



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2020년01월23일  
(11) 등록번호 10-2069790  
(24) 등록일자 2020년01월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
  - A61K 31/198 (2006.01) A23L 3/358 (2006.01)
  - A61K 31/122 (2006.01) A61K 31/195 (2006.01)
  - A61K 31/355 (2006.01) A61K 31/375 (2006.01)
  - A61K 31/405 (2006.01) A61K 31/7004 (2006.01)
  - A61K 33/26 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
  - A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
  - A61K 31/198 (2013.01)
  - A23L 3/358 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7035048(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년09월26일  
  - 심사청구일자 2018년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월03일
- (65) 공개번호 10-2018-0132974
- (43) 공개일자 2018년12월12일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7019051  
  - 원출원일자(국제) 2011년09월26일
  - 심사청구일자 2017년08월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/053265
- (87) 국제공개번호 WO 2012/040707  
  - 국제공개일자 2012년03월29일
- (30) 우선권주장  
  - 61/386,317 2010년09월24일 미국(US)
  - 61/431,629 2011년01월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
  - KR1020020089448 A\*
  - KR100136072 B1\*
  - Gut 47:632-637(2000.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
  - 유니버시티 오브 플로리다 리서치 파운데이션, 인크.
  - 미국 32611-5500 플로리다 가이네스빌 그린터 홀 223
- (72) 발명자  
  - 비디야사가르, 사다시반
  - 미국 플로리다 32607 게인즈빌 테라스 90티에이치 에스더블유 1220
  - 오쿠니에프, 파울
  - 미국 플로리다 32608 게인즈빌 드라이브 932디 에스.더블유. 4010
  - 장, 루통
  - 미국 플로리다 32608 게인즈빌 드라이브 25티에이치 에스.더블유. 3227
- (74) 대리인  
  - 특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 김희승

(54) 발명의 명칭 **위장 기능을 증진시키기 위한 물질 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은, 소장 점막의 손상(small intestine mucosa)을 치료하거나 완화시키기 위한 치료 조성물 및 이의 용도를 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 조성물은, 상당한 흡수 능력을 획득하거나 또는 유지하는 하나 또는 그 이상의 영양소 및/또는 전해질을 포함한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 31/122* (2013.01)

*A61K 31/195* (2013.01)

*A61K 31/355* (2013.01)

*A61K 31/375* (2013.01)

*A61K 33/26* (2013.01)

*A61K 47/183* (2013.01)

*A61K 9/0053* (2013.01)

*A61K 9/0095* (2013.01)

*A23V 2002/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

위장(GI) 관의 불균형한(misbalanced) 흡수 상태를 치료하기 위한 치료 조성물로서,

상기 조성물은 장내 투여(enteral administration)를 위해 제형화되고, 유리 아미노산(free amino acids)으로서 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 및 티로신 중 둘 이상; 및 임의로 물을 포함하고;

상기 조성물은 글루코스를 포함하지 않고;

상기 조성물은 유리 아미노산 메티오닌 또는 메티오닌-함유 디펩티드를 포함하지 않으며,

상기 조성물은 글루코스로 가수분해될 수 있는, 임의의 디-, 올리고, 다당류 및 탄수화물을 포함하지 않는, 치료 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은, 전해질(electrolytes), 비타민, 미네랄 및 착향료(flavoring agents)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것인, 치료 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 용모 위축을 가지는 피검자를 치료하기 위한 것이고, 상기 조성물은 장내 투여를 통해 상기 피검자에게 투여하는 것인, 치료 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 피검자는 인간인, 치료 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 피검자는, 정상과 비교한 경우, 용모 영역에서의 소장 상피 세포의 전체 수에서 적어도 10 % 감소를 가지는 것인, 치료 조성물.

#### 청구항 7

제4항에 있어서,

상기 피검자는, 정상과 비교한 경우, 소장에서 용모 높이에 있어서 적어도 10 % 손실(loss)을 가지는 것인, 치료 조

성물.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

제4항에 있어서,

상기 용모 위축은, 질병, 방사선, 화학요법(chemotherapy), 양성자 치료(proton therapy), 복부 수술(abdominal surgery), 세포독성 제제(cytotoxic agent) 또는 이들의 조합에 의해 야기되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 조성물은, 상기 피검자가 방사선, 화학요법, 양성자 치료, 또는 세포독성 제제를 받은 후에 1 내지 14 일의 기간 동안 투여되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 11**

제9항에 있어서,

방사선 장염(radiation enteritis)을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 12**

제9항에 있어서,

시스플라틴(cisplatin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil)(5-FU), 수산화요소, 에토포시스(etoposide), 아라비노사이드(arabinoside), 6-메르캅토피리딘(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 플루다라빈(fludarabine), 메토텍세이트(methotrexate), 스테로이드, 및 이들의 조합으로부터 선택된 화학요법 또는 세포독성 제제에 의해 야기된 소장 손상을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 13**

제9항에 있어서,

염증성 장질환(TBD), 궤양성 대장염, 십이지장 궤양(duodenal ulcers) 또는 크론 병을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 14**

제1항에 있어서,

물을 포함하고, 230 mosm 내지 280 mosm의 삼투압을 갖는 것인, 치료 조성물.

**청구항 15**

제1항에 있어서,

상기 조성물은 분말의 형태인, 치료 조성물.

**청구항 16**

제1항의 조성물, 또는 물과 혼합되면 제1항의 조성물이 제조되는 분말을 포함하는 패키지(package)로서, 상기 패키지는 용모 위축을 갖는 환자 또는 용모 위축이 발생될 것으로 예측되는 환자에게 상기 조성물을 투여하기 위한 설명(instructions)을 더 포함하는, 패키지.

**청구항 17**

탈수의 치료 또는 완화용 치료 조성물로서,

상기 조성물은 장내 투여를 위해 제형화되고, 유리 아미노산으로서 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 및 티로신 중 둘 이상; 및 임의적으로 물을 포함하고;

상기 조성물은 유리 아미노산 글루타민 또는 글루타민-함유 디펩티드를 포함하지 않거나, 또는, 만약 유리 아미노산 글루타민, 글루타민-함유 디펩티드, 또는 이들 모두가 존재한다면, 상기 유리 아미노산 글루타민 및 상기 글루타민-함유 디펩티드의 전체 농도는 50 mg/l 미만이고;

상기 조성물은 글루코스를 포함하지 않고;

상기 조성물은 유리 아미노산 메티오닌 또는 메티오닌-함유 디펩티드를 포함하지 않고,

상기 조성물은 글루코스로 가수분해될 수 있는, 임의의 디-, 올리고, 다당류 및 탄수화물을 포함하지 않는, 치료 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 조성물은 글루타민을 포함하지 않는 것인, 치료 조성물.

**청구항 19**

제17항에 있어서,

상기 조성물은, 전해질, 비타민, 미네랄 및 착향료로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것인, 치료 조성물.

**청구항 20**

제17항에 있어서,

상기 조성물은 용모 위축을 가지는 피검자를 치료하기 위한 것이고, 상기 조성물은 장내 투여를 통해 상기 피검자에게 투여하는 것인, 치료 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

상기 피검자는 인간인, 치료 조성물.

**청구항 22**

제20항에 있어서,

상기 피검자는, 정상과 비교한 경우, 용모 영역에서의 소장 상피 세포의 전체 수에서 적어도 10 % 감소를 가지는 것인, 치료 조성물.

**청구항 23**

제20항에 있어서,

상기 피검자는, 정상과 비교한 경우, 소장에서 용모 높이에서 적어도 10 % 손실을 가지는 것인, 치료 조성물.

**청구항 24**

제20항에 있어서,

상기 조성물은 글루타민을 포함하지 않는 것인, 치료 조성물.

**청구항 25**

제20항에 있어서,

상기 용모 위축은, 질병, 방사선, 화학요법, 양성자 치료, 복부 수술, 세포독성 제제 또는 이들의 조합에 의해 야기되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 26**

제25항에 있어서,

상기 조성물은, 상기 피검자가 방사선, 화학요법, 양성자 치료, 또는 세포독성 제제를 받은 후에 1 내지 14 일의 기간 동안 투여되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 27**

제25항에 있어서,

방사선 장염을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 28**

제25항에 있어서,

시스플라틴(cisplatin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil)(5-FU), 수산화요소, 에토포시스(etoposide), 아라비노사이드(arabinoside), 6-메르캅토피리딘(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 플루다라빈(fludarabine), 메토텀레이트(methotrexate), 스테로이드, 및 이들의 조합으로부터 선택된 화학요법 또는 세포독성 제제에 의해 야기된 소장 손상을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 29**

제25항에 있어서,

염증성 장질환(TBD), 궤양성 대장염, 십이지장 궤양(duodenal ulcers) 또는 크론병을 치료하는데 사용되는 것인, 치료 조성물.

**청구항 30**

제17항에 있어서,

물을 포함하고, 230 mosm 내지 280 mosm의 삼투압을 갖는 것인, 치료 조성물.

**청구항 31**

제17항에 있어서,

상기 조성물은 분말의 형태인, 치료 조성물.

**청구항 32**

제17항의 조성물, 또는 물과 혼합되면 제17항의 조성물이 제조되는 분말을 포함하는 패키지로서, 상기 패키지는 탈수를 갖는 환자 또는 탈수가 발생될 것으로 예측되는 환자에게 상기 조성물을 투여하기 위한 설명을 더 포함하는, 패키지.

**청구항 33**

소장 건강을 개선하기 위한 식품 조성물로서,

상기 조성물은 유리 아미노산으로서 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 및 티로신 중 둘 이상을 포함하고;

상기 조성물은 글루코스를 포함하지 않고;

상기 조성물은 유리 아미노산 메티오닌 또는 메티오닌-함유 디펩티드를 포함하지 않고;

상기 조성물은 글루코스로 가수분해될 수 있는, 임의의 디-, 올리고, 다당류 및 탄수화물을 포함하지 않는, 식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련된 출원서의 상호-참조

[0002] 본 출원서는, 이의 전체가 참고문헌으로서 본원에 포함된, 2010년 9월 24일에 출원된 U.S. 가출원 번호 제 61/386,317호 및 2011년 1월 11일에 출원된 U.S. 가출원 번호 제61/431,629호의 우선권 이익을 청구한다.

[0003] 정부 지원(Government Support)

[0004] 본 발명은, 미국 국립 보건원에 의해 수여된 승인 제RC2-AI-087580호 하의 정부 지원으로 창작되었다. 상기 정부는 이러한 발명에 대한 특정한 권리를 갖는다.

**배경 기술**

[0005] 방사선, 복부(abdomen) 및 골반에서의 악성 종양(malignancies)에 대한 일반적인 치료가, 장의 상피세포를 빠르게 분열하는 것으로 구성된, 위장관[gastrointestinal (GI) tract]의 내벽(lining)에 심각한 손해를 야기할 수 있다. 위장 시스템(gastrointestinal system)에서의 방사선의 독성 효과는, 암 치료 중에 메스꺼움(nausea), 구토(vomiting), 설사, 전해질 불균형(electrolyte imbalance) 및 탈수(dehydration)와 같은 증상을 일으키고,

환자의 회복에 부정적인 영향을 미친다. 심지어 낮은 투여량에서, 소장(의 융모(villous) 및 브러시 보더(brush border)의 지속적인 손실은 조사 후의 수일 내에 관찰된다. 크립트 세포(crypt cell)는 (조사) IR의 가벼운 (mild) 내지 중간의 투여량(moderate doses) 후에는 영역을 빠르게 다시 재생시킬(repopulate) 수 있는 반면에, 이들이 높은 투여량에서 조사 후에 대수의 비율(logarithmic rate)로 손실된다.

[0006] 조사(Irradiation)는 영양분 및 전해질 흡수가 일어나는, 융모의 상피(villous epithelium)에 특히 파괴적이다. 융모의 상피는, 미숙한 장세포(immature enterocyte)의 지속적인 공급이, 리버쿰(Lieberkuhn)의 크립트의 보다 낮은 극(the lower poles) 내에 위치한 간세포(progenitor cell)로부터 비롯된, 융모의 위에 크립트의 기저(base)에서 증식하는 구획(compartment)의 안에서 밖으로 이동하는, 지속적인 세포의 손실(continuous cellular loss) 및 재생 과정을 겪는다. 이러한 짧은 수명(short lifespan) 동안에, 이러한 장세포가 융모 세포 내로 크립트-융모 축을 따라 서서히 성숙된다(these enterocytes gradually mature along the crypt-villous axis into villous cells). 복부 및 골반 영역에 대한 방사선 치료가 존재하는 융모 세포(the existing villous cells) 뿐만 아니라, 새로운 융모 세포가 형성되는 장세포도 파괴되고, 따라서 이는 보통의 투여량에서조차도 대부분의 전체 융모의 상피를 감소시킬 수 있다(deplete).

