



(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) 
1-0022191

(51)⁷ **C12N 1/20, A61K 35/74, A61P 17/00,** (13) **B**
C12R 1/36

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2013-01885 | (22) | 22.12.2011 | | |
| (86) | PCT/EP2011/073747 | 22.12.2011 | (87) | WO2012/085182 | 28.06.2012 |
| (30) | 1061081 | 22.12.2010 | FR | | |
| (45) | 25.11.2019 | 380 | (43) | 25.09.2013 | 306 |
| (73) | 1. PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE (FR)
45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, France
2. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) (FR)
4, place Jussieu, F-75005 Paris, France
3. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (FR)
3, rue Michel Ange, F-75016 Paris, France | | | | |
| (72) | LEBARON, Philippe (FR), BOURRAIN, Muriel (FR), CASTEX-RIZZI, Nathalie (FR), NGUYEN, Thien (FR) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | | | | |
-

(54) **VI KHUẨN, DỊCH CHIẾT CHỨA VI KHUẨN NÀY VÀ CHẾ PHẨM CHỮA BỆNH NGOÀI DA CHỨA CHÚNG**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới được phân lập từ nước ngầm. Sáng chế cũng đề cập đến dịch chiết chứa vi khuẩn và ứng dụng chúng trong điều trị bệnh viêm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm mới để điều trị và phòng ngừa các rối loạn viêm, đặc biệt là các bệnh ngoài da.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới được phân lập từ nước ngầm. Sáng chế cũng đề cập đến dịch chiết chứa vi khuẩn và ứng dụng chúng để điều trị các bệnh viêm.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm mới để dùng trong điều trị và phòng ngừa các rối loạn viêm, đặc biệt là bệnh ngoài da.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh ngoài da như bệnh viêm da cơ địa dị ứng, bệnh ngứa, nấm eczema và bệnh vảy nến xuất hiện ngày càng nhiều ở trẻ nhỏ. Bệnh viêm da cơ địa dị ứng đã gia tăng gấp đôi hoặc ba lần ở các nước phát triển trong hơn 30 năm qua: làm ảnh hưởng tới từ 15% đến 30% trẻ em và từ 2% đến 10% người lớn (Williams H. *et al.*, JACI 2006; 118:209-13). Bệnh viêm da cơ địa dị ứng là một dạng dị ứng xuất hiện trên da; nó là bệnh viêm da mạn tính hoặc nấm eczema, xuất hiện trong một số hoàn cảnh nhất định có liên quan tới di truyền. Hiện nay bệnh này được xem là mối quan tâm lớn cho sức khỏe cộng đồng. Bệnh viêm da cơ địa dị ứng thường đi kèm với các rối loạn dị ứng khác như chứng viêm mũi và bệnh hen. Bệnh này hầu hết thường xuất hiện trong suốt thời kỳ thơ ấu và được đặc trưng bởi sự bùng phát bệnh lặp lại sau vài năm. Nó tiến triển theo các đợt bùng phát, xen kẽ với các đợt thuyên giảm tự phát.

Chất lượng cuộc sống của bệnh nhân mắc bệnh viêm da cơ địa dị ứng bị xáo trộn một cách trầm trọng. Các thuốc điều trị được chấp nhận bao gồm các corticosteroid dùng tại chỗ và chất điều biến miễn dịch, chất tác dụng toàn thân thường có tác dụng phụ nên chúng hạn chế sử dụng trong thời gian dài, và thuốc làm mềm da. Phương pháp điều trị đang được áp dụng là điều trị phản ứng bùng phát, nhưng hiện nay người ta cho rằng việc can thiệp sớm nhằm kiểm soát các cơn bùng phát và chứng viêm da có thể có lợi trong cả việc kiểm soát bệnh này lẫn

kiểm soát khả năng xuất hiện bệnh hen và/hoặc chứng viêm mũi (Bieber, T. 2008, Atopic dermatitis, The New England Journal of Medicine, vol. 358(14) 1483-1494), do bệnh viêm da cơ địa dị ứng được coi là pha ban đầu của quá trình tiến triển dị ứng. Trong hầu hết các trường hợp, phương pháp điều trị là điều trị tại chỗ để giảm đau đớn ở mức tối đa cho bệnh nhân.

Các phương pháp điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng chuẩn thường sử dụng các corticosteroid hoặc chất ức chế miễn dịch tại chỗ, mặc dù các phương pháp này không làm mất đi các tác dụng phụ, đặc biệt là ở trẻ em.

Bệnh viêm da cơ địa dị ứng là bệnh phức tạp và đa nhân tố. Trong tài liệu, một số nghiên cứu dịch tễ học cho thấy rằng yếu tố “vệ sinh” ở môi trường thành thị có thể thúc đẩy các bệnh như dị ứng và bệnh tự miễn. Mặt khác, ở môi trường nông thôn, con người thường xuyên tiếp xúc với vi sinh vật và/hoặc tác nhân gây dị ứng, nên sự phơi nhiễm này sẽ kích thích hệ miễn dịch bảo vệ con người từ lúc mới sinh.

Ở bệnh viêm da cơ địa dị ứng, chức năng của hàng rào bảo vệ trên da bị suy yếu và tổn thương, tạo điều kiện cho quá trình tấn công và xâm lấn của các nguồn gây bệnh (vi khuẩn, virus), đặc biệt là *Staphylococcus aureus* - vi khuẩn hội sinh thường xuất hiện trên da.

Về miễn dịch học, bệnh này là một trong các tình trạng mất cân bằng đáp ứng miễn dịch. Phản ứng dị ứng thường được mô tả là một biểu hiện dị ứng (IgE làm trung gian, chi phối các cytokin IL-4, IL-5, IL-13) hoặc đáp ứng Th2. Trường hợp sau còn tác dụng mạnh hơn nữa khi có “kích thích kháng nguyên” của *Staphylococcus aureus*. Quá trình điều biến miễn dịch là quá trình đưa nội cân bằng miễn dịch quay trở lại trạng thái cân bằng Th1/Th2.

Tính miễn dịch tự nhiên là đáp ứng chủ yếu, nhanh chóng và không đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú. Hàng rào bảo vệ đầu tiên của tế bào bao gồm các thụ thể tương tự Toll (Toll-like receptor - TLR). Mỗi TLR sẽ nhận biết đặc hiệu kiểu phân tử liên quan tới nguồn gây bệnh (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) như axit nucleic (TLR3), peptit, protein bề mặt, axit lipoteichoic (TLR2), roi (TLR5) và lipopolysacarit (TLR4) có nguồn gốc từ vi sinh vật ngoại lai. Tương tác đặc hiệu giữa motyp (chất chủ vận) và TLR sẽ gây ra hàng

loạt các phản ứng phức tạp dẫn tới quá trình phiên mã NF κ B, sau đó sản sinh ra xytokin gây viêm và kháng viêm và chemokin (Kang *et al.*, 2006). Các kết quả được lý thu được khác là sinh ra peptit kháng khuẩn (antimicrobial peptide - AMP) có khả năng ức chế sự phát triển của các nguồn gây bệnh (vi khuẩn, virus, vật ký sinh) (Glaser, R. *et al.* 2005, Nat. Immunol. 6:57-64).

Bệnh viêm da cơ địa dị ứng thường đi kèm với chứng ngứa ngáy và bệnh ngứa, gây khó chịu và ảnh hưởng đến cuộc sống thường ngày (gãi, mất ngủ, v.v.). Một trong các nguyên nhân gây ra bệnh viêm này là do sự hoạt hóa thụ thể ngẫu hợp protein G, được gọi là PAR2 (thụ thể hoạt hóa proteaza 2) (Steinhoff, M. *et al.* 2003 J Neurosci. 23:6176-6180). PAR2 biểu hiện trên bề mặt của nhiều loại tế bào, đặc biệt là tế bào keratin, tế bào nội mô, tế bào mô cơ trực tràng, tế bào ruột, tế bào thần kinh ruột và tế bào miễn dịch. Các proteaza (trypsin, tryptaza), có mặt chủ yếu trên biểu bì, phân tách PAR2 ở đầu N bộc lộ peptit đặc hiệu hoạt hóa chính thụ thể này (hiện tượng tự hoạt hóa) (Vergnolle, N. 2009 Pharmacol. Ther. 123:292-309). Quá trình này bao gồm hoạt hóa gen NF κ B, tiếp đó là cảm ứng xytokin gây viêm, kích thích quá trình viêm. Trong trường hợp này, chất đối kháng PAR2 và/hoặc chất ức chế proteaza được phát triển thành các chất có khả năng điều trị bệnh ngứa.

Bệnh vẩy nến cũng là bệnh viêm da kèm theo tiến triển mạn tính; nó ảnh hưởng tới 2% dân số. Cùng với bệnh viêm da cơ địa dị ứng, bệnh vẩy nến là một trong các bệnh viêm da mạn tính thường gặp nhất. Nó đặc trưng bởi sự phát triển bất thường của các tế bào biểu bì liên quan tới phản ứng viêm. Cơ chế chủ yếu của hiện tượng viêm có liên quan tới tác động của các tế bào T của hệ miễn dịch, phần lớn là các tế bào Th1 (Wilsmann-Theis, D. *et al.*, Eur J Dermatol., vol. 18(2) 172-180), chúng khởi xướng và duy trì quá trình viêm và kích thích quá trình tăng sinh quá mức của các tế bào keratin, sau đó tham gia vào pha biệt hóa gia tốc và không hoàn toàn. Các tế bào keratin biểu hiện các thụ thể làm cho chúng nhạy với các tín hiệu viêm và giải phóng chất trung gian gây viêm. Như vậy, chứng viêm ở bệnh vẩy nến được duy trì bởi quá trình kích thích lẫn nhau của các tế bào T và tế bào keratin.

Do đó, bệnh này cần phải được điều trị trong thời gian dài. Từ đó, cần phải

có phương pháp điều trị khác để điều trị bệnh viêm da.

Tài liệu EP2018891 (Guéniche A., 2009) và tài liệu của Guéniche A. *et al.*, 2006 (European Journal of Dermatology, 16, 4, 380-384) mô tả việc sử dụng dịch chiết chứa vi khuẩn *Vitreoscilla filiformis* (*V. filiformis*) để điều trị bệnh viêm da cơ địa dị ứng. Dịch chiết đó có nhược điểm là đòi hỏi dịch nuôi cấy vi khuẩn *V. filiformis* dạng sợi phải chứa nước khoáng không có sulphua.

Trong bản mô tả này, sáng chế đưa ra cách thức điều trị các rối loạn viêm nêu trên bằng cách phân lập, mô tả đặc điểm và phân đoạn một chủng vi khuẩn mới chưa từng được biết trước đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đây là lần đầu tiên, và thật bất ngờ, người nộp đơn đã thành công trong việc phân lập chủng thuộc loài vi khuẩn mới từ nước ngầm, trong đó chủng vi khuẩn (hoặc vi khuẩn) mới này được đặt tên là LMB64.

Sau khi được phân lập, vi khuẩn LMB64 này đã được mô tả đặc điểm và được xác định là thuộc lớp *Betaproteobacteria*, siêu họ *Neisseriaceae*, và có thể thuộc một loài mới chưa được xác định. Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa ARN ribosom 16S (rRNA) cho thấy có thể xếp vi khuẩn này gần với loài *Chromobacterium*, *Paludimonas*, *Lutelia* và *Glubenkiana*, là các loài có mức tương đồng trình tự bằng 95%.

Vi khuẩn không gây bệnh này là vi khuẩn Gram âm và sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Vi khuẩn này cũng có đặc điểm đặc trưng là không phải vi khuẩn dạng sợi. Ngoài ra, vi khuẩn này có ưu điểm là có thể được nuôi cấy trong môi trường chứa loại nước bất kỳ, và cụ thể hơn, nước thông thường. Ví dụ, trái với *V. filiformis*, môi trường nuôi cấy vi khuẩn LMB64 theo sáng chế không yêu cầu điều kiện nuôi cấy đặc biệt và, cụ thể hơn, không yêu cầu môi trường chứa ít nhất một loại chất khoáng không chứa sulphua và/hoặc nước nóng. Điều này rõ ràng là một lợi thế cả về điều kiện và phương tiện nuôi cấy lẫn tính kinh tế.

Gen mã hóa 16S rRNA đã được xác định trình tự gần như hoàn toàn (1487bp, tương ứng với trình tự SEQ ID No. 1). Vi khuẩn LMB64 có plasmid vòng

kích thước 10948bp. Plasmid này đã được xác định trình tự hoàn toàn và trình tự này được thể hiện trong trình tự SEQ ID No. 2.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất vi khuẩn Gram âm không gây bệnh thuộc lớp *Betaproteobacteria*, siêu họ *Neisseriaceae*, trong đó trình tự nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA chứa hoặc bao gồm trình tự SEQ ID No. 1, hoặc trình tự nucleotit bất kỳ có mức tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu bằng 85%, 90 %, 95% và 98% so với trình tự SEQ ID No. 1.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất vi khuẩn Gram âm không gây bệnh thuộc lớp *Betaproteobacteria*, siêu họ *Neisseriaceae*, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của gen 16S rARN của vi khuẩn này chứa hoặc bao gồm trình tự SEQ ID No. 1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa vị trí phát sinh của trình tự mã hóa 16S rRNA của chủng LMB64. Trình tự xuất hiện trên cây trình tự này là trình tự thu được từ dữ liệu GenBank gần nhất với trình tự của LMB64.

Fig. 2A và 2B là ảnh của vi khuẩn LMB64 dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (A) và kính hiển vi điện tử quét (B).

Fig. 3 thể hiện khả năng phát triển tối ưu theo nhiệt độ, pH và độ mặn của môi trường nuôi cấy R3.

Fig. 4 minh họa khả năng cảm ứng của các xytokin IL-10 và IL-12 của dịch chiết E0 (hiệu quả phụ thuộc liều).

Fig. 5 minh họa khả năng cảm ứng của các phân tử bề mặt CD80, CD86, CD83 và CD54 của dịch chiết E0 (hiệu quả phụ thuộc liều).

