



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

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



1-0053587

(51)^{2020.01} **A61K 35/74; A61P 17/00; A61Q 19/00;** (13) **B**
A61K 8/99

(21) 1-2020-03601	(22) 06/12/2018
(86) PCT/IB2018/059694 06/12/2018	(87) WO2019/111189 13/06/2019
(30) 102017000141330 06/12/2017 IT	
(45) 25/11/2025 452	(43) 25/12/2020 393A
(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 VI SINH VẬT CÓ LỢI

(21) 1-2020-03601

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* DSM26760 để làm giảm tình trạng tổn thương da và/hoặc tác động do/liên quan đến tác động của vi khuẩn *P. acnes*; cũng như chế phẩm chứa hỗn hợp của các vi sinh vật có lợi cho da, trong đó các vi sinh vật có lợi bao gồm chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* DSM26760 để điều trị rối loạn và/hoặc bệnh lý viêm ảnh hưởng đến da để làm giảm và/hoặc điều trị triệu chứng và/hoặc tác động liên quan đến rối loạn/bệnh lý này và/hoặc tăng cường quá trình lành vết thương và/hoặc quá trình tái tạo cấu trúc biểu mô và/hoặc quá trình liền sẹo.

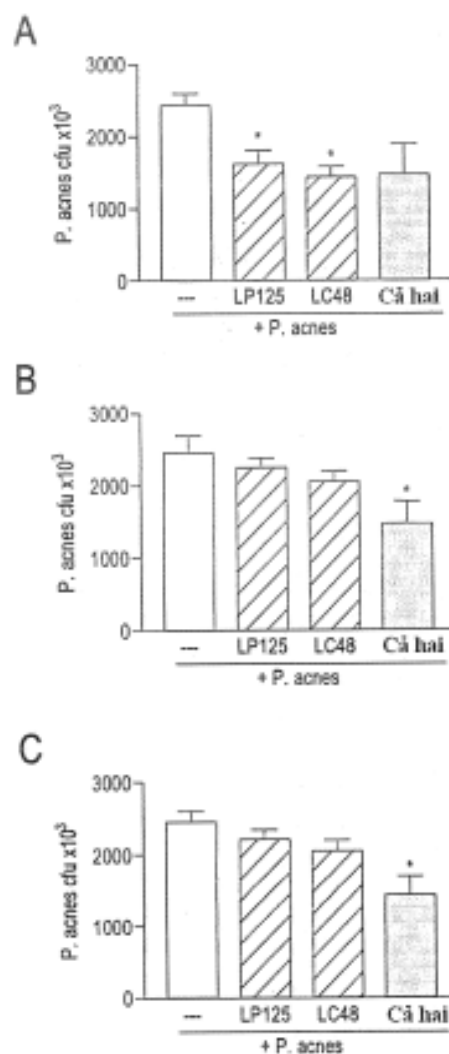


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi sinh vật có lợi, tốt hơn nếu chế phẩm này chứa vi khuẩn có lợi, cụ thể là vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus*, để sử dụng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn ảnh hưởng đến da, cụ thể là bệnh viêm, cụ thể hơn là bệnh viêm da tự miễn, như bệnh viêm da cơ địa. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế hữu ích để phòng ngừa và/hoặc làm giảm tình trạng tổn thương gây ra bởi bức xạ UV, cụ thể là tình trạng lão hóa da.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Da người thường tích tụ nhiều vi sinh vật. Trước đây, các vi sinh vật này được cho nguồn lây nhiễm tiềm tàng, nhưng ngược lại ngày nay hệ vi sinh vật ở người, cũng như hệ vi sinh vật ở da được cho là có các chức năng quan trọng và hữu ích cho vật chủ, do hệ vi sinh vật này có cả khả năng chống lại quá trình bám dính và phát triển của các tác nhân bệnh trên da, lẫn khả năng liên kết và tương tác với hệ miễn dịch. Khi rối loạn hệ vi sinh vật xuất hiện ở da, thì các vi sinh vật có lợi có thể đóng vai trò là tác nhân điều hòa và phục hồi cân bằng hệ vi sinh vật ở da.

Trong thập kỷ qua, việc sử dụng các phương pháp mới đã tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân loại hệ vi sinh vật ở da bao gồm quần thể vi khuẩn có thể lên tới khoảng 1010 loài vi sinh vật thuộc trên 25 ngành, phổ biến nhất là *Actinobacteria*, *Firmicutes*, và *Proteobacteria*. Các bệnh về da khác nhau thường liên quan đến các tình trạng biến đổi hệ vi sinh vật ở da.

Ví dụ, trong trường hợp của bệnh viêm nang lông, *P. acnes* được xem là vi khuẩn gây bệnh chính; thực tế là trong tình trạng bệnh lý này, quá trình sản sinh tăng tiết bã nhờn tạo ra môi trường sinh trưởng tối ưu cho vi khuẩn này. Phương pháp thông thường để khắc phục tình trạng bệnh lý này là sử dụng các chế phẩm kháng khuẩn, tức là sử dụng chế phẩm diệt khuẩn và kháng sinh qua đường khu trú. Một mặt, kháng sinh chắc chắn có hiệu quả, nhưng mặt khác kháng sinh cũng tiêu diệt vi khuẩn có lợi, gây ra nguy cơ nhạy cảm và tác dụng không mong muốn tiềm tàng, đặc biệt trong trường hợp sử dụng kéo dài kháng sinh phổ rộng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là phát triển chế phẩm chứa vi sinh vật có lợi thể hệ mới, cụ thể là chế phẩm chứa vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus* để phục hồi cân bằng hệ vi sinh vật ở da. Thực tế là, tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng chế phẩm chứa vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng phòng ngừa, hoặc trong trường hợp bất kỳ chế phẩm chứa vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng làm giảm tác động của vi khuẩn gây hại cho da, như *P. acnes*, do đó chế phẩm này có khả năng: 1) góp phần phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn ảnh hưởng đến da; 2) tăng cường quá trình làm lành vết thương thông thường; và 3) tăng cường và/hoặc cải thiện quá trình tái tạo cấu trúc biểu mô và/hoặc quá trình liền sẹo thông thường.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây cùng hình vẽ kèm theo.

Fig.1 là biểu đồ thể hiện mức độ bám dính của *P. acnes* theo tỷ lệ phần trăm của các tế bào sống bám dính. Fig.1A là biểu đồ thể hiện tình trạng kích thích sơ bộ bởi quá trình tiếp xúc của các tế bào sừng với các vi khuẩn có lợi được thử nghiệm; Fig.1B là biểu đồ thể hiện quá trình ủ đồng thời của các tế bào sừng với *P. acnes* và với các vi khuẩn có lợi được thử nghiệm; Fig.1C là biểu đồ thể hiện quá trình ủ của các tế bào sừng với các vi khuẩn có lợi được thử nghiệm, sau khi các tế bào nhân thật này đã được thử thách với tác nhân gây bệnh *P. acnes*, trong đó 100 thể hiện mức độ bám dính của *P. acnes* trong trường hợp không có kích thích bởi các vi sinh vật có lợi, khả năng ức chế của các chủng được thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ % làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* so với mẫu đối chứng dương. Cụ thể là, Fig.1A là biểu đồ thể hiện khả năng của cả hai chủng vi khuẩn có lợi để phòng ngừa tình trạng bám dính của *P. acnes*, theo cùng tỷ lệ % (42% đối với chủng *L. casei* DG[®] và 35% đối với chủng *L. paracasei* LPC-S01). Fig.1B là biểu đồ thể hiện khả năng của chủng *L. casei* DG[®] để làm giảm 17% mức độ bám dính của *P. acnes*, trong khi đó chủng *L. paracasei* LPC-S01 làm giảm 9% mức độ bám dính của *P. acnes*. Hỗn hợp chứa các chủng này có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ bám dính của *P. acnes*, tức là làm giảm 42% mức độ bám dính của *P. acnes*, tỷ lệ phần trăm này cao hơn đáng kể so với tỷ lệ phần trăm quan sát

được đối với cả hai chủng được xem xét riêng biệt và tổng tác dụng của hai chủng này. Fig.1C là biểu đồ thể hiện tác dụng hiệp đồng có ý nghĩa thống kê của hỗn hợp chứa hai vi sinh vật có lợi này, có khả năng làm giảm 42% mức độ bám dính của *P. acnes*. Ngược lại, các vi sinh vật có lợi riêng biệt này có khả năng giảm mức độ bám dính của *P. acnes* thấp hơn một nửa so với khả năng làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* của hỗn hợp chứa hai vi sinh vật có lợi này, 18% đối với chủng *L. casei* DG[®] và 11% đối với chủng *L. paracasei* LPC-S01.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện kết quả định lượng các xytokin IL-10, IL-1 β , IL-8 và TSLP trong các dịch nuôi cấy của các tế bào, được biểu diễn theo đơn vị pg/mL dịch nổi, được xác định bằng thử nghiệm ELISA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi sinh vật có lợi, tốt hơn nếu một hoặc nhiều vi khuẩn có lợi, để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa rối loạn và/hoặc tình trạng bệnh lý, tốt hơn nếu bệnh viêm, ảnh hưởng đến da, tốt hơn nếu bệnh ngoài ra.

