêu âm được thực hiện theo các kỹ thuật, quy trình và thiết bị đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vi khuẩn được đưa vào quy trình bất hoạt bằng cách gia nhiệt hoặc bằng phương pháp tyndall là bị chết (điều khiển bằng phương tiện đếm trên đĩa và/hoặc phân tích huỳnh quang tế bào) trong khi vách tế bào vẫn nguyên vẹn, tốt hơn là ở a % vi khuẩn nằm trong khoảng từ 70% đến 99,5%, tốt hơn là từ 80% đến 95%, tính theo tổng số lượng vi khuẩn được đưa vào quy trình gia nhiệt hoặc kỹ thuật bất hoạt theo phương pháp tyndall.

Theo phương án khác, lợi khuẩn, tốt hơn là là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, được sử dụng (cùng với axit hyaluronic hoặc muối của nó) ở dạng dịch tan và/hoặc phân chiết, tức là, chúng được sử dụng làm tiền lợi khuẩn.

Theo cách khác, lợi khuẩn, tốt hơn là là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, được sử dụng (cùng với axit hyaluronic hoặc muối của nó) ở dạng sản phẩm vi khuẩn được chọn từ: dịch nổi, chất chuyển hoá, sản phẩm sinh học chuyển hoá, sau lợi khuẩn, vách tế bào và các thành phần của chúng, exopolysacarit, ribosom và glycoprotein, glucan và các polysacarit khác, lipopolysacarit và thành phần bất kỳ của dịch nổi.

Nói tóm lại, theo sáng chế, cách biểu diễn “(các) dẫn xuất” của chủng vi khuẩn hoặc của chủng vi khuẩn sống được hoặc lợi khuẩn (ví dụ *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) tiền lợi khuẩn nêu trên (dịch tan hoặc phân chiết) hoặc dẫn xuất bất kỳ và/hoặc thành phần của chủng vi khuẩn (dịch nổi, chất chuyển hoá, sản phẩm sinh học chuyển hoá, sau lợi khuẩn, vách tế bào và các thành phần của chúng, exopolysacarit, ribosom và glycoprotein, glucan và các polysacarit khác, lipopolysacarit hoặc thành phần bất kỳ của dịch nổi) mà, nếu được dùng (qua đường miệng hoặc dùng khu trú) với lượng thích hợp, tạo ra lợi ích cho người tiêu thụ hoặc động vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ “lợi khuẩn”, trừ khi có quy định khác, cho biết và bao gồm các chủng vi khuẩn (ví dụ *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760), sống và được

làm bất hoạt và dẫn xuất của chủng vi khuẩn, như được xác định trên đây.

Nói chung, các lợi khuẩn là các vi sinh vật đơn lẻ hoặc tổ hợp của các vi sinh vật hoặc mạng lưới, của các loài vi sinh vật bất kỳ được liệt kê trong danh mục QPS của EFSA.

Tốt hơn, nếu chế phẩm như được mô tả trên đây bao gồm tổ hợp của các chủng được nêu trên đây với các vi sinh vật khác như được mô tả trên đây, tốt hơn là được chọn từ: vi khuẩn, nấm, nấm men và tổ hợp của chúng.

Tốt hơn, nếu lợi khuẩn là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, có mặt trong chế phẩm (cùng với axit hyaluronic hoặc muối của nó) với lượng tối thiểu đủ để cho phép tạo khuẩn lạc tạm thời trên da, ruột và/hoặc các vùng khác của sinh vật. Tốt hơn, nếu lượng này thay đổi với nồng độ nằm trong khoảng từ 1×10^6 CFU đến 1×10^{12} CFU, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{12} đơn vị vi sinh vật, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10^9 đến 10^{11} đơn vị vi sinh vật, ví dụ khoảng 1×10^9 đơn vị tạo khuẩn lạc (*Colony Forming Unit*-CFU) hoặc lớn hơn, so với mức dùng hàng ngày (hoặc liều đơn) chế phẩm của sáng chế.

Lợi khuẩn của sáng chế, tốt hơn là là chủng vi khuẩn *L. casei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, tốt hơn là được dùng với lượng thay đổi nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{12} đơn vị vi sinh vật, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10^9 đến 10^{11} đơn vị vi sinh vật, đối với mỗi lần dùng.

Theo khía cạnh được ưu tiên, việc dùng lợi khuẩn, tốt hơn là là vi khuẩn, được thực hiện ít nhất 1-2 lần một ngày.

Như được mô tả trên đây, chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó và tổ hợp của chúng. Axit hyaluronic hoặc muối của nó (viết tắt là HA), có mặt trong chế phẩm của sáng chế cùng với chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và, tùy ý, ít nhất một cơ chất thứ nhất hoặc thứ hai khác (theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả), tốt hơn là có trọng lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 10 kDa (kiloDalton=1.000,00 Dalton hoặc 10^3 Dalton) đến 3.000 kDa, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 800 kDa đến 2,500 kDa, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1.000 kDa đến 2.000 kDa, ví dụ khoảng 1.300 kDa,

1.400 kDa, 1.500 kDa, 1.600 kDa, 1.700 kDa, 1.800 kDa. Theo một phương án, muối của axit hyaluronic (ví dụ, hyaluronat của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ) được chọn từ: natri hyaluronat, kali hyaluronat, amoni hyaluronat, canxi hyaluronat, magie hyaluronat, kẽm hyaluronat, coban hyaluronat và tổ hợp của chúng.

Hơn nữa, theo sáng chế, thuật ngữ “axit hyaluronic hoặc muối của nó” hoặc “HA” hoặc đơn giản là “axit hyaluronic” được dùng để chỉ axit hyaluronic như và axit hyaluronic được thuỷ phân (ví dụ thu được bằng cách lên men), cũng như muối của axit hyaluronic (hyaluronat) như được mô tả trên đây.

Khi axit hyaluronic của sáng chế là axit hyaluronic được thuỷ phân về mặt công nghệ sinh học bằng cách lên men, nó có thể có trọng lượng phân tử trung bình khoảng 10 kDa. Khi axit hyaluronic của sáng chế là natri hyaluronat (ví dụ CAS N° 9067-32-7, Mw-trọng lượng phân tử 1.000-1.400 kDa hoặc Mw 1.000-1.700 kDa) hoặc kali hyaluronat, nó có thể có trọng lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1.000 kDa đến 2.000 kDa.

Bên cạnh *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 và HA, tốt hơn là chế phẩm của sáng chế còn chứa các tá dược được dụng và/hoặc các cơ chất khác (ví dụ, cơ chất thứ nhất hoặc cơ chất thứ hai như được mô tả dưới đây) và/hoặc chất mang.

Bên cạnh *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 và HA và, tùy ý, cơ chất thứ hai (được xác định dưới đây), tốt hơn là chế phẩm của sáng chế còn bao gồm cơ chất thứ nhất được chọn từ: huyết tương, PRP, tác nhân sẹo hoá, tác nhân tái tạo biểu mô, chất tạo ẩm, tác nhân hydrat hoá, tác nhân làm mềm, tác nhân hấp phụ, tác nhân làm giảm đau, tác nhân giữ ẩm và tái tạo mô, tác nhân chống viêm, thuốc giãn cơ, thuốc kháng sinh, tác nhân kháng vi khuẩn, tác nhân chống nấm, tác nhân chống virus, thuốc diệt sinh vật gây hại, peptit và/hoặc tác nhân protein và/hoặc protein, như collagen, các tác nhân thuộc mô liên kết như glycosaminoglycan, tốt hơn là là chondroitin sulphat, và/hoặc tổ hợp của chúng.

Theo phương án của sáng chế, chế phẩm được bào chế (ví dụ ở dạng rắn, bán rắn hoặc dạng lỏng) để dùng khu trú hoặc dùng khu trú cho da, tốt hơn là ở dạng kem, gel, dầu, nhũ tương (hoặc bột), dung dịch, thể phân tán (dạng rắn-lỏng hoặc dạng lỏng-lỏng), huyền phù, hỗn hợp hai pha, thuốc xịt (chất lỏng dùng để xịt), gạc, băng dán,

băng cuộn, thuốc xúc ngoài da, bột, mặt nạ (mặt nạ áp dụng được cho da), thuốc mỡ hoặc bột nhão.

Theo phương án của sáng chế, chế phẩm được bào chế để dùng qua đường miệng, tốt hơn là ở dạng viên nén, viên nang, dạng thanh, bột hạt, dạng hình bầu dục, hạt hoà tan được trong miệng, gói hoặc viên thuốc, huyền phù (ví dụ lọ nhỏ có thể uống được) hoặc dung dịch (một pha hoặc hai pha).

Theo cách khác, chế phẩm được bào chế theo cách tùy ý bằng cách trộn chế phẩm với nước.

Theo cách khác, chế phẩm được bào chế theo cách tùy ý bằng cách trộn cùng với hai thành phần, lợi khuẩn (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760) và axit hyaluronic hoặc muối của nó, ví dụ để tạo ra mặt nạ sẽ được áp dụng cho da hoặc huyền phù để dùng qua đường miệng (lọ nhỏ có thể uống). Cụ thể, thiết bị để bào chế tùy ý chế phẩm của sáng chế có thể bao gồm lọ nhỏ chứa dung dịch trong nước chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó và phần ở một đầu chai (ví dụ để bịt kín lọ nhỏ, như nắp) bao gồm chủng vi khuẩn (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, sống được hoặc được làm bất hoạt hoặc dẫn xuất của nó) trong đó ở dạng bột rắn, hạt hoặc viên nén; việc bào chế tùy ý chế phẩm của sáng chế xảy ra bằng cách giải phóng (ví dụ bằng cách ép) chủng vi khuẩn ở dạng rắn từ phần ở đầu lọ nhỏ vào dung dịch chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó có trong lọ nhỏ.

Theo phương án được ưu tiên, bên cạnh *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 và HA và, tùy ý, cơ chất thứ nhất, chế phẩm của sáng chế còn chứa các cơ chất khác (cơ chất thứ hai) được chọn từ: axit amin, chất bổ sung, vitamin, các nguyên tố vi lượng như kẽm và selen, chất dinh dưỡng đa lượng và vi chất dinh dưỡng, enzym và/hoặc các cơ chất lợi khuẩn như fructooligosaccharit (fructooligosaccharide-FOS), galactooligosaccharit (galacto-oligosaccharide-GOS), xylo-oligosaccharit (xylo-oligosaccharit-XOS), inulin, gồm guar hoặc tổ hợp của chúng.

Chế phẩm của sáng chế, chứa *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, HA và, tùy ý, cơ chất thứ nhất hoặc cơ chất thứ hai, còn chứa (II) ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dùng hoặc loại dùng trong thực phẩm hoặc loại dùng trong mỹ phẩm, mà là cơ chất không có hoạt tính điều trị thích hợp để sử dụng trong dược phẩm hoặc thực phẩm. Theo sáng chế, các chất phụ gia và/hoặc tá dược chấp nhận được để dùng trong

được phẩm hoặc thực phẩm hoặc mỹ phẩm bao gồm tất cả các cơ chất phụ trợ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để bào chế chế phẩm ở dạng rắn, bán rắn hoặc lỏng như, ví dụ, chất pha loãng, dung môi (bao gồm nước, glyxerin, rượu etylic), chất hoà tan, tác nhân axit hoá, chất độn, chất tạo ngọt, chất tăng cường hương vị, chất tạo màu, chất bôi trơn, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, dung dịch đệm ổn định độ pH và hỗn hợp của chúng.

Chế phẩm của sáng chế, chứa chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó và, tùy ý, cơ chất thứ nhất và/hoặc cơ chất thứ hai, có thể là được phẩm (hoặc sản phẩm điều trị sinh học sống), chế phẩm dùng thiết bị y tế, chất bổ sung ăn kiêng, thức ăn, thực phẩm mới, các sản phẩm lợi khuẩn, chế phẩm đối với thực phẩm cho mục đích y tế đặc biệt (food for special medical purpose-FSMP), hoặc chế phẩm thẩm mỹ.

Các phương án (FRn) của sáng chế sẽ được mô tả dưới đây:

FR1. Chế phẩm bao gồm lợi khuẩn và axit hyaluronic hoặc muối của nó để sử dụng trong điều trị, ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến/do lão hoá da gây ra hoặc điều trị, ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến/do mức giảm về hệ thống miễn dịch của da gây ra.

FR2. Chế phẩm để sử dụng theo phương án FR1, trong đó lão hoá da được chọn từ lão hoá da do yếu tố nội tại và lão hoá da do yếu tố bên ngoài.

FR3. Chế phẩm theo phương án FR2, trong đó ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến/lão hoá da do yếu tố nội tại gây ra được chọn từ: nếp nhăn, yếu da, mất hoặc giảm tính nguyên vẹn của da, thiếu tính đàn hồi của da, thiếu màu da, da mỏng, tróc da và mất nước của da.