Fig. 6 minh họa khả năng ức chế của thụ thể IgE các bởi dịch chiết E0.

Fig. 7 minh họa khả năng hoạt hóa của TLR2 bởi dịch chiết ES0.

Fig. 8 minh họa khả năng hoạt hóa của TLR4 bởi dịch chiết ES0.

Fig. 9 minh họa khả năng hoạt hóa của TLR5 bởi dịch chiết ES0.

Fig. 10 minh họa hoạt tính đối kháng PAR2 đặc hiệu bởi dịch chiết ES0.

Fig. 11 minh họa khả năng cảm ứng của các peptit kháng khuẩn và protein bởi dịch chiết ES0.

Fig. 12 là ảnh của SDS-PAGE gel của dịch chiết ES0.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả của sáng chế, “tỷ lệ tương đồng” giữa hai trình tự axit nucleic dùng để chỉ tỷ lệ của các nucleotit giống nhau giữa hai trình tự cần so sánh, thu được sau khi sắp hàng theo cách tốt nhất (sắp hàng tối ưu), trong đó tỷ lệ này hoàn toàn mang tính thống kê và sự khác nhau giữa hai trình tự được phân bố ngẫu nhiên và theo toàn bộ chiều dài của chúng. Việc so sánh hai trình tự axit nucleic thường được thực hiện bằng cách so sánh các trình tự này sau khi chúng được sắp hàng theo cách tối ưu, trong đó việc so sánh này có thể được thực hiện theo từng đoạn hoặc từng “cửa sổ so sánh”. Ngoài việc sắp hàng bằng tay, việc sắp hàng tối ưu trình tự để so sánh có thể được thực hiện bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith và Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Needleman và Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp nghiên cứu tính đồng nhất của Pearson và Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. The USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy tính có sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Group Computer, 575 Science Dr., Madison, WI, or the BLAST N or BLAST P comparison software).

Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic được xác định bằng cách so sánh hai trình tự đã sắp hàng theo cách tối ưu trong đó trình tự axit nucleic cần so sánh có thể bao gồm đoạn cài xen hoặc đoạn khuyết liên quan tới trình tự viện dẫn để sắp hàng tối ưu giữa hai trình tự này. Tỷ lệ tương đồng được tính toán bằng cách xác định số vị trí giống nhau của các nucleotit giữa hai trình tự, tiếp đó chia số vị trí giống nhau cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh và nhân kết quả thu được với 100 để thu được tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự này.

Ví dụ, chương trình “trình tự BLAST 2” (Tatusova *et al.*, “BLAST 2 sequences— a new tool for comparing protein and nucleotide sequences,” FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), ở trang <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, có thể được sử dụng với các thông số mặc định (cụ thể đối với các thông số “điểm phạt cho đoạn quãng cách”: 5, và “điểm phạt cho đoạn mở rộng”: 2; với ma trận đã

chọn, ví dụ, ma trận “BLOSUM 62” được gợi ý bởi chương trình), với tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự cần so sánh được tính toán trực tiếp bởi chương trình. Cũng có thể sử dụng các chương trình khác như phần mềm “ALIGN” hoặc “Megalign” (DNASTAR).

Theo phương án khác, vi khuẩn theo sáng chế chứa ít nhất một plasmit bao gồm trình tự SEQ ID No. 2, hoặc trình tự bất kỳ với mức tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn 85%, 90%, 95% và 98% so với trình tự SEQ ID No. 2 này.

Theo phương án ưu tiên, vi khuẩn LMB64 chứa ít nhất một plasmit bao gồm trình tự SEQ ID No. 2.

Theo phương án ưu tiên, vi khuẩn LMB64 này khác biệt ở chỗ nó không phải vi khuẩn dạng sợi.

Các đặc điểm đặc trưng khác của vi khuẩn LMB64 này sẽ được mô tả chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Ngoài ra, vi khuẩn LMB64 theo sáng chế được Người nộp đơn nộp lưu theo Hiệp ước Budapest (the Budapest Treaty) tại Ngân hàng các chủng vi sinh vật quốc gia (the *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* - CNCM), viện Pasteur, Paris, vào ngày 8 tháng 4 năm 2010, với số hồ sơ là I-4290.

Do đó, một đối tượng của sáng chế là vi khuẩn được nộp lưu cho CNCM vào ngày 8 tháng 4 năm 2010, với số hồ sơ là I-4290, hoặc dạng tương đồng, thể hệ con cháu hoặc thể đột biến khác bất kỳ.

Thuật ngữ “thể đột biến” dùng để chỉ vi khuẩn bất kỳ có nguồn gốc trực tiếp từ chủng I-4290 và có thể bao gồm thể đột biến tự nhiên hoặc dạng tái tổ hợp, ví dụ, như dạng tái tổ hợp bất kỳ liên quan tới quá trình tăng sinh tế bào, phân chia tế bào (đột biến do xuất hiện các sai sót trong quá trình phân chia vi khuẩn hoặc sao chép ADN) hoặc cơ chế khác bất kỳ của việc chọn lọc tự nhiên, như chọn lọc các thể đột biến có tính kháng hoặc trở nên có tính kháng với hợp chất đã định. Các thể đột biến bao gồm vi khuẩn bất kỳ có nguồn gốc từ chủng I-4290 chứa một hoặc nhiều đoạn đột biến trong trình tự hệ gen của chúng (hoặc đoạn đột biến của plasmit của chúng), trong đó các đoạn đột biến này được tạo ra bởi phóng xạ, virus, gen nhảy hoặc bằng cách đột biến hóa học.

Theo phương án thứ nhất, từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn, toàn bộ sinh

khối có thể được phân lập bằng các phương pháp đã biết khác nhau như, ví dụ, bằng cách lọc, đông tụ bằng rượu (etanol, isopropanol, isobutanol), bằng cách làm khô trên ống lăn có lớp trên đã được cắt nhỏ, v.v., và sau đó được sử dụng ở dạng đông khô hoặc bất hoạt bằng nhiệt.

Theo phương án ưu tiên khác, sáng chế đề xuất một cách tổng thể dịch chiết chứa vi khuẩn, cũng được gọi là phân đoạn vi khuẩn, thu được từ huyền phù chứa vi khuẩn như đã nêu trên, cụ thể là vi khuẩn LMB64.

Thuật ngữ “dịch chiết chứa vi khuẩn” dùng để chỉ dịch chiết hoặc phân đoạn bất kỳ của sinh khối vi khuẩn hoặc phân đoạn hoạt tính bất kỳ của dịch chiết này. Ví dụ, dịch chiết như vậy có thể thu được từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn LMB64 bằng phương pháp điều chế bao gồm ít nhất một bước phân giải vi khuẩn và một bước tách các phân đoạn khác nhau bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Theo cách không giới hạn, dịch chiết theo sáng chế có thể chứa các tế bào vi khuẩn được phân lập từ môi trường nuôi cấy đã được cô đặc, ví dụ bằng cách ly tâm; hoặc các tế bào vi khuẩn cô đặc đã qua công đoạn xử lý trong đó vỏ tế bào được làm vỡ ra bằng các cách bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như bằng tác động của siêu âm hoặc chưng cất cao áp; hoặc dịch nổi thu được bằng cách lọc.

Bước quan trọng trong phương pháp chiết theo sáng chế là bước loại bỏ các thành phần nội bào khác nhau, ví dụ, như axit nucleic (ADN nhiễm sắc thể, ADN vòng ngoài nhiễm sắc thể, plasmid), ribosom và các chất chứa trong nội bào như glycogen, tinh bột và poly- α -hydroxybutyrat, v.v..

Theo cách ưu tiên, dịch chiết chứa vi khuẩn theo sáng chế thu được sau khi xử lý huyền phù chứa vi khuẩn này theo cách sao cho loại bỏ được các thành phần nội bào.

Kết quả là dịch chiết theo sáng chế chủ yếu bao gồm các thành phần có nguồn gốc từ màng, khe quanh tế bào chất và/hoặc từ khe ngoại bào.

Cụ thể hơn, các thành phần nội bào này bao gồm ít nhất một axit nucleic.

Ngoài việc loại bỏ các hợp chất nội bào, và không có tính giới hạn, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể dễ dàng tách, sau khi phân giải vi khuẩn và ly tâm, các thành phần của dịch nổi nuôi cấy (dưới đây gọi là phân đoạn

S0) và các thành phần cấu thành phần hạt (pellet) (dưới đây gọi là E0). Ví dụ, có thể cho rằng ngưỡng tách giữa các thành phần S0 và E0 là trọng lượng phân tử khoảng 100kDa. Do đó, phần lớn các thành phần của phân đoạn S0 có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 100kDa, trong khi đó phần lớn các thành phần của phân đoạn E0 có trọng lượng phân tử lớn hơn 100kDa.

Cụ thể hơn, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tiến hành chiết và tách các phân tử sinh học có trong dịch nổi nuôi cấy (S0) ra khỏi các thành phần chủ yếu cấu thành từ protein bề mặt và protein nằm ở khe quanh tế bào chất của vi khuẩn (E0).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dịch chiết chứa vi khuẩn chứa phân đoạn E0 bao gồm ít nhất protein màng, protein quanh bào chất và protein có nguồn gốc từ roi.

Protein quanh bào chất bao gồm các protein nằm ở khe quanh tế bào chất của vi khuẩn Gram âm có thể được giải phóng bằng cách bằng cách sốc thẩm thấu hoặc bằng cách ủ trong môi trường chứa tác nhân chaotrop hoặc chất làm sạch (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition: Sambrook and Russell. CSHL Press).

Các protein có nguồn gốc từ roi bao gồm các protein multimer của roi hoặc đoạn roi. Các phương pháp phân lập và tinh chế toàn bộ roi vi khuẩn bằng các chất làm sạch sau đó, tách siêu ly tâm (với sự có mặt của gradien CsCl) đã được mô tả trong tài liệu. Theo sáng chế, các ví dụ về các phương pháp chiết có thể bao hàm cả đoạn roi.

Protein màng bao gồm các protein được neo giữ trên màng và một phần của chúng được tiếp xúc trên bề mặt (protein ngoài màng, hoặc Omp), các protein bám dính trên bề mặt màng, lipoprotein và porin (Ward JB., Microbial adhesion to surfaces, 1980).

Theo phương án ưu tiên, protein màng này cấu thành từ porin, OmpA, lipopolysaccharit và/hoặc lipoprotein.

Theo phương án khác, sáng chế ưu tiên sử dụng phân đoạn S0.

Cụ thể hơn, dịch chiết chứa vi khuẩn theo sáng chế bao gồm phân đoạn S0 bao gồm ít nhất một peptit tiết và protein và chất chuyển hóa sơ cấp.

Peptit tiết và protein bao gồm peptit và protein được tạo ra tự nhiên và tiết bởi vi khuẩn LMB64 và có thể được thu hồi bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Chất chuyển hóa sơ cấp bao gồm các phân tử nhỏ trong đó vi khuẩn LMB64 được sản sinh và tiết vào môi trường nuôi cấy.

Sự có mặt của các lipopolysacarit nằm trong phân đoạn S0 cũng được đề cập trong bản mô tả này. Thực vậy, mặc dù các lipopolysacarit được tìm thấy chủ yếu trong phân đoạn E0, nhưng chúng cũng được tìm thấy với lượng nhỏ trong phân đoạn S0.

Theo cách có lợi, các phân đoạn E0 và S0 có thể được gộp vào theo cách sao cho thu được phân đoạn ES0 bằng cách để yên, ví dụ, môi trường nuôi cấy cần được ủ và phản ứng trong môi trường bazơ (độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11) trong thời gian khoảng 5 giờ ở nhiệt độ 4°C, bằng cách ly tâm và lọc qua màng 0,2µm để thu được dung dịch ES0 trong suốt.

Do đó, ngoài các thành phần khác, dịch chiết chứa vi khuẩn ES0 còn bao gồm protein màng, lipopolysacarit, protein quanh bào chất, đoạn protein của roi và các chất chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp được tạo ra bởi vi khuẩn.

Theo phương án ưu tiên, dịch chiết ES0 có profin protein bao gồm ít nhất, theo kỹ thuật SDS-PAGE, 12 dải gồm 3 dải riêng rẽ tương ứng với trọng lượng phân tử (khoảng trọng lượng phân tử đưa ra liên quan tới các tiêu chuẩn của phân tử, đặc biệt được cung bởi Bio-Rad Laboratories) nằm trong khoảng:

- dải 1: nằm trong khoảng từ 30 kDa đến 36 kDa, tốt hơn là bằng 34 kDa;
- dải 2: nằm trong khoảng từ 41 kDa đến 45 kDa, tốt hơn là bằng 43 kDa;
- dải 3: nằm trong khoảng từ 47 kDa đến 51 kDa, tốt hơn là bằng 49 kDa.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dịch chiết chứa vi khuẩn bao gồm phân đoạn ES0 bao gồm ít nhất phân đoạn E0 và phân đoạn S0.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất dịch chiết chứa vi khuẩn bao gồm phân đoạn ES0 có profin protein, thu được bằng cách SDS-PAGE, bao gồm 3 dải riêng rẽ tương ứng với trọng lượng phân tử lần lượt nằm trong khoảng từ 30 kDa đến 36 kDa, nằm trong khoảng từ 41 kDa đến 45 kDa, và nằm trong khoảng từ 47 kDa đến 51 kDa.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất dịch chiết chứa vi khuẩn bao gồm

phân đoạn ES0 có profin protein, thu được bằng cách SDS-PAGE, bao gồm 3 dải riêng rẽ tương ứng với trọng lượng phân tử lần lượt bằng 34 kDa, 43 kDa và 49 kDa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dịch chiết chứa vi khuẩn bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy vi khuẩn LMB64 trong môi trường thích hợp; và
- b) loại bỏ các thành phần nội bào.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dịch chiết chứa vi khuẩn S0, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy vi khuẩn LMB64 trong môi trường thích hợp;
- b) ly tâm môi trường nuôi cấy này; và
- c) thu hồi dịch nổi S0.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dịch chiết chứa vi khuẩn E0, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy vi khuẩn LMB64 trong môi trường thích hợp;
- b) ly tâm môi trường nuôi cấy này và loại bỏ dịch nổi;
- c) xử lý sinh khối thu được từ bước b) theo cách sao cho loại bỏ được các thành phần nội bào; và
- d) thu hồi E0 bazơ.