Rối loạn và/hoặc bệnh lý ảnh hưởng đến da theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm da, tốt hơn nếu liên quan đến tình trạng kích ứng và/hoặc trầy xước da, bệnh viêm nang lông, bệnh nhiễm trùng, tình trạng viêm da, ban đỏ, vết loét, bệnh vẩy nến, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm tai, vết nứt nẻ, đường rò, bệnh trĩ, và rối loạn hoặc tổn thương da bất kỳ khác có hoặc không có sự xuất hiện của quá trình viêm tiến triển và/hoặc tình trạng kết hợp và/hoặc biến chứng và/hoặc hậu quả của chúng.

Tốt hơn nếu rối loạn và/hoặc bệnh lý ảnh hưởng đến da liên quan đến hoặc gây ra bởi các tác nhân gây bệnh. Tức là, chế phẩm theo sáng chế không chỉ đặc biệt hữu hiệu để phòng ngừa, mà còn hữu hiệu để điều trị bệnh, tức là sau khi thử thách với các tác nhân gây bệnh này.

Theo một khía cạnh ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế cũng có thể hỗ trợ/tạo điều kiện thuận lợi cho/tăng cường/tăng tốc quá trình làm lành vết thương và/hoặc quá trình tái tạo cấu trúc biểu mô và/hoặc quá trình liền sẹo.

Tốt hơn nếu các tác nhân gây bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, vi nấm, nấm men, virus và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn nếu các tác nhân gây bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, và tốt hơn nếu các vi khuẩn gây bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium*, tốt hơn nếu các loài *Propionibacterium acnes*; *Staphylococcus*, tốt hơn nếu *Epidermidis*, *Aureus*, *Warned*, *Pyogenes*, *Mitis* *Corynebacterium ssp*; *Pseudomonas*, tốt hơn nếu *Aeruginosa*; *Acinetobacter*, tốt hơn nếu *Johnsonii*; *Streptococcus*, tốt hơn nếu *Pyogenes*; *Micrococcus ssp.*, và *Brevibacterium ssp.*

Hơn nữa, chế phẩm chứa các vi sinh vật có lợi, tốt hơn nếu một hoặc nhiều vi khuẩn có lợi, như được mô tả chi tiết dưới đây, được chỉ định để bảo vệ da và/hoặc môi và/hoặc kết mạc, chống lại bức xạ UV, bức xạ UV-A và/hoặc bức xạ UV-B. Nói cách khác, chế phẩm này được chỉ định để phòng ngừa và/hoặc làm giảm tình trạng tổn thương và/hoặc tác động do/liên quan đến quá trình tiếp xúc với bức xạ UV, bức xạ UV-A và/hoặc bức xạ UV-B. Tốt hơn nếu chế phẩm này được chỉ định để phòng ngừa và/hoặc làm giảm tình trạng lão hóa da.

Từ góc độ này, chế phẩm chứa các vi sinh vật có lợi, tốt hơn nếu một hoặc nhiều vi khuẩn có lợi, như được mô tả chi tiết dưới đây, có thể được sử dụng làm mỹ phẩm. Tốt hơn nếu chế phẩm này được sử dụng là do tác dụng điều hòa miễn dịch của các vi sinh vật có lợi chứa trong chế phẩm này, tốt hơn nếu các vi sinh vật có lợi như được định nghĩa và mô tả dưới đây. Tác dụng điều hòa miễn dịch này bao gồm tác dụng điều hòa, tốt hơn nếu tác dụng làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất một xytokin được chọn từ nhóm bao gồm xytokin tạo máu, tốt hơn nếu yếu tố sinh trưởng tạo máu và/hoặc CSF; xytokin viêm sơ cấp, tốt hơn nếu IL-1 và/hoặc TNF; xytokin ức chế miễn dịch và/hoặc chống viêm, tốt hơn nếu IL-10 và/hoặc TGF- β ; xytokin viêm thứ cấp (chemokin); xytokin điều hòa đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, tốt hơn nếu IL-2, và hỗn hợp của chúng. Tốt hơn nếu tác dụng điều hòa miễn dịch này bao gồm tác dụng điều hòa, tốt hơn nếu tác dụng làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất một xytokin, được chọn từ nhóm bao gồm IL-1 β , IL-10, IL-8, TSLP và hỗn hợp của chúng.

Về vấn đề này, lưu ý rằng xytokin là polypeptit điều hòa đặc hiệu kháng nguyên đóng vai trò là tín hiệu liên kết giữa các tế bào của hệ miễn dịch và giữa hệ miễn dịch và

các cơ quan và các mô khác nhau. Xytokin được sản sinh bởi các loại tế bào khác nhau và khi được giải phóng trong cơ thể, xytokin gây ra các phản ứng đặc hiệu trong các tế bào lân cận (hiệu ứng cận tiết tố), ở các vùng rất xa (hiệu ứng nội tiết) hoặc trong các vùng sản sinh xytokin (hiệu ứng tự tiết tố). Cụ thể là, xytokin được sản sinh bởi các tế bào của hệ miễn dịch, như interleukin và chemokin, đóng vai trò cơ bản trong điều hòa và hoạt hóa cơ chế bảo vệ và quá trình viêm. Mạng lưới phức hợp của xytokin duy trì cân bằng giữa tác dụng tiền viêm và tác dụng chống viêm. Tình trạng mất cân bằng giữa xytokin tiền viêm và xytokin chống viêm, cũng như quá trình sản sinh không kiểm soát xytokin, có thể gây ra các bệnh viêm, tình trạng dị ứng hoặc tình trạng bệnh lý tự miễn. TSLP (lymphopoietin cơ chất tuyến ức) là protein thuộc họ xytokin và đóng vai trò quan trọng trong quá trình trưởng thành của quần thể tế bào T thông qua quá trình hoạt hóa tế bào biểu hiện kháng nguyên. TSLP chủ yếu được sản sinh bởi các tế bào không tạo máu, như nguyên bào sợi, tế bào biểu mô và các loại tế bào cơ chất khác nhau, và quá trình biểu hiện của TSLP liên quan đến nhiều tình trạng bệnh lý, bao gồm bệnh hen phế quản, bệnh viêm khớp, bệnh viêm da cơ địa, bệnh chàm, bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ái toan và các tình trạng dị ứng khác.

Cụ thể là, tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng khi các tế bào sùng được tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi, thì các vi sinh vật có lợi này có khả năng tạo ra tác dụng điều hòa miễn dịch, như được kiểm chứng từ kết quả đánh giá thử nghiệm xytokin trong dịch nổi tế bào. Cụ thể là, mức độ biểu hiện của IL-1 β , IL-10 và IL-8 được quan sát là được giảm bởi các chủng vi khuẩn có lợi nêu trên được xem xét riêng biệt, cụ thể là bởi chủng *L. paracasei* LPC-S01. Tác dụng duy trì mức độ biểu hiện xytokin xuất hiện rõ ràng hơn sau khi thử thách các tế bào sùng bằng LPS.

Liên quan đến TSLP, quá trình tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi đã làm giảm mức độ biểu hiện của chất chỉ thị này so với mức độ biểu hiện đường nền (của các tế bào sùng không được kích thích bằng chủng vi khuẩn có lợi). Quá trình kích thích sơ bộ các tế bào sùng bằng LPS không dẫn đến làm tăng mức độ biểu hiện của TLSP, là hiện tượng được mong đợi, do đã biết rằng các phân tử còn lại kích thích mạnh hơn đối với các thụ thể tương tự Toll của LPS. Các chủng vi khuẩn có lợi nêu trên, được xem xét riêng biệt và trong hỗn hợp, có tác dụng kiểm soát hữu hiệu quá trình biểu hiện của chất chỉ thị này. Chất chỉ thị này được quan tâm đáng kể, do chất chỉ thị này được biểu hiện quá mức

trong một số tình trạng bệnh lý về da, như bệnh viêm da cơ địa. Hơn nữa, xytokin này được xem là chất điều hòa quan trọng ở mặt phân cách chức năng giữa các tế bào sừng và các tế bào đuôi gai.

Theo một khía cạnh ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế hữu ích trong quá trình làm lành vết thương và/hoặc quá trình tái tạo cấu trúc biểu mô và/hoặc quá trình liền sẹo của da bị tổn thương và/hoặc da bị ảnh hưởng bởi rối loạn.