[0007] 높은 전체 조사 투여량(high total radiation doses) 및 세포독성 제제(cytotoxic agents)의 증가된 사용 때문에, 방사선치료가 이의 급성 GI 독성에 의해 복잡해진다. GI 관(GI tract)에 대한 손실이, 흡수 불량(malabsorption) 뿐만 아니라 영양소 및 유체(fluids)의 손실의 결과 뿐만 아니라 장의 장벽 기능(intestinal barrier function)을 방해한다. 장 누수(leaky gut)는, 염증, 균혈증(bacteremia) 및 내독소혈증(endotoxemia)을 일으키는, 점막 관문(mucosal barrier)을 따라 병원균의 용이한 출입을 가능하게 한다. GI 독성은 보다 높은 투여량에서 일반적으로 발생할지라도, 예를 들어, 급성 방사선 장염(acute radiation enteritis), 설사 및 복통은, 5-12 Gy와 같은 낮은 투여량에서조차도 방사선 후에 수일 내로 발생할 수 있다 [방사선의 일반적인 분획된 코스는 분획(fraction) 당 1.8-2 Gy를 사용함]. 급성의 방사선 장염은 방사선치료 후에 18 개월 내지 6 년 사이에 발병되는 반면에, 이는 15 년 후<sup>27-29</sup>조차도 발생할 수도 있다(it may develop even 15 years later<sup>27-29</sup>).

[0008] 방사선 장염을 위한 치료의 선택권은 한정된다. 일반적인 치료 체제(Conventional treatment regimes)는, 유체 손실(fluid loss), 담즙염(bile salts)의 흡착(adsorbant)을 예방하기 위한 지사제(antidiarrheals)의 투여, 위 또는 직장 통증을 완화하기 위한 오피오이드(opioids), 및 염증을 완화하기 위한 스테로이드를 포함한다. 임상 시험은, 설사 예방을 위한 스멕타이트(smectite) 또는 수크랄페이트(sucralfate), *L. acidophilus*의 효능을 또한 조사할 뿐만 아니라, 급성 GI 증후군의 보통의 감소가 성취된다<sup>30</sup>.

[0009] 방사선 장염의 치료에서의 일반적인 접근은, 장의 휴식을 제공하도록 전체적인 장관외 영양(total parenteral nutrition, TPN)을 사용하는 것이다. 그러나, 장관외 영양은 환자의 영양상의 필요를 만족시키거나 또는 방사선 장염에서의 치료적인 효과를 실제로 갖는지를 측정하도록 남아있다(whether parenteral nutrition satisfies the nutritional needs of patients, or actually has therapeutic effects on radiation enteritis remains to be determined). TPN은 특정한 환자에서 영양 불균형을 바로잡을 수 있을지라도, 심각한 방사선 장염이 여전히 발생할 수도 있다<sup>37</sup>. TPN은 투여의 48 시간 내에 일반적으로, 장 위축이 또한 발생된다. TPN은 또한 기계적인 및 면역학적 장벽<sup>38</sup>을 또한 약하게 한다.

[0010] 보다 잘 성립되지 않는, TPN 동안 점막의 위축을 유도하는 정확한 생물학적 매커니즘은, 일부의 영양소-감지 세포 신호<sup>39</sup> 및 위장 호르몬<sup>40, 41</sup>과 같은 체액성 신호(humoral signals) 둘 다를 포함하도록 여겨진다. TPN은, 24 h에 단백질 합성의 억제 및 융모의 위축, 48 h<sup>42</sup>에서의 세포 증식 및 생존에 앞서, 장내 혈류량에서의 빠른 (<8 h) 감소를 유도하는 것을 보여준다. 이에 반해서, 경구 섭취(oral feeding)가 신생의 및 성숙한 동물<sup>43,44</sup>에서의 장내 혈류량을 서서히 증가시킨다. 유사하게, 신생의 새끼 돼지에서, 장의 섭취는, 식품을 주지않은 새끼 돼지(food-deprived piglets)<sup>45</sup>에서의 수치에서의 50 %까지의 문맥의 혈류량(portal blood flow, PBF)을 대부분 즉각적으로(1 내지 3 시간 내에) 증가시켰다. 따라서, 다양한 연구에서 나타낸 바와 같이, 장의 섭취는 장관외 섭취(parenteral feeding)<sup>7,8</sup>보다 더 뛰어나다.

[0011] 현재, 방사선 장염을 효과적으로 완화시킬 수 있는 영양상의 치료의 부족(lack of nutritional therapy)이

있다. 기본적인 또는 특정한 제외 식단이 선택된 경우<sup>2,31,32</sup>에 이로우 수도 있음이 초기의 연구가 제시되었을 지라도, 이러한 접근의 효과는 나중에 확인되지 않고 있다. 현재의 식이 요법은, 급성의 방사선 장염을 갖는 영양실조의 환자에게 영양상의 지원의 수단을 단지 제공할 뿐이다.

[0012] 동물 연구는, 글루타민이 화학 요법 또는 방사선 치료(RT)<sup>33-35</sup>에 의해 야기되는 손상으로부터 상위 및 하위 GI 관 점막 둘 다를 보호하는 것을 입증하였다. 그러나, 경구의 글루타민 섭취(oral glutamine feeding)가 골반의 방사선 치료<sup>36</sup>을 받은 환자에서의 급성 설사를 예방하거나 또는 완화시킬 수 있음을 나타내는 것은 실패하였다. 따라서, 조사-유도된 GI 손상의 치료를 위한 개선된 영양 보급 조성물(improved feeding compositions)에 대한 개발이 필요성이 존재한다. 하기에 나타낸 내용으로부터 명확해짐에 따라, 이러한 것 및 그 밖의 이익이 본 발명에 의해 제공된다.

**발명의 내용**

[0013] 본 발명은, 소장 기능을 개선시키기 위한(for improving small intestine function) 치료 조성물 및 방법을 제공한다. 본 조성물은, 소장 상피 세포, 특히 융모 영역 및 브러시보더(brush border)에서의 손실(loss)과 관련된 위장의 손실(gastrointestinal injury)의 치료 또는 개선(amelioration), 및/또는 소장에서의 흡수 능력(absorptive capacity)의 변화와 관련된 질환 또는 증상의 치료 또는 개선에 유용하다.

[0014] 유리하게, 본 발명의 치료 조성물은, 소장에서의 수송 단백질 기능(transport protein function)의 변화 및 소장 상피 세포의 손실에 의해 발생된 위장의 시스템(gastrointestinal system)의 불균형한 흡수 상태(the misbalanced absorptive state)를 조절할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 경구 투여(oral administration)를 위해 제형화된다.

[0015] 하나의 실시형태에서, 상기 치료 조성물(therapeutic composition)은, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신( isoleucine), 트립토판, 아스파라긴 및 세린으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 유리 아미노산; 및 선택적으로, 치료학적으로 수용가능한 담체, 전해질, 비타민, 완충제 및 착향료(flavoring agents)를 포함하고, 근본적으로 구성된, 또는 구성된다. 상기 치료상의 조성물은, 장의 경로(enteral route)를 통해 투여된다. 하나의 실시형태에서, 상기 조성물의 전체 삼투성은 약 230 mosm 내지 280 mosm, 또는 바람직하게 약 250 내지 260 mosm이다. 하나의 실시형태에서, 상기 조성물은, 약 7.1 내지 7.9, 바람직하게 약 7.4 인 pH 를 갖는다.

[0016] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 상기 조성물은, 글루코스, 글루타민, 메티오닌 및/또는 락토스를 포함하지 않는다.

[0017] 소장 상피 세포, 특히 융모 영역 및 브러시보더에서의 손실과 관련된 질병 또는 증후군, 및 소장 상피에서의 수송 단백질 작용의 변화와 관련된 질병 또는 증후군의 치료 또는 개선(amelioration)을 위한 방법을 또한 제공한다. 상기 방법은, 본 발명의 조성물의 유효한 양을 이러한 치료를 필요로 하는 피검자에게 장의 경로(enteral route)를 통해 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 본 조성물은 경구적으로 투여되고, 피검자의 장에 도달된다.

[0018] 본 발명은, 치료의 조성물을 제조하기 위한 방법, 및 소장 상피세포의 파괴 후의 상당한 흡수 능력을 유지하거나 또는 획득하는 영양소 또는 전해질을 선별함으로써, 본 치료/식이요법 조성물 내로 포함(inclusion)을 위한 영양소 또는 전해질을 위한 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 개별적인 환자에서 사용하기 위한 조절될 수 있고, 이로 인하여 개별적인 환자의 필요를 충족하기 위해 설계된 명확하게 조성물 및 방법의 개발을 가능하게 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0019] **도 1** 은, 순 음이온 분비(on net anion secretion)(A) 및 전도도(conductance)(B)에서의 조사(IR)의 효과를 나타낸 것이다. (A). 12 Gy IR 조직을 1일, 3일 및 4 일에 연구하였다.  $I_{sc}$ 에서의 최대한의 증가가 2일에 관찰되었다. 화살표는, 포스콜린(forskolin)이 첨가된 경우의 시점을 나타낸다. (B). 순 음이온 분비에서의 IR의 증가된 투여량의 효과. 모든 조직은 6일 및 n=12로 연구되었다. 결과는 전도도(conductance)에서의 IR 투여량-의존 증가(IR dose-dependent increase)를 나타내었다.

**도 2** 는, 조사의 증가된 투여량과 함께  $I_{sc}$  에서의 변화를 나타낸다. 모든 수치는 n = 24 조직으로부터 유도된

다. 실험은 296 mosm의 전체 삼투압을 갖는 챔버의 양면(both sides)에서의 일정한 링거 용액(regular Ringer solution)에서의 4 일 후-조사(day 4 post-irradiation)에서 실행하였다. 조직병리학 섹션은, 0 Gy와 비교하여, 3 Gy에서 최소한의 용모 및 크립트 손상을 나타내었고, 7 Gy에서 광범위한 용모 및 크립트 손상을 나타내었다.

**도 3A** 는, 3 Gy에서의 조사 후에 시간 동안 마우스 상피 세포에서의  $I_{sc}$  에서의 변화를 나타낸 것이다. 수치는 평균(mean)±S.E.M. n = 6의 조직을 나타낸다.  $I_{sc}$ 에서의 최대한의 증가는 조사 후의 6 일째에 관찰되었다. 현저한 차이는 5, 6 및 7 일째 날 사이에 관찰된다. 조사 후의 시간 > 7 일에서(With time > 7 days post-irradiation), 5 일, 6 일 또는 7일의  $I_{sc}$ 와 비교한 바와 같이,  $I_{sc}$  에서의 약간의 감소(a slight decrease)가 있다. **도 3B** 는, 소장 상피 세포의 이온 수송을 나타낸다. **도 3C** 는, 조사되지 않은 조직 및 3-Gy 조사된 조직(non-irradiated and 3-Gy irradiated tissues)에서, 기초(basal) 및 cAMP-자극된  $I_{sc}$  에서의 부메타나이드(bumetanide)의 효과를 나타낸 것이다. **도 3D** 는 순 음이온 분비에서의  $HCO_3^-$ 의 기부(contribution)를 나타낸 것이다. 이는, 이세티오네이트(isethionate)의 등몰의 양(equimolar amounts)으로 링거 용액에서의  $Cl^-$  을 대신함으로써 측정된다. 포스콜린(Forskolin)이 0 Gy(\*. p < 0.02)에서  $I_{sc}$  에서 증가를 나타내지만, 3 Gy 조직에서 증가되지 않았다. **도 3E** 는  $HCO_3^-$  분비(secretion)에서의 배스  $Na^+$ (bath  $Na^+$ )의 효과를 나타낸 것이다. 도 3 에서 나타난 결과의 모두는 n= 6 조직으로부터의 결과이다. 에러 바(Error bars)는 SEM 을 나타낸다.

**도 4A** 는, IR 후의 플라즈마 엔도톡신 레벨(plasma endotoxin level)에서의 변화를 나타낸 것이다. 플라즈마 엔도톡신 레벨은 IR 후의(post-IR) 6일에 측정되었다. **도 4B** 는, 막 전압(membrane voltage)[희석 포텐셜(Dilution potential)]에서의 변화에 대해 나타낸  $Cl^-$  &  $Na^+$  의 삼투성 비율에서의 변화를 나타낸다. 7 Gy에서의 조사는 선택성(selectivity)의 완전한 손실을 초래한다.

**도 5** 는, 상기 조사가 IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  및 MIP- $\alpha$  를 포함하는 염증성 매개물질(inflammatory mediator)의 레벨을 증가시킴을 나타낸다.