FR4. Chế phẩm để sử dụng theo phương án FR2, trong đó ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến/lão hoá da do yếu tố bên ngoài gây ra được chọn từ: ban đỏ, nhiễm sắc tố, sùng hoá, cụ thể là tăng sùng hoá, đỏ da, bong, đục vỏ thuỷ tinh thể, mộng thịt, phản ứng của bệnh hecpet môi, tổn thương da có bản chất bất kỳ, cụ thể là tổn thương môi và/hoặc mô tiếp hợp, khối u ác tính da, ung thư biểu mô vảy da, ung thư biểu mô tế bào gốc (ung thư tế bào đáy), ung thư biểu mô tế bào vảy hoặc ung thư biểu mô màng kết.

FR5. Chế phẩm để sử dụng theo phương án FR1, trong đó ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng có liên quan đến/giảm hệ thống miễn dịch của da gây ra được chọn từ: viêm da, cụ thể là có liên quan đến kích thích hoặc trầy da, mụn trứng cá, nhiễm trùng, viêm da, ban đỏ, loét, bệnh vẩy nến, viêm da dị ứng, viêm tai, nứt nẻ, ống dò và bệnh trĩ.

FR6. Chế phẩm để sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ FR1 đến FR-5, trong đó tốt hơn là lợi khuẩn được chọn từ: vi khuẩn, nấm, nấm men và tổ hợp của chúng, tốt hơn là chúng là vi khuẩn thuộc ít nhất một chi được chọn từ: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* và *Enterococcus*.

FR7. Chế phẩm để sử dụng theo phương án FR6, trong đó vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* thuộc ít nhất một loài trong số các loài được chọn từ: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* và tổ hợp của chúng.

FR8. Chế phẩm để sử dụng theo phương án FR6 hoặc FR7, trong đó vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei*, tốt hơn là là chủng *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 và/hoặc chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FR9. Chế phẩm để sử dụng theo FR bất kỳ trong số các FR nêu trên, trong đó muối của axit hyaluronic được chọn từ: natri hyaluronat, kali hyaluronat, amoni hyaluronat, canxi hyaluronat, magie hyaluronat, kẽm hyaluronat, coban hyaluronat và tổ hợp của chúng.

FR10. Chế phẩm để sử dụng theo FR bất kỳ trong số các FR nêu trên, trong đó lợi

khuẩn là sống và/hoặc chết và/hoặc được làm bất hoạt và/hoặc được thanh trùng nhiệt theo phương pháp Tyndall và/hoặc ở dạng dịch tan và/hoặc phần chiết và/hoặc ở dạng sản phẩm vi khuẩn được chọn từ: dịch nổi, chất chuyển hoá, sản phẩm sinh học chuyển hoá, sau lợi khuẩn, vách tế bào và các thành phần của nó, exopolysacarit, ribosom và glycoprotein, glucan và các polysacarit khác, lipopolysacarit và thành phần bất kỳ của dịch nổi.

FR11. Chế phẩm để sử dụng theo FR bất kỳ trong số các FR nêu trên, trong đó lợi khuẩn có mặt với lượng thay đổi nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{12} đơn vị vi sinh vật, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^9 đến 10^{11} đơn vị vi sinh vật.

FR12. Chế phẩm để sử dụng theo FR bất kỳ trong số các FR nêu trên ở dạng kem, gel, dầu, nhũ tương, dung dịch phun, gạc, miếng dán, băng, thuốc xức ngoài ra, bột, mặt nạ, thuốc mỡ, bột nhào hoặc chế phẩm dạng lỏng để bào chế theo cách tùy ý.

Thuật ngữ “điều trị” hoặc “trị liệu” hoặc “phương pháp điều trị” theo sáng chế được dùng để chỉ sự can thiệp đối với đối tượng có nhu cầu này, bao gồm việc dùng lượng có tác dụng điều trị của chế phẩm hoặc hỗn hợp M của sáng chế, nhằm mục đích loại trừ, giảm/làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh lý hoặc bệnh và triệu chứng hoặc các rối loạn của nó.

Thuật ngữ “lượng có tác dụng điều trị” dùng để chỉ lượng hoạt chất và/hoặc chủng vi khuẩn mà tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y khoa trong mô, hệ thống, động vật có vú hoặc người mà tìm kiếm và được xác định bởi cá nhân, nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, thầy thuốc hoặc bác sĩ lâm sàng hoặc nhân viên y tế khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” được dùng để chỉ đối tượng là người hoặc đối tượng là động vật (ví dụ động vật nuôi, như chó hoặc mèo hoặc các động vật có vú khác). Tốt hơn, nếu các chế phẩm của sáng chế là để sử dụng trong phương pháp điều trị y khoa hoặc để sử dụng thẩm mỹ cho đối tượng là người.

Theo sáng chế, thuật ngữ “thiết bị y tế” được dùng với nghĩa theo Nghị định số 46 ngày 24 tháng 2 năm 1997, hoặc theo quy định về thiết bị y tế mới (EU) 2017/745 (MDR).

Theo sáng chế, thuật ngữ “thực phẩm mới” được dùng với nghĩa theo Regulation EC 258 năm 1997.

Nếu không có quy định khác, thuật ngữ chế phẩm hoặc hỗn hợp hoặc theo cách

khác bao gồm thành phần với lượng “nằm trong khoảng từ x đến y” được dùng để chỉ thành phần có thể có mặt trong chế phẩm hoặc hỗn hợp hoặc phần chiết hoặc theo cách khác với tất cả các lượng có mặt trong khoảng này, thậm chí nếu không được quy định rõ, các số cực trị của khoảng được bao gồm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ A

Kem theo sáng chế bao gồm chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó:

để tạo ra kem này, chủng LPC-S01 DSM 26760 (sống được hoặc được làm bất hoạt) – được làm đông khô ở dạng bột hoặc viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) – được hoà tan trong 13 ml kem chủ yếu chứa axit hyaluronic (viết tắt là kem HA).

Ví dụ về chế phẩm dạng kem HA (% trọng lượng/trọng lượng):

- nước (dung môi) vừa đủ ở 100%;
- cơ chất chức: octocrylen (tác nhân lọc UV-B) 2-8% (4,5%), BMDDBM bao nang được làm ổn định với octocrylen (tác nhân lọc UV-B) 0,1-5% (2%), dung dịch đệm hữu cơ bơ (*butyrospermum parkii* = bơ) (CAS N° 194043-92-0) 0,1-4% (1%), hỗn hợp collagen và panthenol 0,1-4% (1%), butyl metoxydibenzoylmetan (tác nhân lọc UV-A) 0,1-4% (1%), vitamin E 0,01-1% (0,3%), thân cây dành dành 0,01-1% (0,1%), axit hyaluronic trọng lượng phân tử thấp (ví dụ CAS N° 9004-61-9) 0,005-1% (0,05%), axit hyaluronic trọng lượng phân tử trung bình/cao (ví dụ CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,02%);
- tá dược và các chất phụ trợ (2-10% trọng lượng, theo các yêu cầu kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này): chất chống oxy hoá (ví dụ tocopheryl axetat), chất bảo quản (ví dụ phenoxyetanol, kali sorbat), chất hoạt động bề mặt-chất nhũ hoá (ví dụ xetearyl glucosit, rượu xetylic), chất ổn định nhũ tương (ví dụ carbome), dung môi (ví dụ 1,2-hexandirol), chất mài mòn (ví dụ silic dioxit), chất gắn kết (ví dụ PVP), chất tạo ẩm (ví dụ glyxerin), và/hoặc tác nhân dưỡng da (ví dụ dimethicon, gôm xanthan, tropolon).

Ví dụ B

Mặt nạ theo sáng chế bao gồm chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic hoặc muối của nó:

để tạo ra mặt nạ, chủng LPC-S01 DSM 26760 (sống được hoặc được làm bất hoạt, tốt hơn là sống được) – được đông khô ở dạng bột hoặc viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) – được hoà tan trong dung dịch nước chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó, ví dụ, dung dịch có các thành phần được nêu trong bảng A, trong đó axit hyaluronic trọng lượng phân tử thấp (ví dụ CAS N° 9004-61-9) 0,01-2% (0,1%) và axit hyaluronic trọng lượng phân tử trung bình/cao (ví dụ CAS N° 9067-32-7) 0,005-1% (0,05%) có mặt ở % theo trọng lượng (tính theo tổng trọng lượng của dung dịch nước chứa axit hyaluronic).

Thành phần	CAS N°
nước	7732-18-5
propandiol	504-63-2
natri hyaluronat	9067-32-7
phenoxyetanol	122-99-6
1,2-hexandiol	6920-22-5
caprylyl glycol	1117-86-8
axit hyaluronic thuỷ phân	9004-61-9
natri hydroxit	1310-73-2
chất phụ trợ/tá được	-

Bảng A

- Chủng *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 được làm bất hoạt bằng cách gia nhiệt:

Phần thử nghiệm – (1)

Episkin T-Skin™ MODEL (mô hình da 3D)

Episkin T-Skin™ (viết tắt là T-Skin hoặc “da dày đầy đủ” hoặc da 3D) trong mô hình da 3D được tái cấu trúc *in vitro*, bao gồm hạ bì và biểu bì (mô hình da dày đầy đủ).

Episkin T-Skin™ là da được tái cấu trúc *in vitro* có phần da tương đương với nguyên bào sợi của người được xếp chồng lên lớp biểu bì phân tầng khác biệt thu được

từ tế bào biểu mô sừng của người bình thường được nuôi cấy trên dụng cụ lọc polycarbonat trơ.

Mô hình da người được tái cấu trúc in vitro gần hơn - khi xét đến hình thái học (biểu mô nhiều lớp), các đặc tính sinh hoá và sinh lý - với mô của người in vivo và chúng là sự thay thế hứa hẹn nhất đối với động vật, với mô cấy ghép *ex vivo* và với các lớp đơn tế bào xếp chồng để đánh giá hiệu quả và tính an toàn của việc áp dụng khu trú sản phẩm (Gordon et al. 2015, Zuang V. 2016).

Sự tương quan sinh học và khả năng dự đoán của các mô hình này thu được nhờ sự có mặt của mô được tổ chức với các lớp khác nhau của tế bào sống mà cho phép đánh giá cá sản phẩm được áp dụng khu trú ở các liều lâm sàng thực và các điều kiện tiếp xúc. Việc điều trị da người bằng các sản phẩm được dùng khu trú, như mỹ phẩm, dẫn đến đáp ứng hệ gen mà có con đường động học và nó thể hiện tín hiệu tế bào thứ nhất, ở mức phiên mã, đáp ứng với dòng sự kiện. Mô 3D của người là hệ thống thử nghiệm thích hợp để nghiên cứu cơ chế hoạt động và đánh giá hiệu quả của sản phẩm khi xét đến cả đáp ứng hệ gen trực tiếp và kết quả của giao tiếp tế bào và giao tiếp chéo thông qua các tác nhân trung gian có thể hoà tan và sự biểu hiện của các tác nhân đánh dấu sinh học riêng.

I. Mô hình cân bằng (không viêm) đối với mô hình Episkin T-Skin™

Trong nghiên cứu in vitro hiện tại của mô hình cân bằng trên mô hình Episkin T-Skin™, hiệu quả có lợi đối với sự cân bằng da của chế phẩm theo sáng chế chứa axit hyaluronic (HA) và chủng vi khuẩn sống được hoặc được làm bất hoạt LPC-S01 DSM 26760 được đánh giá để khai thác ứng dụng tiềm ẩn của nó và hiệu quả chăm sóc da của nó.

Mục đích của nghiên cứu này là để nghiên cứu khả năng dung nạp của da của chế phẩm theo sáng chế sau khi tiếp xúc với nồng độ cao và để đánh giá hiệu quả của chúng ở:

- mức tăng cường khả năng tự bảo vệ da nhờ sự kích ứng của các peptit kháng vi sinh vật,
- kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh của tế bào biểu mô sừng, tái tạo và phân hoá biểu bì,

- kích ứng sự tái tạo tích cực biểu bì và các khoang da, tác dụng dưới dạng tác nhân chống lão hoá.

I.1. Chủng vi khuẩn sống được – Mô hình cân bằng

I.1.1. Sản phẩm theo sự phân tích và đối chứng.

- Đối chứng âm tính (NC): dung dịch nước muối NaCl 0,9%.
- P1: chủng sống được LPC-S01 DSM 26760 được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối;
- P2: dung dịch nước axit hyaluronic (như trong ví dụ B (mặt nạ) được nêu trên đây);
- P3: chủng sống được LPC-S01 DSM 26760 được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước axit hyaluronic;

Để tạo ra P3, hàm lượng viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) chủng sống được được đông khô LPC-S01 DSM 26760 được hoà tan trong 13 ml dung dịch nước axit hyaluronic.