Do đó, dữ liệu này rõ ràng cho thấy rằng các vi sinh vật có lợi, cụ thể là các chủng được thử nghiệm, có khả năng tạo ra tác dụng chống viêm và/hoặc tác dụng điều hòa miễn dịch trên các tế bào sừng, do đó cũng có khả năng tạo ra tác dụng chống viêm và/hoặc tác dụng điều hòa miễn dịch trên da.

Nhìn chung, xem xét các tác dụng theo sáng chế, chế phẩm chứa các vi sinh vật có lợi theo sáng chế hữu ích để phục hồi cân bằng hệ vi sinh vật ở da.

Thuật ngữ “da” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lớp bảo vệ đầu tiên của cơ thể chống lại môi trường bên ngoài; cụ thể là tác dụng bảo vệ này được thực hiện thông qua tác dụng của các tế bào sừng nằm bên trong lớp da ngoài cùng (biểu bì), ở đó các tế bào sừng này có thể gây bài tiết xytokin và chemokin để truyền thông tin cảnh báo đến các lớp sâu hơn của da, do đó gây ra đáp ứng viêm. Trong quá trình phát triển của chúng, các tế bào sừng di chuyển từ các lớp sâu hơn đến các lớp nông hơn, với tình trạng lắng đọng tiến triển keratin, tạo ra tác dụng bảo vệ cho các tế bào bên dưới.

Thuật ngữ “tình trạng lão hóa da” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình sinh lý hoàn toàn tự nhiên và không thể tránh khỏi xuất hiện ở toàn bộ các cá thể. Theo thời gian, da trải qua các thay đổi cấu trúc gây ra bởi một loạt các yếu tố có nguồn gốc khác nhau, dẫn đến làm mất độ ẩm của da, xuất hiện nếp nhăn, làm mất độ đàn hồi, bệnh á sừng và hình thành vết sắc tố được gọi là “vết đồi mồi”.

Tốt hơn nếu tình trạng lão hóa là tình trạng lão hóa bên trong cơ thể hoặc tình trạng lão hóa theo thời gian chủ yếu phụ thuộc vào yếu tố di truyền hoặc yếu tố bên trong cơ thể. Ngoài ra, tình trạng lão hóa da là tình trạng lão hóa bên ngoài cơ thể hoặc tình trạng lão hóa do yếu tố môi trường - tức là gây ra bởi yếu tố bên ngoài (yếu tố ngoại cảnh).

Nhìn chung, tình trạng lão hóa bên trong cơ thể thường bắt đầu sau 25 tuổi. Tình trạng lão hóa bên trong cơ thể thường bao gồm một loạt các thay đổi thường dẫn đến làm mỏng và/hoặc làm biến dạng cấu trúc da.

Tốt hơn nếu tình trạng lão hóa bên ngoài cơ thể gây ra bởi quá trình thâm nhập của các chất bên ngoài cơ thể và/hoặc các yếu tố môi trường được chọn từ nhóm bao gồm bức xạ UV (gây ra tình trạng lão hóa do ánh nắng mặt trời), hút thuốc, lạm dụng rượu, ô nhiễm môi trường, tiếp xúc liên tục với các chất gây kích ứng và tình trạng kết hợp của chúng.

Tốt hơn nếu tình trạng tổn thương và/hoặc ảnh hưởng do/liên quan đến quá trình tiếp xúc với bức xạ UV được chọn từ nhóm bao gồm ban đỏ, nhiễm sắc tố, bệnh dày sừng, bệnh á sừng, đốm da, cháy nắng, bỏng, tình trạng lão hóa do ánh nắng mặt trời hoặc tổn thương elastin do ánh nắng mặt trời, bệnh đục võ thủy tinh thể, mộng thịt mắt, tái phát mụn rộp ở miệng, tình trạng tổn thương da có bản chất tự nhiên, tốt hơn nếu tình trạng tổn thương môi và/hoặc kết mạc, bệnh u melanin da, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở da, bệnh ung thư biểu mô tế bào nền, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở giác mạc hoặc kết mạc và/hoặc tình trạng kết hợp và/hoặc biến chứng và/hoặc hậu quả của chúng.

Thuật ngữ “phục hồi cân bằng hệ vi sinh vật ở da” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp phục hồi thành phần sinh lý cả về chất và lượng của hệ vi sinh vật ở da, được hiểu là toàn bộ các vi sinh vật có mặt trên da, do đó phục hồi hệ vi sinh vật sinh lý trên da.

Thuật ngữ “thử thách” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thử nghiệm hoặc thử thách hoặc thí nghiệm bất kỳ bao gồm bước lây nhiễm với các loài vi sinh vật khác nhau, sau đó đánh giá mức độ thay đổi tải lượng vi sinh vật, thường bằng cách đếm số lượng của các vi sinh vật sống ở các khoảng thời gian cách đều nhau trên đĩa nuôi cấy.

Theo định nghĩa của FAO và WHO, thuật ngữ “vi sinh vật có lợi” có nghĩa là “vi sinh vật sống khi được sử dụng ở lượng hữu hiệu có khả năng tạo ra tác dụng có lợi cho sức khỏe của vật chủ”. Nói cách khác, khi được sử dụng ở lượng thích hợp, các vi sinh vật có lợi là các vi sinh vật có khả năng tạo ra các chức năng có lợi cho cơ thể.

Tốt hơn nếu vi sinh vật này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, vi nấm, nấm men và hỗn hợp của chúng.

Theo một khía cạnh ưu tiên, vi khuẩn có lợi thuộc ít nhất một chi được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* và *Enterococcus*. Tốt hơn nữa nếu vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactobacillus* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchmeri*, *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 kefiranosfaciens*, *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 hỗn hợp của chúng.

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

Cả hai chủng được phân lập và lưu trữ bởi SOFAR S.p.A., cụ thể là, chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* DG được lưu trữ tại Cơ quan lưu trữ giống và vi sinh vật (CNCM) tại Viện Pasteur, Paris vào ngày 05/05/1995, với mã số lưu trữ là CNCM I-1572. Chủng này ban đầu được gọi là *Lactobacillus casei* DG sub. *casei*.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức, với mã số lưu trữ là DSM26760.

Các chủng này đặc biệt hữu ích để sử dụng theo sáng chế khi các chủng này được sử dụng đồng thời và/hoặc kết hợp, thực tế là các chủng này có tác dụng cộng tính và/hoặc thậm chí tác dụng hiệp đồng.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Bifidobacterium* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. bourn*, *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* và *B. tsurumiense*; tốt hơn nữa nếu được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* và *Bacillus marinus*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Propionibacterium* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* và *P. thoenii*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Streptococcus* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferns*, *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 ratti*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* và *Streptococcus zooepidemicus*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Lactococcus* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* và *L. taiwanensis*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Aerococcus* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaeequi* và *A. urinaehominis*.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, vi khuẩn có lợi thuộc chi *Enterococcus* là ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *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 một khía cạnh ưu tiên khác, nấm men có lợi là nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, tốt hơn nữa nếu các loài *Saccharomyces cerevisiae* và/hoặc *Saccharomyces boulardii*.

Các vi sinh vật, tốt hơn nếu chúng vi khuẩn *L. casei* DG[®] và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, tốt hơn nếu được sử dụng ở dạng sống, tức là các vi sinh vật này được sử dụng làm các vi sinh vật có lợi.

Ngoài ra, các vi sinh vật, tốt hơn nếu chúng vi khuẩn *L. casei* DG[®] và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 được sử dụng dưới dạng các vi sinh vật chết hoặc bất hoạt.

Theo một phương án khác, các vi sinh vật, tốt hơn nếu chúng vi khuẩn *L. casei* DG[®] và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, được sử dụng ở dạng sản phẩm phân giải và/hoặc chiết xuất, tức là các vi sinh vật này được sử dụng làm vi sinh vật có lợi dạng bất hoạt. Ngoài ra, các vi sinh vật, tốt hơn nếu chúng vi khuẩn *L. casei* DG[®] và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, được sử dụng ở dạng sản phẩm vi khuẩn, dịch nổi, dẫn xuất, tốt hơn nếu dẫn xuất vi khuẩn, tốt hơn nếu chất chuyển hóa, sinh phẩm chuyển hóa, sản phẩm quá trình chuyển hóa của vi sinh vật có lợi, thành tế bào và các thành phần của nó, polysacarit ngoại bào, hoặc hợp phân chứa

thành phần miễn dịch, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm ribosom và glycoprotein, dẫn xuất kích thích miễn dịch, như glucan và các polysacarit khác, lipopolysacarit và thành phần bất kỳ của dịch nổi.

Nhìn chung, các vi sinh vật này là các vi sinh vật riêng biệt hoặc hỗn hợp của các vi sinh vật, hoặc quần thể, của các loài vi sinh vật bất kỳ được liệt kê trong danh sách QPS của EFSA.