Theo cách ưu tiên, bước c) bao gồm việc xử lý siêu âm sinh khối thu được từ bước b) và sau đó ly tâm lần thứ nhất để loại bỏ các viên nhỏ bao gồm các thành phần nội bào và sau đó ly tâm lần thứ hai dịch nổi.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế dịch chiết chứa vi khuẩn E0, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy vi khuẩn LMB64 trong môi trường thích hợp;
- b) ly tâm môi trường nuôi cấy này và loại bỏ dịch nổi;
- c) xử lý bằng cách siêu âm sinh khối thu được từ bước b);
- d) ly tâm sinh khối đã được xử lý bằng siêu âm và loại bỏ sinh khối thu được;
- e) ly tâm dịch nổi thu được từ bước d); và
- f) thu hồi E0 bazơ.

Cần lưu ý rằng các phương pháp khác nhau như đã nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa và các phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng.

Do người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hiểu từ phần Ví dụ dưới đây, nên người nộp đơn cho rằng, ngoài các thao tác mong muốn cần tiến hành đối với dịch chiết, còn một số các thao tác mới khác chưa được mô tả trước đây.

Theo khía cạnh có lợi thứ nhất, sáng chế mô tả quá trình điều biến miễn dịch, dựa trên đặc tính điều biến của các xytokin gây viêm. Cụ thể hơn, việc sử dụng vi khuẩn và/hoặc dịch chiết theo sáng chế sẽ tạo ra đáng kể các xytokin IL-10, IL-12 và TNF- α , tốt hơn là có liên quan tới đáp ứng miễn dịch Th1, và ức chế đáng kể các xytokin IL-4 và IL-6. Kết quả là làm hoạt hóa các tế bào Langerhans và trở về trạng thái cân bằng Th1/Th2.

Ngoài ra, theo cách khác, còn nhận thấy rằng việc sử dụng vi khuẩn và/hoặc dịch chiết theo sáng chế có thể làm giảm đáng kể sự biểu hiện của thụ thể IgE, lưu ý rằng IgE làm tăng xuất hiện hiện tượng dị ứng.

Theo khía cạnh có lợi khác, là hiển nhiên bởi các ví dụ, sáng chế dựa trên việc sử dụng vi khuẩn và/hoặc dịch chiết theo sáng chế cảm ứng quá trình tạo ra các peptit kháng khuẩn như, ví dụ, peptit hBD-2, hBD-3, S1007A và LL-31.

Cụ thể hơn, như đã nêu trên, dịch chiết chứa vi khuẩn *Vitreoscilla filiformis* (Guéniche A. *et al.*, Eur J Dermatol 2006; 16:380) đã biết là có tác động trên TLR2, do sự có mặt của OmpA, và trên TLR4, do sự có mặt của các lipopolysacarit. Do không có roi trong vi khuẩn *V. filiformis*, nên dịch chiết thu được từ *V. filiformis* không có hoạt tính TLR5.

Trước tiên, người nộp đơn mô tả dịch chiết chứa vi khuẩn theo sáng chế, ngoài việc tác động lên TLR2 và TLR4, nó còn tác động lên TLR5.

Do đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn và/hoặc dịch chiết chứa vi khuẩn như đã nêu trên để dùng làm chất hoạt hóa TLR2, TLR4 và TLR5.

Theo cách ưu tiên, chất hoạt hóa TLR2, TLR4 và TLR5 là dịch chiết chứa vi khuẩn bao gồm dịch chiết gồm toàn bộ hoặc một phần protein có nguồn gốc từ roi. Trong trường hợp này, ví dụ, tốt hơn nếu dịch chiết này là dịch chiết E0 hoặc dịch chiết ES0.

Hoạt tính hoạt hóa TLR5 này là hoạt tính đáng kể trong đó đã biết rằng TLR5 cảm ứng một số peptit kháng khuẩn nhất định như psoriasin (S100A7) và hBD-2 (Glaser *et al.*, Journal of Investigative Dermatology (2009) 129, 641–649). Ngoài ra, các chất chủ vận TLR5 có tác dụng hiệp đồng với các chất chủ vận TLR2 và TLR4, từ đó có khả năng tạo ra peptit kháng khuẩn. Nhận thấy rằng bằng cách phong bế TLR5 bằng kháng thể, các peptit được tạo ra rất ít hoặc không được tạo ra.

Do đó, khía cạnh này là có tính mới về mặt ứng dụng điều biến miễn dịch đối với vi khuẩn và/hoặc dịch chiết theo sáng chế.

Ngoài ra, theo cách bất ngờ, người nộp đơn cũng nhận thấy rằng trái với dịch chiết chứa vi khuẩn đã mô tả cho đến nay, hoạt tính đối kháng hướng tới PAR2. Hoạt tính này là có tác dụng đáng kể trong điều trị kháng viêm.

Do đó, sáng chế đề xuất cụ thể vi khuẩn và/hoặc dịch chiết chứa vi khuẩn như đã nêu trên được dùng làm chất đối kháng PAR2.

Theo cách ưu tiên, chất đối kháng PAR2 là dịch chiết chứa vi khuẩn này bao gồm dịch chiết S0 hoặc dịch chiết ES0.

PAR2 được biểu hiện quá mức ở tế bào nội mô, tế bào mô cơ trực tràng, tế bào ruột, tế bào thần kinh ruột, tế bào miễn dịch và tế bào keratin. Các proteaza (trypsin, tryptaza) có mặt với lượng lớn trong môi trường sẽ phân tách PAR2 ở đầu N bộc lộ peptit đặc hiệu, hoạt hóa chính thụ thể này (hiện tượng tự hoạt hóa). Do đó, nó sẽ hoạt hóa quá trình tạo ra các gây viêm xytokin và kích hoạt quá trình viêm (Vergnolle, N., 2009 Pharmacol. Ther. 123:292-309). Hiện tượng này quan sát được ở chuột hoang nhưng không xuất hiện ở chuột KO (thiếu hụt PAR2). Việc điều trị bằng antiproteaza và/hoặc chất đối kháng PAR2 có thể tránh được hiện tượng viêm.

Việc kết hợp và hiệp đồng tất cả các tác động này sẽ làm cho vi khuẩn LMB64, hoặc dịch chiết bất kỳ có nguồn gốc từ cùng một loại vi khuẩn này, có hiệu quả cao trong điều trị bệnh viêm và, cụ thể hơn, bệnh viêm trong đó PAR2 có liên quan và/hoặc hệ miễn dịch bị suy yếu, rối loạn hoặc mất cân bằng.

Do đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn như đã nêu trên và/hoặc dịch chiết chứa vi khuẩn có nguồn gốc từ vi khuẩn này được dùng để điều chế chế phẩm được dự

định để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn viêm ngoài da.

Theo cách ưu tiên, các rối loạn viêm ngoài da này bao gồm viêm da cơ địa dị ứng, bệnh ngứa, nấm eczema và bệnh vảy nến.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm hoạt chất là ít nhất một vi khuẩn và/hoặc một dịch chiết chứa vi khuẩn theo sáng chế.

Do đó, theo cách ưu tiên, sáng chế đề xuất mỹ phẩm hoặc chế phẩm dùng ngoài da.

Chế phẩm theo sáng chế dùng để điều trị các rối loạn viêm ngoài da.

Theo cách ưu tiên, các rối loạn viêm ngoài da này bao gồm viêm da cơ địa dị ứng, bệnh ngứa, nấm eczema và bệnh vảy nến.

Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất bổ trợ và hỗ trợ cho việc bào chế như chất nhũ hóa, chất độn, chất tạo gel, chất gắn kết nước, chất rắn, chất ổn định, chất màu, chất tạo hương và chất bảo quản.

Mỹ phẩm hoặc chế phẩm dùng ngoài da theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược tương hợp về mặt da học khác.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng nhũ tương nước trong dầu (W/O) hoặc dầu trong nước (O/W), đa nhũ tương như, ví dụ, nhũ tương nước trong dầu trong nước (W/O/W) hoặc dầu trong nước trong dầu (O/W/O), vi nhũ tương hoặc ở dạng thể phân tán trong nước hoặc thể phân tán trong lipid, gel hoặc sol khí.

Tá dược tương hợp với chế phẩm dùng ngoài da hoặc mỹ phẩm có thể là tá dược bất kỳ trong số các loại tá dược đã biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật để thu được chế phẩm dùng tại chỗ ở dạng sữa, kem, dầu thơm, dầu, nước thơm, gel, gel bột, sáp thơm bôi tóc, khí dung, v.v.

Ngoài chế phẩm dùng ngoài da và mỹ phẩm, sáng chế cũng đề xuất được phẩm để dùng làm thuốc.

Do đó, sáng chế đề xuất được phẩm còn bao gồm chất mang dược dụng.

Trong bản mô tả này, “chất mang dược dụng” dùng để chỉ hợp chất hoặc dạng kết hợp của hợp chất tạo ra một phần dược phẩm không gây ra các phản ứng thứ cấp và, ví dụ, thuận tiện cho việc dùng các hoạt chất, làm tăng vòng đời của chúng và/hoặc có hiệu lực cho cơ thể, làm tăng độ tan của dung dịch hoặc cải thiện

khả năng bảo quản của chúng. Các chất mang được dụng là đã biết và thích hợp với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật theo bản chất và đường dùng của hoạt chất đã chọn.

Tốt hơn, nếu các hợp chất này có thể được dùng toàn thân theo đường trong cơ, trong da, trong màng bụng hoặc dưới da, hoặc theo đường uống. Chế phẩm bao gồm các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng một vài liều, ngắt quãng theo thời gian.

Đường dùng, liều dùng và dạng dùng tối ưu của chúng có thể được xác định theo tiêu chuẩn thường được xem xét trong quá trình thiết lập việc điều trị phù hợp với bệnh nhân, ví dụ, như tuổi tác hoặc thể trọng của bệnh nhân, mức độ trầm trọng của tình trạng sức khỏe tổng thể của bệnh nhân, khả năng dung nạp với việc điều trị và các tác dụng phụ cần lưu ý.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được hiểu chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây nhằm minh họa cho sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Chọn lọc và mô tả đặc điểm của vi khuẩn LMB64

Vi khuẩn AV13 được phân lập từ nước ngầm.

Vị trí phân loại của vi khuẩn LMB64 mới được đưa ra trong Fig. 1.

Cụ thể hơn, vi khuẩn LMB64 có hình que với chiều dài khoảng 2,3 μ m ($\pm 0,3$) và chiều rộng khoảng 1,0 μ m ($\pm 0,1$). Đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn này là có roi phân cực (các Fig.2A và 2B). Như có thể thấy trong các ảnh này, vi khuẩn LMB64 là vi khuẩn không phải dạng sợi.

Như đã nêu trên, vi khuẩn LMB64 có plasmit vòng khoảng 11kpb. Plasmit này được xác định trình tự hoàn toàn (SEQ ID No. 2).

Gen mã hóa 16S rRNA cũng được xác định trình tự (SEQ ID No. 1). Vi khuẩn này được nuôi cấy với chất lên men trong môi trường tổng hợp. Tốc độ phát triển là lớn hơn nếu môi trường có nồng độ các chất chứa cacbon thấp.

Môi trường nuôi cấy đã thử nghiệm là môi trường R3, MS-glucosa và LB chứa các thành phần như được mô tả trong các Bảng 1a, 1b và 1c, tương ứng.

Thành phần của môi trường R3	
Dịch chiết nấm men	1 g/l
Đifco proteoza pepton	1 g/l
Axit casamino	1 g/l
Glucoza	1 g/l
Tinh bột hòa tan	1 g/l
Natri pyruvat	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,6 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g/l

Bảng 1a

Thành phần của môi trường MS-Glucoza	
Glucoza	6,0 g/l
Axit xitric	0,84 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g/l
NH ₄ Cl	1,06 g/l
K ₂ HPO ₄ khan	8,75 g/l
Muối natri của axit pyruvic	0,5 g/l
Kẽm sulfat, 7H ₂ O	4 mg/l
Coban clorua, 6H ₂ O	3,5 mg/l
Natri molybđat, 2H ₂ O	3,5 mg/l
Mangan sulfat, 1H ₂ O	5 mg/l
Axit boric	2 mg/l
Axit clohydric đậm đặc	50 mg/l
Đồng sulfat, 5H ₂ O	4 mg/l
Sắt clorua, 6H ₂ O	27 mg/l

Bảng 1b

Thành phần của môi trường LB	
Trypton	10 g/l
Dịch chiết nấm men	5 g/l
NaCl	5 g/l

Bảng 1c

Tốc độ phát triển của vi khuẩn LMB64 theo loại môi trường nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 2 dưới đây.

Tốc độ phát triển (/giờ)

LB	0,25 ($\pm 0,05$)
LB (tỷ lệ pha loãng 1/2)	0,46 ($\pm 0,11$)
LB (tỷ lệ pha loãng 1/5)	0,60 ($\pm 0,14$)
LB (tỷ lệ pha loãng 1/10)	0,69 ($\pm 0,15$)
MS-glucoza	0,13 ($\pm 0,04$)
R3	0,62 ($\pm 0,14$)

Bảng 2

Khả năng phát triển tối ưu được xác định theo nhiệt độ, độ pH và độ mặn của môi trường nuôi cấy R3 (Fig. 3).

Nguồn cacbon có khả năng đồng hóa bởi vi khuẩn được đặc trưng bằng cách sử dụng khoang API 50CH (nhiệt độ ủ: 25°C). Kết quả được tóm tắt trong Bảng 3 dưới đây.