Để tạo ra P1 (chỉ một chủng), hàm lượng viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) chủng sống được được đông khô LPC-S01 DSM 26760 được tạo huyền phù lại trong 13 ml dung dịch nước muối.

I.1.2. Đánh giá theo phương pháp gia tăng khả năng tự bảo vệ và khả năng tái tạo tế bào

Sự gia tăng khả năng tự bảo vệ và khả năng tái tạo tế bào của chủng lợi khuẩn LPC-S01 (*Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, sống được; P1), của chủng lợi khuẩn LPC-S01 (sống được) + axit hyaluronic (P3) và axit hyaluronic (P2) được đánh giá trên mô hình da 3D đầy đủ được tái cấu trúc *in vitro* mà tái tạo các khoang của hạ bì và biểu bì và do đó cho phép nghiên cứu các cải biến của chất nền ngoại bào của hạ bì và sự phân hoá của các lớp da sống được (mô hình “da dày đầy đủ”).

Nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá hiệu quả của chủng LPC-S01 DSM 26760, axit hyaluronic và chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 + axit hyaluronic đối với sự hoạt hoá đáp ứng miễn dịch, phân hoá tế bào biểu bì và tái tạo tế bào hạ bì. Chủng LPC-S01 DSM 26760, axit hyaluronic và chế phẩm bao gồm chủng lợi khuẩn LPC-S01 + axit hyaluronic được áp dụng (30 µl) trực tiếp lên bề mặt của mô hình da

3D, ủ trong 8 giờ và sau đó rửa bằng cách sử dụng dung dịch nước muối để loại bỏ sản phẩm dư thừa. Mô được nuôi cấy trong 16 giờ nữa trước khi phân tích, để mô phỏng sự tiếp xúc thực của mặt nạ trong 24 giờ.

Dung dịch nước muối được sử dụng làm đối chứng âm tính (NC).

Các tham số sau đây được phân tích so với đối chứng âm tính (theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này):

- Phân tích mô học bằng cách nhuộm tricrom Masson;
- Sự biểu hiện gen (qRT-PCR) của tác nhân đánh dấu sinh học chính về khả năng bảo vệ da (HBD2 và CCL27), đáp ứng miễn dịch bẩm sinh (TLR2), mức phân hoá biểu bì (KRT14, LOR và IVL), sự tái tạo biểu bì (HAS-2, CD44, Collagen III, IV và XIII, KGF và EGF);
- Mức tổn thương tế bào bằng cách định lượng sự giải phóng adenylat kinaza (viết tắt là AK) (thử nghiệm Toxilight).

Các thử nghiệm được thực hiện theo bộ ba sinh học.

I.1.2.1. Phân tích hình thái mô học bằng cách nhuộm tricrom Masson

Khi kết thúc quá trình xử lý, mô được rửa bằng dung dịch nước muối và được cố định trong formalin 10%. Các phần mô được đánh dấu bằng cách sử dụng kit tricrom Masson (Abcam 150686) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với mỗi mẫu, 3 lần thu nhận bằng kính hiển vi được thực hiện trên 3 phần mô khác nhau. Các mẫu mô học được phân tích dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 20x và 40x) và các cải biến hình thái của mô được đánh giá.

I.1.2.2. Phân tích PCR theo thời gian thực

Khi kết thúc quá trình xử lý, thu gom mô trong dung dịch đệm tan để trích xuất ARN và phiên mã ngược ADN bổ trợ. Tính nguyên vẹn của ARN được đánh giá bằng cách nạp ARN được trích xuất trong gel agarosa 1%: sợi ribosom 18S và 28S được phát hiện. GAPDH được sử dụng làm gen đối chứng nội sinh để tiêu chuẩn hoá lượng nạp vào. Phép phân tích dữ liệu thu được được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

I.1.3. Kết quả hoạt hoá khả năng tự bảo vệ và khả năng tái tạo tế bào

I.1.3.1. Kết quả của phép phân tích hình thái mô học bằng cách nhuộm tricrom Masson.

Sau khi ủ bằng dung dịch nước muối, đối chứng âm tính (Fig.1A) không thể hiện sự thay đổi hình thái học và/hoặc cấu trúc trong cả biểu bì và hạ bì. Sự phân bố sợi collagen được định hướng và chứa nguyên bào sợi.

Việc điều trị bằng chủng LPC-S01 DSM 26760 (sống được) không làm thay đổi đáng kể cấu trúc của biểu bì và hạ bì. Sợi collagen và sự phân bố của chúng thể độ dày giảm và mật độ sợi giảm so với đối chứng âm tính (Fig.1B).

Việc điều trị bằng axit hyaluronic không làm thay đổi đáng kể cấu trúc của biểu bì và hạ bì. Sợi collagen thể hiện mật độ giảm so với đối chứng âm tính (Fig.2A).

Việc điều trị bằng chủng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 (sống được) + axit hyaluronic có khả năng làm thay đổi hình thái học của biểu bì, cụ thể là lớp sừng mỏng hơn, làm gia tăng quy trình phân hoá (Fig.2B).

I.1.3.2. Kết quả PCR thời gian thực (qRT-PCR).

Bảng 1 thể hiện phép định lượng tương đối (relative quantification-RQ), so với đối chứng âm tính, của các trị số thu được bằng PCR thời gian thực, của mô được xử lý bằng LPC-S01 DSM 26760 (sống được), axit hyaluronic và LPC-S01 DSM 26760 (sống được)+ axit hyaluronic.

Bảng 1

Khoang	Chức năng	Tác nhân đánh dấu sinh học	LPC-S01	Axit hyaluronic	Axit hyaluronic + LPC-S01
Biểu bì	Bảo vệ da	Defensin $\beta 2$ của người	5,80	0,59	2,18
		CCL27	1,12	0,87	0,96

	Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh	TLR2	1,94	0,93	1,38
	Phân hoá biểu bì	Xytokeratin 14	1,11	0,96	1,23
		Loricrin	0,59	1,35	1,68
		Involucrin	1,50	0,98	1,30
	Cấu trúc biểu bì	Colagen XIII	0,91	1,06	0,92
		KGF	0,61	1,08	0,37
		EGF	0,95	1,09	1,61
Hạ bì	Tái tạo tế bào, chống lão hoá, cơ chất tế bào	HAS-2	0,53	1,08	0,53
		CD44	1,09	1,00	1,10
		Colagen III	0,45	0,75	0,33
		Colagen IV	1,00	1,01	0,12

Việc điều trị bằng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 làm tăng defensin $\beta 2$ của người (HBD2) và TLR2. Các dữ liệu này phù hợp với các đặc tính điều biến miễn dịch của lợi khuẩn và chúng thể hiện khả năng kích ứng bảo vệ da và tăng cường đáp ứng miễn dịch bẩm sinh của da.

Việc điều trị bằng axit hyaluronic không thể gây ra sự điều biến biểu hiện của đối tượng gen đánh giá.

Việc điều trị bằng axit hyaluronic + LPC-S01 DSM 26760 làm tăng mức biểu hiện HBD2 so với việc điều trị bằng axit hyaluronic. Mức giảm các trị số collagen III và HAS-2 được quan sát (như được quan sát trong việc điều trị bằng lợi khuẩn riêng rẽ), trong khi mức giảm KGF cũng được quan sát.

Nói chung, các kết quả thu được cho biết rằng khi áp dụng riêng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 tạo ra tác dụng tích cực đối với da bằng cách tăng cường tính miễn dịch bẩm sinh của nó (dựa trên TLR2 và HBD-2).

Axit hyaluronic được áp dụng riêng không tạo ra tác dụng tích cực đối với da; trái lại, LPC-S01 đưa vào trong cùng chế phẩm với axit hyaluronic có khả năng duy trì hoạt tính chính của nó để làm tăng cường khả năng bảo vệ bẩm sinh của da.

I.1.3.4 Kết quả giải phóng adenylat kinaza (thử nghiệm Toxilight).

Hàm lượng adenylat kinaza được giải phóng bởi mô được xử lý bằng các sản phẩm của nghiên cứu thể hiện mức sinh khả dụng tốt của các sản phẩm sau 8 và 16 giờ ủ.

I.1.4. Kết luận

Các kết quả thu được cho biết rằng việc điều trị bằng axit hyaluronic + LPC-S01 DSM 26760 (sống và sống được) là hứa hẹn nhất, thể hiện hiệu quả tích cực đối với sự cải thiện quy trình phân hoá da, đối với sự tái tạo da và nói chung là làm tăng cường cấu trúc của khoang da bằng cách làm tăng mạng lưới collagen. Do đó, việc dùng kết hợp axit hyaluronic và lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 (P3) đã thể hiện tác dụng hiệp đồng trong việc tăng cường cấu trúc hạ bì, tham gia vào các yếu tố chính của quá trình phân hoá và tái tạo tế bào. Tác dụng hiệp đồng này không thể dự đoán được do việc dùng axit hyaluronic và lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 một cách riêng biệt không thể hiện tác dụng đáng kể đối với sự phân hoá da.

I.2. Chủng vi khuẩn bất hoạt – Mô hình nội cân bằng

I.2.1. Các sản phẩm sẽ được phân tích và làm đối chứng.

- đối chứng âm tính (NC): dung dịch nước muối NaCl 0,9%;
- P1-i.: chủng bất hoạt LPC-S01 DMS 26760 được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối (10^9 tế bào/mô), sử dụng nồng độ 2 g LPC-S01/ml;
- P2-i.: kem được tạo thành chủ yếu từ axit hyaluronic (như trong ví dụ A (kem) được mô tả trên đây);

- P3-i.: chủng bất hoạt LPC-S01 DSM 26760 được tạo huyền phù lại trong kem được tạo thành chủ yếu từ axit hyaluronic (tương tự với P2-i.) (10^9 tế bào/mô), sử dụng nồng độ 2 g tế bào/ml.

Để tạo ra P3-i., hàm lượng viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) chủng bất hoạt đông khô LPC-S01 DSM 26760 được hoà tan trong kem được tạo thành chủ yếu từ axit hyaluronic.

Để tạo ra P1-i. (chỉ một chủng này), hàm lượng viên nang chứa bột (khoảng 8×10^9 CFU) chủng bất hoạt đông khô LPC-S01 DSM 26760 được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối.

I.2.2. Sự bất hoạt chủng vi khuẩn trong phân tích.

Nguyên liệu khởi đầu: tế bào vi khuẩn sống được của chủng LPC-S01 DSM 26760 ở dạng đông khô với lượng tế bào sống được 2×10^{11} tế bào/g bột.

Ngày trước khi xử lý, cân trọng lượng 2 g bột và tạo huyền phù lại trong 4 mL dung dịch nước muối để thu được huyền phù 10^{11} tế bào vi khuẩn/mL dung dịch nước muối. Sử dụng 30 μ L huyền phù này để xác nhận lượng vi khuẩn hữu hiệu bằng cách đếm trên thạch MRS.

Vào ngày xử lý, huyền phù chứa chủng vi khuẩn được tạo ra trong dung dịch nước muối được làm bất hoạt bằng nhiệt bằng cách ủ huyền phù vi khuẩn ở 85°C trong 1 giờ. Sau khoảng thời gian này, vi khuẩn được chia vào trong 4 ống thử nghiệm *ependorf* (mỗi ống chứa 1 ml, tương ứng với 10^{11} tế bào vi khuẩn) và ly tâm. Sau đó, tạo huyền phù lại viên trong:

- 1 ml dung dịch nước muối, thu được P1-i.
- 1 ml kem được tạo thành chủ yếu từ axit hyaluronic, thu được P3-i.

I.2.3. Phương pháp.

Sản phẩm sẽ được phân tích và trong đối chứng âm tính (P1-i., P2-i., P3-i., NC: 15 μ l) được phủ trực tiếp lên bề mặt mô của mô hình T-Skin trong 24 giờ và 48 giờ trong điều kiện nội cân bằng. Bằng cách phủ 15 μ L huyền phù P1-i và P3-i., 10^9 vi khuẩn/mô được phủ.

Các tham số sau đây được phân tích so với đối chứng không được xử lý (đối chứng âm tính, NC):

- Phân tích hình thái mô học bằng cách nhuộm H&E (Hematoxylin & Eosin);
- Mức biểu hiện gen (bằng RT-qPCR) của tác nhân đánh dấu sinh học chính về khả năng bảo vệ da (defensin $\beta 2$ của người (DEFB4)), đáp ứng miễn dịch bẩm sinh (TLR2, TNF α), sự phân hoá và tái tạo biểu bì (TGMS-1, CCND1, TGF- $\beta 1$).