Trong trường hợp bất kỳ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa loại vi sinh vật bất kỳ, cụ thể là vi khuẩn, có tác động/tác dụng/chức năng có lợi và/hoặc các vi sinh vật như mô tả nêu trên, tốt hơn nếu vi khuẩn, có khả năng khu trú ổn định ở da, ruột và/hoặc các vùng khác của cơ thể, cạnh tranh không gian sống với các vi sinh vật/vi khuẩn gây bệnh và/hoặc tấn công trực tiếp các vi sinh vật/vi khuẩn gây bệnh. Tốt hơn nếu mỹ phẩm và/hoặc được phẩm như mô tả nêu trên chứa hỗn hợp của chủng nêu trên với các vi sinh vật khác như mô tả nêu trên, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, vi nấm, nấm men và hỗn hợp của chúng.

Các vi sinh vật, tốt hơn nếu vi khuẩn, có mặt ở hàm lượng tối thiểu đủ để cho phép khu trú tạm thời ở da, ruột và/hoặc các vùng khác của cơ thể. Tốt hơn nếu hàm lượng này nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{11} đơn vị vi sinh vật, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^9 đơn vị vi sinh vật, tốt hơn nếu hàm lượng này là hàm lượng/liều/ngày (hàng ngày).

Chế phẩm theo sáng chế còn chứa tá dược và/hoặc chất bổ trợ được dụng và/hoặc chất mang.

Tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế tốt còn chứa chất bổ trợ được chọn từ nhóm bao gồm huyết tương, PRP, chất làm liền sẹo, chất tái tạo cấu trúc biểu mô, chất làm ẩm, chất hút ẩm, chất làm mềm, chất hấp thụ, chất giảm đau và trợ tĩnh mạch, chất chống viêm, chất giãn cơ, chất có bản chất peptit và/hoặc protein và/hoặc protein, như collagen, chất thuộc mô liên kết, như glycosaminoglycan, tốt hơn nếu chondroitin sulphat, và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng qua đường khu trú, tốt hơn nếu ở dạng kem, gel, dầu, nhũ tương, thuốc xịt, gạc,

miếng dán, băng y tế, thuốc xức, kem bôi môi, thuốc mỡ, bột nhão, hoặc chế phẩm dạng lỏng trong đó tốt hơn nếu chế phẩm này được bổ sung vào ngay trước khi bôi lên da.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để tái tạo hệ vi sinh vật ở da. Thuật ngữ “tái tạo hệ vi sinh vật ở da” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng, tốt hơn nếu sử dụng qua đường khu trú hệ vi sinh vật ở da, và/hoặc một phần hệ vi sinh vật này, của các đối tượng khỏe mạnh, không bị rối loạn về da, để tái lập cân bằng thiết yếu, nhờ đó điều trị được tình trạng rối loạn hệ vi sinh vật bất kỳ. Để đạt được các mục đích này, tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế chứa vi khuẩn, tốt hơn nếu chủng vi khuẩn *L. casei* DG® và/hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, và tùy ý cũng chứa vi nấm, virus, peptit, chất có bản chất peptit và/hoặc protein, carbohydrat, vitamin, nguyên tố vi lượng hoặc chất bất kỳ khác thiết yếu cho hệ vi sinh vật ở da và/hoặc các vùng khác của cơ thể. Để đạt được các mục đích này, tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với axit amin, chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, vitamin, nguyên tố vi lượng, như kẽm và selen, cơ chất dinh dưỡng phân tử lớn và phân tử nhỏ, enzym và/hoặc cơ chất của vi sinh vật có lợi, như fructooligosacarit, galactooligosacarit, inulin, gồm guar và/hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một phương án, chế phẩm được bào chế để sử dụng qua đường miệng, tốt hơn nếu dưới dạng chế phẩm dạng rắn, tốt hơn nếu dưới dạng viên tròn, viên nang, viên nén, bột cốm, viên nang cứng, cốm hòa tan trong miệng, túi thuốc hoặc viên ngậm.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế được bào chế dưới dạng chế phẩm dạng lỏng, tốt hơn nếu để bào chế tại chỗ.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế được bào chế dưới dạng có khả năng tạo ra tác dụng khu trú, ví dụ thuốc thụ, kem, thuốc xịt, gel, miếng dán, thuốc xức, kem bôi môi, thuốc mỡ, bột nhão, hoặc chế phẩm dạng lỏng trong đó tốt hơn nếu chế phẩm này được bổ sung vào và/hoặc bào chế ngay trước khi bôi lên da.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với axit amin, chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, vitamin, nguyên tố vi lượng, như kẽm và selen, cơ chất dinh dưỡng phân tử lớn và phân tử nhỏ, enzym và/hoặc cơ chất của vi sinh vật có lợi, như fructooligosacarit, galactooligosacarit, inulin, gồm guar hoặc hỗn hợp của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chủng vi khuẩn và tế bào

Các chủng vi khuẩn sau được sử dụng trong các ví dụ theo sáng chế

Chủng vi khuẩn:

- *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572)
- *L. paracasei* LPC-S01 ;
- Hỗn hợp chứa *L. casei* DG[®] + *L. paracasei* LPC-S01 theo tỷ lệ 1:1.

Các chủng vi khuẩn nêu trên được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc cấu thành từ MRS (de Man Rogosa Sharpe) trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C. Khi quá trình sinh trưởng đạt đến pha ổn định, mẫu chứa vi khuẩn được thu nhận, để sử dụng trong các thử nghiệm. Các mẫu được rửa vài lần bằng dung dịch muối đệm phosphat (PBS) và ly tâm để loại bỏ môi trường nuôi cấy đã sử dụng. Các tế bào sống trong pha ổn định được sử dụng thay vì tế bào bất hoạt do trong pha này vi khuẩn gây ra đáp ứng miễn dịch yếu hơn.

Toàn bộ các thử nghiệm được mô tả dưới đây được thực hiện ba lần.

Các tế bào sừng của người khỏe mạnh được duy trì trong môi trường nuôi cấy chứa chế phẩm bổ sung dinh dưỡng thích hợp được sử dụng trong các thử nghiệm.

Propionibacterium acnes (*P. acnes*) CCUG 50865 (do CCUG cung cấp (Culture Collection, University of Goteborg)) được nuôi cấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường canh thang thịt (cả dạng lỏng lẫn dạng rắn), được điều chế theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau đó, nồng độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp quang phổ, bằng cách đọc mật độ quang ở bước sóng bằng 600nm, và được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá mức độ bám dính.

Thử nghiệm đánh giá mức độ bám dính và thử thách dòng tế bào với tác nhân gây bệnh

Các tế bào sừng được tạo mầm ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong các giếng của các đĩa nuôi cấy tế bào và được cho phép sinh trưởng cho đến khi đạt được quá trình hợp lưu (tức là khoảng 10⁵ tế bào tổng số). Tỷ lệ tạo mầm bằng 2,5x10⁵ tế bào/0,32cm² (tức là

mật độ tế bào bằng $7,8 \times 10^5$ tế bào/cm²). Ở thời điểm thử nghiệm, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, các tế bào được rửa bằng môi trường không chứa kháng sinh, và sau đó các vi khuẩn được bổ sung vào trong các thử nghiệm, được thực hiện theo các quy trình khác nhau được mô tả dưới đây.

1) Mức độ bám dính của các chủng với các tế bào sừng.

Sau khi số lượng của các tế bào sừng tính trên mỗi giếng đã được xác định, các chủng *L. paracasei* được bổ sung vào ở tỷ lệ MOI bằng 1:10 (10^5 tế bào và 10^6 CFU vi khuẩn tính trên mỗi giếng). Các chủng này được thử nghiệm ở tỷ lệ bằng 1:1, ở cả dạng các chủng riêng biệt và hỗn hợp.

Các vi khuẩn này được cho tiếp xúc với các tế bào được duy trì ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ trong 60 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng môi trường vô trùng để loại bỏ vi khuẩn đã không bám dính vào lớp tế bào đơn.

Để tính toán số lượng của các vi khuẩn bám dính, các tế bào được phân tách và phân giải và các vi khuẩn được đếm bằng cách nhuộm tươi sau khi tạo mầm trong môi trường thạch MRS.

2) Thử nghiệm loại bỏ bám dính.

Sau khi số lượng của các tế bào sừng được xác định cho mỗi giếng, các chủng *L. paracasei* được bổ sung vào các tế bào ở tỷ lệ bằng 1:1, ở cả dạng các chủng riêng biệt và hỗn hợp.

Các vi khuẩn này được cho tiếp xúc với các tế bào được duy trì ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ trong 60 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng môi trường vô trùng để loại bỏ vi khuẩn đã không bám dính vào lớp tế bào đơn.

Sau đó, *P. acnes* (ở tỷ lệ MOI bằng 1:10) được cho tiếp xúc với các tế bào được để ủ trong 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các vi khuẩn không bám dính được loại bỏ bằng cách rửa bằng môi trường vô trùng.