Thời gian ủ

4 ngày

5 ngày

1. Glyxerol		
2. Erythritol		
3. D-arabinoza		
4. L-arabinoza		
5. D-riboza		
6. D-xyloza		
7. L-xyloza		
8. D-đonitol		
9. Metyl- β -D-xylopyranosit		
10. D-galactoza		
11. D-glucoza	+	+
12. D-fructoza	+	+
13. D-manoza		
14. L-sorboza		
15. L-rhamnoza		
16. Đulxitol		
17. Inositol	1	+
18. D-manitol		
19. D-sorbitol		
20. Metyl- α -D-mannopyranosit		
21. Metyl- α -D-glucopyranosit		
22. N-axetylglucosamin		

23. Amygdalin		
24. Arbutin		
25. Esculin/sắt xitrat		
26. Salixin		
27. D-celobioza		
28. D-maltoza	1	+
29. D-lactoza (lấy từ bò)		
30. D-melibioza		
31. D-sucroza	+	+
32. D-trehaloza	1	+
33. Inulin		
34. D-melezitoza		
35. D-raffinoza		
36. Tinh bột		
37. Glycogen		
38. Xylitol		
39. Gentiobioza		
40. D-turanoza	1	+
41. D-lyxoza		
42. D-tagatoza		
43. D-fucoza		
44. L-fucoza		
45. D-arabitol		
46. L-arabitol		
47. Kali gluconat		
48. Kali 2-ketogluconat		
49. Kali 5-ketogluconat		

+: chất có thể sử dụng, l: ít sử dụng

Bảng 3

Hoạt tính enzym được thể hiện trong khoang API ZYM như sau: phosphataza kiềm, esteraza (C4), esteraza/lipaza (C8), leuxin arylamidaza, valin arylamidaza, phosphataza axit, naphtol-AS-BI-phosphohydrolaza, và α -glucosidaza.

Vì khuẩn LMB64 nhạy với tất cả các loại kháng sinh đã thử nghiệm như được thể hiện ở Bảng 4 dưới đây.

Kháng sinh đã thử nghiệm	Vùng đường kính ức chế (mm)			Hoạt tính ức chế
	R3	LB 1/2	LB 1/5	
Ampicillin (10 ug)	29	28	29	+
Chloramphenicol (30 ug)	29	26	24	+

Ciprofloxacin (5 ug)	38	34	34	+
Kanamycin (30 ug)	27	30	27	+
Penicillin (6 ug)	21	26	20	+
Polymyxin B (50 ug)	11	15	13	+
Rifampicin (30 ug)	20	19	15	+
Tetracycline (30 ug)	30	25	20	+
Streptomycin (10 ug)	25	25	24	+
Vancomycin (30 ug)	20	21	21	+

Bảng 4

Ví dụ 2: Phương pháp chiết các phân đoạn E0, S0 và ES0

Trước khi nuôi cấy: Chủng AV13 được chủng ngừa vào bình cầu Erlenmyer chứa 250ml môi trường MS glucoza pyruvat (xem Bảng 5 dưới đây), sau đó ủ kèm theo khuấy trộn trong thời gian khoảng 40 giờ ở 30°C (pH 7) và 200 vòng/phút cho tới khi thu được $OD_{600} \approx 1,5$.

MS Glucoza Pyruvat	
Axit xitric	0,84 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g
NH ₄ Cl	1,06 g
K ₂ HPO ₄ khan	8,75 g
Muối natri của axit pyruvic	0,5 g
Hỗn hợp oligo	1 ml
ddH ₂ O vừa đủ	1000 ml
Kiểm tra độ pH	7
Chung cao áp	121°C 30 phút
Sau khi hấp add:	
20% glucoza	30 ml

Hỗn hợp oligo	
Hòa tan vào 100ml nước tinh khiết:	
Kẽm sulfat, 7H ₂ O	4 g
Coban clorua, 6H ₂ O	3,5 g
Natri molybđat, 2H ₂ O	3,5 g
Mangan sulfat, 1H ₂ O	5 g
Axit boric	2 g
Axit clohydric đậm đặc	50 g
Đồng sulfat, 5H ₂ O	4 g
Hòa tan vào 50ml nước tinh khiết:	
Sắt clorua, 6H ₂ O	27 g
ddH ₂ O vừa đủ	1000 ml

Bảng 5

Môi trường nuôi cấy: Môi trường trước khi nuôi cấy sau đó được chủng ngừa chất lên men (Applikon) chứa 3,7l MS môi trường pyruvat + 114 ml 20% dung dịch glucoza. Thiết bị đo độ nhạy nhiệt độ điều chỉnh nhiệt độ tốt hơn là gần bằng 30°C. Thiết bị đo độ nhạy oxy (AppliSens) được sử dụng để duy trì nồng độ oxy hòa tan trong môi trường ở 18-25%. Thiết bị đo độ nhạy pH (AppliSens) được sử dụng để duy trì độ pH bằng 7 bằng cách bổ sung 10% NH₄OH bằng bơm có tốc độ chảy cố định. Thiết bị đo độ nhạy Wedgewood Analytical được sử dụng để kiểm soát sự thay đổi về cường độ quang học theo thời gian thực. Môi trường nuôi cấy được đặt chương trình theo chế độ tính theo mẻ; bằng cách bơm với tốc độ chảy thay đổi môi trường nuôi cấy được bổ sung 20% dung dịch glucoza. Quá trình lên men được cho dừng lại khi OD₆₀₀ ≈ 22-26, thường sau thời gian khoảng 30 giờ.

Chiết S0: Dịch nổi được tách ra khỏi sinh khối bằng cách ly tâm trong 1 giờ ở 4 °C và 4000 g.

Chiết E0: Sinh khối ẩm được lấy ra khỏi dung dịch NaCl (1M). Sau khi ly

tâm trong 15 phút ở 4°C và 9000g, dịch nổi được gạn bỏ và các viên nhỏ được lấy ra khỏi dung dịch NaCl 1M. Sau đó, ống mẫu được rửa trong bể siêu âm lạnh với cường độ 50-60W trong vài phút. Sau khi ly tâm trong 30 phút ở 4°C và 6000 g, các viên nhỏ được gạn bỏ và dịch nổi được thu hồi. Hai thể tích etanol lạnh được bổ sung và huyền phù được để qua đêm ở 4°C. Sau ly tâm trong 30 phút ở 4°C và 6000 g, dịch nổi được gạn bỏ và các viên nhỏ được lấy ra khỏi dung dịch đệm Tris 25mM, độ pH = 8,8.

Chiết ES0: Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến pH bazơ (pH 9-11) bằng dung dịch đệm bazơ. Bước tiếp theo là ủ đồng thời khuấy trộn trong 5 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau ly tâm, dịch nổi được lọc trước để loại bỏ trừ mảnh vụn sinh khối còn lại và sau đó lọc trên thiết bị lọc 0,2µm. Thu được dung dịch trong suốt màu vàng (ES0).

Protein được phân tích theo quy trình DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad). đường được phân tích theo đường lượng glucoza theo phương pháp phenol/axit sulfuric (Dubois, M. *et al.*, 1956).

Ví dụ, Bảng 6 dưới đây thể hiện một số đặc tính cụ thể của dịch chiết ES0 như thu được trong các điều kiện nêu trên.

	Mẻ thử nghiệm	Mẻ tiền lâm sàng 1
Cảm quan	Chất lỏng đồng nhất và trong mờ màu vàng cam Tỷ trọng gần bằng nước	
pH (có mặt dung dịch đệm bazơ)	10,0	10,2
Cặn khô (cân bằng nhiệt)	5,9%	5,1%
Profin protein (SDS-PAGE)	12 dải phát hiện được (bao gồm 3 dải riêng rẽ có kích thước khoảng 34 kDa, 43 kDa và 49 kDa)	
Thử nghiệm protein toàn phần (uBCA)	2,9 mg/ml	3,0 mg/ml

Bảng 6

Cần hiểu rõ rằng dữ liệu nêu trên chỉ mang tính chất minh họa.

Chính xác hơn, dữ liệu liên quan đến profin protein thu được bằng cách SDS-PAGE có 3 dải riêng rẽ.

Quy trình SDS-PAGE:

Dịch chiết ES0 được đưa vào dung dịch đệm (20mM Tris-HCl, độ pH = 8,0; 1mM EDTA; 2,5% SDS và 0,01% bromophenol xanh da trời) và 1M DTT (1,4-đithiothreitol). Mẫu và hỗn hợp chứa các gen đánh dấu trọng lượng phân tử (WesternC, Bio-Rad) được nạp lưu tương ứng trong các lỗ chứa gel acrylamit 8-16% SDS-PAGE (GeBaGel, Gene Bio-Application). Dung dịch đệm di chuyển chứa 2,5mM Tris, 19,2mM glyxin và 0,01% SDS (khối lượng/thể tích). Quá trình di chuyển được tiến hành ở điện thế ổn định 160V trong khoảng 1 giờ (hệ thống GeBaGel). Các dải protein sau đó được nhuộm bằng Coomassie xanh da trời (Instant Blue, Expedeon). Kích thước được tính toán theo mẫu chuẩn đã biết (STD).

Gel thu được có mặt trên Fig. 12.

Theo một phương án, 3 dải này có phân tử lượng lần lượt xấp xỉ 34kDa, 43kDa và 49kDa.

Ví dụ 3: Chứng minh tác dụng được lý của các phân đoạn E0 và ES0

Các tế bào Langerhans (LC) được tạo ra *in vitro* từ các bạch cầu đơn nhân người được phân lập từ túi Buffy-Coat do Trung tâm Máu quốc gia Pháp (French National Blood Service) cung cấp (*Etablissement Français du Sang (EFS) Pyrénées Méditerranée*): tiến hành phân lập theo gradien Ficoll (Môi trường tách lympho bào, tỷ trọng 1,077g/ml) và tinh chế bằng cách chọn lọc miễn dịch từ tính (Miltenyi Biotec); quá trình biệt hóa LC được tiến hành trong 6 ngày với sự có mặt của cytokine xytokin (GM-CSF/IL-4/TGF β). LC được phân bố vào các đĩa 24 lỗ trong môi trường nuôi cấy RPMI-5% FCS được ủ trong 24 giờ với dịch chiết ES0.

Các phân tử bề mặt được phân tích bằng cách đo dòng chảy tế bào (FACSCalibur, BD Biosciences) bằng cách nhuộm 3 hoặc 4 lần: CD1a/CD54/CD80/CD83/CD86/Fc ϵ RI; cytokine đã tiết vào dịch nuôi cấy được phân tích bằng Cytometry Bead Array (cat. no. 550749, BD) trong máy đo dòng chảy tế bào: IL-6, IL-8, TNF, IL-4, IL-10, IL-12.

3.1 Cảm ứng cytokine quan trọng để phân cực Th1

Theo hiệu lực phụ thuộc liều, dịch chiết E0 cảm ứng sự biểu hiện cytokine

IL-10 và IL-12 bằng các tế bào Langerhans (Fig. 4). Các cytokin này thúc đẩy quá trình cảm ứng tính phân cực TH1 của lympho bào T đơn giản.

3.2 Đột biến tế bào Langerhans và ức chế thụ thể IgE (FcεRI)

Dịch chiết E0 cảm ứng quá trình đột biến tế bào Langerhans được quan sát bằng cách cảm ứng phụ thuộc liều của các phân tử bề mặt CD80, CD86, CD83 và CD54 (Fig. 5). Tương tự, dịch chiết E0 ức chế sự biểu hiện của các thụ thể IgE (FcεRI) theo hiệu lực phụ thuộc liều (Fig. 6).

3.3 Hoạt hóa thụ thể tương tự Toll (TLRs)

Hoạt tính TLR của ES0 được đánh giá trên TLR2, TLR4 và TLR5 bằng cách sử dụng mô hình tế bào HEK293 đã được đồng chuyển nhiễm bởi gen đối với TLR2, TLR4 hoặc TLR5 và bởi gen báo cáo NFκB-sAP (phosphatase kiềm tiết). Quá trình gắn kết phối tử với TLR của nó làm hoạt hóa yếu tố phiên mã NFκB; gen sAP được kiểm tra bởi gen khởi đầu có thể được cảm ứng bởi NFκB. Gen báo cáo này có thể kiểm soát quá trình truyền tín hiệu tế bào thông qua các TLR: quá trình giải phóng sAP gây ra bởi ES0 và đo được bằng thử nghiệm đo nhiệt lượng có thể xác định được hoạt tính của hoạt chất chủ vận TLR2, TLR4 hoặc TLR5.

Nghiên cứu được tiến hành các dòng tế bào thận phôi người (HEK293):

- các tế bào HEK-Blue™-2 đối với TLR2,
- các tế bào HEK-Blue™-4 đối với TLR4,
- các tế bào HEK-Blue™-5 đối với TLR5,

Các dòng tế bào này được giữ trong môi trường nuôi cấy HEK-Blue™ chọn lọc 10% FCS và sau đó được phân bố vào các đĩa 96 lỗ trong môi trường phát hiện HEK-Blue™ với sự có mặt của ES0 trong 18 giờ. Các đĩa này được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đo nhiệt lượng ở 620nm

3.3.1 Hoạt hóa TLR2

Dịch chiết ES0 cảm ứng sự hoạt hóa TLR2 theo hiệu lực phụ thuộc liều với hoạt tính tối đa ở 100ng/ml (Fig. 7).

3.3.2 Hoạt hóa TLR4

Dịch chiết ES0 cảm ứng sự hoạt hóa TLR4 với hoạt tính tối đa ở 10ng/ml (Fig. 8).

3.3.3 Hoạt hóa TLR5

Dịch chiết ES0 cảm ứng sự hoạt hóa TLR5 theo cách phụ thuộc liều. Hoạt tính này được ức chế với sự có mặt của kháng thể kháng TLR5, chứng tỏ rằng có sự hoạt hóa tính đặc hiệu của dịch chiết ES0 trên TLR5 (Fig. 9).