Các thử nghiệm được thực hiện theo bộ ba sinh học.

I.2.4. Kết quả.

I.2.4.1. Kết quả của phép phân tích hình thái mô học H&E ở 24 giờ và 48 giờ

Ba phần mô theo phương thẳng đứng (có 3 bản sao) được tạo ra trên mỗi đường trượt mô học; 5 lần thu nhận bằng kính hiển vi được thực hiện trên phần được lựa chọn. Đối với mỗi bản sao sinh học, lần thu nhận tiêu biểu nhất của phần lựa chọn được báo cáo. Độ dày trung bình được tính toán dựa trên 5 lần thu nhận bằng kính hiển vi.

Các kết quả được báo cáo dưới đây:

CN ở 24 giờ (Fig.6a):

- Biểu bì: sống được hoàn toàn và với cấu trúc lớp màng sừng (SC) không đổi;
- Tiếp giáp da-biểu bì: tính nguyên vẹn của cấu trúc được quan sát;
- Sự phân bố sợi và collagen: được định hướng và bao gồm nhiều nguyên bào sợi.

P1-i. ở 24 giờ (không được thể hiện trên hình vẽ Fig.):

- Biểu bì: sự khác nhau được quan sát trong cùng một bản sao, có thể có liên quan đến sự phân bố không đồng nhất; có thể quan sát được nhiều tế bào có hoạt tính chuyển hoá và tăng sinh; một vài nhân kết đặc; cấu trúc lớp SC dường như không bị thay đổi đáng kể;

P3-i. ở 24 giờ (Fig.6b):

- Biểu bì: sự khác nhau được quan sát trong cùng một bản sao, có thể có liên quan đến sự phân bố không đồng nhất; có thể quan sát được nhiều tế bào có hoạt tính chuyển hoá và tăng sinh; một vài nhân kết đặc; cấu trúc lớp sừng (SC) dường như bị thay đổi đáng kể;
- Tiếp giáp da-biểu bì: tính nguyên vẹn của cấu trúc được quan sát;

- Phân bố sợi và collagen: mật độ được định hướng, nhỏ gọn và chứa nhiều nguyên bào sợi.

NC ở 48 giờ (Fig.6c):

- Biểu bì: sống được hoàn toàn và cấu trúc lớp sừng (SC) không đổi;
- Tiếp giáp da-biểu bì: tách ra và mất tính nguyên vẹn (mô dễ bị vỡ do yếu tố nội tại) được quan sát;
- Phân bố sợi và collagen: được định hướng và chứa nhiều nguyên bào sợi.

P1-i. ở 48 giờ (không được thể hiện trên hình vẽ Fig.):

- Biểu bì: biểu bì được phân hoá hoàn toàn được quan sát; mô thể hiện SC được thay đổi - khi xét đến cấu trúc và độ dày - do sự tăng sinh và phân hoá lớn hơn.

P3-i. ở 48 giờ (Fig.6d):

- Biểu bì: sự khác nhau được quan sát trong cùng một bản sao, có thể có liên quan đến sự phân bố không đồng nhất; có thể quan sát được nhiều tế bào có hoạt tính chuyển hoá và tăng sinh; một vài nhân kết đặc; cấu trúc lớp sừng (SC) dường như bị thay đổi do sự tăng sinh lớn hơn;
- Tiếp giáp da-biểu bì: tính nguyên vẹn của cấu trúc được quan sát;
- Phân bố sợi và collagen: được định hướng và bao gồm nhiều nguyên bào sợi; mật độ lớn hơn và nhỏ gọn so với đối chứng âm tính.

Các dữ liệu được nêu trên đây chứng minh rằng chế phẩm P3-i. (chủng bất hoạt + HA) hoạt động trong thời gian ngắn hơn và với hiệu quả lớn hơn so với chế phẩm P1-i (chỉ chủng bất hoạt này), thể hiện rằng sau khi áp dụng cho mô P3-i ở 24 giờ, cấu trúc lớp sừng (SC) dường như bị thay đổi, trong khi sau khi áp dụng P1-I, cần phải chờ đợi trong 48 giờ trước khi quan sát sự thay đổi của cấu trúc lớp SC.

I.2.4.2. Kết quả PCR thời gian thực

I.2.4.2.1. Kết quả PCR thời gian thực ở 24 giờ

Fig.7 thể hiện kết quả biểu hiện gen (qRT-PCR) ở 24 giờ (RQ được tính toán với NC ở 24 giờ=1; điều chỉnh giảm $RQ < 0,5$, điều chỉnh tăng $RQ > 2$)

Kết quả biểu hiện gen định lượng tương đối (RQ) (qRT-PCR) thu được trong mô được xử lý bằng chế phẩm sẽ được phân tích (P1-i., P2-i., P3-i.) ở 24 giờ được

tổng kết trên Fig.7 dưới đây. Kết quả được biểu hiện so với đối chứng âm tính (NC ở 24 giờ = 1; điều chỉnh giảm $RQ < 0,5$, điều chỉnh tăng $RQ > 2$).

Nói chung, việc áp dụng không hoàn toàn đồng nhất chế phẩm sẽ được phân tích dẫn đến khả năng thay đổi sinh học cao giữa ba bản sao.

Sau 24 giờ xử lý:

- Chủng lợi khuẩn bất hoạt sẽ được phân tích, riêng (P1-i) hoặc có trong chế phẩm bao gồm HA (P3-i), gây điều chỉnh tăng defensin $\beta 2$ của người (DEFB4). Các dữ liệu này phù hợp với các đặc tính điều biến miễn dịch của chủng sống được LPC-S01 DMS 26760 được quan sát trong phần I.1.3.1. và chúng thể hiện khả năng khơi mào bảo vệ da thậm chí trong điều kiện không sống được. Do đó, hoạt tính điều biến miễn dịch này có thể tương quan với các yếu tố tiếp xúc bên ngoài trong vách tế bào vi khuẩn.
- Chế phẩm chỉ chứa HA (P2-i.) không điều biến defensin $\beta 2$ của người (DEFB4): kết quả này xác nhận rằng việc điều chỉnh tăng DEFB4 ở P3-i. (chủng+HA) có liên quan theo cách loại trừ với sự có mặt của vi khuẩn.
- chế phẩm P3-i. (chủng + HA) gây điều chỉnh tăng defensin $\beta 2$ của người (DEFB4) ở 24 giờ theo cách cao hơn (mặc dù không đáng kể) khi so với P1-i. (chỉ có chủng). Việc điều chỉnh đáng kể TNF α được định lượng cho biết sự kích ứng đáp ứng viêm có thể là do nhận biết miễn dịch của vi khuẩn bởi bề mặt da. Do tác dụng này không được quan sát trong mô được xử lý bằng P2-i. (chỉ có HA), kết quả này có thể có liên quan đến liều cao của chủng LPC-S01 DMS 26760 chứa trong chế phẩm P3-i.

I.2.4.2.2. Kết quả PCR thời gian thực ở 48 giờ

Việc kích ứng defensin $\beta 2$ của người (DEFB4) bởi chủng vi khuẩn bất hoạt sẽ được phân tích (cả trong P1-i. và P3-i.) được xác định, với các trị số lớn hơn thời điểm 24 giờ (phần I.2.4.2.1.), cho biết đáp ứng sinh học ổn định và tăng cường bảo vệ da, dẫn đến cơ chế bảo vệ hữu hiệu.

I.2.5. Kết luận.

Trong mô hình nội cân bằng (không viêm), chế phẩm theo sáng chế P3-i. (chủng bất hoạt + HA), bao gồm tổ hợp của chủng vi khuẩn LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt và axit hyaluronic, được dung nạp tốt trong mô hình da 3D và có khả năng kích

thích cơ chế bảo vệ cơ thể và quy trình phân hoá tế bào khi so với các thành phần đơn lẻ và/hoặc đối chứng âm tính.

Cụ thể, mức hữu hiệu của chế phẩm của sáng chế P3-i. (chủng bất hoạt + HA) đạt được trong thời gian ngắn hơn khi so với chủng vi khuẩn không kết hợp với axit hyaluronic (P1-i.).

II. Mô hình viêm trên mô hình Episkin T-Skin™

Khả năng của các chế phẩm theo sáng chế, bao gồm chủng vi khuẩn LPC-S01 DMS 26760 (sống được hoặc bất hoạt) và axit hyaluronic, làm giảm tổn thương do bức xạ tia cực tím gây ra được đánh giá trên mô hình da được tái cấu trúc in vitro 3D đầy đủ mà tái tạo các khoang của hạ bì và biểu bì (mô hình T-Skin™), do đó cho phép nghiên cứu các thay đổi của chất nền ngoại bào của hạ bì và sự phân hoá các lớp sống được (mô hình da có độ dày đầy đủ).

Việc đánh giá này được thực hiện theo hai mô hình, mô hình viêm A (xử lý sơ bộ trên mô không bị tổn thương) và mô hình viêm B (trước và sau xử lý trên mô bị tổn thương), được mô tả dưới đây.

II.A. Mô hình viêm A đối với chủng vi khuẩn sống được hoặc bất hoạt

II.A.1. Các sản phẩm sẽ được phân tích và đối chứng.

- P1: LPC-S01 DMS 26760 sống được được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối,
- P2: dung dịch axit hyaluronic (xem I.1.1. Mặt nạ);
- P3: LPC-S01 DMS 26760 sống được được tạo huyền phù lại trong dung dịch axit hyaluronic,
- P1-i.: LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt và được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối,
- P2-i.: dung dịch axit hyaluronic (xem I.1.1. Mặt nạ);
- P3-i.: LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt được tạo huyền phù lại trong dung dịch axit hyaluronic,
- Đối chứng dương tính (PC): mô được xử lý bằng dung dịch nước muối NaCl 0,9%, được mài mòn và được tiếp xúc với bức xạ tia cực tím.
- Đối chứng âm tính (NC): mô được xử lý bằng dung dịch nước muối NaCl 0,9% mà không tiếp xúc với bức xạ tia cực tím.

P1 (chỉ có chủng sống được) và P3 (chủng sống được + HA) lần lượt được tạo ra bằng cách tạo huyền phù lại hàm lượng viên nang chứa chủng vi khuẩn đông khô (CFU 8×10^9) trong 13 ml dung dịch nước muối chứa axit hyaluronic.

P1-i. (chỉ có chủng bất hoạt) và P3-i. (chủng bất hoạt + HA) lần lượt được tạo ra bằng cách tạo huyền phù lại hàm lượng viên nang chứa chủng vi khuẩn đông khô (CFU 8×10^9) trong dung dịch nước muối và ủ ở 85°C trong 1 giờ. Sau thời gian này, lần lượt vi khuẩn được ly tâm và viên được tạo huyền phù trong 13 ml dung dịch nước muối trên axit hyaluronic (hoặc kem).

II.A. Phương pháp đánh giá mức giảm tổn thương do tia cực tím

Mức giảm tổn thương do tia cực tím của chủng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 (sống và sống được hoặc bất hoạt) được đánh giá trên mô hình “da dày hoàn toàn”, như được mô tả trên đây. Nghiên cứu tập chung vào tác dụng của chủng LPC-S01, axit hyaluronic và chế phẩm bao gồm chủng LPC-S01 DSM 26760 + axit hyaluronic đối với hình thái học của mô được đánh dấu haematoxylin-eosin và đối với sự kích ứng các thể gây viêm đáp lại bức xạ tia cực tím. Chủng LPC-S01 DSM 26760, axit hyaluronic và chế phẩm bao gồm chủng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 + axit hyaluronic được phủ trực tiếp lên bề mặt của mô hình da 3D, ủ qua đêm và sau đó rửa bằng cách sử dụng dung dịch nước muối để loại bỏ sản phẩm dư thừa (bước xử lý sơ bộ). Mô được mài mòn không đáng kể và sau đó được tiếp xúc với 1 MED (liều gây ban đỏ tối thiểu) tia cực tím để mô phỏng sự tiếp xúc với ánh nắng mặt trời thông thường. Sự kích ứng viêm được thử nghiệm 4 và 24 giờ sau khi tiếp xúc với tia cực tím. Mô được xử lý bằng dung dịch nước muối và được tiếp xúc với tia cực tím được sử dụng làm đối chứng dương tính. Mô được xử lý bằng dung dịch nước muối và không được tiếp xúc với tia cực tím được sử dụng làm đối chứng âm tính.

Việc đánh giá hiệu quả của các chế phẩm sẽ được phân tích trong việc làm giảm tổn thương do tia cực tím gây ra được phân tích, theo các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bằng cách:

- phương pháp nhuộm miễn dịch NFkB;
- phân tích hình thái mô học bằng cách nhuộm haematoxylin/eosin (H&E); và
- phương pháp định lượng IL-1 β (chỉ đối với chủng sống được).