Để tính toán số lượng của *P. acnes* bám dính vào các tế bào sừng, các tế bào được phân tách và phân giải và các vi khuẩn được đếm bằng cách nhuộm tươi sau khi tạo mầm trong môi trường thạch chứa 5% máu cừu trong điều kiện kỵ khí trong thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các giếng chứa các tế bào sừng không được ủ trước với các chủng *L. paracasei*, nhưng thay vào đó chỉ được cấy với *P. acnes*, được sử dụng làm mẫu đối chứng dương để đánh giá mức độ bám dính của *P. acnes* (mẫu đối chứng bám dính *P. acnes*), trong khi đó các giếng chứa các tế bào chưa được ủ với vi khuẩn bất kỳ được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (mẫu đối chứng vô trùng).

3) Thử nghiệm mức độ cạnh tranh bám dính

Sau khi số lượng của các tế bào sừng tính trên mỗi giếng đã được xác định, các chủng *L. paracasei* được bổ sung vào (ở cả dạng các chủng riêng biệt và hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1) đồng thời với *P. acnes*. Các vi khuẩn được bổ sung vào ở tỷ lệ MOI tổng số bằng 1:10 và tỷ lệ vi khuẩn có lợi:vi khuẩn gây bệnh bằng 1:1.

Các vi khuẩn này được cho tiếp xúc với các tế bào ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ trong 60 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng môi trường vô trùng để loại bỏ vi khuẩn đã không bám dính vào lớp tế bào đơn.

Để tính toán số lượng của *P. acnes* bám dính vào các tế bào sừng, các tế bào được phân tách và phân giải và các vi khuẩn được đếm bằng cách nhuộm tươi sau khi tạo mầm trong môi trường thạch chứa 5% máu cừu trong điều kiện kỵ khí trong thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các giếng chứa các tế bào sừng chỉ được cấy với *P. acnes* được sử dụng làm mẫu đối chứng dương (mẫu đối chứng bám dính *P. acnes*), trong khi đó các giếng chứa các tế bào chưa được ủ với vi khuẩn bất kỳ được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (mẫu đối chứng vô trùng).

4) Thử nghiệm loại bỏ vi khuẩn gây bệnh bám dính.

Sau khi số lượng của các tế bào sừng tính trên mỗi giếng đã được xác định, *P. acnes* được bổ sung vào (tỷ lệ MOI bằng 1:10).

Các vi khuẩn này được cho tiếp xúc với các tế bào được duy trì ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ trong 60 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại

bò và vi khuẩn đã không bám dính vào lớp tế bào đơn được loại bỏ bằng cách rửa nhiều lần bằng môi trường vô trùng.

Sau đó, các chủng *L. paracasei* (ở cả dạng các chủng riêng biệt và hỗn hợp ở tỷ lệ bằng 1:1) được cho tiếp xúc với các tế bào được duy trì ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ trong 60 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng môi trường vô trùng để loại bỏ vi khuẩn đã không bám dính vào lớp tế bào đơn.

Để tính toán số lượng của *P. acnes* bám dính vào các tế bào sừng, các tế bào được phân tách và phân giải và các vi khuẩn được đếm bằng cách nhuộm tươi sau khi tạo mầm trong môi trường thạch chứa 5% máu cừu trong điều kiện kỵ khí trong thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các tế bào sừng được xử lý bằng *P. acnes* được sử dụng làm mẫu đối chứng dương (mẫu đối chứng bám dính *P. acnes*), trong khi đó các tế bào sừng không được xử lý bằng vi khuẩn được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (mẫu đối chứng vô trùng).

Các thử nghiệm này được thực hiện trên cả các chủng riêng biệt ở dạng tinh khiết lẫn dạng hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 được lặp lại hai lần.

1) Mức độ bám dính của các chủng với các tế bào sừng - Kết quả

Kết quả của thử nghiệm này đã kiểm chứng được khả năng của các chủng nêu trên, ở cả dạng các chủng riêng biệt và hỗn hợp, để bám dính vào các tế bào sừng. Cụ thể là, chủng *L. casei* DG[®] có khả năng bám dính vào các tế bào sừng cao hơn chủng *L. paracasei* LPC-S01. Do đó, khả năng bám dính quan sát được đối với hỗn hợp của các chủng nêu trên có lẽ là do đóng góp được tạo ra bởi chủng *L. casei* DG[®].

Bảng 1

	Mức độ bám dính (Mật độ vi khuẩn - CFU/giếng)
<i>L. casei</i> DG [®]	139 x 10 ² - 141 x 10 ²
<i>L. paracasei</i> LPC-S01	18,2 x 10 ² - 21,8 x 10 ²
Hỗn hợp chứa <i>L. casei</i> DG [®] và <i>L. paracasei</i> LPC-S01 theo tỷ lệ 1:1	98 x 10 ² - 122 x 10 ²
<i>Propionibacterium acnes</i>	700 x 10 ² - 2000 x 10 ²

- Thử nghiệm loại bỏ bám dính (xử lý sơ bộ các tế bào nhân thật với các vi sinh vật có lợi, sau đó ủ với tác nhân gây bệnh) - Kết quả

Như lưu ý nêu trên, lớp đơn của các tế bào sừng ban đầu được cho tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi, và sau khi loại bỏ các vi khuẩn không bám dính, được cho tiếp xúc với *P. acnes*, sau đó được loại bỏ bằng cách rửa; tiếp theo là đánh giá khả năng sống sót của *P. acnes*.

Mẫu đối chứng âm là các tế bào nhân thật không được kích thích bằng cách cho tiếp xúc với vi khuẩn, trong khi đó mẫu đối chứng dương được đặc trưng bởi khả năng của *P. acnes* để bám dính vào các tế bào sừng không được xử lý sơ bộ bất kỳ với các vi sinh vật có lợi. Fig.1A là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá mức độ bám dính của *P. acnes*, theo tỷ lệ phần trăm tế bào sống bám dính sau khi kích thích sơ bộ các tế bào sừng bằng cách cho tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi khác nhau được thử nghiệm, trong đó 100 thể hiện mức độ bám dính của *P. acnes* trong trường hợp không được kích thích bằng các vi sinh vật có lợi, khả năng ức chế của các chủng được thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ % làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* so với mẫu đối chứng dương.

Cả hai chủng vi khuẩn có lợi nêu trên có khả năng phòng ngừa tình trạng bám dính của *P. acnes*, theo cùng tỷ lệ % (42% đối với chủng *L. casei* DG[®] và 35% đối với chủng *L. paracasei* LPC-S01).

- Thử nghiệm mức độ cạnh tranh bám dính (quá trình ủ đồng thời các tế bào nhân thật với các vi sinh vật có lợi và với tác nhân gây bệnh) - Kết quả

Trong các thử nghiệm này, tác dụng làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* với các tế bào sừng, nếu có, được đánh giá sau khi xử lý đồng thời dòng tế bào này với các vi sinh vật có lợi và tác nhân gây bệnh, để đánh giá tác dụng ức chế cạnh tranh tiềm năng gây ra bởi các vi sinh vật có lợi khi được ủ đồng thời với *P. acnes*.

Các tế bào sừng được xử lý bằng *P. acnes* được sử dụng làm mẫu đối chứng dương, trong khi đó các tế bào sừng không được xử lý bằng vi khuẩn được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (mẫu đối chứng vô trùng).

Fig.1B là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá mức độ bám dính của *P. acnes* theo tỷ lệ phần trăm tế bào sống bám dính sau khi ủ đồng thời các tế bào sừng với *P. acnes* và

với các vi sinh vật có lợi khác nhau được thử nghiệm. Như mô tả nêu trên, 100 thể hiện mức độ bám dính của *P. acnes* trong trường hợp không có kích thích bởi các vi sinh vật có lợi, khả năng ức chế của các chủng được thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ % làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* so với mẫu đối chứng dương.

Theo cơ chế tương tác này giữa các vi sinh vật có lợi và tác nhân gây bệnh, chủng *L. casei* DG[®] có khả năng làm giảm 17% mức độ bám dính của *P. acnes*, trong khi đó chủng *L. paracasei* LPC-S01 có khả năng làm giảm 9% mức độ bám dính của *P. acnes*. Hỗn hợp chứa các chủng này có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ bám dính của *P. acnes*, tức là làm giảm 42% mức độ bám dính của *P. acnes*, tỷ lệ phần trăm này cao hơn đáng kể so với tỷ lệ phần trăm quan sát được đối với cả hai chủng được xem xét riêng biệt và tổng tác dụng của hai chủng này.

- Thử nghiệm loại bỏ các tác nhân gây bệnh bám dính (xử lý sơ bộ các tế bào nhân thật với tác nhân gây bệnh, sau đó ủ với chủng vi khuẩn có lợi) - Kết quả

Trong các thử nghiệm này, tác dụng làm giảm bất kỳ mức độ bám dính của *P. acnes* với các tế bào sừng được đánh giá sau khi xử lý sơ bộ dòng tế bào với tác nhân gây bệnh, sau đó ủ với các vi sinh vật có lợi sau khi loại bỏ tác nhân gây bệnh không bám dính.