3.4 Ức chế thụ thể đã hoạt hóa proteaza 2 (PAR2)

Quá trình ức chế thụ thể đã hoạt hóa proteaza bởi dịch chiết ES0 được đánh giá trên tế bào keratin người từ dòng tế bào (HaCaT) bằng cách đo dòng canxi nội bào đã cảm ứng sau khi kích thích đặc hiệu PAR2 bằng enzym trypsin ở lớp sừng (stratum corneum tryptic enzyme - SCTE). Đoạn môi phát huỳnh quang Fluo-4/AM được sử dụng: dạng đã este hóa của nó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thẩm thấu của nó bằng cách khuếch tán tích cực vào tế bào; dạng khử este hóa gắn kết với các ion canxi được kích thích dưới đèn phát huỳnh quang 485nm và phát ra ở 535nm.

Đoạn môi phát huỳnh quang được đưa vào các tế bào chưa ủ vào các đĩa 96 lỗ trong 30 phút và sau đó dịch chiết ES0 được ủ trong 30 phút. Dòng canxi được đo ở từng lỗ theo thời gian thực theo động lực học trước và sau khi tiêm SCTE. Các đĩa này được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc Mithras LB940™ (Berthold Technologies®).

Dịch chiết ES0 ức chế theo cách phụ thuộc liều sự hoạt hóa PAR2 cảm ứng bởi SCTE người (Fig. 10).

3.5 Điều biến vật đích của bệnh viêm da cơ địa dị ứng trên các tế bào keratin

Nghiên cứu được tiến hành trên keratin biểu bì ở người khỏe mạnh (môi trường nuôi cấy NHEK, K-SFM) về việc cảm ứng hiện tượng viêm da cơ địa dị ứng. Hoạt tính của ES0 được nghiên cứu trên các tế bào keratin có hiện tượng viêm da cơ địa dị ứng sau khi kích thích 24 giờ bằng Poly I:C + IL-4 + IL-13 + TNF- α và được phân tích bằng dây PCR về sự biểu hiện trên 32 gen đã chọn.

Trên các tế bào keratin, theo hiệu lực phụ thuộc liều dịch chiết ES0 ức chế 15 vật đích trong số các chất trung gian gây ra bệnh viêm da cơ địa dị ứng, như có thể thấy rõ ràng trong bảng 7 dưới đây (Các kết quả thể hiện đối với mỗi gen đích là tỷ lệ phần trăm ức chế thu được).

		ES0			Dexamethasone
		10 ug/ml	30 ug/ml	60 ug/ml	2 àM
Xytokin	TSLP	56%	75%	92%	91%
	IL-1 α	35%	46%	59%	54%
	IL-18	27%	44%	65%	44%
	IFN- β 1	66%	82%	90%	49%
Chemokin	IL-8	37%	55%	88%	75%
	MIP-1 α	10%	43%	75%	76%
	RANTES	15%	44%	65%	12%
	MCP-3	43%	63%	88%	Pro 20%
	TARC	58%	64%	39%	Pro 20%
	MIP-3 α	41%	61%	80%	40%
	MDC	16%	44%	58%	45%
	Skinkine	28%	32%	39%	59%
Thụ thể	IL-4-R	30%	45%	69%	75%
	RARRES3	30%	47%	63%	28%
	TLR3	22%	50%	60%	pro 29%

Bảng 7

3.6 Cảm ứng peptit kháng khuẩn

Hoạt tính của dịch chiết ES0 đối với sự biểu hiện của peptit kháng khuẩn và protein được nghiên cứu trên dòng tế bào keratin HaCaT: sau 3 giờ xử lý với sự có mặt của ES0, các tế bào được thu hồi để phân tích sự biểu hiện của các đích diệt khuẩn bằng cách RT-PCR định lượng; ARN toàn phần được chiết và thử nghiệm; sau khi phiên mã đảo ARN thông tin thành ADN vòng, bước khuếch đại PCR định lượng được tiến hành trên các đĩa 96 lỗ trên hệ PCR định lượng iCycler (Bio-Rad). Các kết quả thu được được thể hiện bằng lượng tương đối (relative quantity - RQ) của ARN thông tin sau khi xử lý bằng ES0 liên quan đến nhóm đối chứng không chứa hoạt chất. IL-1 β được sử dụng song song làm chất cảm ứng so sánh dương tính với sự biểu hiện của peptit kháng khuẩn. Sự biểu hiện của gen nhất định được xem là được điều hòa khi $RQ \geq 2$ (cảm ứng) hoặc $RQ \leq 0,5$ (ức chế).

Dịch chiết ES0 cảm ứng sự biểu hiện của peptit kháng khuẩn và các protein hBD2, hBD3, S1007A, LL37, PI3, RNaza và NOD2 (Fig. 11).

Ví dụ 4: Điều chế kem dùng “toàn thân và mặt” bao gồm dịch chiết chứa vi khuẩn ES0

Dịch chiết ES0:	0,1-5%
Dầu primoza ban đêm:	1-3%
Glyxin:	0,1-0,4%
Xeramit:	0,1-0,3%
Chất giữ ẩm:	5-20%
Chất tạo nhũ tương:	2-7%
Capric/caprylic triglyxerit:	1-10%
Chất bảo quản	
Nước vừa đủ 100%	

Ví dụ 5: Điều chế gel làm sạch “toàn thân và mặt” bao gồm dịch chiết chứa vi khuẩn ES0

Dịch chiết ES0:	0,1-5%
Dầu primoza ban đêm:	0,5-2%
Glyxin:	0,1-0,4%
Xeramit:	0,1-0,4%
Chất hoạt động bề mặt:	10-20% ở dạng hoạt tính
Chất giữ ẩm:	5-15%
Chất bảo quản	
Nước vừa đủ 100%	

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> PIERRE FABRE DERM-COSMETIQUE
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
- <120> VI KHUẨN, DỊCH CHIẾT CHỨA VI KHUẨN NÀY VÀ CHẾ PHẨM CHỮA BỆNH NGOÀI DA
CHỨA CHÚNG
- <130> D29306
- <140> PCT EP2011/073747
<141> 2011-12-22
- <150> FR 1061081
<151> 2010-12-22
- <160> 2
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 1487
<212> ADN
<213> nhân tạo
- <220>
<223> Vi khuẩn LMB64 mới, thuộc lớp
betaproteobacteria, từ nước ngầm
- <400> 1
agtttgatca tggctcagat tgaacgcggg cggcatgctt tacacatgca agtcgaacgg 60
cagcacgggc ttgcgcctgg tggcgagtgg cgaacgggtg agtaatgcgt cggaacgcgc 120
cgagtagtgg gggataacgc agcgaaagct gtgctaatac cgcatacgta ctgaggtaga 180
aagtggggga ccttcggggc tcacgctatt cgagcggccg acgtctgatt agctagttgg 240

tggggtaaag gccaccaag gcgacgatca gtagcgggtc tgagaggatg atccgccaca	300
ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat tttggacaat	360
gggcgcaagc ctgatccagc catgccgcgt gtctgaagaa ggccctcggg ttgtaaagga	420
cttttgccg ggagcaaagc ctgcttgta ataccgagtg gggatgagag taccggaaga	480
ataagcaccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggtgc aagcgtaat	540
cggaattact gggcgtaaag cgtgcgcagg cggttggtgca agtctgatgt gaaagccccg	600
ggctcaacct gggaacggca ttggagactg cacggctaga gtgcgtcaga ggggggtaga	660
attccacgtg tagcagtga atgcgtagag atgtggagga ataccgatgg cgaaggcagc	720
cccctgggat gacactgacg ctcatgcacg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac	780
cctggtagtc cacgccctaa acgatgtcaa ttagctgttg ggggttgaa tccttggtag	840
cgaagctaac gcgtgaaatt gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta aaactcaaag	900
gaattgacgg ggaccgcac aagcggtgga tgatgtggat taattcgatg caacgcgaaa	960
aaccttacct gctcttgaca tgtaccgaag cctgaagaga tttgggtgtg ccgaaaggg	1020
agcggtaaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag	1080
tcccgcaacg agcgcaacc ttgtcattag ttgccatcat ttggttgggc actctaata	1140
gactgccggt gacaaaccgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcctcat ggccttatg	1200
agcagggtt cacacgtcat acaatggctg gtacagaggg tcgccaagcc gcgaggtgga	1260
gccaatctca gaaagccgat cgtagtccg atcgactct gcaactcgag tgcgtgaagt	1320
cggaatcgct agtaatcgca gatcagcatg ctgcggtgaa tacgttccc ggtcttgatc	1380

acaccgccccg tcacaccatg ggagtggggg ataccagaag tgggtaggct aaccgcaagg 1440

gaggccgctt accacggtat gcttcatgac tgggggtgaag tcgtaac 1487

<210> 2

<211> 10948

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Vi khuẩn LMB64 mới, thuộc lớp
betaproteobacteria, từ nước ngầm

<400> 2

gggcgagca ccatcgccca ggccaaaagc caccctgcc gattcggcgg cctgttctc 60

gcgctcaatg cgctgcgcct ggtcggccaa gtcggcggtc tgctgctcgg ccttgcccg 120

caggggtgtca cgctcgcggg tcagttccgc caactgctcg gctagggcat cgcgctcggc 180

ctcgatcacc tcaccagcgg ccgccagctc ggcggcttcg ctctgcgcct ggaccaagcg 240

gccctcgacc tcggcgcggg cctggggcggc tgcgcgctcg atctcggcgg caatggcggc 300

ggtcaatgcc tggggcagtt ccggcgagc agcagcggcc accggccggg cctctcgcca 360

ggcagttaga tgcttgtaga cgggtattcg gctgccggtg cccaaacgct cgcggatcgc 420

gcggatagtc ggctgctgcc cttcgccgac cagcgcatca gcggcgcgcg cgaacgggtg 480

gcccgtgcag aggcccgcgt cgagcagatc gagcagcagg ccgccaaggc ggcacaggcc 540

cacgaagaag cccgcgccgc cgccacgcag gaagcccggc aagtgaagc cgaacgcgac 600

gaagcccgca aggtggccgc cgaggcgcg cagcagaccg cgcgcctggc tgggcaactc 660

gaagccctca ccgcgaagga gcgaaaagcc gatgaaagac cgtgaccaca acgaagcgat 720

ggccggcatg tttcaggccg acccccgatt tgccgccgac tatctgcgcc aggtgttggc	780
cgatggcgag cctaccgacg tgcgcgccg cttgcggcaa atggcggatg tgctgcgcgt	840
cagtcaggcc gccgcgccga ccgattctgc gccttcggcg ggctctttg accgggccgg	900
cgtgcgctac gaagtggcgt gcgatgtgat cggggcggtt attgccatt acgccgaaat	960
catgggacgg gaacgcgagc aggcgcagcc gaatgaggcg gttttgcgcg tggccggagc	1020
catgaaggcg gcgctggccg gggagcggga tgatctcgat ccgcgcgata gcgccggcat	1080
cgaggcggcg atttcgcgct atgcgccact ggcgccgccg ctgtatggcc aggctgaaaa	1140
cgaccacgcc cgccaggaac agcgtcgcgc cgatttcgac caggtgcatg cttcgctggc	1200
cttgaggggg ctggccatga gcgcggacga tttggcggtt caggcgctgc tgatccggg	1260
cgacattacc cacgatgagg cgggtgcagt ctaccgcata ctgcataccc atgcgcggta	1320
aaaccgactg gccgcccag gtggccgggtg tgctggggtt gctcgaatcg cagccgccag	1380
aggcggcgat gctgggtggc tgttttctgg cggcggtagc ccatcccgat catgcggccg	1440
aattggcgat gttcgacaaa ttgccgccag cggcccggat ggtcgtcggg cgatttttcc	1500
tcgtttttct ggcgggcggc ctggacgatg ccgggcgcga aaaactgcat tcgcacatgc	1560
aggcatggtt tgtccgtcag cgccgttttc ggtgaatggc ttgcctcatc cactagggcc	1620
gggcaagggg tgaacagcgg gcgatgctgg cttgcgggac gacccgcac ccccgaaaa	1680
cttgtcacac accacgcaac tcccgttgct tcgctaaaag ccttggtgcc caaggctttt	1740
agcgaggcga caccgaagac acatgcggc gacaccgaaa gggccgaacc ggcctaaac	1800
ccttgctgcg caaggagaac agccgcgctt tcgcgcgcga aagtgttca aatgcctgtc	1860

ggcatcagca gggataggat cggcacgccg aaggcggttg cgatgcgctc caggttgtcc	1920
aaggagatgt ttctgacttg gcgctcgag tgcgcaacga aggtgcgatg taggccgcac	1980
tcaaaggcga gcgtttcttg tgaccagcct ctttcccggc gtaatcggat catgttggcc	2040
gcgagcacgg cccgcgcgga atgcgcggtt ggtgcgggag gttgagcggc gggagacatg	2100
caaaccagtc tcctgatatg ccgcttttac gtcagccgtg ttttaagtcac aatatggttt	2160
tctcatagag aaagacggcg tgacgatggg cagaaaaaca gcaatcaggc gaggggggtgc	2220
cggtttggcc agcctgttga tttgcgcaat tgaaccggtc ggcgcggcct ccctggtcgg	2280
cggtcaaacc gatgattccg tgtgcgacct gggcagcgcg ccacagaacg cccggaagct	2340
gtcggcagcg ggcgacttca tccgcgcgca gtgcaaaaac ggtcaaagt tggtgggttc	2400
cggcacgtg cctgccggcg ggtttgactc ggaagtgtg cgctggcg gcaccttctg	2460
ccgcatggcg gacattcaga ctccggcgac gcagggcaac atggccggcc tcgtcatgga	2520
gatcgacgag gtacggtgca tcatcgggaa gttgccgaca tgagaaaagc gatgttggt	2580
ggctttctgg ccgttgttgt ggccaacgtg gttgccgtg agggcggtgc gcccttgcg	2640
ggcgggtgtt gcacggacc gttccgtggc gctgattccg tcgtgcactg cgagcacatc	2700
ggcaaggtga cgatccgcca gatttacgaa aagggtttc gggtcgttca catgcaggac	2760
gacaagaaca cagccagcta cgttgtgctg gttatcgagg agcagggcg atgagggcga	2820
aagcgtggcg gatgctgttt gccgggcggc gctgggtgct ctggcttccc gtgccggcgt	2880
cggtatggct ggcactgccc gaatggcagc acattccgc catgttgttg ggcggcctga	2940
tcgtgtggat tcccttctgg ctccgctggt ggctcagtga tggcttcgcg ggcattcca	3000