**도 6** 은, 조사로 인한  $HCO_3^-$  분비 및  $HCO_3^-$  분비성 조직( $HCO_3^-$  secretory machinery)에 대한 면역염색(immunostaining)에서의 변화를 나타낸 것이다. (A)는  $HCO_3^-$  분비에서의 배스  $Na^+$ 에서의 조사의 효과를 나타낸 것이다. A) 140 mM  $Na^+$  과 함께  $Cl^-$ -포함하는 용액 또는 B)  $Na^+$  없는  $Cl^-$  포함하는 용액에서 실험을 실행하였다. 조직은, 포스콜린(forskolin)으로 자극되었다.  $HCO_3^-$  분비는 0 Gy 내지 3Gy 조사된 마우스와 비교하였다. 현저하게 보다 높은 배스  $Na^+$ -의존적인  $HCO_3^-$  분비(Significantly higher bath  $Na^+$ -dependent  $HCO_3^-$  secretion)가, 3 Gy 조사된 마우스(p < 0.001)와 비교한 바와 같이, 0 Gy에서 관찰되었다. 결과는 n = 6의 조직으로부터 유도된다. 에러 바는, NBCe1 a/b 항체를 사용하여, 0 Gy 및 3 Gy 조사를 받은 마우스의 빈창자 조직(jejunum tissues)의 면역 염색을 나타낸 것이다.

**도 7** 은, 글루코스 수송 및 반응속도(kinetics)에서의 IR 투여량-의존적인 변화(IR dose-dependent changes)를 나타낸 것이다. (A)는, 조사가, 유성 챔버(Ussing chamber)에서 측정된 글루코스-자극된  $Na^+$   $I_{sc}$  에서의 투여량-의존적인 감소(a dose-dependent decrease)를 결과적으로 나타냄을 보여준다. (B)는 조사 투여량이 증가됨으로써 글루코스에 대한 감소된 SGLT1 친화력(decreased SGLT1 affinity)을 나타낸다.

**도 8** 은, 조사가 1 Gy에서의 조사에서 출발한 투여량-의존적인 방식(dose-dependent manner)에서 글루코스-자극된 흐름(glucose-stimulated current)을 감소시킴을 나타낸 것이다. 7 Gy에서의 조사는 글루코스 수송을 완전하게 불활성시킨다.

**도 9A** 는, 글루코스 농도에서의 증가와 함께 포화된 반응속도론을 나타낸, 단락 전류(short-circuit current)를 나타낸 것이다. 특히, 글루코스 수송은, 4 mM의 농도에서 포화된다. **도 9B** 는  $K_m$  수치에서의 조사 투여량-의존적인 증가(irradiation dose-dependent increase)를 나타낸다.  $K_m$  에서의 최대한의 증가가 7 Gy에서 관찰된다. 이는, 조사가 글루코스에 대한 SGLT-1의 감소된 친화도를 일으킴을 나타낸 것이다.

**도 10** 은,  $V_{max}$ 가 조사 투여량이 증가됨에 따라 감소됨을 나타낸 것이다.  $V_{max}$ 에서의 최소한의 감소가 7 Gy에서 관찰된다. 이는, 조사가 글루코스 수송에 대해 기능적인 SGLT-1의 감소를 일으킴을 나타낸다.

**도 11** 은, 조사 후의 시간 동안의  $K_m$ 에서의 변화를 나타낸 것이다.  $K_m$ 은 조사 후에 즉시 증가되고, 조사 후 대략 14일에 정상[대조군 수치(control values)]으로 돌아온다.

**도 12A 및 B** 는, 9-Gy 및 15.6-Gy 조사 후의 쥐와 동물의 생존 연구의 결과를 나타낸 것이다. 글루코스-치료된 마우스의 사망은 5일 및 7일에 발생한 반면에, 대조군 마우스는 조사 후에 10일이 될 때까지 사망하지 않았다. 20일에, 대조군 마우스의 30 %가 살아있는 반면에, 글루코스-치료된 마우스의 어떠한 것도 20일에 생존하지 못하였다.

**도 13** 은, 전체-세포 용해물(whole-cell lysates)에서의 SGLT-1 단백질 레벨의 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)을 나타낸 것이다. 상기 결과는, 조사가 SGLT-1 발현을 증가시킴을 나타낸다.

**도 14** 는, 빈창자 조직의 브러시-보더 막 소포(brush-border membrane vesicles)에서의 SGLT-1 단백질 레벨의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 조사는 투여량-의존적인 방식(dose-dependent manner)에서 SGLT-1 단백질 레벨을 증가시킨다. 어떠한 SGLT-1 단백질도 결장 조직에서 발견되지 않았다(No SGLT-1 protein was detected in colonic tissues).

**도 15** 는, 조사가 글루타민-자극된  $I_{sc}$ (glutamine-stimulated  $I_{sc}$ )에서의 투여량-의존적인 증가를 야기함을 나타낸 것이다.

**도 16** 은, 조사가 리신-자극된  $I_{sc}$  에서의 투여량-의존적인 감소를 야기함을 나타낸 것이다.

**도 17A 및 B** 는, IR 후에 리신(A) 또는 글루코스(B) 치료 후의 마우스 생존 비율을 나타낸 것이다. 리신 투여는 증가된 생존을 야기한 반면에, 글루코스 투여는 감소된 생존을 야기하였다.

**도 18**은, 다양한 수송 단백질을 위한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 웨스턴 블롯 분석은 마우스의 빈창자에서의 NKCC1 (A), CFTR (C) 및 NBCe1-A/B (B) 단백질 레벨을 나타낸 것이다. 왼쪽에서 오른쪽으로, 상기 레인(lanes)은 0, 1, 3, 5 및 7 Gy를 나타낸다. 조사는 1-5 Gy로부터의 NKCC1 단백질 레벨을 증가시키고, 이러한 증가는 7 Gy에서 감소된다(A). NBCe1-A/B 단백질 레벨은 조사 후에 현저하게 감소된다. 빈창자 조직에서의 CFTR 단백질 레벨은, 0 Gy와 비교한 바와 같이 3 Gy에서의 조사 후에 현저하게 증가된다(C). 빈창자는 십이지장, 회장(ileum) 또는 결장에서 레벨과 비교하여 가장 높은 NBCe1-A/B 단백질 레벨을 갖는다(D). 조직은 조사 후 6 일에 웨스턴 블롯을 위해 채취되었다.

**도 19A 및 B** 는, cAMP-자극된 (A) 및 조사-유도된 (B) 음이온 분비에 대한 도식도(schematic model)이다.

**도 20** 은, 5-플루오로우라실(5-FU)(**도 20A**) 및 시스플라틴(**도 20 B**)로 처리된 마우스에서의 소장 점막에서의 손상을 나타낸 것이다. (A)는 5-FU-주입된 마우스에서의  $I_{sc}$ 에서의 변화를 나타낸 것이다. (B)는 시스플라틴-주입된 마우스에서의  $I_{sc}$ 에서의 변화를 나타낸 것이다.

**도 21** 은, 본 발명의 치료 조성물의 투여가 5-FU 를 받은 마우스의 소장 기능을 개선시킴을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 소장의 기능을 개선하기 위한 치료 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 조성물은 장내 투여를 위해 제형화된다. 본 발명의 조성물 및 방법은, 소장 상피 세포, 특히 용모 영역 및 브러시보더에서의 손실과 관련된 위장의 손상의 치료 또는 개선, 및/또는 소장 상피에서의 수송 단백질 작용의 변화와 관련된 질환 또는 증상의 치료에 특히 유용하다.

[0021] 유리하게, 본 치료 조성물은, 수송 단백질 기능의 변화 뿐만 아니라, 소장 상피 세포, 특히 소장 용모 영역 및 브러시보더에서의 손실에 의해 야기된 위장 시스템의 불균형 흡수 상태(misbalanced absorptive state)를 조정한다. 특히, 본 발명은 소장 점막의 치유(small intestine mucosal healing)를 개선하고, 소장 기능을 회복하고, 유체의 유지를 향상시키고, 소장 위축(small intestine atrophy)을 예방하거나 또는 완화시킬 수 있고/있거나, 소장 점막에 대한 손실을 갖는 환자의 소장 장벽 기능(small intestine barrier function)을 회복하거나 또는 증진시킨다.

[0022] 하나의 실시형태에서, 치료 조성물은, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토

관, 아스파라긴, 및 세린으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 유리 아미노산; 및 임의적으로 약제학적으로 수용가능한 담체, 전해질, 비타민, 완충제, 및 착향료를 포함하거나, 기본적으로 구성된, 또는 구성된다. 상기 치료 조성물은, 장의 경로를 통해 투여된다. 하나의 실시형태에서, 상기 조성물의 전체 삼투성은 약 230 mosm 내지 280 mosm이거나, 또는 특히 약 250 내지 260 mosm이다. 하나의 실시형태에서, 상기 조성물은 약 4.0 내지 8.5, 바람직하게 5.0 내지 8.2, 보다 바람직하게 6.0 내지 8.0, 보다 바람직하게 7.1 내지 7.9, 및 가장 바람직하게 약 7.4의 pH 를 갖는다.

- [0023] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 조성물은, 글루코스, 글루타민, 메티오닌 및/또는 락토오스(lactose)를 포함하지 않는다.
- [0024] 소장 상피 세포, 특히 융모 영역 및 브러시보더에서의 손실과 연관된 질병 또는 증상, 및 소장 상피에서의 수송 단백질 작용의 변화와 관련된 질환 또는 증상의 치료 또는 개선을 위한 방법이 또한 제공된다. 상기 방법은, 본 발명의 조성물의 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 피검자에게 장내 경로(enteral route)를 통해 투여되는 것을 포함한다.
- [0025] 본 발명은, 소장 점막에 대한 손상 후에 충분한 흡수 능력을 유지하거나 또는 획득하기 위해 오직 영양소와 함께 피검자에게 장내 공급(enteral feeding)에서의 발견에서의, 적어도 일부에 기초하고, 점막 치료를 개선하고, 소장 기능을 회복하고, 유체 유지를 증진시키고, 흡수 불량(malabsorption), 설사, 구역(nausea), 구토, 전해질 불균형 및 탈수증(dehydration)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 관련된 다수의 질환 증후군을 완화시킨다.
- [0026] 본 발명에 따라, 조사 및 화학요법 후에, 예를 들어, 글루코스, 글루타민 및 리신, 및  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  및  $\text{Cl}^-$  과 같은 전해질에 대한 수송 단백질 기능에서의 변화가 관찰됨이 측정되었다. 게다가, 방사선은 순 음이온 분비(net anion secretion)를 일으킨다. 영양소 및 전해질 흡수 능력의 변화는, 방사선 및 화학요법 후에 즉시 발생되지만, 이는 흡수 능력이 정상으로 회복되는 것이 가능하다(마우스 모델에서 조사 후에 약 8 내지 14일).
- [0027] 명확하게, 방사선은, 글루코스에 대한 나트륨-의존적인 글루코스 수송 시스템(sodium-dependent glucose transport system)(SGLT-1)의 감소된 친화도 때문에, 글루코스 흡수에서의 조사 투여량-의존적인 감소(irradiation dose-dependent decrease)를 야기한다. 글루코스-자극에서의 기능적인 연구는, 조사가 글루코스-수송 활성도에서의 투여량-의존적인 감소를 일으키고, 글루코스에 대한 SGLT-1의 친화도를 감소시킴을 나타낸다.
- [0028] 장의 루멘(intestinal lumen)에서의 흡수되지 않는 영양소 또는 용질(solute)의 존재가 삼투압성 설사(osmotic diarrhea)를 유도할 수 있음이 알려져 있다. 본 발명에 따라, 글루코스 및/또는 글루타민으로 조사된 피검자의 경구 공급(oral feeding)은 삼투압성 설사를 야기하고, 감소된 생존을 나타낸 반면에, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 및/또는 세린으로부터 선택된 아미노산의 각각, 또는 이들의 조합의 경구 공급은 생존을 연장시킨다.
- [0029] 소장 기능을 개선하기 위한 치료 조성물
- [0030] 하나의 양상에서, 본 발명은, 소장 기능을 개선하기 위한 치료요 조성물을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 치료 조성물은, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 및 세린으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 유리 아미노산; 및 임의적으로 약제학적으로 수용가능한 담체, 전해질, 비타민, 완충제, 및 착향료를 포함하거나, 기본적으로 구성된, 또는 구성된다. 치료 조성물은 장내 경로를 통해 투여된다.
- [0031] 바람직하게, 상기 조성물은 약간 알칼리성이고, 소장 상피 세포[소장의 융모 세포(villous cells) 또는 크립트 세포(crypt cells)와 같은]의 삼투압과 비교한 경우, 저삼투압(hypotonic)이다. 바람직하게 본 발명은 물을 포함한다. 바람직하게 상기 조성물은, 융모 상피 세포의 손실 또는 손상으로 인해 약화된, 소장 기능을 개선하기 위한 경구 재수화 음료(oral rehydration drink)로서 제형화된다.
- [0032] 하나의 실시형태에서, 상기 조성물의 전체 삼투성은, 약 230 mosm 내지 280 mosm, 또는 이들 사이의 어떠한 수치(any value therebetween)이다. 바람직하게, 전체 삼투성은 약 250 내지 260 mosm이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 조성물은 280 mosm 보다 낮은 어떠한 수치인 전체 삼투성을 갖는다.
- [0033] 하나의 실시형태에서, 상기 조성물은 약 7.1 내지 7.9, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 pH 를 갖는다. 바람직하게, 상기 조성물은 약 7.3 내지 7.5, 보다 바람직하게 약 7.4의 pH 를 갖는다.