Các tế bào sừng được xử lý bằng *P. acnes* được sử dụng làm mẫu đối chứng dương, trong khi đó các tế bào sừng không được xử lý bằng vi khuẩn được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (mẫu đối chứng vô trùng).

Fig.1C là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá mức độ bám dính của *P. acnes* theo tỷ lệ phần trăm tế bào sống bám dính sau khi ủ các tế bào sừng với các vi sinh vật có lợi khác nhau được thử nghiệm, sau khi thử thách các tế bào nhân thật với tác nhân gây bệnh. Như mô tả nêu trên, 100 thể hiện mức độ bám dính của *P. acnes* trong trường hợp không có các vi sinh vật có lợi, khả năng ức chế của các chủng được thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ % làm giảm mức độ bám dính của *P. acnes* so với mẫu đối chứng dương.

Tương tự trong các thử nghiệm này, như trong trường hợp của quy trình ủ đồng thời, tác dụng hiệp đồng có ý nghĩa thống kê của hỗn hợp chứa hai vi sinh vật có lợi đã

quan sát được, hỗn hợp này có khả năng làm giảm 42% mức độ bám dính của *P. acnes*. Ngược lại, các vi sinh vật có lợi riêng biệt có khả năng làm giảm mức độ bám dính nhỏ hơn một nửa khả năng làm giảm mức độ bám dính của hỗn hợp chứa hai vi sinh vật có lợi này. 18% đối với chủng *L. casei* DG[®] và 11% đối với chủng *L. paracasei* LPC-S01.

Thử nghiệm miễn dịch

The thử nghiệm miễn dịch được thực hiện để kiểm chứng xem các chủng vi khuẩn có lợi nêu trên có khả năng điều hòa giải phóng xytokin bởi các tế bào sừng của người được tiếp xúc với kích thích bất lợi của lipopolysaccharit vi khuẩn (LPS) hay không.

Các tế bào sừng của người khỏe mạnh được tạo mầm như mô tả nêu trên trong các đĩa nuôi cấy tế bào và khi đạt được quá trình hợp lưu, các tế bào này được sử dụng trong các thử nghiệm. Cụ thể là, các lớp tế bào đơn được rửa và ủ trong môi trường mới không chứa kháng sinh. Sau đó, các chủng *L. paracasei* được bổ sung vào dưới dạng riêng biệt và hỗn hợp ở tỷ lệ bằng 1:1 ở tỷ lệ MOI bằng 1:10.

Các vi khuẩn này được cho tiếp xúc với các tế bào sừng trong 120 phút ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc nhẹ. Trong một số trường hợp, các tế bào được kích thích sơ bộ (thử thách trong khoảng 24 giờ) bằng LPS ở nồng độ cuối cùng bằng 100ng/mL.

Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, các tế bào được rửa bằng môi trường vô trùng để loại bỏ vi khuẩn đã không bám dính vào các tế bào, sau đó duy trì trong môi trường nuôi cấy trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Sau khi kết thúc quá trình ủ, môi trường nuôi cấy được thu nhận để định lượng các xytokin được sản sinh bằng thử nghiệm ELISA (IL-10, IL-1 β , IL-8, lymphopoietin cơ chất tuyến ức [TSLP]), trong khi đó mức độ biểu hiện của cyclooxygenase-2 (COX-2) và NF-kB được hoạt hóa (gây ra bởi LPS hoặc IL-1 β) được xác định bằng phương pháp thấm tách Western trên các protein tổng số được chiết xuất từ các tế bào sừng được phân giải.

Các chất chỉ thị này được chọn lọc do các chất này liên quan đến cả bệnh viêm quanh cấp tính và bệnh viêm da dị ứng, cũng như bệnh viêm quanh mãn tính. Cụ thể là, IL-10 được xem là xytokin chống viêm, và quá trình sản sinh IL-10 thường gia tăng song với quá trình sản sinh xytokin tiền viêm hoạt tính mạnh, như IL-1 β . TSLP là xytokin điều

hòa tác dụng của tế bào lympho và liên quan đến quá trình phát triển bệnh viêm giác mạc mãn tính.

Kết quả

Khả năng của các chủng thử nghiệm để kích thích đáp ứng miễn dịch của các tế bào sừng được đánh giá theo quy trình mô tả nêu trên. Các thử nghiệm được tập trung vào việc xác định xytokin (IL-8, IL-1 β , và IL-10) và đánh giá quá trình hoạt hóa 2 chất chỉ thị, COX-2 và NF-kB.

COX-2 (cyclooxygenaza-2) là chất chỉ thị cảm ứng được sản sinh bởi số lượng hạn chế của các loại tế bào đáp ứng với kích thích viêm đặc hiệu. COX-2 được biểu hiện quá mức trong một số khối u, bao gồm khối u da. NF-kB (chất tăng cường chuỗi nhẹ kappa yếu tố nhân của tế bào B được hoạt hóa) là phức hợp protein với chức năng của yếu tố phiên mã, được sản sinh bởi toàn bộ các loại tế bào đáp ứng với các kích thích khác nhau, bao gồm các kích thích có bản chất viêm.

Các tế bào sừng được nuôi cấy được cho tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi *L. paracasei*, *L. casei* DG[®] và *L. paracasei* LPC-S01, và hỗn hợp chứa hai chủng này ở tỷ lệ bằng 1:1 theo các quy trình mô tả nêu trên. Sau đó, các dịch nổi tế bào được định lượng để xác định các xytokin, có tham chiếu cụ thể với các xytokin chống viêm có thể được định lượng trong các tế bào sừng được cho tiếp xúc với các chủng có lợi. Kết quả định lượng được thể hiện trên Fig.2 và thể hiện kết quả định lượng IL-10, IL-1 β và IL-8 trong các dịch nổi tế bào, được tính theo đơn vị pg/mL dịch nổi, được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Các đánh giá chi tiết về kết quả thu được cho phép kết luận như sau:

- IL-1 β : mức độ biểu hiện bằng một vài ng/mL dịch nổi nuôi cấy của các tế bào sừng. Quá trình tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi không tạo ra tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ biểu hiện của xytokin này so với mức độ biểu hiện đường nền (của các tế bào sừng không được kích thích bằng chủng vi khuẩn có lợi). Chủng *L. paracasei* LPC-S01 có tác động có lợi vừa phải so với chủng *L. casei* DG[®] và tác dụng có lợi tương đương với tác dụng có lợi của hỗn hợp chứa hai chủng này. Các xem xét đánh giá tương tự cũng được áp dụng trong trường hợp kích thích sơ bộ các tế bào sừng bằng LPS để tối đa hóa đáp ứng miễn dịch.

- IL-10: mức độ biểu hiện bằng khoảng vài chục pg/mL dịch nổi nuôi cấy của các tế bào sừng. Quá trình tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi tạo ra tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ biểu hiện của xytokin này so với mức độ biểu hiện đường nền (của các tế bào sừng không được kích thích bằng chủng vi khuẩn có lợi). Chủng *L. paracasei* LPC-S01 có tác động có lợi vừa phải so với chủng *L. casei* DG® và tương đương với tác dụng có lợi của hỗn hợp chứa hai chủng này. Các xem xét đánh giá tương tự cũng được áp dụng trong trường hợp kích thích sơ bộ các tế bào sừng bằng LPS để tối đa hóa đáp ứng miễn dịch.

- IL-8: mức độ biểu hiện bằng một vài ng/mL dịch nổi nuôi cấy của các tế bào sừng. Quá trình tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi tạo ra tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ biểu hiện của xytokin này so với mức độ biểu hiện đường nền (của các tế bào sừng không được kích thích bằng chủng vi khuẩn có lợi). Chủng *L. paracasei* LPC-S01 có tác dụng có lợi so với chủng *L. casei* DG® và tương đương với tác dụng có lợi của hỗn hợp chứa hai chủng này. Trong trường hợp kích thích sơ bộ các tế bào sừng bằng LPS để tối đa hóa đáp ứng miễn dịch, cả hai vi sinh vật có lợi này có khả năng ảnh hưởng có lợi đến kiểm soát sản sinh xytokin này, với tiềm năng tương tự cả cho các vi sinh vật có lợi được xem xét riêng biệt và hỗn hợp chứa hai chủng này.