II.A.3. Kết quả giảm tổn thương do tia cực tím (mô hình viêm A)

II.A.3.1. Kết quả nhuộm miễn dịch NFkB

Fig.3 tổng kết các kết quả định lượng chuyển đoạn NFkB sau 4 giờ từ khi tiếp xúc với tia cực tím (các chế phẩm sẽ được phân tích bao gồm các chủng sống được).

4 giờ sau khi bức xạ, đối chứng dương tính (PC) thể hiện số lượng lớn đoạn chuyển NFkB, cụ thể là trong lớp đáy trên của biểu bì.

Việc xử lý bằng LPC-S01 DSM 26760 (P1), với chủng LPC-S01 DSM 26760 và axit hyaluronic (P2) và axit hyaluronic (P3) ức chế việc chuyển đoạn trong nhân của NFkB đáng kể so với đối chứng dương tính.

Do đó, việc xử lý bằng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760, LPC-S01 DSM 26760 + axit hyaluronic và axit hyaluronic thể hiện khả năng ngăn ngừa kích ứng viêm bằng cách ức chế sự chuyển đoạn NFkB trong nhân tế bào được cho vào tiếp xúc tia cực tím.

Ngoài ra, bảng 2 thể hiện dữ liệu bán định lượng của đoạn chuyển nhân NFkB được xác định trong thời gian xử lý sơ bộ 16 giờ (kéo dài) bằng chế phẩm sẽ được phân tích bao gồm chủng sống được (P3) hoặc chủng bất hoạt (P3-i), và đánh giá các tham số 4 giờ sau khi tiếp xúc với tia cực tím, hữu ích để đánh giá tác dụng điều trị kéo dài.

Mối tương quan sinh học và khả năng tái tạo của mô hình gây viêm (tiếp xúc với tia cực tím ở 1 MED, liều gây ban đỏ tối thiểu) được xác nhận bằng việc gia tăng đoạn chuyển NFkB trong nhân tế bào trong các mẫu được chiếu bức xạ (đối chứng dương tính) khi so với các mẫu không được bức xạ (đối chứng âm tính).

Sự gia tăng tương đối đoạn chuyển NFkB (tỷ lệ phần trăm khác nhau) trong nghiên cứu với chế phẩm P3-i với các chủng bất hoạt (+ 70,7%, $w = 0,01$) có thể so sánh được với mức gia tăng được định lượng trong nghiên cứu với chế phẩm P3 với các chủng sống được (+83,7, $w = 0,01$).

		Đoạn chuyển NFkB (trung bình $\pm$ st.dev.)	
Đối chứng âm tính	NC	11,0 $\pm$ 2,1	25,7 $\pm$ 8,3
Đối chứng	PC	18,8 $\pm$ 4,8 (+70,7%	47,2 $\pm$ 6,2 (+83,7 $w=0,01$)

dương tính		w=0,01)	
Xử lý		16 giờ (ON)	16 giờ (ON)
Chủng (sống được) + HA	P3	-	$29,6 \pm 6,3$ (-37,3%w=0,00)
Chủng (bất hoạt) + HA	P3-i	$16,0 \pm 3,2$ (+14,8)	-

Bảng 2

Hơn nữa, ở 24 giờ P3 thể hiện mức giảm hàm lượng tế bào chất của NFkB khi so với đối chứng dương tính (dữ liệu không được đo đối với P3-i).

II.A.3.2. Kết quả hình thái mô học bằng cách nhuộm H&E.

Fig.4 và Fig.5 thể hiện mô được xử lý bằng dung dịch nước muối (đối chứng dương tính) (A), với lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 (B), với axit hyaluronic (C) và với LPC-S01 DSM 26760 (sống được) + axit hyaluronic (D) lần lượt 4 và 24 giờ sau khi tiếp xúc với tia cực tím (hình thái mô học bằng cách nhuộm H&E).

Như có thể nhìn thấy được, trên cả hai hình vẽ, việc xử lý bằng axit hyaluronic và việc xử lý bằng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 không có khả năng làm giảm tổn thương do tia cực tím gây ra. Cụ thể, các dấu hiệu cháy nắng do tia cực tím gây ra có thể nhìn thấy được trong lớp cơ sở và trong lớp gai của biểu bì. Hơn nữa, lớp tiếp giáp da-biểu bì bị tổn thương do tia cực tím và biểu bì không dính bám hoàn toàn vào hạ bì, dấu hiệu cấu trúc da bị thay đổi (Fig.4A, Fig.4B, Fig.5A và Fig.5B).

Việc xử lý bằng axit hyaluronic + lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 có khả năng làm giảm tổn thương do tia cực tím gây ra sau 4 và 24 giờ từ khi kích ứng tổn thương. Cụ thể, cấu trúc của cả hạ bì và biểu bì nhỏ gọn hơn khi so với việc xử lý bằng axit hyaluronic và bằng lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 được dùng theo cách riêng rẽ. Hơn nữa, cấu trúc của lớp tiếp giáp da-biểu bì được duy trì tốt hơn, cho phép biểu bì bám dính tốt hơn vào hạ bì (các hình vẽ Fig.4D và Fig.5D).

Tác dụng hiệp đồng của việc dùng kết hợp axit hyaluronic và lợi khuẩn LPC-S01 DSM 26760 không thể dự đoán được cho biết rằng không phải axit hyaluronic đơn lẻ cũng không phải lợi khuẩn được dùng đơn lẻ có khả năng làm giảm “sự giải phóng” biểu bì ra khỏi hạ bì và do đó, không thể duy trì cấu trúc vật lý của da.

II.A.3.3. Kết quả định lượng IL-1 β

IL-1 β được định lượng ở 4 giờ đối với chế phẩm theo sáng chế P3, bao gồm chủng sống được và axit hyaluronic, đối với đối chứng âm tính và đối chứng dương tính (bảng 3). Các kết quả không thể được xem là dữ liệu định lượng cho biết rằng tính hiệu thấp hơn giới hạn phát hiện của kit (giới hạn 3,91 Pg / mL). Các kết quả thu được cho biết xu hướng tổng thể.

	NC	PC	P3a
IL-1 β (pg/ml)	2,12	2,74	1,84

Bảng 3

II.A.4. Kết luận

Mô hình thử nghiệm trên T-skinTM (da dày đầu đủ) dựa trên các con đường viêm do UVA + UVB (liều 1 MED) gây ra được sử dụng để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm theo sáng chế P3 và P3-i, bao gồm chủng vi khuẩn LPC-S01 DMS 26760 (lần lượt sống được hoặc bất hoạt) và axit hyaluronic, khi được dùng trước khi kích ứng ứng suất tác nhân gây viêm (xử lý sơ bộ).

Chế phẩm theo sáng chế P3 (chủng sống được + HA) và P3-i (chủng bất hoạt + HA) có hiệu quả tốt trong việc làm giảm sự chuyển đoạn NF κ B trong thời gian xử lý sơ bộ kéo dài (16 giờ).

Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế P3 (chủng sống được + HA) thể hiện khả năng bảo vệ tốt cấu trúc của lớp tiếp giáp da-biểu bì không bị tia cực tím trong nghiên cứu hình thái mô học bằng cách nhuộm H&E.

II.B. Mô hình viêm B đối với chủng bất hoạt

Mô hình thử nghiệm trên T-skinTM (da dày đầy đủ) dựa trên các con đường viêm do UVA + UVB (liều 1 MED) gây ra được sử dụng để đánh giá hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế P3-i, bao gồm chủng vi khuẩn bất hoạt LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic, được dùng cho mô bị tổn thương trước hoặc sau khi kích ứng ứng suất tác nhân gây viêm (xử lý sơ bộ hoặc sau xử lý bằng bức xạ tia cực tím).

Chế phẩm sẽ được phân tích (xem II.B.1) được đánh giá bằng cách sử dụng nồng độ cao của chủng vi khuẩn bất hoạt sẽ được phân tích (10^7 hoặc 10^9 tế bào/mô) với mục đích khai thác ứng dụng tiềm ẩn của chúng và hiệu quả trên mô hình tác nhân gây viêm T-Skin theo 2 giao thức:

B.I. Giao thức xử lý sơ bộ: T-skin được mài mòn thông qua ứng suất cơ học trên bề mặt biểu bì và được xử lý sơ bộ trong 45 phút hoặc 4 giờ bằng chế phẩm sẽ thử nghiệm, sau đó đưa vào bức xạ UVA và UVB (1 MED). 4 giờ sau bức xạ (sau khi ủ), mô được thu gom để phân tích.

B.II. Giao thức sau xử lý: T-skin được mài mòn bằng ứng suất cơ học trên bề mặt biểu bì và được đưa vào bức xạ UVA và UVB (1 MED), sau đó được xử lý trong 45 phút hoặc 4 giờ bằng chế phẩm sẽ thử nghiệm và thu gom ngay để phân tích.

Mục đích của nghiên cứu là để nghiên cứu hiệu quả của chủng vi khuẩn để phân tích bị bất hoạt ở liều cao (riêng hoặc trộn với HA) để điều biến sự kích ứng và chuyển đoạn NFkB trong nhân.

II.B.1. Chế phẩm sẽ được phân tích và đối chứng.

- P3-i.-10⁹: LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt (10⁹ tế bào/mô) được tạo huyền phù lại trong kem trên axit hyaluronic (xem I.2.1.), tương ứng với chế phẩm cuối cùng 30%;
- P3-i.-10⁷: LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt (10⁷ tế bào trên mô) được tạo huyền phù lại trong kem trên axit hyaluronic (xem I.2.1.), tương ứng với chế phẩm cuối cùng 0,03%;
- Đối chứng dương tính (PC): mô được xử lý bằng dung dịch nước muối NaCl 0,9%, được mài mòn và được tiếp xúc với bức xạ tia cực tím.
- Đối chứng âm tính (NC): mô được xử lý bằng dung dịch nước muối NaCl 0,9% mà không tiếp xúc với bức xạ tia cực tím.

P3-i. (chủng bất hoạt + HA) được tạo ra bằng cách tạo huyền phù lại hàm lượng viên nang chứa chủng vi khuẩn đông khô (CFU 10⁹) trong dung dịch nước muối và ủ ở 85°C trong 1 giờ. Sau khoảng thời gian này, vi khuẩn được ly tâm và viên được tạo huyền phù trong 13 ml kem trên axit hyaluronic.

II.B.2. Thiết kế nghiên cứu

II.B.2.1. Tạo ra chế phẩm sẽ được phân tích

Chủng bất hoạt sẽ được phân tích ở dạng đông khô có số lượng tế bào là 2 * 10¹¹ tế bào/g bột được cân trọng lượng và được tạo huyền phù lại trong dung môi hiệu chỉnh như sau:

- 2 g trong 4 ml kem trên HA (xem I.2.1.), thu được P3-10⁹. 10⁹ vi khuẩn/mô được phủ bằng cách áp dụng 15 µL huyền phù.

- 0,02 g trong 4 ml kem trên HA (xem I.2.1.), thu được $P3-10^7 \cdot 10^7$ vi khuẩn/mô được phủ bằng cách áp dụng 15 μ L huyền phù.

II.B.2.2. Kích ứng và xử lý tác nhân gây viêm T-skin

II.B.2.2.1. Giao thức xử lý sơ bộ

Mô hình thử nghiệm được tổng kết trên Fig.8: vào ngày thử nghiệm, mô được làm tổn thương bằng ứng suất cơ học không đáng kể (kỳ Algerbrush $n = 2$) và được xử lý bằng 15 μ L chế phẩm phân tích (P3-i.) mà được áp dụng trực tiếp và đồng nhất cho mô T-SkinTM và ủ trong 45 phút hoặc 4 giờ.

Tiếp theo, mô được bức xạ bằng 1 MED (tương đương với 0,025 J/cm²), trong PBS, sử dụng bộ kích thích năng lượng mặt trời Oriel 1KW với đèn hồ quang xenon và bộ lọc ban đỏ bức xạ WG320 [mW/cm²], (0,035 mW/cm², theo giấy phép hiệu chuẩn số 16121 do Opto.Cal GmbH cấp). Sau khi kích ứng tác nhân gây viêm, mô được ủ sau trong điều kiện nội cân bằng trong 4 giờ và sau đó được cố định trong formalin và được hợp nhất trong parafin (FFPE) để nhuộm miễn dịch NF κ B. Mô cũng được thu gom để phân tích RT-qPCR tiếp theo. Thu gom vật mang và lưu trữ ở -20°C.