ggtggccagg aaccggcgca cctgcggtat ctggcgggggt gaaccgcac accggcaagc 3060
 catgcacggt gtatcaccag ccgtggggag ataccttcgt ggtgggagac tgattatttg 3120
 attgaggaac gatgacaagg gccagcaaca agctggccct tgtcgttttc tggactgttt 3180
 taccacaac atccgctctg ctgctgaatt ggcgacatg gcaccgagcc gaacgaacag 3240
 aacacgcagc aatcccccg cttggggcg agcagcgat ggaggccgg gcaactcgtag 3300
 tagaactggc aggcgtccgt gggcatggtt tcctgctgtg cgtggccgca gtgcgggcag 3360
 gtcagcacgg attcgagaat gacggcgctc atcgtggcgt tacctctgca cgggtggacgg 3420
 atagcctgcg ttcgtcgttg ccgaggtcaa cgcttcggc ttggccttgt cggcgtcata 3480
 ggtgacggtg gccgttttct tgcgaaatc gaccttgacg gcgctcacac cgggcacttt 3540
 ctccagcgac ttcttgactg tgatcgggca tagctcgag gtcattgttct gaacggccag 3600
 cgtgacggtt ttcggggttg cggccagcac ggcgagcggc acggcagcca gcagagcaat 3660
 cagcagtttg cgcatgggag tctcctttca atagaacagc ggggcgaacc acggcacggc 3720
 caacagggca agcaacagca cagtgcgat ccagaacgctc aggcgctgcc gctggcgtgt 3780
 gcgcgatca gcgcatggcg tgccgggctg gcagacctgc ggcaccagat agagcttgcg 3840
 gaaggccagt ccgagaaaga gcagcgtcat gccgatgaaa aagggccggt acggctccat 3900
 cgcggtcagg ctgccaacc atgagccacc aatgccaagc accagcagga caagcgccc 3960
 gacacagcac accgacgcg cgatggcggt cagtacgctc acgatcaacg agcttttttc 4020
 agtgagtcgt gccatgtcgc tttccttgta cctgtttgcc caagtgttac tctaaatccc 4080
 gtacctaagt acggagtcaa gggggtgtga tgggaacaga actgaccatc ggcaagctgg 4140

ctgacgctgc cggggtgaat atcgagacga ttcgctacta ccagcggcgc ggcctgctgg	4200
atgagccgcc taaaccgcca ggggggcatc ggcgctatgc gcctgagcag gcaaaacgtg	4260
tgcgatttat caagcgggca caggcgcttg gtttcacgct ggacgaggtg ggcgcgctac	4320
tgacctgga tgcggcctgc gcctgcggtg agacgcgagc gctggctgtg cgcaagctgg	4380
gtctgatcga gcagaagatg gctgacctcg cggccatgcg gcaggcgctg ggtggattgg	4440
tgcagcagtg tgatgcgggc gacgggtggag ccagctgtcc catcatcgac gtgctggcag	4500
gtaattagat gtgttcaaaa aatggtggtt ttctggacac atgccggttt gccctgtcct	4560
gagttgtcct gatgcgttaa agtggttcatt tattcggtca gctttcaatg tggcggaact	4620
gttcatgaat caacgcacg gctatgcccg cgtttcgacc gacgaccaa acctagacct	4680
gcaacgggac gactccggc aggctggatg ctcaaccatt tacgaggaag cagccagcgg	4740
aaagagcgca gcaaggccc agcttgagca gtgtcggaag gctctccggc ccggcgacac	4800
gcttgtggtg tggcggcttg atcgcccttg gcgcagcctg cccgacctgg tgcagatcgt	4860
ggctgatctt gaacagcgcg gcgtgcattt cgagagcctg accgagaaga tcgagacggg	4920
gagcgcagcg ggtaagctgc aattccatgt tttcgctgca ctgcgccagt tcgagcgcg	4980
cctgatccgg gagcgaacct gggcagggct ggatgcagct cgcgccctg gccgatccgg	5040
tggacgcaaa ccgaagctgg acgccaagca gatacgccac attaaggcgc tactacgtga	5100
cccgaatacc tgtgttgctg aactcgcccg tgactacggc gtgtcgagaa caactatcta	5160
taaacactgc ggtgtggttc tgccgcgtac agccgatgaa ggggcaatat gacaaaaaag	5220
acaacagcat tcgatgtatt cgagaaatgc gtccaagcag ttcaggctgg tgaactgatc	5280

gaatccgttt ctgcgaagga caaggaattc catttccaga actggtttca gaagcgctc	5340
cagagcctgt cgatgcactt cgaggggtcg ggtcgcaaca cctaccgga cttctgcttg	5400
gtagagcaca ccgagggcta cgagatcaag ggtttggcat ggcctggccg cgagcgcgac	5460
tacgactcga acagccaagt gccgactggc tatcacaacg gccgtcaaatt cttctacgtg	5520
ttcgggcgct accccgcaga cctgtctggc tatgccgatc agggcaacgg ccgcaggcag	5580
taccgggtgg ttgacctcgt ggtctgccac ggcgacttcc tcaacgccga tcacaactac	5640
gtccataaga acaagagcgt aaagggcttt ggcacctacg gcgacatcat gatccgcgac	5700
cggaagatgt acgtcgcgcc gacgccattt gcgctgaccg aaggcaccac tggcctgatg	5760
actttgatcc tgccggagaa cttcggcacc gatgaccgtt accaggtggg cggtaacctc	5820
actcgcgtcg aggcggaaac gctggtggtt ggctacaact ttgacctgcg cacgaacgag	5880
ctgagcgcag agcgcgtgcc caatcccaac gcaggcacc agcaccgatt cgtggcctac	5940
cggctcaagg atcaagcgag caagcctgtc tccatgactg gcaccaggt gcagcccgac	6000
gagaacaacc tgccggacga cgaatgaaca ccatcaccga caagatcggg ttcgcttacc	6060
cggttgcagc gaccgcgtg gagtgcgact tcccgtggt cgaaatcagc cagatcgccg	6120
agcaggaaag ttggcgaaag gagatcaaca ggccgatcta ccacatccac aagtgggtgg	6180
cgaccagact tgggtcgggt tttcgtggca ttacccttgg tgctttgagt cagcctgta	6240
ctgacctctg ggcgcagttc tacaaaacgc acgacctggc cggttaaggta gtgctcgatc	6300
ccttcattggg cagtggcacg acgcttggcg aggccgtcaa gctgggtgcc aaggccatcg	6360
gctgcgacat caaccagtc agtaccttcc tcgtacgtca ggcgttcacg ccggcgctccg	6420

aggcagagct gcgtgccgct ttcgagcggc tggaacgtga cgtggcaccg gagattcggc	6480
gctactacca gacgcgcgat cctaagacgg gcgagctgat tcaggtcttg tactacttct	6540
gggtcaagac ggtgacgacg cccgagggcg aggtaatccc cttgctgtcg cgctacgtgt	6600
tttcacaaga cgctacccg aagaagaagc cgcgagcgca gatcgtgtgc cctggctgct	6660
ggagtgtgct ggaggatcgc tacgatgcga ctgacctgca ctgccagcac tgcggccacc	6720
agttcaatcc gcaggaaggc ccggccgctg gtcagtacgt caaaaccaag ggcggtcacc	6780
gttaccgcat caaggaacta ctgccaaagg acggtacgcc gccctctcat cgaatgtacg	6840
cgatgatggc cttgcgagcg gatggatcga aggtctatct gccggtgcgg aatgaggact	6900
tggccctcta cgaggaagcc caagaacgcc ttgctacaga ggcaactgcc ctgccgaaaa	6960
cctctgttcg acctggccac aacaccgacc aggcgcgcgg ctacaactac acccaatggc	7020
gcgacttctt caatgcgcgc caactgctgt gccttggcct gctgctgcgg gaaatcctga	7080
ccatcgacga cctggcagtg caagagcaga tgctgtgctt gttctccagc accttgaggt	7140
tcaacaacct gttttgcagc ttcaaggggt agggaaacagg ggccgtgcgg catatgttct	7200
cgaaccacat cctcaagcca gagcgcaccc cgctggagaa ctccgtgtgg ggcaactggca	7260
agagcagcgg tacgttttagc acgttggtcg agtctcgctt gctacgtgcg aagcgctacc	7320
tcgatgagcc gttcgagatc gcgttcgagc atgaccagga cggtaaccgc gcaggctcgc	7380
gcaagacggt ggctagccat ccgatccgcg cccgtcgcgt cgaaacctgg ccggaattgg	7440
agggcgcaga tcatggcctg ctgatcctca acggtgacag ctcgaagctg ccggtgcccc	7500
ctggttcggg gatgcccgtg gtgactgatc cgccctactt cgacttcgtt cattactcgg	7560

agttgagcga cttctttttt gcttggtca cccctgtgct gcgccagcgc tatccgtgga	7620
tggcccgga ggactcgtct gaccaagggg aggtgcagca caaagaccct cgtgtgttcg	7680
cccgtcagct tgcgtcggg ttcacggagg cgtgccgcgt gcttaaggac gatggagtgt	7740
tggcgttcag cttccaccac tcgctgccc agggctgggc ggccatctat gaagcgatca	7800
acaaggcggg cctggccgta gttgcggctc accctgtcca tgccgagctg cgcgcggcaa	7860
gtcccaagac tgcggccaaa gaccgatca gccttgatgc gattctggtg tgtcgcaaaa	7920
aggcgtttgc cctgcaccag tcgctgcta tccaggatgt ccgccaggct gttgatgcgc	7980
tggcatcacg gctgcaagct gctggccttc gcctctcggc gggtgaccgc ttcgtgatcg	8040
gcgcagcgca aaccttgatt gcacgcgtg ctgatgacat gggcttcgac gagatcaagg	8100
ttgatcttga ggcaattcgg ctggccgtgg ggccaaggc tgcaacatca aaggctgcga	8160
gtcgtggga tgacgatgtg cccttctgat tggctgcacg gccttgctcg cgcgtgcgtt	8220
ttgatggcag ccgctgcacg caagccgcgt ccctccgcgt aaagttcatt tatacgcaaa	8280
tacgtatttg cgtgatacaa taacgccata ttaatggagg tgcgtaaatg cggactattg	8340
ttgtggctag caaaaaggt ggcgtcggca agacaacgat tgcaggtcac ttgggtgtca	8400
tggccgagca gagcaaagag gggccagtgg cgctgatcga cacagacca caaggctcgc	8460
tcgctcctg gtggaatgag cgaaccaatg aggcaccgct gtttgcacgg gtggaaatcg	8520
gcaagctgac cgagcacctt caggcattgt ccaagggtgg catcaagctg gccatcatcg	8580
acaccccgcc ctctgttacg gaaatgattc agcaggtgct ccgcaccgcc gacttggtag	8640
tgatccccac caggccgagt ccgcatgact tgcgcgcggt cggatctacc gtcgaactgg	8700

tggagaacgc aggaagcga atgatcttcg tcatcaatgg ggcggcacct cgcgcgcgga	8760
tcgcgggtga ggctgccgtg gcgctttcgc agcatggcac ggttgcccc gtgacgctgt	8820
accagcgcac cgacttcgcc agctcgatga tcgacggccg caccgtccag gaaatcgacc	8880
ccaaggggcg gtcggccgaa gaaatcgggc agttgtggaa atacgtatct acacaactgc	8940
gtaaaatttg atataatag tacatgcgta ttaatggaga tacgtaaatg gctaaaactg	9000
catctttgac tgccggcctg gtggccaaga aaggggaggc gtcccctgct acggttgctg	9060
cggcacccca ggttcaacct atcgaagtga aggcacggc gactggcggc ggccgggatt	9120
actacaaggc gttgaccgtc aagttggatc gtgaccgcta cgagagtctg aaaagcatgg	9180
gcgtgaagct ggacaagaag agccaggaaa tctttgtcga ggccctggat ttgtggatga	9240
agtcggccgc tggccagcaa cacgcctaag aggccctat gcgttcagtg cgctctgccg	9300
tcgaactcgc caaggagttg gccgaaaaag ccaaggccc cgcctagcg gcggaaaaga	9360
acgagctggg acttgaaggc ccggcgcagg gcaacgccgg caccactccc agcccggatga	9420
aggttgccgc cgaagtggg ggcgagcagc cggcacgacg caagggagcg ccgaaagggc	9480
cgcgtggcct gatgccggtg catcatccaa accgcgattt cttcttgtgc gatctgtttg	9540
actacgccct aaaggatgac ggcgtgagca tggaggcccc catcttcacc ttggcaacca	9600
ggccggacac ctctgtttgg cattgggaaa gcaaggatgg gacacgcgcc atcaccgtca	9660
cgccaagcgt gaaggggagg gccacgcagt ttgataagga tttacttatt tacgtagtta	9720
gccagatgac cgaggctatc aatcgcggtc ggcctgatgc gaacaatcga accgtgcgct	9780
ttcgcgtcta tgactacttg gtctcaacca acaagccgac tggcggcaag gaggaccagc	9840

gactggagga tgccctagac aggctgcggg gtacatcgat caagacgaac atcaagacgg	9900
gtggccagcg tgtgaaggaa ggcttcggca tcgtcgatag ctggacgatc atcgagaagg	9960
ccccgacga tgaccgcatg attgccgtcg aggtcacgct ctccaagtgg cttttcaatg	10020
cagtgcaggc ccacgaggtt ctgaccatca acccggacta tttccggctg cgtaagccaa	10080
ttgagcgccg tttgtacgag ctggccagga agcactgtgg cgaccaggcc tttttgtga	10140
ttgggctgga actgttgacg gacaagtgcg gcagcaagtc ggcaactgtt gagttccgcc	10200
gtgccttgcg cgagatcatc aaggccgaca ccttgccaga ctaccgcatg acgcttgatg	10260
acgagaaaga ccaggtgatt ttctacacc gcgacacgaa gaagctagcg gcgtctaccg	10320
ctctggcccg gcgcttcag tgacgccaa agtattgacg gtcaatactt cgttatttca	10380
cccatgcggt gttaccgctg cgtgttgac gttcccttga cctagcggcc gaggcaggcg	10440
tttcgcgctt tgcatgagc caccaagtgc gtctcgctcc ttcgagcatc aagccctaac	10500
gcgtttcatg tcactttcgc gcacgaaagt cgaggcaaga ggcttgatcg tgtctatcgt	10560
tacatcacc atgcctgtgg atggacacgt tacatcacc atgttttctg tggatgggca	10620
cgttacatca cccatacctc acttcgttac atcgcccatg cagcgatttg tggaagcctt	10680
gagcagcaag gctttacgag cgttatccac agccgtaaca cgcgcgcgcg attttttaac	10740
tttataaatc tttaacgcgg ttgcggacaa agcccgccgc gcctcttggg ggctacgcc	10800
ccgccggctc ctacgggccc caagcggccc tccgccgcgc cttcgcgctc cctcccggca	10860
tccccgaggg gtttcgcttc gctgcacccc tcgcgcttcg cgctcaccgc catatcgagg	10920
cccccaaagg gggccggatg gtgcccc	10948