- [0034] 특정 실시형태에서, 각각의 아미노산은, 4 mM 내지 40 mM, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에 존재할 수 있고, 상기 조성물의 전체 삼투성은 약 230 mosm 내지 280 mosm이다. 선택적으로, 만약 아미노산 농도가 mg/l 를 기초로 계산된다면, 각각의 유리 아미노산은 300 mg/l 내지 8000 mg/L, 이들 사이의 어떠한 수치에 존재할 수 있고, 상기 조성물의 삼투성은 약 240 mosm 내지 280 mosm이다.
- [0035] 특정한 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 하기와 같은 이들 각각의 농도로 존재하는 하나 또는 그 이상의 유리 아미노산을 포함한다: 약 730 내지 6575 mg/l 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 리신; 약 532 내지 4792 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 아스파르트산; 약 300 내지 2703 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 글리신; 약 525 내지 4722 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 이소류신; 약 476 내지 4288 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 트레오닌; 약 725 내지 6523 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 티로신; 약 469 내지 4217 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 발린; 약 817 내지 7352 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 트립토판; 약 528 내지 4756 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 아스파라긴; 및/또는 약 420 내지 3784 mg/l, 또는 이들 사이의 어떠한 수치의 농도에서의 세린; 상기 조성물의 전체 삼투성은 약 240 mosm 내지 280 mosm이다.
- [0036] 하나의 실시형태에서, 본 발명은, 하기의 성분 리신(11-21 mosm), 아스파르트산(3-13 mosm), 글리신(19-29 mosm), 이소류신(19-29 mosm), 트레오닌(19-29 mosm), 티로신(0.5-5 mosm), 발린(19-29 mosm), 트립토판(5-20 mosm), 아스파라긴 (3-13 mosm), 및 세린(3-8 mosm), 또는 이러한 성분의 부분 집합(subset)을 포함하는 음료를 제공한다.
- [0037] 하나의 특정한 실시형태에서, 상기 조성물은, 유리 아미노산의 형태로 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신을 포함한다. 추가적인 특정한 실시형태에서, 상기 조성물은, 유리 아미노산의 형태로 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴 및 세린을 포함한다.
- [0038] 추가적인 실시형태에서, 상기 조성물은, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴 또는 세린으로부터 선택된 동일한 또는 상이한 아미노산으로 만들어진 하나 또는 그 이상의 디펩티드(dipeptide)를 포함한다.
- [0039] 하나의 실시형태에서, 상기 조성물은, 글루타민 및/또는 메티오닌; 및 글루타민 및/또는 메티오닌으로 가수분해될 수 있는 어떠한 디(di)-, 올리고(oligo)-, 또는 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하지 않는다.
- [0040] 선택적인 실시형태에서, 상기 조성물은, 유리 아미노산 글루타민, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 글루타민-함유 디펩티드(dipeptides)를 포함할 수도 있고, 상기 유리 아미노산 글루타민 및 상기 글루타민-함유 디펩티드의 전체 농도는, 300 mg/l 미만, 또는 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0.5 mg/l, 또는 0.01 mg/l와 같은, 어떠한 300 mg/l 보다 낮은 농도이다.
- [0041] 또 다른 선택적인 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 유리 아미노산 메티오닌, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 메티오닌-함유 디펩티드를 포함할 수도 있고, 상기 유리 아미노산 메티오닌 및 메티오닌-함유 디펩티드의 전체 농도가 300 mg/l 미만, 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0.5 mg/l, 또는 0.01 mg/l와 같은 300 mg/l 보다 낮은 어떠한 농도이다.
- [0042] 하나의 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 어떠한 모노-, 디-, 올리고-, 다당류(polysaccharides) 및 탄수화물을 포함하는 어떠한 다당류를 포함하지 않는다. 하나의 특정한 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 글루코스, 및/또는 글루코스로 가수분해될 수 있는 어떠한 디-, 올리고, 다당류, 및 탄수화물을 포함하지 않는다. 특정한 실시형태에서, 상기 조성물은 락토오스를 포함하지 않는다. 또 다른 특정한 실시형태에서, 상기 치료 조성물은 프룩토오스(fructose) 및/또는 갈락토오스, 및/또는 어떠한 디-, 올리고, 다당류, 및 프룩토오스 및/또는 갈락토오스로 가수분해될 수 있는 탄수화물을 포함하지 않는다.
- [0043] 선택적인 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 단당류 글루코스, 및 임의적으로 락토오스 외의 하나 또는 그 이상의 글루코스-포함하는 이당류를 포함할 수도 있고, 상기 단당류 글루코스 및 글루코스-포함하는 이당류의 전체 농도는 3 g/l 미만(less than), 1 g/l, 500 mg/l, 300 mg/l, 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0.5 mg/l, or 0.01 mg/l와 같은 3 g/l 보다 낮은 어떠한 농도이다.
- [0044] 특정한 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 예를 들어  $\text{Na}^+$ ;  $\text{K}^+$ ;  $\text{HCO}_3^-$ ;  $\text{CO}_3^{2-}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Cl}^-$ ;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$

, 및  $PO_4^{3-}$  와 같은 인산 이온(phosphate ion); 아연(zinc); 요오드(iodine); 구리; 철; 셀레늄(selenium); 크롬; 및 폴리브텐으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 전해질을 포함한다. 선택적인 실시형태에서, 상기 조성물은  $HCO_3^-$  또는  $CO_3^{2-}$  를 포함하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 상기 조성물은, 5 mg/l 미만의 전체 농도, 또는 5 mg/l 보다 낮은 농도에서의  $HCO_3^-$  및  $CO_3^{2-}$  을 포함한다.

[0045] 추가적인 실시형태에서, 상기 치료 조성물은, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D (예를 들어, 비타민 D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, 및/또는 D<sub>5</sub>), 비타민 E, 비타민 B<sub>1</sub>(티아민), 비타민 B<sub>2</sub> (예를 들어, 리보플라빈), 비타민 B<sub>3</sub> [예를 들어, 니아신(niacin) 또는 니아신아미드(niacinamide)], 비타민 B<sub>5</sub> [펜토텐산(pantothenic acid)], 비타민 B<sub>6</sub> (pyridoxine), 비타민 B<sub>7</sub> (biotin), 비타민 B<sub>9</sub> [예를 들어, 폴레이트(folate) 또는 엽산(folic acid)], 비타민 B<sub>12</sub> [코발라민(cobalamin)], 및 비타민 K (e.g., 비타민 K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, 및 K<sub>5</sub>), 및 콜린(choline)을 포함한다.

[0046] 특정 실시형태에서, 상기 조성물은, 올리고-, 다당류 및 탄수화물; 올리고-, 또는 다당류 또는 단백질; 지질; 작은(small)-, 중간(medium)-, 및/또는 긴-사슬 지방산(long-chain fatty acids); 및/또는 하나 또는 그 이상의 상기-언급된 영양소를 포함하는 식품으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 성분을 포함하지 않는다.

[0047] 하나의 실시형태에서,  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ , 및  $PO_4^{3-}$  와 같은 인산 이온은, 본 발명의 조성물을 보호하는데(buffer) 사용된다. 하나의 실시형태에서, 상기 치료 조성물은 완충용액으로서  $HCO_3^-$  또는  $CO_3^{2-}$  를 사용한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 치료 조성물은 완충용액으로서  $HCO_3^-$  또는  $CO_3^{2-}$  을 사용하지 않는다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기본적으로 구성된(consisting essentially of)"는, 본 발명의 기본적으로 신규한 특성, 즉 소장 상피, 특히, 용모 영역 및 브러시보더(brush border)에 대한 손상의 치료를 위한 조성물 및 방법에 실질적으로 영향을 미치지 않는, 성분 및 명시된 물질에 대한 단계 또는 단계 및 이러한 것들의 범위를 한정한다. 예를 들어, "기본적으로 구성된"을 사용함으로써, 치료 조성물은, 소장 상피, 특히 용모 영역 및 브러시보더에 대한 손상의 치료에 직접적인 유익한 또는 부정적인 치료 효과를 갖는 유리 아미노산, 디-, 올리고- 또는 다당류 또는 단백질; 및 모노-, 디-, 올리고-, 다당류 및 탄수화물을 포함하지만, 이로 한정되지 않는 어떠한 명시되지 않는 성분을 포함하지 않는다. 또한, 예를 들어, "기본적으로 구성된"을 사용함으로써, 상기 합성(compositing)은, 소장 상피에 대한 손상의 치료에 대한 치료의 효과를 갖지 않는 물질을 포함할 수도 있다; 이러한 성분은, 손상된 소장 상피, 특히 용모 영역 및 브러시보더의 작용 또는 건강에 영향을 미치지 않는, 담체, 부형제(excipients), 아쥬반트(adjutant), 착향료 등을 포함한다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "올리고펩티드"는, 3 내지 20 개의 아미노산으로 구성된 펩티드를 나타낸다. 상기 용어 "올리고당(oligosaccharide)"은 3 내지 20 개의 단당류로 구성된 당류(saccharide)를 나타낸다.

[0050] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 조성물은, 소장 상피 세포[용모 세포, 크립트 세포, 장세포(enterocytes) 및 장의 전구세포(intestinal progenitor cells)와 같은]에 대한 손상을 갖지 않는 정상의 대조군의 흡수 능력과 비교하였을 경우, 장내 상피 세포에 대한 손상을 갖는 피검자에서의 개선된 흡수 능력을 유지하거나 또는 획득하는 영양소(유리 아미노산과 같은) 및/또는 전해질을 포함한다.

[0051] 추가적인 실시형태에서, 본 발명의 조성물은, 소장 상피 세포[용모 세포, 크립트 세포, 장세포(enterocytes) 및 장의 전구세포(intestinal progenitor cells)와 같은]에 대한 손상을 갖지 않는 정상의 대조군의 흡수 능력과 비교한 경우, 소장 상피 세포에 대한 손상을 갖는 피검자에서 흡수되지 않거나 또는 감소된 흡수를 갖는, 영양소(아미노산과 같은) 및/또는 전해질을 포함하지 않는다. 유리하게, 본 발명의 조성물은 지나친 에너지 지출(energy expenditure)을 감소시키기 위해 장에 의해 영양분의 쉬운 흡수를 용이하게 하고, 이로 인하여 점막 손상(mucosal injury) 후의 즉각적인 시간 기간에서의 장의 휴식(intestinal rest)을 제공한다.

[0052] 소장 기능을 개선하기 위한 치료 방법

[0053] 본 발명의 또 다른 측면은, 소장 상피 세포, 특히 용모 영역 및 브러시보더(brush border)에 대한 손실(loss) 또는 손상(injury)과 연관된 질환 또는 증상의 치료 또는 개선을 위한 방법을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 소장 상피 세포의 손실 또는 손상은, 영양분, 전해질, 및/또는 유체(fluid)에 대한 변화된 흡수 능력을 야기한다. 유리하게, 소장 상피 세포의 손실 또는 손상을 갖는 환자, 특히 소장 용모 위축을 갖는 환자에게, 본 발명

은, 소장 점막 치유(small intestine mucosal healing)를 개선하고; 소장 기능을 개선하고; 소장에서의 영양소의 흡수 및 유체의 유지를 증진하고; 소장 위축을 예방하거나 또는 완화하고; 복통을 완화하고; 설사를 예방하고/예방하거나 치료하고; 소장 장벽 기능(small intestine barrier function)을 회복하거나 또는 증진시키고; 및/또는 소장 점막의 염증, 세균혈정(bacteremia) 및/또는 내독소혈증(endotoxemia)을 감소시킨다.