II.B.2.2.2. Giao thức sau xử lý

Mô hình thử nghiệm được tổng kết trên Fig.9: vào ngày thử nghiệm, mô được làm tổn thương bằng ứng suất cơ học không đáng kể (kỳ Algerbrush $n = 2$) và được bức xạ bằng 1 MED (tương đương với 0,025 J/cm²), trong PBS. Sau khi kích ứng tác nhân gây viêm, mô được xử lý bằng 15 μ L chế phẩm sẽ được phân tích và ủ trong 45 phút hoặc 4 giờ. Ngay sau khi xử lý, mô được thu gom và được cố định trong formalin để nhuộm miễn dịch NF κ B. Mô cũng được thu gom để phân tích RT-qPCR hơn nữa.

II.B.3. Kết quả nhuộm miễn dịch NF κ B

Bảng 4 dưới đây thể hiện kết quả chuyển đoạn NF κ B (được biểu diễn dưới dạng tổng số lượng nhân được phát hiện trong 3 bản sao sinh học) đối với đối chứng âm tính so với đối chứng dương tính của mỗi giao thức. Như được nêu trong bảng 4, việc kích ứng mô hình tác nhân viêm được xác nhận bằng cách gia tăng chuyển đoạn NF κ B trong nhân tế bào trong các mẫu được bức xạ so với đối chứng âm tính.

Tuy nhiên, trong mẻ T-skin này, sự hoạt hoá NFκB sớm hơn được quan sát sau khi bức xạ, mặc dù quan sát được đoạn chuyển tại mỗi thời điểm. Cụ thể, sự kích ứng NFκB lớn nhất được quan sát 45 phút sau khi bức xạ.

Giao thức được làm thích ứng được dựa trên phép đọc sau bức xạ tia cực tím trong mô hình sau xử lý và đọc sau ủ trong mô hình xử lý sơ bộ, cho biết rằng mục đích là để đánh giá hiệu quả của sản phẩm khi thu hồi từ quy trình viêm cấp tính.

Đối chứng âm tính	0
Đối chứng dương tính 45 phút xử lý sơ bộ + 4 giờ sau khi ủ tia cực tím	7
Đối chứng dương tính 4 giờ xử lý sơ bộ + 4 giờ ủ tia cực tím	5
Đối chứng dương tính 45 phút sau bức xạ tia cực tím	9
Đối chứng dương tính 4 giờ sau bức xạ tia cực tím	4

Bảng 4

A) 45 phút xử lý sơ bộ

Trong bảng 5, phép phân tích bán định lượng của đoạn chuyển nhân NFκB (được biểu diễn dưới dạng tổng số lượng nhân được phát hiện trong tất cả các bản sao sinh học) được thể hiện trong 45 phút xử lý sơ bộ + 4 giờ ủ sau bức xạ tia cực tím.

Đối chứng âm tính	NC	0
Đối chứng dương tính	PC	7
chủng bất hoạt 10^9 + HA *	P3-i.(10^9)	1
chủng bất hoạt 10^7 + HA *	P3-i.(10^7)	5

Bảng 5. *chế phẩm theo sáng chế

B) 4 giờ xử lý sơ bộ

Trong bảng 6, phép phân tích bán định lượng của đoạn chuyển nhân NFκB (được biểu diễn dưới dạng tổng số lượng nhân được phát hiện trong tất cả các mẫu sinh học) được thể hiện trong 4 giờ xử lý sơ bộ + 4 giờ ủ sau bức xạ tia cực tím.

Đối chứng âm tính	NC	0
Đối chứng dương tính	PC	5

chủng bất hoạt $10^9 + HA^*$	P3-i.(10^9)	1
chủng bất hoạt $10^7 + HA^*$	P3-i.(10^7)	2

Bảng 6. *chế phẩm theo sáng chế

Phân tích kết quả của bảng 5 và 6:

- Khi áp dụng dưới dạng xử lý sơ bộ, chế phẩm P3-i., chứa chủng bất hoạt LPC-S01 DMS 26760 và axit hyaluronic, có khả năng làm giảm đoạn chuyển NFκB trong nhân, cho biết hiệu quả ngăn ngừa trong việc bảo vệ da khỏi bị ứng suất viêm do tia cực tím gây ra.
- Ở nồng độ 10^9 chủng, trong mô hình xử lý sơ bộ 45 phút, chế phẩm P3-i. (chủng bất hoạt+HA) có thể làm giảm nhiều đoạn chuyển NFκB trong nhân cho biết tác dụng hiệp đồng và/hoặc hiệu quả cao giữa chủng LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt và axit hyaluronic.
- Mô đáp ứng với giao thức xử lý sơ bộ của chế phẩm P3-i.(10^9) và P3-i.(10^7) ở 2 nồng độ khác nhau của LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt cho biết cơ chế đáp ứng liều: nhận ở vị trí NFκB ít hơn được phát hiện ở nồng độ chủng gia tăng trong chế phẩm.

C) 45 phút sau xử lý

Trong bảng 7, phép phân tích bán định lượng của đoạn chuyển trong nhân của NFκB (được biểu diễn dưới dạng tổng số lượng nhân được phát hiện trong tất cả các mẫu sinh học) được thể hiện trong 45 phút xử lý sơ bộ sau khi bức xạ tia cực tím.

Đối chứng âm tính	NC	0
Đối chứng dương tính	PC	9
chủng bất hoạt $10^9 + HA^*$	P3-i.(10^9)	3
chủng bất hoạt $10^7 + HA^*$	P3-i.(10^7)	0

Bảng 7. *chế phẩm theo sáng chế

D) 4 giờ sau xử lý

Trong bảng 8, phép phân tích bán định lượng của đoạn chuyển trong nhân của NFκB (được biểu diễn dưới dạng tổng số lượng nhân được phát hiện trong tất cả các mẫu sinh học) được thể hiện trong 4 giờ xử lý sơ bộ sau khi bức xạ tia cực tím.

Đối chứng âm tính	NC	0
Đối chứng dương tính	PC	4
chủng bất hoạt $10^9 + \text{HA}^*$	P3-i.(10^9)	1
chủng bất hoạt $10^7 + \text{HA}^*$	P3-i.(10^7)	9

Bảng 8. *chế phẩm theo sáng chế

- Chế phẩm P3 (chủng bất hoạt + HA) đã chứng minh việc phục hồi nhanh chóng và hữu hiệu của mức cơ sở NFkB, cụ thể là trong thời gian ngắn (khi đáp ứng viêm ở mức đối đa của nó), cho biết tác dụng/hiệu quả hiệp đồng cải thiện trong tổ hợp của chủng bất hoạt LPC-S01 DMS 26760 + axit hyaluronic để khôi phục tính nội cân bằng của mô bị viêm.

II.B.4. Kết luận

Các kết quả này xác nhận rằng chế phẩm P3-i chứa tổ hợp của LPC-S01 DMS 26760 bất hoạt + axit hyaluronic có hiệu quả trong cả các điều kiện nội cân bằng (xem phần I.2.) và trong điều kiện viêm da (ví dụ do bức xạ tia cực tím gây ra), cụ thể là trong giai đoạn viêm cấp tính cho biết rằng nó đặc biệt hiệu quả trong thời gian ngắn của quá trình phát triển viêm.

Phần thử nghiệm (2)

Đánh giá sự bám dính của *Cutibacterium acnes* DSM 1897 vào mô hình “da dày đầy đủ” 3D với sự có mặt của theo sáng chế (chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 và axit hyaluronic)

1. Mục đích của nghiên cứu.

Mục đích của nghiên cứu là để đánh giá khả năng của chủng lợi khuẩn *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, riêng và/hoặc kết hợp với axit hyaluronic (HA), chống lại sự dính bám *in-vitro* của *C. acnes* vào mô hình “da dày đầy đủ”.

Cutibacterium acnes (viết tắt là *C. acne*, cũng đã biết dưới dạng *Propionibacterium acnes* hoặc *P. acne* (Douglas et Günter, 1946)) là vi khuẩn kỵ khí Gram dương phát triển chậm có liên quan đến các bệnh da nhất định, như mụn trứng cá; nó cũng có thể là nguyên nhân gây viêm mí mắt và viêm nội nhãn.

Để đánh giá các tình trạng nhiễm trùng khác nhau xảy ra, mô hình cạnh tranh và mô hình loại trừ được thực hiện, dựa trên sự thích ứng của phương pháp được mô tả bởi Coman et al. năm 2015.

2. Mô hình thử nghiệm.

Chủng *C. acnes* DSM 1897 được sử dụng để kích thích nhiễm trùng trong mô hình “da dày đầy đủ” 3D, trong tổng số 30 mẫu lồng vào, được mua từ Phenion (Henkel).

Các thử nghiệm được thực hiện trong các điều kiện xử lý khác nhau, được liệt kê dưới đây:

- 1) không xử lý, để đánh giá khả năng bám dính hữu hiệu của *C. acnes* DSM1897 trong 2 mô hình loại trừ và cạnh tranh;
- 2) xử lý ngăn ngừa hoặc đồng thời bằng *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 trong 24 giờ;
- 3) xử lý ngăn ngừa hoặc đồng thời bằng axit hyaluronic 0,5% trong 24 giờ (Sigma-Aldrich 41897);
- 4) xử lý ngăn ngừa hoặc đồng thời bằng hỗn hợp đồng nhất chứa axit hyaluronic và *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 trong 24 giờ;
- 5) xử lý ngăn ngừa hoặc đồng thời bằng benzoyl peroxit trong 24 giờ (Benzac 10%, đối chứng dương tính).

Huyền phù chứa chủng *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 được tạo ra và đặt 50 µl huyền phù này tiếp xúc với bề mặt của mô lồng vào.

Huyền phù chứa axit hyaluronic 0,5% được tạo ra và đặt 50 µl huyền phù này tiếp xúc với mô lồng vào.

Hơn nữa, 50 µl chủng *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 được trộn với 0,25 mg axit hyaluronic để thu được chế phẩm tổ hợp chứa lợi khuẩn + axit hyaluronic, ở cùng một nồng độ axit hyaluronic (0,5%) và ở cùng một lượng ban đầu được sử dụng để thử nghiệm với các cơ chất riêng rẽ.

50 µl gel Benzac 10% (benzoyl peroxit) được đặt tiếp xúc với mô lồng vào làm đối chứng dương tính.

Tất cả 5 điều kiện được liệt kê trên đây được thử nghiệm hai lần và 10 mô lồng vào được ủ trong 24 giờ ở 37°C với sự có mặt của CO₂.

2.a. Thực hiện thử nghiệm loại trừ

Thử nghiệm loại trừ được thực hiện để xử lý sơ bộ mô lỏng vào bằng chủng lợi khuẩn (hoặc bằng axit hyaluronic hoặc bằng hỗn hợp của cả hai), việc lây nhiễm tiếp theo với mầm bệnh và xác nhận tiếp theo về mức giảm có thể xảy ra về % bám dính của mầm bệnh vào mô lỏng vào so với điều kiện lây nhiễm lý tưởng (mô hình điều trị lợi khuẩn ngăn ngừa *in-vitro*).

2.b. Thực hiện thử nghiệm cạnh tranh

Thử nghiệm cạnh tranh để xử lý đồng thời mô lỏng vào bằng chủng lợi khuẩn (hoặc bằng axit hyaluronic hoặc bằng hỗn hợp của cả hai) và bằng mầm bệnh và xác nhận tiếp theo về mức giảm có thể xảy ra theo % bám dính của mầm bệnh vào mô lỏng vào so với điều kiện lây nhiễm lý tưởng (mô hình xử lý lợi khuẩn *in-vitro* trong quá trình lây nhiễm).

3. Kết quả

3.1 Thử nghiệm loại trừ

Fig.10 thể hiện mức giảm khả năng sống của mầm bệnh *C. acnes* DMS1897 được biểu diễn theo Log10 CFU, trong khi bảng 9 thể hiện cùng một tình trạng như mức giảm theo tỷ lệ phần trăm (%) về khả năng sống của mầm bệnh trong các điều kiện được thử nghiệm khác nhau.

Điều kiện thử nghiệm	% giảm mầm bệnh
LPC-S01	19,1
LPC-S01 + axit hyaluronic	19,5
Axit hyaluronic	0,8
Benzac	17,0

Bảng 9

Như có thể nhìn thấy được từ kết quả được báo cáo, việc xử lý được thực hiện bằng Benzac 10%, LPC-S01 DSM 26760 và tổ hợp của LPC-S01 DSM 26760 với sự có mặt của axit hyaluronic 0,5% làm giảm khả năng sống của *C. acnes* DSM1897 khoảng 1,0-1,4 Log10, tương ứng với mức giảm khoảng 20% khả năng sống của mầm bệnh. Việc xử lý bằng axit hyaluronic 0,5% riêng lẻ dường như không có khả năng làm giảm khả năng sống của mầm bệnh đến phạm vi bất kỳ.