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn Gram âm không gây bệnh, trong đó vi khuẩn Gram âm không gây bệnh này được nộp lưu ở CNCM vào ngày 8 tháng 4 năm 2010, với số hồ sơ là I-4290.
2. Dịch chiết chứa vi khuẩn thu được từ huyền phù chứa vi khuẩn Gram âm không gây bệnh theo điểm 1.
3. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, dịch chiết này thu được sau khi xử lý huyền phù chứa vi khuẩn này theo cách sao cho loại bỏ được các thành phần nội bào.
4. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, các thành phần nội bào này bao gồm ít nhất một axit nucleic.
5. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 3 hoặc điểm 4, khác biệt ở chỗ, dịch chiết này chứa phân đoạn E0 ít nhất bao gồm protein màng, protein chu chất và protein có nguồn gốc từ roi.
6. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, protein màng này bao gồm porin, OmpA, lipopolysaccharit và/hoặc lipoprotein.
7. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 3 hoặc điểm 4, khác biệt ở chỗ, dịch chiết này chứa phân đoạn S0 ít nhất bao gồm peptit và protein tiết và chất chuyển hóa thứ cấp.
8. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 3 hoặc điểm 4, khác biệt ở chỗ, dịch chiết này chứa phân đoạn ES0 ít nhất bao gồm phân đoạn E0 và phân đoạn S0.

9. Dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm 8, khác biệt ở chỗ, dịch chiết này chứa phân đoạn ES0 có protein, thu được bằng cách SDS-PAGE, bao gồm 3 dải chính tương ứng với trọng lượng phân tử lần lượt nằm trong khoảng từ 30kDa đến 36kDa, nằm trong khoảng từ 41kDa đến 45kDa, và nằm trong khoảng từ 47kDa đến 51kDa.
10. Chế phẩm chữa bệnh ngoài da bao gồm hoạt chất là ít nhất một vi khuẩn Gram âm không gây bệnh theo điểm 1 và/hoặc một dịch chiết chứa vi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9.
11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó chế phẩm này dùng để điều trị các rối loạn viêm ngoài da.
12. Chế phẩm theo điểm 11, khác biệt ở chỗ, các rối loạn viêm ngoài da này bao gồm bệnh viêm da cơ địa dị ứng, bệnh ngứa, nấm eczema và bệnh vẩy nến.
13. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược tương hợp về mặt da học khác.

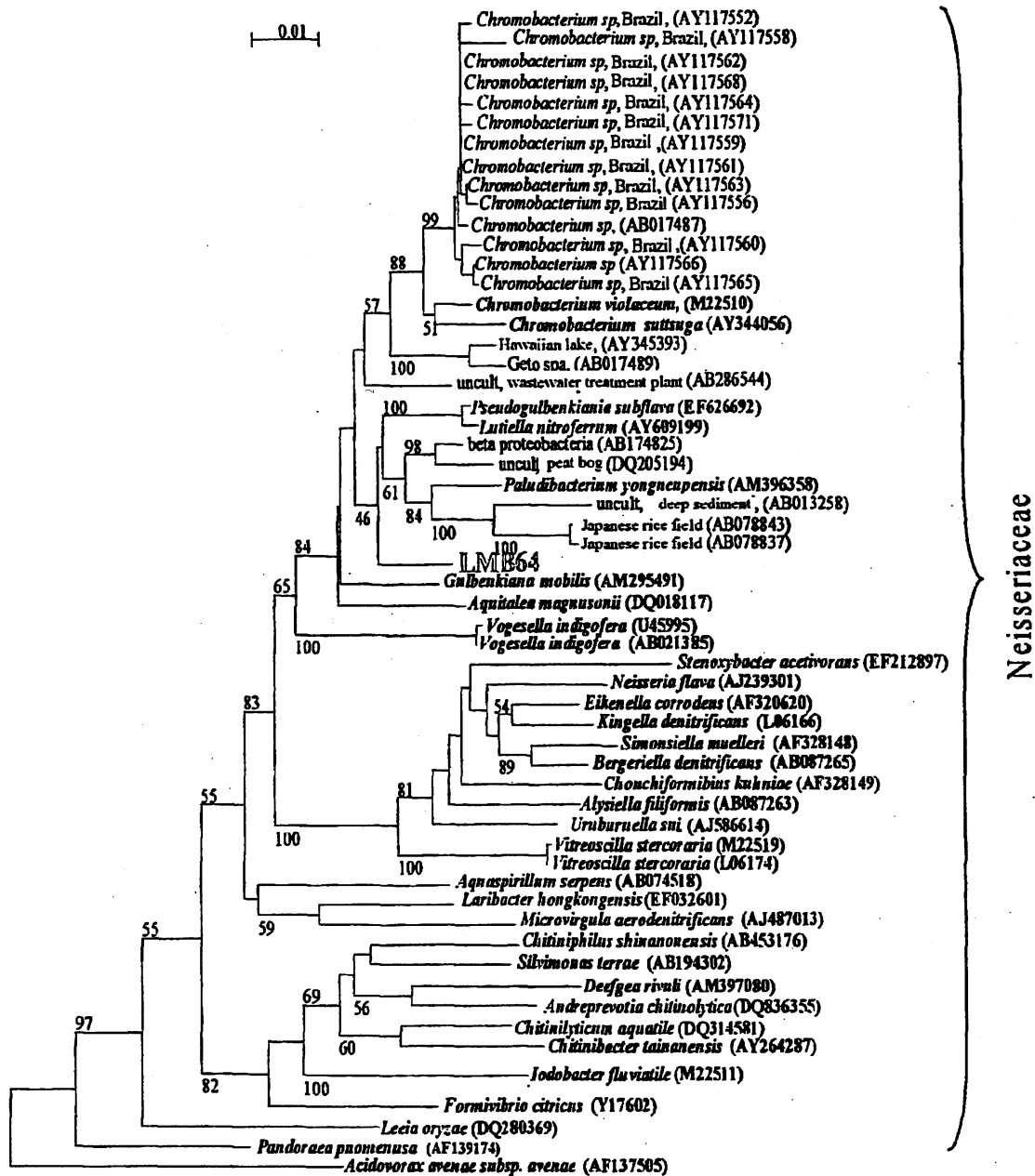
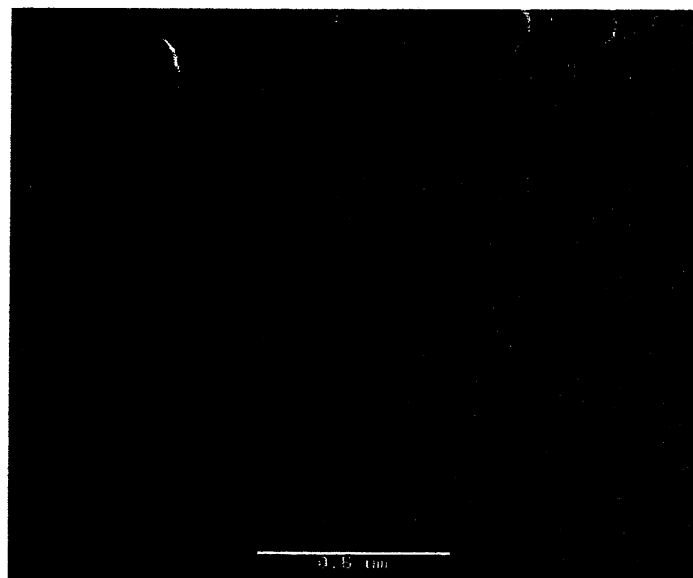


Fig.1

A)



B)