[0054] 이에 따라서, 본 발명은, 세포독성 화학요법 제제(cytotoxic chemotherapeutic agents), 골반 또는 복부 방사선, 양성자 치료(proton therapy) 및 복부 수술을 받은 피검자; 소장에서의 급성 또는 만성 염증과 연관된 감염 또는 자가면역 질환으로 고통받는 피검자; 예를 들어 방사선에 간격을 두고 일상적으로 노출되는 우주 비행사 또는 파일럿(pilot)과 같은 방사선에 일상적으로 또는 우연히 노출된 피검자; 전쟁 또는 테러리즘으로, 핵 사고(nuclear accident)에 노출된 피검자의 위장 건강을 개선하는데 특히 이롭다.

[0055] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은, 본 발명의 조성물의 유효량을, 이러한 치료를 필요로 하는 환자 또는 피검자에게 장의 경로(enteral route)를 통해, 투여되는 것을 포함한다. 상기 조성물은, 소장 상피 세포에 손상 전에, 손상 시, 및/또는 손상 후에 환자 또는 피검자에게 즉시 투여될 수 있고, 매일 한 번 또는 여러 번 투여될 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같은, 상기 용어 "피검자(subject)" 또는 "환자(patient)"는, 본 발명에 따른 조성물로 치료하는 것을 제공하기 위한, 영장류(primates)와 같은 포유동물을 포함하는 유기체(organism)를 지칭한다. 치료의 나타낸 방법으로부터 이익을 받을 수 있는 포유동물 중(Mammalian species)은, 유인원(apes), 침팬지(chimpanzees), 오랑우탄, 인간, 원숭이; 개, 고양이와 같은 가축(domesticated animal); 말, 소, 돼지, 양, 염소, 닭과 같은 축산(live stocks); 및 마우스(mice), 랫, 기니피그(guinea pigs) 및 햄스터와 같은 동물을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0057] 하나의 특정한 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 피검자는, 십이지장(duodenum), 빈창자(jejunum), 및 회장(ileum)의 점막 층(mucosa layer)을 포함하는, 소장 점막 상피 세포에 손상을 입은 환자이다. 특히, 치료를 필요로 하는 피검자는, 소장의 용모 영역 및 브러시보더에 손상을 입은 환자이다. 예를 들어, 치료를 필요로 하는 피검자는, 용모 위축[예를 들어, 용모 영역 및 브러시보더의 부분적인 또는 완전한 쇠약(partial or complete wasting away of the villous region and brush border)]을 갖고; 소장에서의 용모 세포에서의 적어도 5%(적어도 10%, 20%, 30%, 또는 50%와 같은) 감소를 갖고; 정상과 비교한 경우, 적어도 5%(적어도 10%, 20%, 30%, 또는 50%) 용모 길이(villous height)를 상실하고; 상기 소장의 용모 영역 및 브러시보더에서의 하나 또는 그 이상의 수송체(transporter)의 기능 손실을 갖고, 상기 수송체는, SGLT-1 수송체, AE2 수송체, NHE1 수송체, 및 NBCe1-A/B 수송체를 포함하지만, 이로 제한되지 않고, 상기 수송체의 기능의 손실은, 적어도 5%(적어도 10%, 20%, 30%, 또는 50%)이고; 및/또는 소장에서의 하나 또는 그 이상의 영양소의 흡수 능력(absorptive capacity)에서의 변화를 갖고, 상기 영양소는, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 히스티딘, 티로신, 알라닌, 아르기닌, 글루타민, 아스파르트산, 아스파르트산염(aspartate), 시스테인, 글리신, 프롤린, 세린, 아스파라긴, 글루코스, 프룩토오스(fructose), 및/또는 락토오스로부터 선택된 것이고, 상기 흡수 능력에서의 변화는 적어도 5%(적어도 10%, 20%, 30%, 또는 50%)이다.

[0058] 소장의 흡수 능력에서의 변화는, 예를 들어, 본원의 물질 및 방법에 기재된 바와 같이, 유싱 챔버(Ussing Chamber)를 사용하여, 측정될 수 있다. 예를 들어, 흡수 상태에서의 변화는, 예를 들어  $K_m$ ,  $V_{max}$  및  $I_{sc}$ 을 포함하는, 색인의 조합을 측정함으로써 결정될 수 있다. 소장의 용모 및 그 밖의 영역에 대한 손상은, 예를 들어 소장의 점막의 생체 조직 샘플(biopsy samples)의 검사에 의해 결정될 수 있다.

[0059] 소장 용모 세포와 같은 소장 점막의 상피 세포에 손상을 야기하는 질환 및 치료 방법이 숙련된 임상 의( skilled clinician)에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 의료 직업에서 알려진 바와 같이, 염증성 장 질환( IBD), 궤양성 대장염, 십이지장 궤양(duodenal ulcers) 및 크론 질병과 같은 특정한 질병을 갖는 환자는 소장 점막의 만성적인 파괴(chronic destruction)로부터 고통받고 있다. 방사선, 화학요법(chemo)-, 및 양성자 치료(proton therapy)가 또한 소장 세포에 손상을 일으킨다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료(treatment)" 또는 이의 어떠한 문법적인 변화[예를 들어, 치료하다(treat), 치료하는(treating) 및 치료(treatment) 등]는, 질병 또는 증상의 증후군을 완화시키고; 및/또는 질병 또는 증상의 진행(progression), 심각함 및/또는 범위를 감소, 억제(suppressing), 저해(inhibiting), 줄이거나 또는 영향을 미치는 것을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "개선(amelioration)" 또는 이의 어떠한 문법적인 변화[예를 들어, 개선하다

(ameliorate), 개선하는(ameliorating) 및 치료(amelioration) 등]는, 질병 또는 증상[예를 들어, 설사, 세균혈정(bacteremia) 및/또는 내독소혈증(endotoxemia)]의 시작(onset)을 지연시키거나, 또는 심각성을 감소시키는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같은, 개선은 증상이 완전히 없는 것을 필요로 하지 않는다.

- [0062] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유효량(effective amount)"은, 질병 또는 증상을 치료하거나 또는 개선하거나, 또는 의도된 치료 효과를 생산할 수 있는 양을 나타낸다.
- [0063] 하나의 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 소장 상피 세포에 대한 손상을 갖는 피검자의 장의 건강을 촉진시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은, 소장 상피 세포에 대한 손상을 갖거나, 또는 이러한 손상으로 괴로움을 막 당하고(who is about to be inflicted with such an injury), 치료 또는 개선을 필요로 하는 피검자를 확인하고, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴, 및 세린으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 유리 아미노산; 및 임의적으로 치료학적으로 수용가능한 담체, 전해질, 비타민, 완충제 및 착향료를 포함하는, 기본적으로 이루어진 또는 이루어진 조성물의 유효량을, 상기 피검자에게 장의 경로를 통해, 투여되는 것을 포함하고, 상기 조성물은 240 내지 280 mosm의 전체 삼투성 및 약 7.1 내지 7.9의 pH 를 갖는다.
- [0064] 하나의 실시형태에서, 하기의 영양소의 하나 또는 그 이상은, 소장 상피 세포의 손상을 가진[또는 막 가진 (about to have)] 피검자에게, 장의 경로를 통해 투여되지 않고, 상기 영양소는, 글루타민, 메티오닌 및 글루타민 및/또는 메티오닌으로 가수분해될 수 있는 어떠한 디-, 올리고-, 또는 폴리펩티드 또는 단백질로부터 선택되고; 글루코스 및 글루코스로 가수분해 될 수 있는 어떠한 디-, 올리고, 다당류 및 탄수화물; 및/또는 소화 시, 소장에서 상기에 언급된 어떠한 영양소의 흡수를 필요로 하는 식품이다.
- [0065] 추가적인 실시형태에서, 소장 상피 세포에 손상을 가진[또는 막 가진(about to have)] 피검자를 위해, 하기의 영양소 중 어떠한 것도 장의 경로를 통해 투여되지 않고(none of the following nutrients are administered via an enteral route), 상기 영양소는, 당류(saccharides), 지질(lipid), 지방산(fatty acid), 및/또는 소화 시, 소장에서 상기에 언급된 영양소의 어떠한 것 중의 흡수를 필요로 하는 식품으로부터 선택된 것이다. 방사선에 노출된, 또는 방사선, 화학-, 및 양성자 치료(chemo-, and proton therapy)를 받은 환자에 대해, 소장 상피 세포에 대한 손상은, 적어도 3, 7, 14, 21, 30 일, 또는 1 내지 30 일 사이의 어떠한 기간 동안 일반적으로 지속된다.
- [0066] 추가적인 실시형태에서, 상기 피검자가 방사선에 노출되거나 또는 방사선, 화학-, 및/또는 양성자 치료를 받은 이후로, 1 내지 30일 사이의 어떠한 기간(3, 7, 14, 21, 30 일 후와 같은) 후에, 하나 또는 그 이상의 하기의 영양소가 점막 치유(mucosal healing)를 증진시키기 위해 장의 경로를 통해 투여되고, 상기 영양소는, 글루타민, 메티오닌, 및 글루타민 및/또는 메티오닌으로 가수분해 될 수 있는 어떠한 디-, 올리고-, 또는 폴리펩티드 또는 단백질; 글루코스 및 글루코스로 가수분해될 수 있는 어떠한 디-, 올리고, 다당류 및 탄수화물; 및/또는 소화 시, 소장에서 상기-언급된 어떠한 영양소의 흡수를 필요로 하는 식품으로부터 선택된 영양소이다.
- [0067] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 경구적으로 투여되고, 피검자의 소장에 도달한다. 선택적으로, 상기 방법은, 장의 경로를 통해 충분한 양으로 투여되지 않는 요구된 영양소 및 전해질을, 비경구 경로를 통해, 투여되는 것을 더 포함한다.
- [0068] 하나의 실시형태에서, 본 발명은, 피검자에게 충분한 양 또는 모든 필수적인 영양소(essential nutrition)를 제공하는 것이 익숙하지 않지만, 소장 점막 치유를 개선하고, 소장 작용을 회복시키고, 유체 유지를 증진시키고, 또는 소장 용모 수축을 예방하거나 또는 개선하고, 설사를 예방 및/또는 치료하고, 및/또는 장의 장벽 기능(intestinal barrier function)을 회복 또는 향상시킨다. 특정한 실시형태에서, 상기 음료의 조성물은, 상기 장벽 기능에서의 개선을 또한 기초로 한다. 장벽 기능은 하기를 포함하는 다중 기술(multiple technique)을 사용하여 측정될 수 있다: a) 유실 챔버(Ussing chamber)에서 시작된 조직에서의 전도도 측정(conductance measurements)에서의 증가, b) Cl 및 Na(PCl/PNa)의 상대적인 삼투성(relative permeability)을 측정하는데 사용된 희석 포텐셜(dilution potential)[오직 온전하고 기능적인 장벽(only intact and functional barrier)이 이온 선택성(ion selectivity)을 유지할 수 있다; 상기 장벽 기능을 잃으면, 상기 이온 선택성 비율은 1 에 가까워진다(when the barrier function is lost, the ion selective ratio is close to one)], 및 c) 플라즈마 엔도톡신 레벨을 측정. 점막 장벽 기능을 잃으면, 공생 관계의 장 박테리아가 체순환(systemic circulation) 내로 이들의 길에서 발견될 수 있고, 결과적으로 플라즈마 엔도톡신 레벨(plasma endotoxin levels)이

증가된다. 엔도톡신 레벨은 환자의 혈액 샘플에서 측정될 수 있다. 플라즈마 엔도톡신 레벨은 또한, 치료와 함께 개선을 측정하기 위한 지수(index)로서 사용될 수 있다.