- TSLP: mức độ biểu hiện bằng một vài ng/mL dịch nổi nuôi cấy của các tế bào sừng. Quá trình tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi tạo ra tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê mức độ biểu hiện của chất chỉ thị này so với mức độ biểu hiện đường nền (của các tế bào sừng không được kích thích bằng chủng vi khuẩn có lợi). Các chủng vi khuẩn có lợi nêu trên, được xem xét dưới dạng riêng biệt và hỗn hợp, có tác dụng kiểm soát hữu hiệu quá trình biểu hiện của chất chỉ thị này. Chất chỉ thị này được quan tâm đáng kể, do được biểu hiện quá mức trong một số tình trạng bệnh lý về da, như bệnh viêm da cơ địa. Hơn nữa, xytokin này được xem là chất điều hòa quan trọng ở mặt phân cách chức năng giữa các tế bào sừng và các tế bào đuôi gai.

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của COX-2 cho thấy rằng mức độ biểu hiện của chất chỉ thị này dường như không trải qua các thay đổi đặc biệt sau khi cho các tế bào sừng tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi so với mức độ biểu hiện đường nền, ngoại trừ cơ chế phòng ngừa vừa phải do được cho tiếp xúc với chủng *L. paracasei* LPC-S01. Quá trình xử lý bằng LPS thể hiện sự gia tăng mức độ biểu hiện của COX-2 bởi các tế bào

nhân thật, mức độ gia tăng hữu hiệu và được giới hạn bởi tác dụng của các vi sinh vật có lợi. Sự có mặt của chủng *L. paracasei* LPC-S01 đã làm giảm mức độ biểu hiện của chất chỉ thị này đến mức độ lớn hơn so với chủng *L. casei* DG[®], trong khi đó hỗn hợp chứa 2 chủng có lợi này dường như không thể hiện tác dụng bất kỳ.

Do quá trình biểu hiện của IL8 và COX-2 được điều hòa bởi yếu tố phiên mã NF-kB, nên đánh giá định tính được thực hiện đối với mức độ giải phóng NF-kB bởi các tế bào sừng được tiếp xúc với các vi sinh vật có lợi. Kết quả cho thấy rằng, trong trường hợp không có kích thích viêm gây ra bởi LPS, mức độ biểu hiện của chất chỉ thị này dường như không thể phát hiện được. Tuy nhiên, NF-kB được hoạt hóa bởi lipopolysaccharit vi khuẩn thông qua quá trình phosphoryl hóa p65. Hai chủng có lợi này có khả năng duy trì biểu hiện của NF-kB, với tham chiếu đặc biệt đến chủng *L. paracasei* LPC-S01, sự có mặt của chủng này, cả dưới dạng chủng đơn và hỗn hợp với chủng *L. casei* DG[®], cũng có tác dụng duy trì hữu hiệu biểu hiện của NF-kB gây ra bởi LPS.

Đánh giá mức độ làm giảm tổn thương gây ra bởi bức xạ UV

Khả năng của chủng vi khuẩn có lợi *L. paracasei* LPC-S01 để làm giảm tình trạng tổn thương gây ra bởi bức xạ UV được đánh giá trên mô hình da được tái tạo cấu trúc 3D hoàn chỉnh *in vitro* tái tạo cấu trúc các khoang của hạ bì và biểu bì, do đó có thể nghiên cứu các biến đổi của khối ngoại bào của hạ bì và quá trình biệt hóa của các lớp da nhìn thấy (mô hình da có chiều dày đầy đủ). Nghiên cứu này đánh giá tác dụng của chủng LPC-S01 đến quá trình hoạt hóa viêm đáp ứng với bức xạ UV. Chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 được phủ trực tiếp lên bề mặt của mô hình da 3D, ủ qua đêm, sau đó rửa bằng dung dịch nước muối để loại bỏ sản phẩm dư. Mô được làm trầy xước nhẹ, sau đó được cho tiếp xúc với 1 MED (liều gây ra ban đỏ tối thiểu) của bức xạ UV để bắt chước quá trình tiếp xúc với ánh nắng mặt trời thông thường. Quá trình hoạt hóa viêm được đánh giá sau 4 giờ và 24 giờ tiếp xúc với bức xạ UV. Mô được xử lý bằng dung dịch nước muối và được cho tiếp xúc với bức xạ UV được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Dung dịch nước muối được sử dụng làm mẫu đối chứng âm.

Phân tích mô học bằng phương pháp nhuộm màu haematoxylin/eosin

Khi kết thúc quá trình xử lý, các mô được rửa bằng dung dịch nước muối và cố định trong formalin 10%. Đối với mỗi mẫu, các mẫu mô sinh học giống nhau (n = 3)

được nhúng trong các khối parafin giống nhau và 2 phần mô không liên kết có kích cỡ bằng 5µm được cắt và thu thập. Các phần mô này được nhuộm màu bằng haematoxylin và eosin. Các mẫu mô học được phân tích bằng kính hiển vi quang học (độ phóng đại bằng 20x và 40x) và các thay đổi hình thái trong mô và tác dụng gây độc tế bào được đánh giá.

Nhuộm miễn dịch NFκB

Bước đánh dấu NFκB cho phép quá trình di chuyển của NFκB từ bào tương tế bào vào nhân tế bào được đánh giá; thực tế là quá trình di chuyển của NFκB vào nhân tế bào có khả năng hoạt hóa quá trình viêm. NFκB được đánh dấu bằng phương pháp nhuộm màu miễn dịch đã biết trong lĩnh vực này. Cụ thể là, kháng thể sơ cấp kháng NFκB (Abeam) được sử dụng và kháng thể thứ cấp được nhuộm màu bằng fluorophore Alexa 555 và nhuộm ngược chiều bằng DAPI để hiện màu nhân tế bào. Các hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại bằng 40x.

Định lượng interleukin-1β bằng phương pháp ELISA

Các kháng thể được hấp thụ lên đĩa ELISA, sau đó các mẫu được ủ vào. Kháng thể thứ cấp được bổ sung vào để tạo thành “thể kẹp”. Quá trình định lượng được thực hiện trên cơ sở đường chuẩn. Dữ liệu được thu thập bằng phương pháp quang phổ.

Kết quả đánh giá tác dụng làm giảm mức độ tổn thương gây ra bởi bức xạ UV

Sau 4 giờ tiếp xúc với bức xạ UV, mô không được xử lý (mẫu đối chứng dương) có hình thái không bị thay đổi, nhưng với các tế bào được gây tổn thương bởi bức xạ UV trong lớp bên dưới của biểu bì. Sau 4 giờ, mô được xử lý bằng chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 có hình thái, cấu trúc cơ bản của mô gần như không bị thay đổi hoặc không bị tổn thương dạng bong trong lớp bên dưới của biểu bì. Sau 24 giờ tiếp xúc với bức xạ UV, mô có biểu bì bị biến đổi điển hình do tổn thương dạng bong, với nhân tế bào bị cô đặc, biểu bì và hạ bì bị biến đổi. Việc sử dụng chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 không cải thiện tác dụng ngăn ngừa các thay đổi hình thái trong mô gây ra bởi bức xạ UV.

Kết quả đánh giá mức độ di chuyển của NFκB vào nhân tế bào sau 4 giờ tiếp xúc với bức xạ UV được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

	Mẫu đối chứng âm	Mẫu đối chứng dương	Chủng LPC S01
Mức độ di chuyển của NFkB vào nhân tế bào	25,7	47,2	22,4

Sau 4 giờ chiếu xạ, mẫu đối chứng dương có mức độ di chuyển của NFkB vào nhân tế bào cao, đặc biệt là ở lớp nền bên trên của biểu bì.

Quá trình xử lý với chủng vi khuẩn có lợi *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 có khả năng ức chế quá trình di chuyển của NFkB vào nhân tế bào đến mức độ có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng dương. Hơn nữa, chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 cũng có khả năng làm giảm nồng độ của NFkB trong bào tương.

Cuối cùng, mức độ bài tiết IL-1 β được gia tăng sau 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ tiếp xúc và gây tổn thương bởi bức xạ UV. Việc sử dụng chủng vi khuẩn có lợi *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 đã làm phục hồi mức độ bài tiết IL-1 β sau 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ tiếp xúc và gây tổn thương bởi bức xạ UV. Cụ thể là, tác dụng làm giảm mức độ tổn thương quan sát được sau 8 giờ và 24 giờ tiếp xúc với bức xạ UV.

Bảng 3 Mức độ bài tiết IL-1 β

	NC (4 giờ)	PC (4 giờ)	S01 (4 giờ)	NC (8 giờ)	PC (8 giờ)	S01 (8 giờ)	NC (24 giờ)	PC (24 giờ)	S01 (24 giờ)
IL-1 β (pg/mL)	2,12	2,74	2,10	2,49	3,18	1,92	3,13	4,78	3,44

Do đó, chủng vi khuẩn có lợi *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 có khả năng phòng ngừa quá trình hoạt hóa viêm bằng cách ức chế quá trình di chuyển của NFkB vào nhân của các tế bào được tiếp xúc và gây tổn thương bởi bức xạ UV. Hơn nữa, chủng *Lactobacillus paracasei* S01 có tác dụng làm giảm mức độ viêm làm giảm mức độ biểu hiện của interleukin-1 β tiền viêm sau 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ tiếp xúc và gây tổn thương bởi bức xạ UV.