3.2. Thử nghiệm cạnh tranh

Fig.11 và bảng 10 thể hiện các sơ đồ về lượng sống được, được biểu diễn dưới dạng mức giảm theo lôgarit logCFU của *C. acnes* DSM1897 trên mô lông vào, trị số trung bình thu được đối với hai bản sao của mỗi điều kiện thử nghiệm và dưới dạng mức giảm theo tỷ lệ phần trăm thu được trong thử nghiệm cạnh tranh.

Điều kiện thử nghiệm	% giảm mầm bệnh
LPC-S01	18,0
LPC-S01 + axit hyaluronic	17,3
Axit hyaluronic	0,0
Benzac	15,3

Bảng 10

Dựa vào các dữ liệu được thể hiện, người ta đã giả định rằng việc xử lý được thực hiện bằng Benzac 10%, LPC-S01 DSM 26760 và tổ hợp của LPC-S01 DSM 26760 với sự có mặt của axit hyaluronic 0,5% làm giảm khả năng sống của *C. acnes* DSM1897 khoảng 1,0-1,3 Log₁₀ CFU. Như với thử nghiệm loại trừ, việc xử lý bằng axit hyaluronic 0,5% riêng lẻ dường như không có khả năng làm giảm khả năng sống của mầm bệnh.

4. Kết luận

Tất cả thử nghiệm *in-vitro* được thực hiện đã chứng minh hiệu quả của đối chứng dương tính Benzac 10% trong việc ngăn ngừa sự lây nhiễm bởi *C. acnes*, với % giảm khả năng sống của quần thể mầm bệnh khoảng từ 15% đến 23%.

Các thử nghiệm loại trừ và cạnh tranh đã thể hiện rằng việc xử lý được thực hiện với tổ hợp của LPC-S01 + axit hyaluronic 0,5% (chế phẩm theo sáng chế) làm giảm sự lây nhiễm bởi *C. acnes* DSM1897 khoảng từ 18 đến 19%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bao gồm:

- hỗn hợp M chứa hoặc, theo cách khác, chỉ chứa:

(I) chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết dưới dạng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 và được lưu trữ ở Bộ sưu tập vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức GmbH (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* -DSMZ) dưới số truy cập DSM 26760, và

(II) axit hyaluronic hoặc muối của nó;

và tùy ý, chế phẩm này bao gồm

- ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dụng hoặc loại dùng trong mỹ phẩm hoặc thực phẩm.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 là chủng vi khuẩn sống được.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 là chủng vi khuẩn được làm bất hoạt bằng nhiệt hoặc được thanh trùng nhiệt theo phương pháp Tyndall hoặc được siêu âm hoặc được chiếu xạ gama; tốt hơn là được làm bất hoạt bằng nhiệt.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng khu trú ngoài da, tốt hơn là ở dạng kem hoặc mặt nạ.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường miệng, tốt hơn là ở dạng huyền phù hoặc chế phẩm để tạo huyền phù dùng ngay.

6. Chế phẩm bao gồm:

- hỗn hợp M chứa, hoặc theo cách khác, chỉ chứa:

(I) chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết dưới dạng

Lactobacillus paracasei LPC-S01 và được lưu trữ ở Bộ sưu tập vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức GmbH (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* -DSMZ) dưới số truy cập DSM 26760, và

(II) axit hyaluronic hoặc muối của nó;

và tùy ý, chế phẩm này bao gồm

- ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dụng hoặc loại dùng trong mỹ phẩm hoặc thực phẩm,

trong đó chế phẩm này dùng để làm thuốc.

7. Chế phẩm bao gồm:

- hỗn hợp M chứa, hoặc theo cách khác, chỉ chứa:

(I) chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết dưới dạng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 và được lưu trữ ở Bộ sưu tập vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức GmbH (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* -DSMZ) dưới số truy cập DSM 26760, và

(II) axit hyaluronic hoặc muối của nó;

và tùy ý, chế phẩm này bao gồm

- ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dụng hoặc loại dùng trong mỹ phẩm hoặc thực phẩm,

trong đó chế phẩm này để sử dụng trong phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị viêm và/hoặc nhiễm trùng da hoặc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan, trong đó phương pháp điều trị này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng chế phẩm này.

8. Chế phẩm bao gồm:

- hỗn hợp M chứa, hoặc theo cách khác, chỉ chứa:

(I) chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei* được nhận biết dưới dạng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 và được lưu trữ ở Bộ sưu tập vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức GmbH (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* -DSMZ) dưới số truy cập DSM 26760, và

(II) axit hyaluronic hoặc muối của nó;

và tùy ý, chế phẩm này bao gồm

- ít nhất một chất phụ gia và/hoặc tá dược được dụng hoặc loại dùng trong mỹ phẩm hoặc thực phẩm,

trong đó chế phẩm này để sử dụng trong phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị tổn thương gây ra cho da do:

- bức xạ tia cực tím; và/hoặc

- điều kiện thời tiết bất lợi đối với da, cụ thể là do ánh nắng mặt trời, thời tiết lạnh hoặc gió; và/hoặc

- điều kiện sống bất lợi đối với da, cụ thể là ô nhiễm, khói thuốc hoặc tiêu thụ rượu; và/hoặc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan, trong đó phương pháp điều trị này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng chế phẩm này.

9. Mỹ phẩm dùng khu trú ngoài da chứa chế phẩm như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó mỹ phẩm này dùng để:

- duy trì tính nội cân bằng của da, và/hoặc

- làm tác nhân chống lão hoá da.

1/10

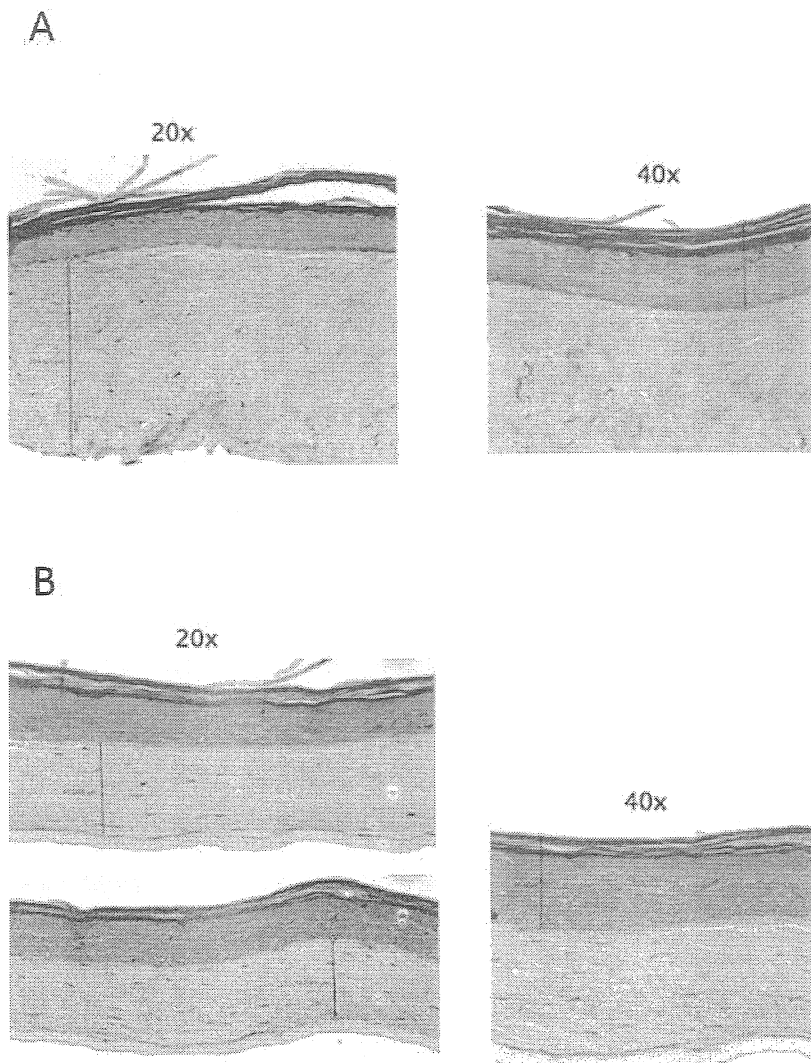
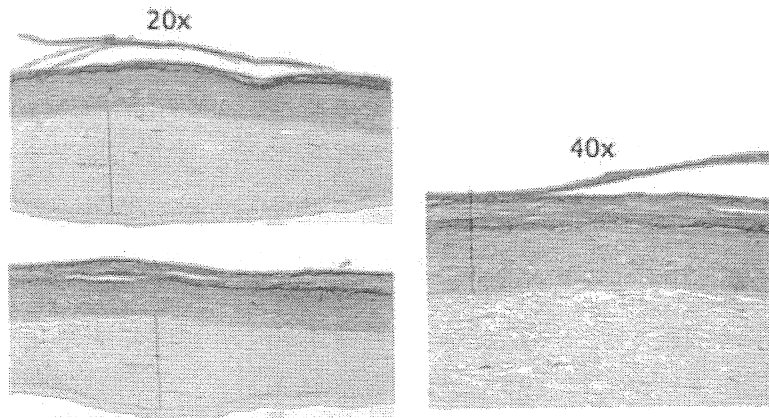


Fig. 1

2/10

A



B

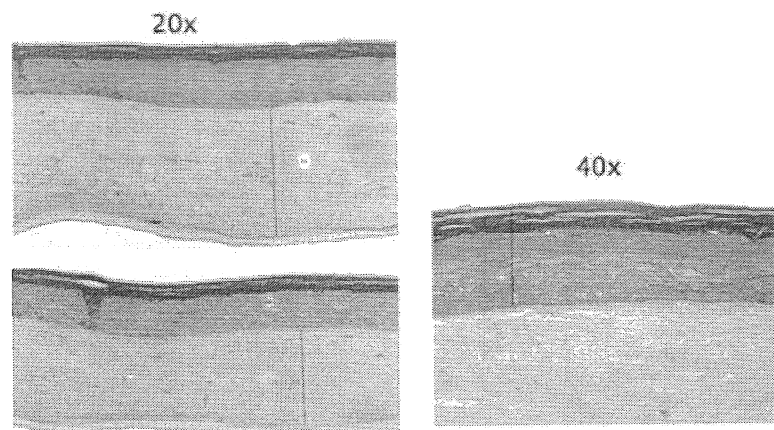


Fig. 2

3/10

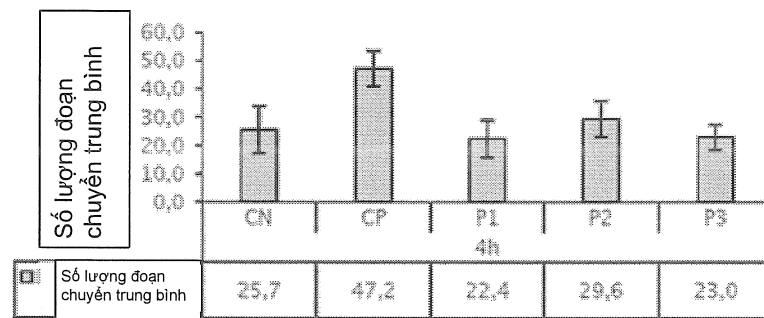


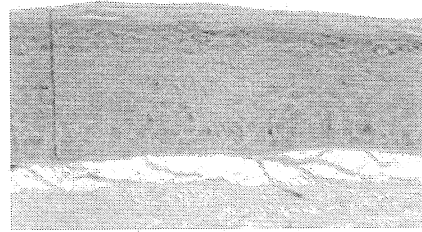
Fig. 3

4/10

A



B



C



D

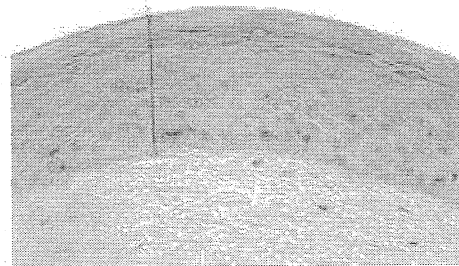
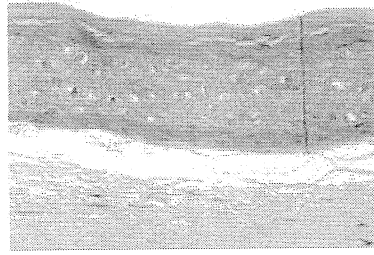