- [0069] 본 발명의 조성물은, 소장 상피 세포의 손실, 파괴 또는 감소와 연관된 어떠한 질환 또는 증상의 치료 또는 개선, 또는 소장 상피 세포의 감소, 특히 소장의 용모 세포(villous cells), 장세포(enterocyte), 및/또는 장의 전구세포(intestinal progenitor cells)의 수 또는 기능에서의 손실(loss), 파괴 또는 감소에 사용될 수 있다. 본 발명은, 소장의 상피 세포에서의 수송 단백질, 특히 소장의 용모 세포에서의 수송 단백질의 손실, 불활성, 또는 기능적인 변화(inactivation)와 연관된 어떠한 질병 또는 증상의 치료 또는 개선에 특히 유용하다.
- [0070] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은, 글루코스에 대한 나트륨-의존적인 글루코스 수송 시스템(SGLT-1)의 감소된 친화도(reduced affinity of sodium-dependent glucose transport system to glucose); NH<sub>2</sub>-말단의 전기발생 Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 공동수송(NBCE1-A/B)의 손실 또는 감소된 활성도[loss or reduced activity of NH<sub>2</sub>-terminal electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBCE1-A/B)]; 애피컬(apical) Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 교환 수송체(AE1)의 손실 또는 감소된 활성도(loss or reduced activity of apical Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange transporter); 및/또는 CFTR 및/또는 NKCC-1 수송체 시스템의 증가된 레벨 또는 활성도에서 발생된, 또는 관련된 질환 또는 증상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0071] 구체적인 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은, 방사선에 의해 야기된 소장에 대한 손상을 치료 또는 완화하는데 사용될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 본 발명은, 방사선 치료, 특히 골반 및 복부 방사선 치료에 의해 발생된 소장에 대한 손상을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 방사선 치료는 암 치료를 위한 것이다.
- [0072] 게다가, 본 발명은, 우주비행사 및 파일럿에서의 방사선 공간에 노출과 같은, 일정한 방사선 노출; 방사능 무기(radioactive weapon) 및 우연한 핵 방출(accidental nuclear release)과 같은 방사선 노출에 의해 발생된 소장에 대한 손상을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명은, 급성 및/또는 만성 방사선 장염을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다.
- [0073] 특정한 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은, 소장에 대한 손상을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있고, 상기 환자는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 Gy에서의 방사선을 받는다. 또 다른 실시형태에서, 상기 피검자는 20 Gy 보다 높은 투여량으로 방사선을 받는다.
- [0074] 게다가, 본 발명은, 시스플라틴, 5-플루오로우라실(5-FU), 수산화요소(hydroxyurea), 에토포시스(etoposide), 아라비노사이드(arabinoside), 6-메르캅토푸린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 플루다라빈(fludarabine), 메토크세이트(methotrexate), 스테로이드, 및/또는 이들의 조합을 포함하지만 이로 제한되지 않는 화학치료제(chemotherapeutic agent)에 의해 발생하는 소장에 대한 손상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0075] 게다가, 본 발명은, 양성자 치료에 의해 발생된 소장에 대한 손상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0076] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 염증성 장 질환(IBD), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 십이지장 궤양(duodenal ulcers), 크론 질환, 및/또는 만성 소화 장애증(coeliac disease)[셀리악 질병(celiac disease)으로 또한 알려짐]을 포함하지만 이로 제한되지 않는 소장에 대한 손상을 포함하는 질병의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다. 본 발명은, 바이러스성, 세균성, 균류(fungal) 또는 그 밖의 미생물 감염(microbial infection)과 같은 병원성 감염 때문에, 소장에 대한 손상을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다.
- [0077] 하나의 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 소장 용모 수축, 즉 용모 영역 및 브러시보더의 부분적인 또는 완전한 제거(partial or complete wasting away of the villous region and brush border), 뿐만 아니라 소장 용모 수축에서 발생하고, 관련되고, 및/또는 일으키는 질병 및 증상의 치료 또는 완화에 사용될 수 있다.
- [0078] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 병소의 용모 위축(focal villous atrophy) 및/또는 용모 위축의 확산; 과형성 용모 위축(hyperplastic villous atrophy) 및/또는 발육부전 용모 위축(hypoplastic villous atrophy); 및/또는 점막 염증(mucosal inflammation)과 함께 및 점막 염증 없는 용모 위축의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.
- [0079] 특정 실시형태에서, 본 발명은, 과형성 용모 위축[크립트 과형성(crypt hyperplasia)과 함께] 및 관련된 질환 및 만성 소화 장애증(coeliac disease)[글루텐 과민성 장질환(gluten-sensitive enteropathy)과 함께]; 만성 외상(chronic trauma); 소장 이식(small bowel transplantation); 비노기의 회장의 도관(urinary ileal

conduits); 장의 점막 염증; 장 궤양(intestinal ulcers); 장의 문합(intestinal anastomosis); 글루카고노마(glucagonoma); 광범위한 소장 절제술; 일차 회장 용모 위축(primary ileal villous atrophy); 미세한 대장염 위축(microscopic colitis atrophy); 장의 미세 용모의 위축(intestinal microvillous atrophy); 및 미토콘드리아 사이토파스(mitochondrial cytopathy)[미토콘드리아 호흡의 체인 아노말리(mitochondrial respiratory chain anomaly)]를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 증상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0080] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 과형성 용모 위축(hypoplastic villous atrophy)[크립트 과형성 없는(without crypt hyperplasia)] 및 관련된 질환 및 악성 종양(malignancy); 파네스 세포 결핍증(paneth cell deficiency); 뇌하수체 기능 저하증(hypopituitarism); 글루텐-유리 식단(gluten-free diet)에 반응이 없는 만성 소화 장애증(coeliac disease unresponsive to gluten-free diet); 열대성 스푸루우(tropical sprue); 방사선 관련 국소 빈혈(radiation-associated ischemia); 네오마이신(neomycin) 및 아자티오프린(azathioprin)에 의해 유도된 용모 위축증과 같은 약물-유도된 용모 위축증을 포함하지만 이로 제한되지 않는 증상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0081] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 점막 염증을 갖는 용모 위축 뿐만 아니라 관련된 질병 및 만성 소화 장애증; 심각한 영양의 과민증(severe alimentary intolerance); 선천성 크론 질병(congenital Crohn disease); 자가면역 장질환(autoimmune enteropathy); 전장염(enterocolitis); 및 면역 결핍 증후군(immunodeficiency syndromes)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 증상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0082] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 간염(hepatitis); 장암(intestinal cancer); 장의 림프종(intestinal lymphoma); 제1형 당뇨병; 알레르기(allergy); 호산구성 위장염(eosinophilic gastroenteritis); 바이러스성 위장염(viral gastroenteritis); 및 자가면역 장질환(autoimmune enteropathy)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 질병에 의해 야기되는 용모 위축의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0083] 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 마쉬 타입 3a 용모 위축증[100 장세포 당 > 40 상피내 림프구(> 40 intraepithelial lymphocytes per 100 enterocytes); 가벼운 용모 위축증(mild villous atrophy)], 마쉬 타입 3b 용모 위축증[100 장세포 당 > 40 상피내 림프구 : 뚜렷한 용모 위축증], 마쉬 타입 3c 용모 위축증[100 장세포 당 > 40 상피내 림프구; 용모 영역 부재 o 대부분 부재(villous region absent o almost absent)], [만성 소화 장애증 및 장의 용모 위축의 변형된 마쉬 분류에 기초로 함(based on modified Marsh classification of coeliac disease and intestinal villous atrophy)]을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 소장에서의 만성 소화 장애증과 관련된 용모 위축증의 치료 또는 개선에 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명은, 흡수 불량(malabsorption), 설사, 구역, 구토, 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 흡수 불량 및 탈수증(dehydration)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 소장에 대한 손상과 관련된 증후군을 치료하거나 또는 개선하는데 또한 사용될 수 있다.

[0085] 소장 기능을 개선하기 위한 치료 조성물의 제조

[0086] 또 다른 양상에서, 본 발명의 치료 조성물을 제조하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 상기 방법은, 소장 상피 세포의 손상, 또는 손실을 갖는 피검자의 장의 건강을 촉진하기 위한 조성물을 제조하는 것을 포함하고, 상기 조성물은, 하나 또는 그 이상의 성분의 유효량을 포함하거나, 기본적으로 이루어지거나, 또는 이루어지고, 상기 성분은, 소장 상피 세포의 손실 또는 손상을 갖는 피검자의 소장에 의해 흡수되고, 상기 조성물은 230 mosm 내지 280 mosm(바람직하게 약 250 mosm 내지 260 mosm)의 전체 삼투성을 갖고, 상기 조성물은 약 7.1 내지 7.9, 또는 이들 사이의 어떠한 수치(바람직하게 약 7.4)의 pH를 갖고, 상기 조성물은 장의 투여를 위해 제형화된다.

[0087] 하나의 실시형태에서, 상기 성분은, 유리 아미노산, 디펩티드, 단당류(monosaccharides), 이당류(disaccharides) 또는 이들의 조합, 및 임의적으로 전해질, 비타민, 착향료 및/또는 담체로부터 선택된 것이다.

[0088] 하나의 실시형태에서, 본 발명은, 용모 및 크립트 영역에서의 소장 상피 세포의 파괴 후에, 흡수 능력을 유지하거나 또는 획득하는, 영양소 또는 전해질을 선택함으로써, 본 치료 조성물 내로 포함하기 위한 영양소 또는 전해질을 선별하기 위한 방법을 제공한다.

[0089] 상기 선별하는 방법(the subject screening methods)은, 소장 상피 세포의 손실, 파괴 또는 감소, 특히, 용모 세포, 장세포 및/또는 장의 전구 세포의 손실, 파괴 또는 감소와 관련된 질병 또는 증상의 치료 또는 개선에 사용될 수 있는 치료 영양분 및/또는 전해질을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 특정한 환자 또는 환자의 그룹의 필요를 충족하기 위한 조성물 및 방법을 설계하는데 사용될 수 있다. 특정

한 실시형태에서, 본 조성물은, 방사선, 화학요법(chemo)-, 양성자 치료(proton therapy) 후의 소장 손상, 또는 소장에서의 급성 또는 만성 염증으로 인한, 치료 또는 개선에 사용된다.

- [0090] 하나의 실시형태에서, 상기 선별 방법은 하기를 포함한다:
- [0091] a) 후보 영양소(candidate nutrient) 또는 전해질로 점막에서의 손상을 갖는 소장 상피 조직을 접촉하고;
- [0092] b) 상기 영양소 또는 전해질을 흡수하기 위한 소장 상피 조직의 능력의 레벨을 측정하고;
- [0093] c) 상기 레벨과 미리 결정된 레벨(정상의 조직에서와 같이)을 비교하고; 및
- [0094] d) 후보 영양소 또는 전해질의 흡수 능력이, 예를 들어 미리결정된 레벨의 적어도 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 또는 90 %이라면, 상기 후보 영양소 또는 전해질을 선택한다.
- [0095] 하나의 실시형태에서, 상기 선별 방법은 하기를 포함한다:
- [0096] a) 상기 소장의 점막에 대한 손상으로 피검자에게 후보 영양소 또는 전해질을, 장의 경로를 통해 투여되고;
- [0097] b) 상기 영양소 또는 전해질의 장의 흡수 능력의 레벨을 측정하고;
- [0098] c) 상기 레벨과 미리 결정된 레벨(정상의 피검자와 같은)을 비교하고; 및
- [0099] d) 후보 영양소 또는 전해질의 흡수 레벨이, 예를 들어 미리결정된 레벨의 적어도 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 또는 90 %이라면, 상기 후부 영양소 또는 전해질을 선택한다.
- [0100] 흡수 능력의 레벨은 예를 들어  $K_m$ ,  $V_{max}$ , 및  $I_{sc}$  를 포함하는 지표의 조합을 기초로 측정될 수 있다.
- [0101] 미리 결정된 기준값(predetermined reference value)이 본 분야의 숙련된 사람에게 의해 설정될 수 있다. 예를 들어, 미리 결정된 기준값은, 점막[융모 세포, 크립트 세포(crypt cells), 장세포 및 장의 전구세포(intestinal progenitor cells)와 같은]에 대한 손상을 갖지 않는, 정상의 소장 상피 조직에서의 상기 영양소 또는 전해질의 흡수 능력의 레벨을 측정함으로써 설정될 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 미리 결정된 기준값은, 소장 상피 세포[융모의 세포, 크립트 세포, 장세포 및 장의 전구세포(intestinal progenitor cells)와 같은]의 손상을 갖지 않는 정상의 인구(population)에서의 상기 영양소 또는 전해질의 장의 흡수 능력의 레벨을 측정함으로써 설정될 수 있다.
- [0102] 또 다른 실시형태에서, 상기 선별 방법은 하기를 포함한다:
- [0103] a) 점막에서의 손상을 갖는 소장 조직의 기능을 측정하고;
- [0104] b) 소장 조직과 후보 영양소 또는 전해질을 접촉하고;
- [0105] c) 소장 조직이 후보 영양소 또는 전해질과 접촉한 후에, 소장 조직의 기능을 측정하고; 및
- [0106] d) 만약 상기 후부 영양소 또는 전해질이 소장 기능을 개선한다면, 후보 영양소 또는 전해질을 선택한다.
- [0107] 또 다른 실시형태에서, 상기 선별 방법은 하기를 포함한다:
- [0108] a) 소장 점막에 대한 손상을 갖는 피검자의 소장 기능을 측정하고;
- [0109] b) 피검자에 대한 후보 영양소 또는 전해질을, 장의 경로를 통해 투여하고;
- [0110] c) 상기 후보 영양소가 투여된 후에 상기 피검자의 소장 기능을 측정하고; 및
- [0111] d) 만약 상기 후보 영양소 또는 전해질이 소장 기능을 개선한다면, 상기 후부 영양소 또는 전해질을 선택한다.
- [0112] 특정한 실시형태에서, 만약 상기 후보 영양소 또는 전해질의 투여가 세포 주위의 투과성(paracellular permeability)을 감소시키고, 소장 장벽 기능(small intestine barrier function)을 증진시킨다면, 소장 기능은 개선된다. 또한, 만약 상기 후보 영양소 또는 전해질의 장의 투여가 설사를 예방 또는 치료하고, 및/또는 생존을 연장한다면, 소장 기능은 개선된다.
- [0113] 특정 실시형태에서, 소장 점막에 대한 손상을 갖는 피검자의 소장 기능을 개선하는 영양소 및 전해질은, 실시예, 명확하게 실시예 15 내지 17에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 선택될 수 있다.
- [0114] 적절한 후보 전해질은, 예를 들어  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  및/또는  $Zn^{2+}$  을 포함한다.