**Fig.2**

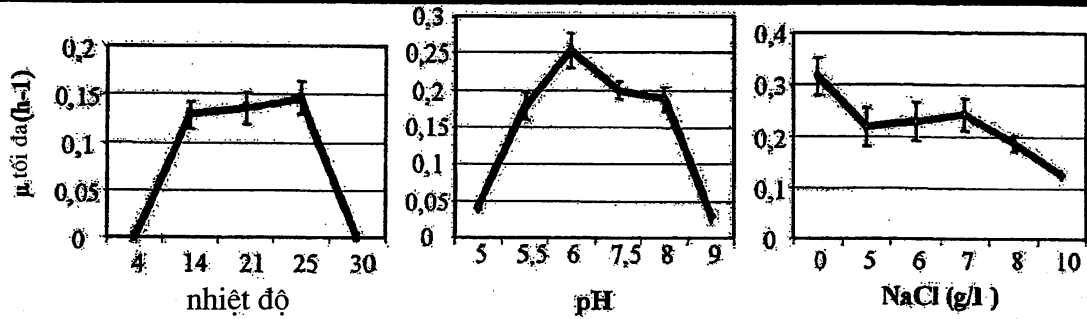


Fig.3

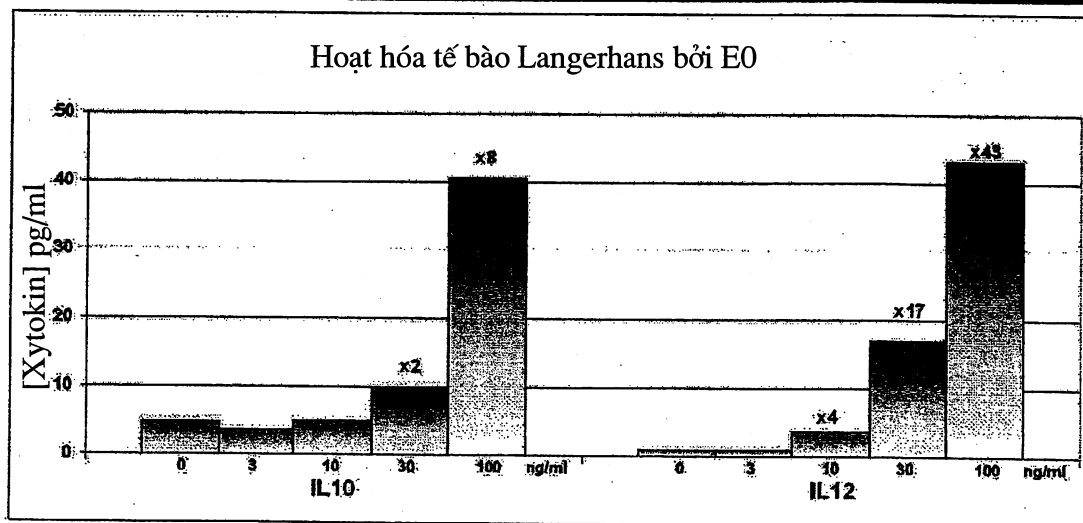


Fig.4

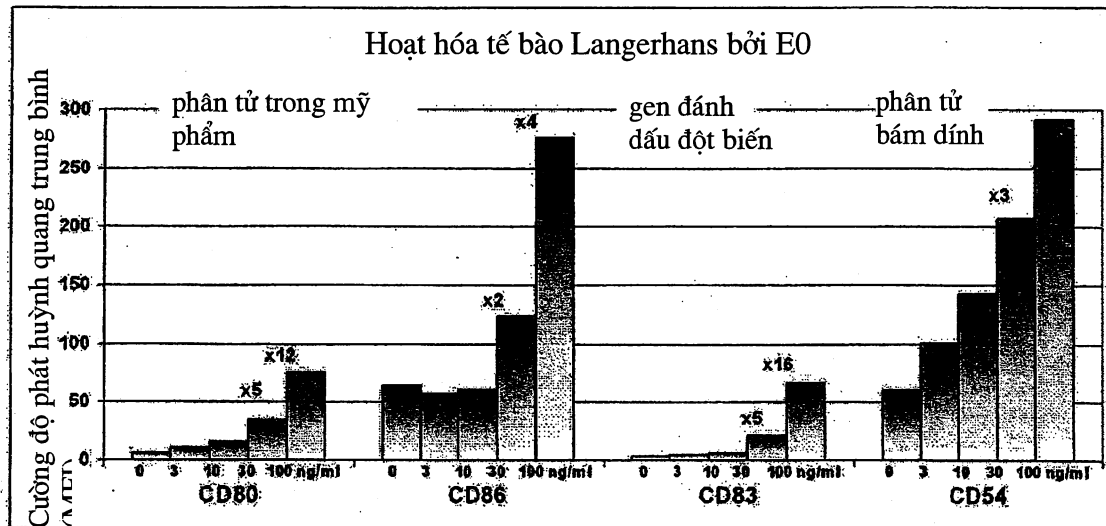


Fig.5

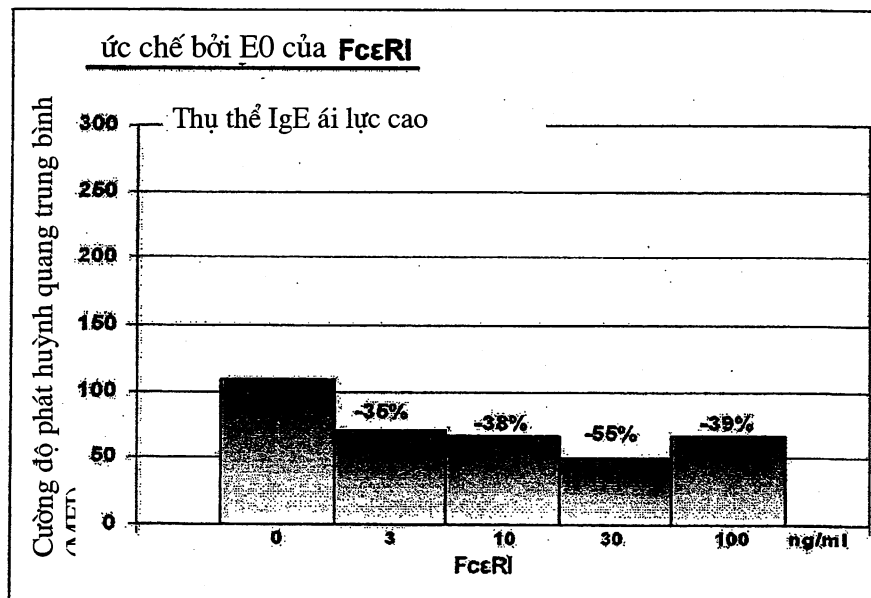


Fig.6

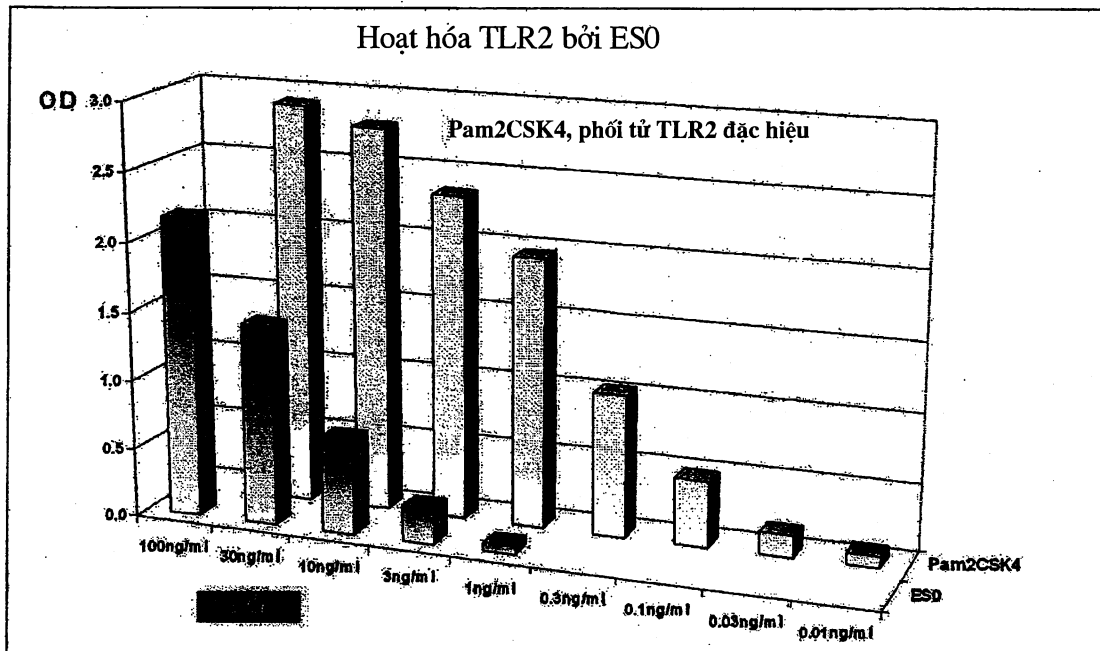


Fig.7

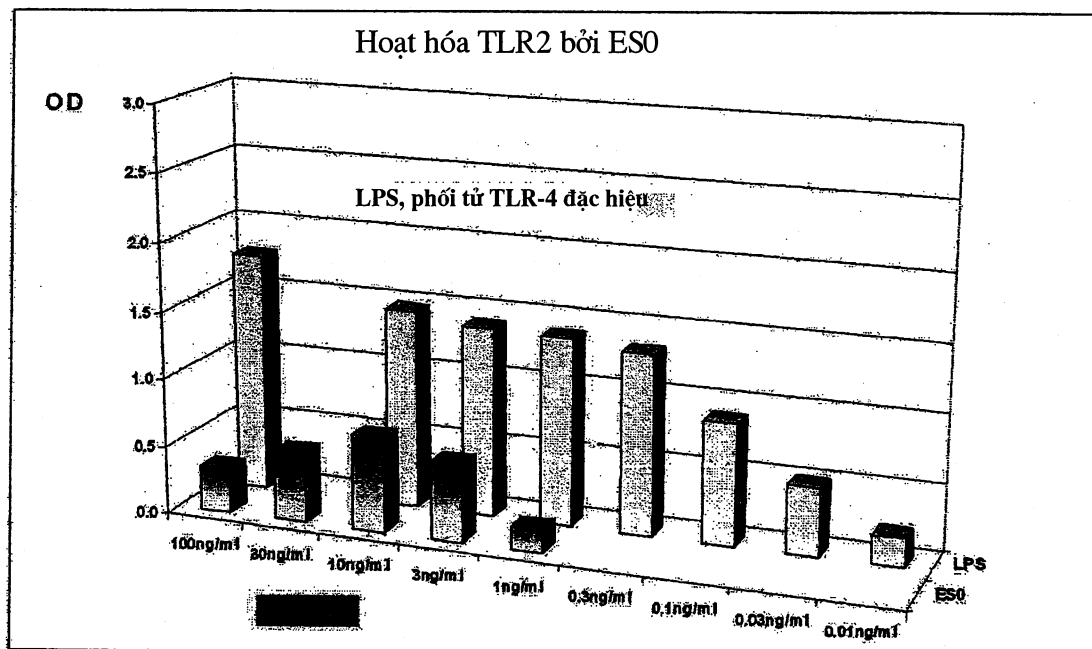


Fig.8

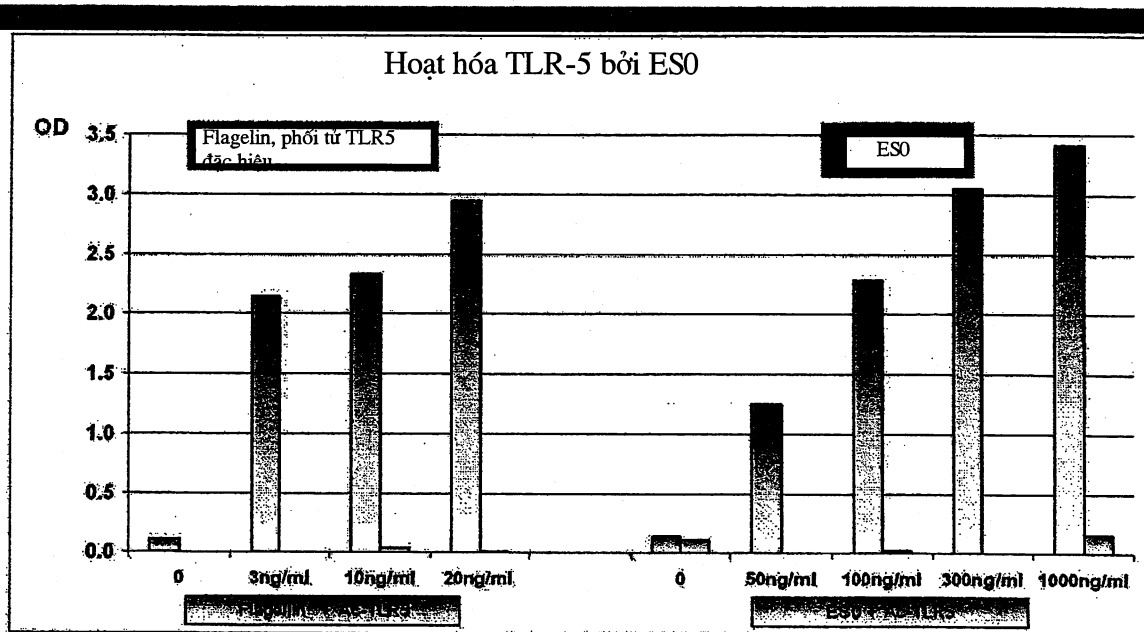


Fig.9

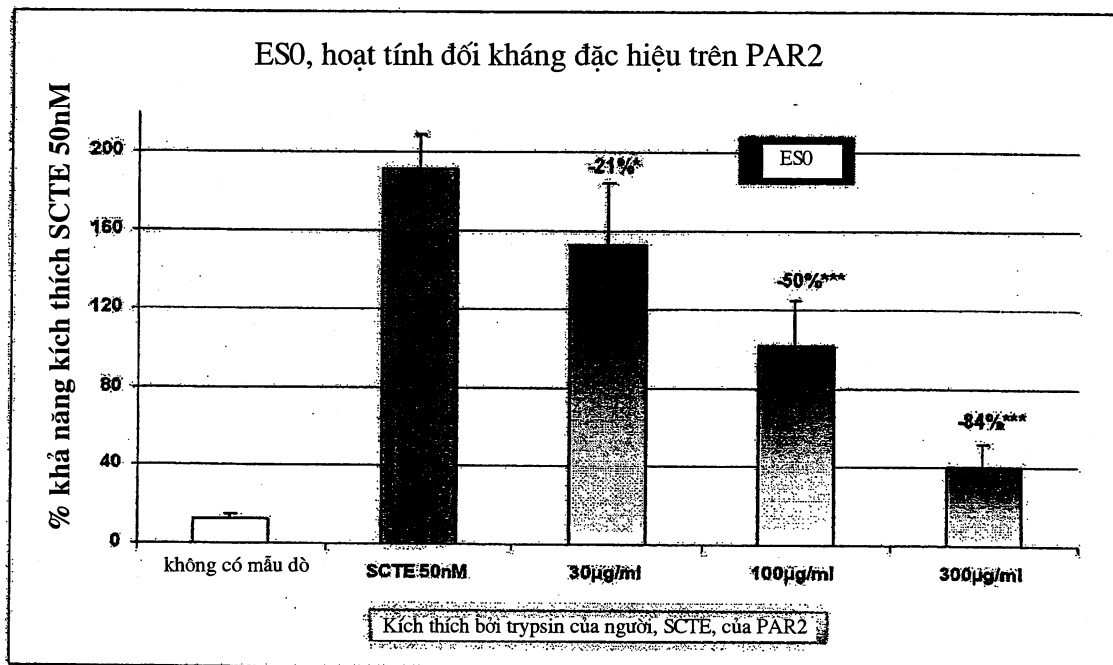


Fig.10

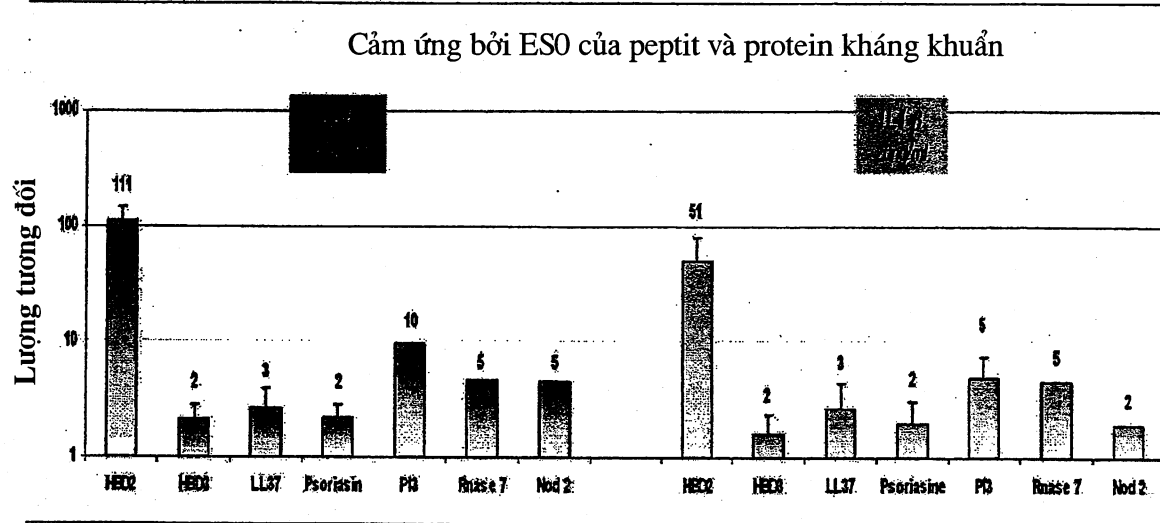


Fig.11

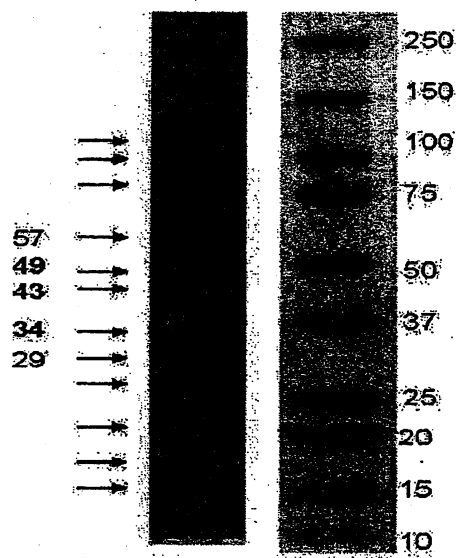


Fig.12