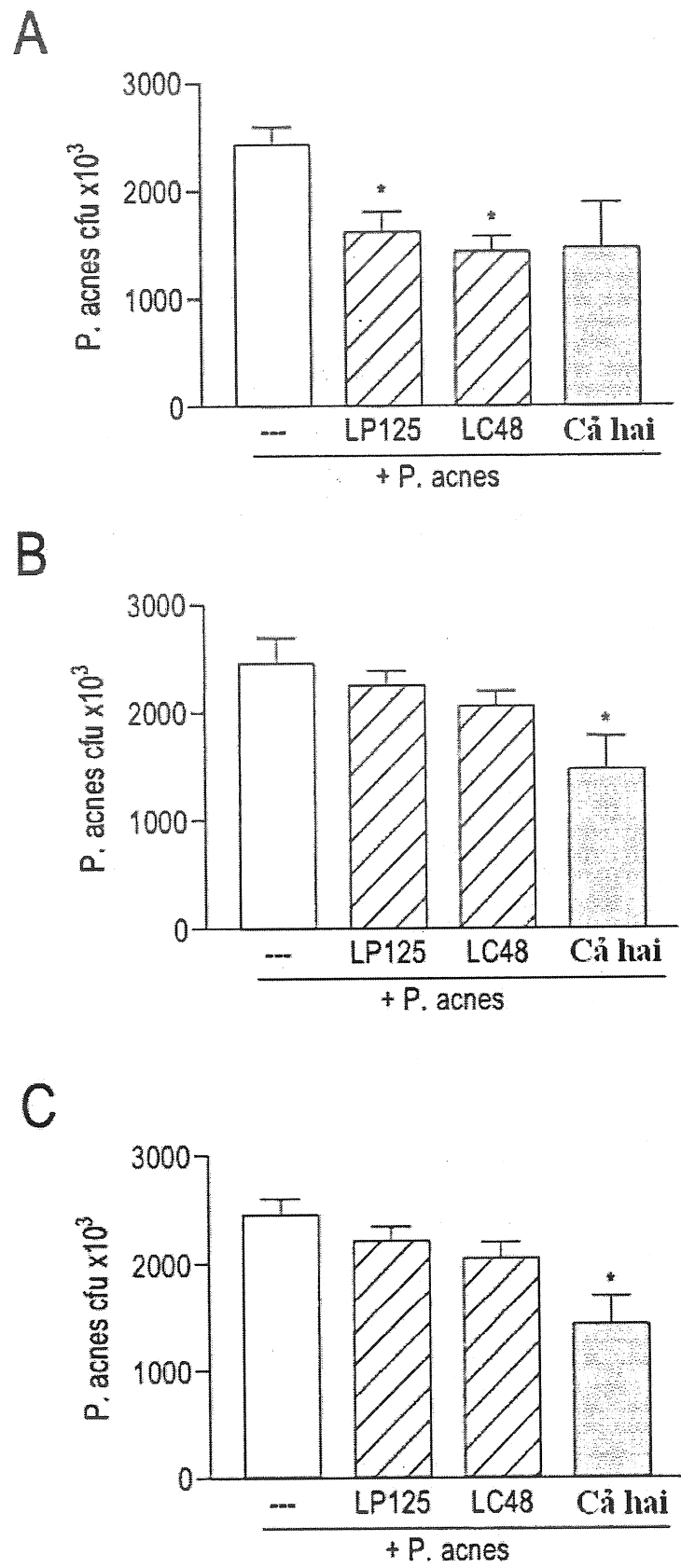
Thông tin lưu trữ vi sinh vật

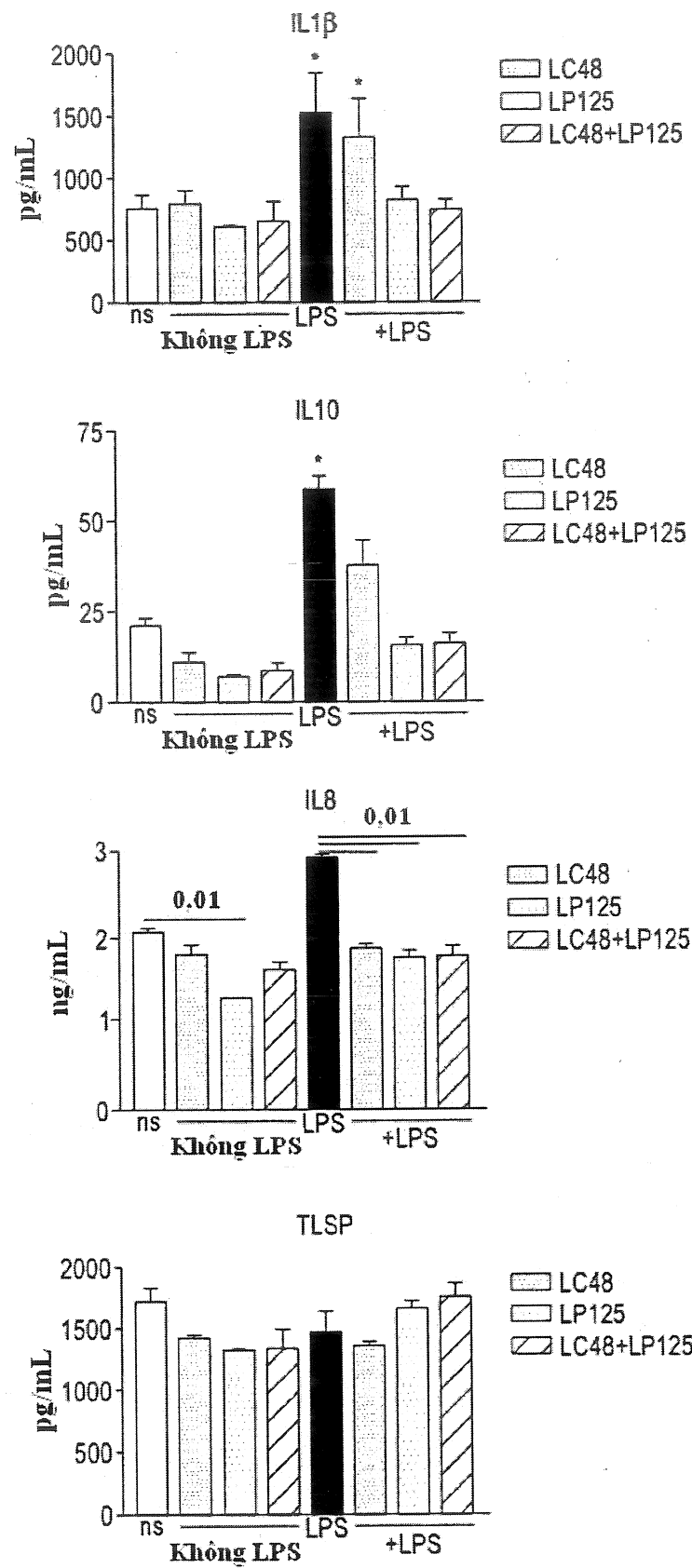
Chủng *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 theo sáng chế được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào, Viện Pasteur, Pháp, có địa chỉ tại 25, Rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15, France vào ngày 05 tháng 05 năm 1995, và chủng *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760 theo sáng chế được lưu trữ tại Ngân

hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany vào ngày 11 tháng 01 năm 2013 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế với mã đăng ký nêu trên dưới tên SOFAR S.P.A., nay đã được chuyển giao cho LAC2BIOME S.R.L..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa hỗn hợp của chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* DSM26760 để làm giảm tình trạng tổn thương da và/hoặc tác động do/liên quan đến tác động của vi khuẩn *P. acnes*.
2. Chế phẩm chứa hỗn hợp của các vi sinh vật có lợi cho da, trong đó các vi sinh vật có lợi bao gồm chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* DSM26760 để điều trị rối loạn và/hoặc bệnh lý viêm ảnh hưởng đến da để làm giảm và/hoặc điều trị triệu chứng và/hoặc tác động liên quan đến rối loạn/bệnh lý này và/hoặc tăng cường quá trình làm lành vết thương và/hoặc quá trình tái tạo cấu trúc biểu mô và/hoặc quá trình liền sẹo.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, vi nấm, nấm men hoặc hỗn hợp của chúng và trong đó vi khuẩn này thuộc ít nhất một chi được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, hoặc *Lactococcus*.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này được sử dụng qua đường khu trú và trong đó chế phẩm này ở dạng kem, gel, dầu, nhũ tương, thuốc xịt, gạc, miếng dán, băng y tế, thuốc xức, kem bôi môi, thuốc mỡ, bột nhào, hoặc chế phẩm dạng lỏng để bào chế tại chỗ.

**Fig.1**

**Fig.2**