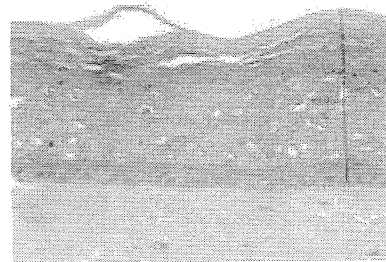
Fig. 4

5/10

A



B



C



D

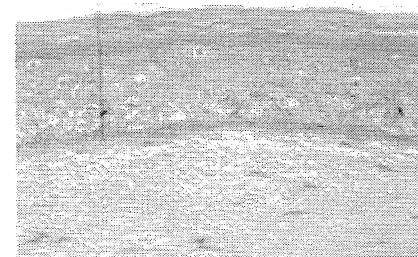


Fig. 5

6/10

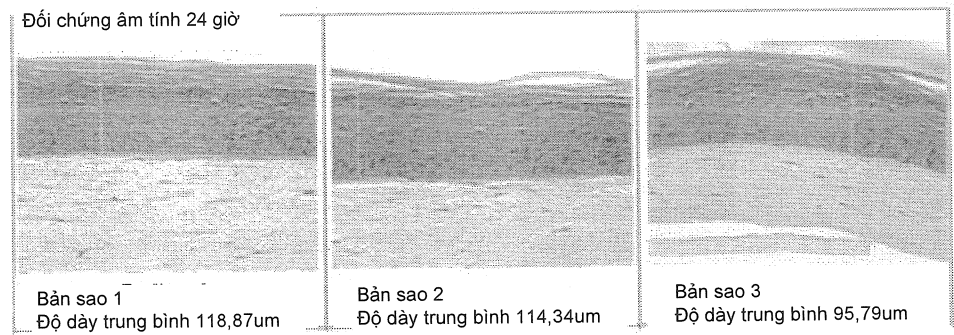


Fig 6a

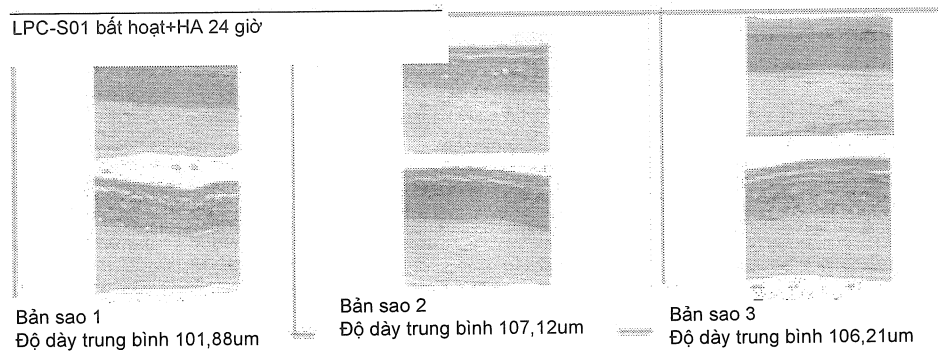


Fig. 6b

7/10

Đối chứng âm tính 48 giờ

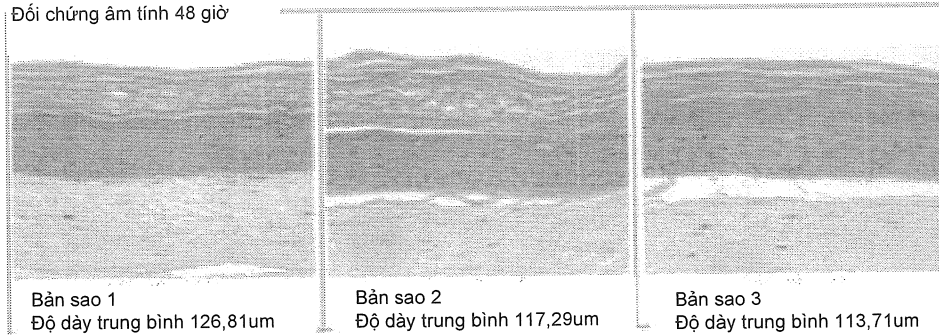


Fig. 6c

LPC-S01 bất hoạt+HA 48 giờ

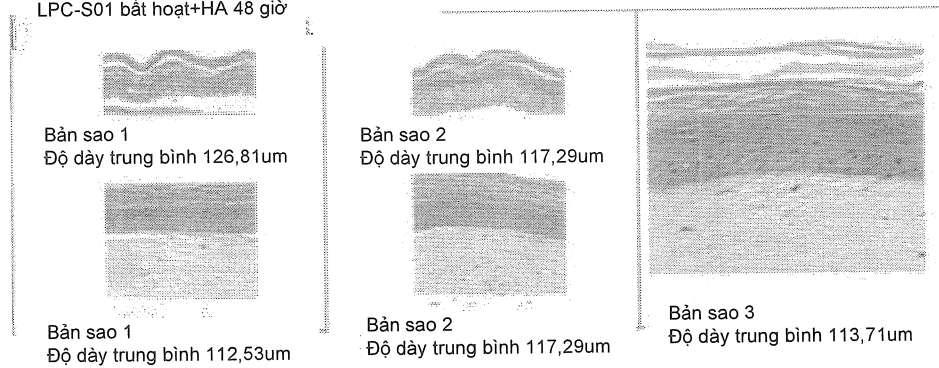


Fig. 6d

8/10

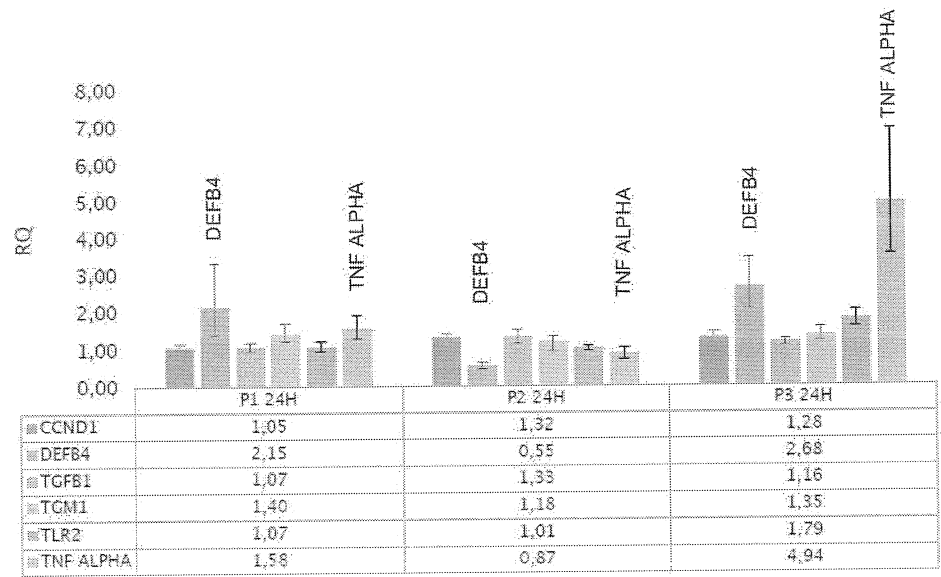


Fig. 7

9/10

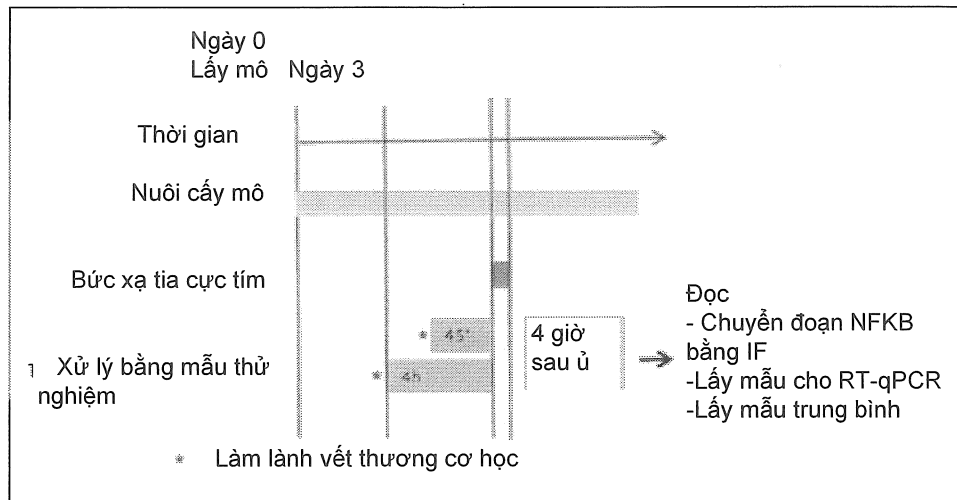


Fig. 8

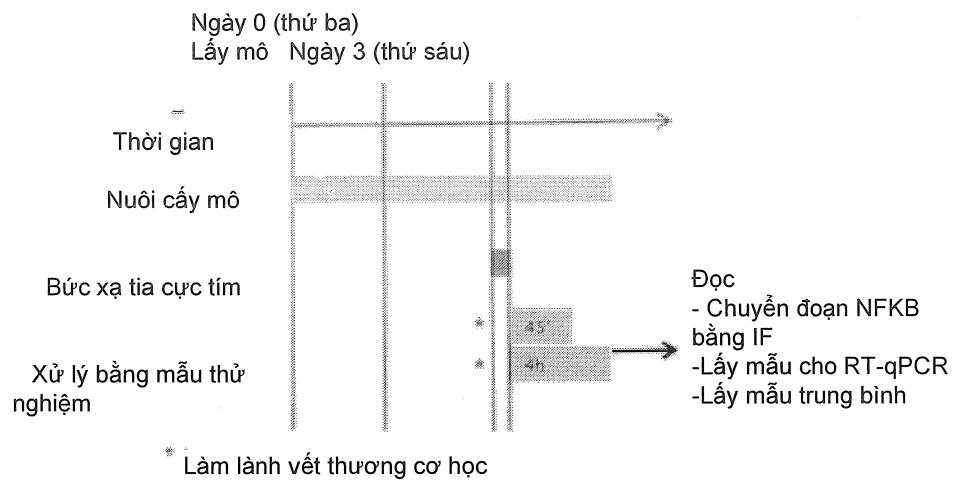


Fig. 9

10/10

Mức giảm lượng *C.acnes* sống được

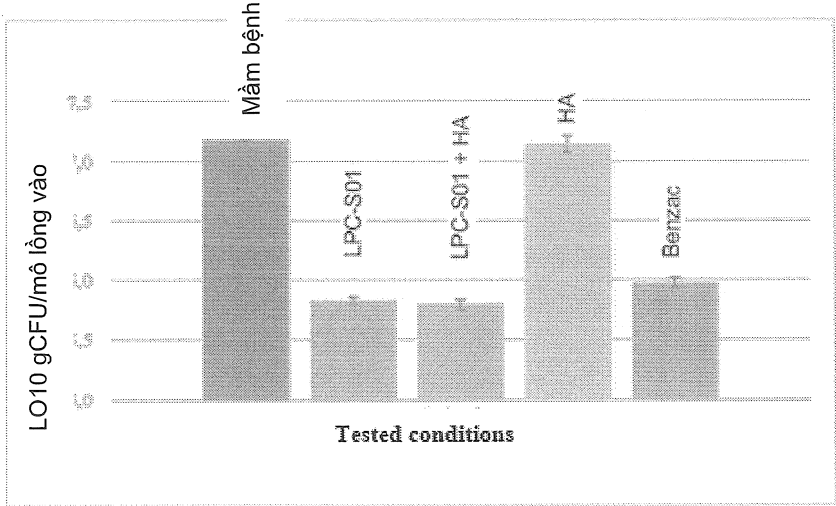


Fig 10

Mức giảm lượng *C.acnes* sống được

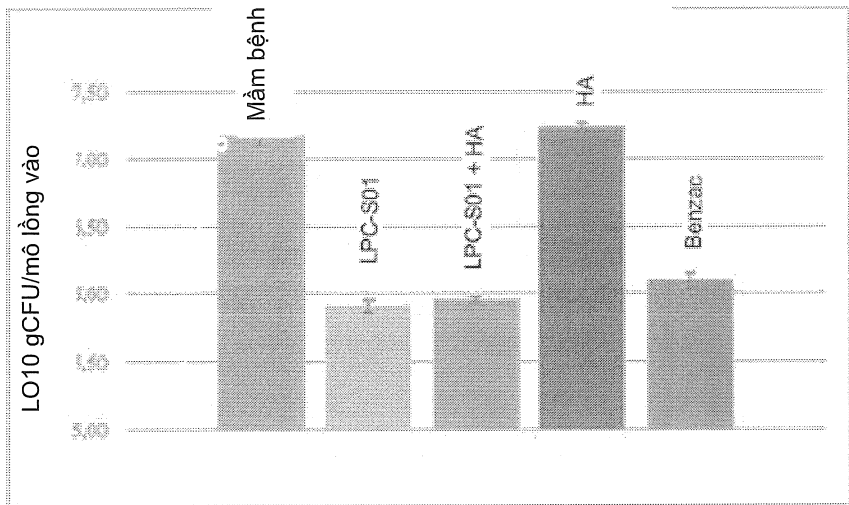


Fig. 11