- [0115] 적절한 후보 영양소는, 예를 들어, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 히스티딘, 티로신, 셀레노시스테인(selenocysteine), 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산염(aspartate), 시스테인, 글리신, 프롤린, 세린, 아스파라긴 및 피롤리신(pyrrrolisine)으로부터 선택된 필수적인 및 비-필수적인 아미노산을 포함한다. 적절한 후보 영양소는, 지방산, 당류(예를 들어, 단당류, 이-당류 및 올리고당), 전해질 및 비타민을 또한 포함할 수도 있다.
- [0116] 후보 영양소는, 예를 들어, 오르니틴, 시트룰린(citrulline), 히드록시프롤린(hydroxyproline), 호모세린(homoserine), 페닐글리신(phenylglycine), 타우린(taurine), 요오드티로신(iodotyrosine), 2,4-디아미노부티르산(diaminobutyric acid),  $\alpha$ -아미노 이소부티르산(amino isobutyric acid), 4-아미노 부티르산, 2-아미노 부티르산,  $\gamma$ -아미노 부티르산,  $\epsilon$ -아미노 헥사노익산( $\epsilon$ -amino hexanoic acid), 6-아미노 헥사노익산, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산(3-amino propionic acid), 노르류신(norleucine), 노르발린, 사르코신(sarcosin), 호모시트룰린(homocitrulline), 시스테산(cysteic acid),  $\tau$ -부틸글리신,  $\tau$ -부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, 및  $\beta$ -알라닌과 같은 비-천연적인 아미노산을 또한 포함할 수도 있다.
- [0117] 추가적인 실시형태에서, 영양소 및 전해질의 선택은 또한, 적어도 부분적으로 피검자에 의해 받은 IR 투여량(dosages), 방사선 근원(radiation sources), 조사될 몸의 일부(body part being irradiated), 및/또는 조사 후의 지난 시간; 화학 치료제(chemotherapeutic agent)의 타입, 투여량, 및/또는 화학치료 후의 지난 시간; 및 피검자가 받은 양성자 치료의 투여량, 및/또는 양성자 치료 후의 지난 시간에 따라 다르다.
- [0118] 상기 피검자 선별 검정(subject screening assays)은, 유성 챔버 연구(Ussing chamber studies), 세포진 검사(cytology), 면역조직화학(immunohistochemistry), 웨스턴 블롯(Western blot), 효소-결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR), 이온 흐름 실험(ion flux experiment), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역형광 염색법(immunofluorescence), 방사면역측정법(radioimmunoassay) 및 면역세포화학을 포함하지만 이로 제한되지 않는, 본 분야에서 잘 알려진 기술의 조합을 사용하여 실행될 수 있다.
- [0119] 명확하게, 상기 성분은, 이러한 성분을 위한 소장의 흡수 능력을 측정하기 위해, 유성 챔버와 같은 기술을 사용하여, *제자리(in-situ)* 또는 분리된 장 준비(isolated bowel preparations)에 의해 측정된 바와 같이, 상기 환자의 소장 점막에 의해 흡수될 수 있는 이들의 능력을 기초로 선택될 수 있다.
- [0120] 제형(Formulations) 및 투여
- [0121] 본 발명은, 본 발명의 조성물, 및 임의적으로 약제학적으로 수용가능한 담체의 치료학적 유효량을 포함하는 치료 또는 약제학적 조성물에 대해 제공한다. 이러한 약제학적 담체가 물과 같은 멸균의 액체일 수 있다. 치료학적 조성물은, 특히 용모 영역 및 브러시보더에서의 손상된 소장 상피의 건강 또는 기능에 영향을 미치지 않는, 부형제(excipients), 아쥘반트(adjuvants), 착향료 등을 또한 포함할 수 있다. 실시형태에서, 상기 치료 조성물 및 본원에 포함된 모든 성분은 멸균상태이다.
- [0122] 용어 "담체(carrier)"는 상기 화합물과 함께 투여될, 희석제, 아쥘반트, 부형제 또는 비히클(vehicle)을 나타낸다. 적절한 약제학적 담체의 예는, "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin에 기재되어 있다. 이러한 조성물은, 환자에게 적절한 투여를 위한 형태로 제공되도록, 적절한 양의 담체와 함께 치료학적 유효량의 치료 조성물을 포함한다. 상기 제형은 투여의 장의 방식(enteral mode)에 적절하여야 한다.
- [0123] 본 발명은, 하나 또는 그 이상의 성분, 예를 들어 화합물, 담체 또는 본 발명의 약제학적 조성물로 채워진 하나 또는 그 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩(pharmaceutical pack) 또는 키트(kit)를 또한 제공한다.
- [0124] 하나의 실시형태에서, 상기 약제학적 팩 또는 키트는, 예를 들어, 유효한 약제학적 투여량에 관하여 투여, 및/또는 예를 들어 방사선, 화학요법(chemotherapy), 또는 양성자 치료에 대한 노출로부터 경과 시간(elapse time)에 관하여, 투여의 시간을 위한 설명(instruction)를 더 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 조성물의 치료학적 투여량은, 소장 점막에 대한 손상의 정도를 기초로 결정된다. 예를 들어, 피검자가 방사선을 받거나 또는 막 방사선을 받은 것에 관해서, 상기 조성물의 치료학적 투여량은, 방사선 근원(radiation sources), 조사될 몸의 일부(body part being irradiated), 및/또는 조사 후의 지난 시간을 기초로 결정된다. 피검자가 화학요법(chemotherapy)을 받거나 또는 화학요법을 막 받은 것에 관해서, 상기 조성물의 치료학적 투여량은, 화학치료제(chemotherapeutic agents)의 타입, 화학치료제의 투여량(dosage) 및/또는 화학치료 후에 지난 시간(the time that has elapsed after chemotherapy)을 기초로 결정된다. 피검자가 양성자치료를 받거나 또는 양성자치료를 막 받은 것에 관해서, 상기 조성물의 치료학적 투여량은, 피검자에 의해 받은 양성자 치료의 투여량, 및

/또는 양성자 치료 후의 지난 시간을 기초로 결정된다.

- [0125] 물질 및 방법(MATERIALS AND METHODS)
- [0126] 실험 동물(*Experimental animals*)
- [0127] 활성  $\text{HCO}_3^-$  분비를 연구하기 위해, 8주 된, 조사하지 않는(non-irradiated) 및 조사된, 수컷 BALB/c 마우스를 국립 암 연구소(National Cancer Institute)로부터 획득하였다. 마우스를 임의적으로 그룹으로 나누고, 1.84 Gy/min으로  $\gamma$ -조사를 전달하는  $^{137}\text{Cs}$  근원을 사용하여, Shepherd Mark-I과 함께 위장의 급성 방사선 증후군(gastrointestinal acute radiation syndrome, GI ARS) 모델에 따라 복부를 조사하였다. 방사선은 단일 분획(single fraction)으로서 제공된다. 상기 GI ARS 모델은 장의 조직에 최대한의 방사선 손상이 달성되고, 골반 또는 복부 종양의 방사선 치료 동안에 장의 손상처럼 보인다.
- [0128] 방사선 후의 시간의 작용로서, 및 방사선의 증가된 투여량 둘 다와 함께, 단락 전류(short circuit current)( $I_{sc}$ )에서의 변화는,  $I_{sc}$ 에서의 현저한 변화를 생산하는데 필요로 하는 가장 빠른 시간 및 최소한의 방사선 투여량을 측정하기 위해 조사된다. 이러한 연구는 University of Rochester Animal Care 및 Use Committee에 의해 승인되었다.
- [0129] 이온 흐름 연구(*Ion flux studies*)
- [0130] 채혈(exsanguinations) 후에, 빈 창자 단편(jejunal segment)이 맹장에 인접한 말단의 12 cm의 소장을 제외함으로써 획득된다. 이러한 단편을, 점막이 밑에 있는 근육 층(the underlying muscular layers)으로부터 벗겨지기 전에, 얼음-냉각 링거 용액(ice-cold Ringer's solution)에 세척하고, 찢어낸다(Zhang, Ameen *et al.* 2007). 상기 점막은,  $0.30 \text{ cm}^2$ 의 영역을 갖는 유성-타입 루시트 챔버(Ussing-type Lucite chamber)의 2 개의 절반(halve)사이에 고정시키고(P2304, Physiologic instruments, San Diego, CA 92128 USA), 전기의 파라미터는 전압/전류 클램프 디바이스(voltage / current clamp device)를 사용하여 기록하였다(VCC MC-8, Physiologic instruments, San Diego, CA 92128 USA) (Vidyasagar *et al.* 2005; Vidyasagar *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007; Vidyasagar and Ramakrishna 2002). 장의 제조(Intestinal preparations)는, 8 mM의 글루타민을 포함하는 일반적인 링거 용액(regular Ringer's solution)(표 1)에 양 방향으로 담그고, 95 % 산소( $\text{O}_2$ ) 및 5 % 이산화탄소( $\text{CO}_2$ )의 혼합물로 가스를 공급한다.

[0131] [표 1]

용액의 조성(Compositions)

이온성 조성	표준의 링거	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 유리(free)	Na <sup>+</sup> 유리 용액	Cl <sup>-</sup> -유리 용액	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 유리 (UB)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> & Cl <sup>-</sup> 유리 (UB)
Na <sup>+</sup>	140	140	-	140	140	140
Cl <sup>-</sup>	119.8	119.8	119.8	-	119.8	-
K <sup>+</sup>	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25	-	25	25	-	-
HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2.4	2.4	2.4	2.4	-	-
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-
Ca <sup>2+</sup>	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Mg <sup>2+</sup>	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-	-	-	1.2	2.4	2.4
글루콘산염 (Gluconate)	-	-	-	-	-	-
시클아미드 (Cyclamide)	-	-	-	1.2	0.4	5.2
이세티오네이트 (Isethionate)	-	25	-	115	25	140
NMDG	-	-	140	-	-	-
HEPES	-	-	-	-	0.1	0.1

참고: 수치는 mM이다. 이온성 용액은 이온-치환 실험(ion-substitution experiments)에 사용된다. 모든 용액의 pH는 7.4이다. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 Cl<sup>-</sup>-유리 용액(Cl<sup>-</sup>-free solution)에서 pH 7.4 로 조절하는데 사용되고, 그 밖의 모든 것은 HCl이 사용된다.

[0132] 약어: UB, 완충되지 않는 용액(unbuffered solution)

[0133] HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이동(movement)의 측정

[0134] Bi-뷰렛 TIM 856(Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne, France)이, 벗겨진 빈창자 시트(stripped jejunal sheets)에서 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비를 측정하는데 사용된다(Vidyasagar *et al.* 2005; Vidyasagar *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007). 자동화된 펌프는 0.025 M 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)의 0.01 μl의 첨가를 통해 루미날 용액(luminal solution)에 대한 일정한 pH 를 유지한다. 표준(Standard)-to-stat pH 눈금은, 선형 적정 곡선(linear titration curve)을 생산하도록, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 증가시킨 농도를 포함하는, 약하게 완충시킨 용액(a weak buffering solution)에 알려진 양의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 을 첨가함으로써 확립된다.

[0135] 빈창자 조직은 배스 사이드(bath side)[장막 사이드(serosal side)]에서 완충된 용액에 노출시키면서, 루미날 사이드(luminal side)는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 유리, 낮게-완충된 용액(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free, low-buffered solution)[0.1-mM HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산) 완충용액, pH 7.4]에 노출시킨다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비는, 7.4에서 pH (또는 stat pH)를 유지하도록, 루미날 용액에 첨가된 산의 양과 동등하다. 모든 실험은 전압-클램프 조건(voltage-clamp condition) 하에서 실행된다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-유리 용액은 100% O<sub>2</sub> 으로 가스를 공급하고, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-포함하는 용액은 95 % O<sub>2</sub> 및 5 % CO<sub>2</sub> 으로 가스를 공급한다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비는 μeq · h<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>으로서 표현된다(Vidyasagar *et al.* 2005; Vidyasagar *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007).

[0136] 조직이 고정된 후에(After the tissue was mounted), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비는, 배스 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 부재에 초기에 존재하지만(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

secretions were initially present in the absence of bath  $\text{HCO}_3^-$ ), 20 내지 30 분 내에 0 으로 빠르게 떨어진 다. 만약 배스  $\text{HCO}_3^-$ 는 적정(titration) 동안에 존재하지 않지만,  $\text{HCO}_3^-$  분비는 0 에 가깝게 남아있다. 배스 용액에서  $\text{HCO}_3^-$ 의 존재는, 적어도 2 시간 동안 일정하게 유지되는,  $\text{HCO}_3^-$  분비에서 빠른 증가를 야기한다 (Vidyasagar *et al.* 2005; Vidyasagar *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007). 저해제(inhibitor)가 점막의 용액 에 첨가된 경우, pH 가 조절되고,  $\text{HCO}_3^-$  분비의 정상 속도(steady rate)가 관찰될 때까지, 30 분 동안 균형을 유지한다(equilibrated). 저해제가 배스 사이드(bath side)에 첨가된 경우, 상기 조직은  $\text{HCO}_3^-$  분비의 정상 속 도를 달성하기 위해 30 분 동안 또한 균형을 유지한다(표 3을 참고).

[0137] 모든 실험은 초기의 1-시간 정상 속도 기간(initial 1-hour steady-state period) 동안에 실행된다. 각각의 동 물로부터의 1 조직은, 각각의 실험에 사용되고; 단지 1 실험 조건이 각각의 조직 샘플과 함께 연구되었다. 모 든 실험은 적어도 4 번 동안 반복된다.

[0138] *면역조직화학(Immunohistochemistry)*

[0139] 조사되지 않은 마우스 및 조사된 마우스 둘 다로부터 냉동된 조직 슬라이스(Frozen tissue slices)는 항-NBCe1-A/B 항체를 사용하여 면역형광으로 염색된 것이다(Bevensee, Schmitt *et al.* 2000). NBCe1-A/B는 둘 다 탄산 수소나트륨 공동 수송(sodium bicarbonate cotransporters) 둘 다(NBCe1-A and NBCe1-B)에 공통된 카르복시 말 단에 대해 형성된 다중클론항체(polyclonal antibody)이다. 면역염색 절차는 조사 후 6일에(on day 6 post-irradiation) 실시된다. 분리된 조직은, 얼음-냉동 표준의 링거 용액(ice-cold regular Ringer's solution)으 로 세척하고, 냉동-부분이 끼워진 배지(frozen-section embedding medium)에 깨워지고, 액체 질소에 두고; 6-mm 절편이 크라이오스테트(cryostat)에서 제조된다.

[0140] *웨스턴 블롯 연구(Western blot studies)*

[0141] 빈창자 용해물(Jejunal lysates)은 조사되지 않는 마우스 및 조사된 마우스의 점막 스크레이핑(mucosal scrapings)으로부터 제조된다. 조직은 NKCC1(Santa Cruz CA, USA), NBCe1-A/B (Mark Daniel Parker, Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, OH), 및 웨스턴 블롯에 의한 단백질 발현(Bevensee *et al.* 2000) 낭포성 섬유증 막관통 전도도 조절자(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)(Santa Cruz CA, USA)에 대해 분석하였다.

[0142] 점막 스크레이핑은, pH 7.4 에서 [10-mM 요오드아세트아미드, 1-mM 페닐메틸술폰닐 플루오라이드, 및  $2-\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  류펩틴(leupeptin)]과 함께 프로테아제 저해제 혼합물(protease inhibitor mixture)을 포함하는 25-mM HEPES; 10 % 글리세롤; 및 1 % Triton X-100[폴리에틸렌 글리콜 p-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 에테르]을 포함하는 트리아실글리세롤 가수분해 효소 완충용액에 용해시켰다(다른 방식으로 나타내지 않았다면, 모든 화합물은 Sigma-Aldrich Co.로부터 입수하였다). 단백질 농도는 브래드포드 검정(Bradford assay)을 사용하여 측정하였 다. 조사된 샘플 및 조사되지 않는 샘플로부터의 단백질의 동가 하중(Equivalent load)이 도데실황산나트륨-폴 리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 사용 하여 분석하였다. NKCC1, NBCe1-A/B, 및 CFTR 단백질을, 친화성-정제된 다중클론항체(affinity-purified polyclonal antibodies)을 사용하여 측정하였다.

[0143] *통계(Statistics)*

[0144] 결과를 평균의 평균  $\pm$  표준 오차(standard error)로서 나타낸다. 통계 분석은 2 단계에서 실행된다: 1) 전체 적인 차이가 변화량의 분석(analysis of variance, ANOVA)을 사용하여 테스트되고[또는 이의 비-매개변수의 동 등한 크러스칼-왈리스(its non-parametric equivalent Kruskal-Wallis)]; 및 2) 본페로니-조정된 P값은 모든 쌍 방식 비교(pair-wise comparisons)로 계산된다.

[0145] *실시예*

[0146] 하기는 본 발명의 실행을 위한 방법을 설명하는 예이다. 이러한 예는, 한정으로서 이해되지 않아야 한다. 다 른 방식으로 나타내지 않는 한, 모든 백분율은 중량에 의한 것이고, 모든 용매 혼합물 비율은 부피에 의한 것이 다(All percentages are by weight and all solvent mixture proportions are by volume).

- [0147] 실시예 1 - 조사는 순 음이온 분비를 증가시킨다(Irradiation increases net anion secretion).
- [0148] 이러한 실시예는 조사가 순 음이온 분비(net anion secretion)를 증가시킴으로써 나타내고, 크립트 세포와 비교하여 용모 상피 세포의 보다 큰 손실을 야기한다. 명확하게, 소장 상피 조직은, 12 Gy 조사를 받은 마우스로부터 획득하고, 음이온 분비는 유성 챔버 연구(Ussing chamber studies)를 사용하여 조사된다. 경상피(Trans epithelial)  $I_{sc}$ , 음이온 분비의 지표가 1, 2, 3 및 4 일에 측정되었다.
- [0149] 도 1A 에 나타낸 바와 같이, 경상피  $I_{sc}$ 에서의 최대한의 증가는, IR 노출되지 않는 조직 및 조사 후 IR-노출된 조직 24 및 72 hrs와 비교한 바와 같이, 조사 후 48 hr에서 관찰되었다(도 1A). 48 hrs의 말단에  $I_{sc}$  에서의 이러한 현저한 증가는, 흡수(absorption) 및 분비(secretion) 사이의 적절한 균형(fine balance)을 방해함을 나타낸다. 비교하여, 48 hrs와 72 hrs의 말단에서 기록된  $I_{sc}$  는 비-IR 마우스 조직(non-IR mice tissues)의  $I_{sc}$  보다 낮았다.
- [0150] 조직병리학적 절편(Histopathology sections)은 조사 때문에 크립트 세포(crypt cells)와 비교한 바와 같이 용모의 상피 세포의 보다 큰 손실을 또한 나타낸다. 48 hrs 전에 채취한 조직병리학적 절편은 최소 용모 손상(minimal villous damage) 및 크립트 세포가 거의 없거나 없는 손상을 나타낸 반면에, 3 일 및 4 일에 채취한 조직병리학적 절편은 크립트 및 용모 세포에서 광범위한 손상을 나타내었다. 특히, 용모 세포는 3 일 후에 거의 완전하게 감소되었다. 크립트 세포의 손실은, IR 후 72 및 96 hr에서 분비성 자극(secretory stimulus)에 대응하여 음이온 분비를 자극에 대한 실패의 증거로서, 또한 관찰되었다(도 1A). IR의 높은 투여량에서, 용모 상피 세포를 형성하기 위해 성숙되고 분화된, 불충분한 크립트 줄기 세포(insufficient crypt stem cells)가 있다.
- [0151] 도 1B 는, 조사가 경상피 전도도(trans epithelial conductance)를 증가시킴을 나타낸다(도 1B). 경상피 전도도(S), 세포사이 및 세포주위 전도도의 합성(a composite of transcellular and paracellular conductance)이 유성 챔버 실험에 의해 측정된다.
- [0152] 옴의 법칙  $1/S = R$  을 기초로, 경상피 전도도에서의 증가는, 경상피 저항성(trans epithelial resistance)(TER 또는 R)에서의 감소를 나타낸다. 마우스의 소장은 낮은-상피 저항성(low-epithelial resistance)을 갖는다. 세포주위 경로(paracellular route)의 전기 저항성은, 경상피 저항성<sup>65-67</sup> (transcellular resistance)보다 보다 더 낮다. 세포주위 경로(paracellular route) 및 세포주위 경로(transcellular route)는  $1/TER = (1/R_{transcellular}) + (1/R_{paracellular})$ 에 의해 나타낸 바와 같은 병렬적이다; 따라서, 측정된 TER은 세포주위 저항성을 주로 반영한다.
- [0153] 실시예 2 - 조사는 단락 전류(Short Circuit Current)( $I_{sc}$ )에서 투여량-의존적인 증가(dose-dependent increase)를 야기한다.
- [0154] 본 실시예는, 증가된 전기발생된 음이온 분비(increased electrogenic anion secretion)를 나타내는, 조사가 단락 전류에서 투여량-의존적인 증가를 야기한다. 간단하게, 0, 1, 3, 5, 7, 9 또는 12 Gy 조사를 받은 마우스를 4 일에 희생시켰다. 도 2 는, 0 및 1 Gy에서 조사된 것과 비교한, 3, 5 & 7 Gy에서의 조사된 마우스 조직에서의  $I_{sc}$  에서의 현저한 증가를 나타낸다( $*p < 0.001$ ). 3, 5 및 7 Gy에서 조사된 마우스와 비교하여, 감소된  $I_{sc}$  가 9 & 12 Gy에서 조사된 마우스 조직에서 관찰되었다( $**p < 0.01$ , 도 2). 1 및 3 Gy 사이에서의 조사는,  $I_{sc}$ 에서의 가장 높은 증가를 야기하고, 최소한의 조직병리학적 변화를 야기한다.
- [0155] 게다가, 조사는 시간 동안  $I_{sc}$ 에서의 변화를 야기한다. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일에 희생된 마우스 중,  $I_{sc}$ 에서의 가장 높은 증가는 IR 후의 5 일 및 6일에 관찰되었다(도 3A). 시간의 작용(function of time)으로서,  $I_{sc}$ 에서의 최대한의 증가를 측정하기 위해, 마우스는 3 Gy로 조사하고, 전기적 파라미터를 기록하기 위해 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 및 14 일에 희생시켰다. 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis)( $P < 0.001$ ). 사후 분석(Post-hoc)은 조사 후 6 일에서의  $I_{sc}$ 에서 최대의 증가를 나타내었다.
- [0156] 도 3A 에 나타낸 바와 같이, 조사 후 1일 및 2일에 기록된  $I_{sc}$  는 작은 통계적인 차이를 나타낸다. 그러나, 조사

후 시간 > 2 일에 기록된  $I_{sc}$  는, 0 일과 비교한 경우 상이한 차이를 나타내었다(  $*P < 0.01$  ). 4, 5, 6 및 7 일에 기록된  $I_{sc}$  중에, 보다 적은 차이가 관찰되었다. 조사후 9 일 및 10 일에 기록된  $I_{sc}$  는 또한, 조사 후 7 일에 기록된 것과 현저하게 상이하지 않았다(  $**P = NS$  ).  $I_{sc}$  는 6 일 후 현저한 감소를 나타낼지라도, 이는 3 Gy에서의 IR을 받은 마우스에서 조사 후 14 일 및 2 년에서의 상승된 레벨에 머무르는 것이 지속되었다(  $4.8 \pm 0.5 \mu eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$  ). 도 3A 는,  $I_{sc}$  에서의 최대한의 증가가 3 Gy에 조사된 마우스에서의 6 일에 발생됨을 나타낸다.

[0157] 조사 후  $I_{sc}$ 에서의 관찰된 증가는, 주로 전기발생 음이온 분비(electrogenic anion secretion)에서의 순 증가(net increase)로 인한다.  $I_{sc}$  증가를 위한 세 가지 가능한 매커니즘이 있다: 1) 증가된 전기발생 음이온 분비(increased electrogenic anion secretion)(예를 들어,  $Cl^-$  및/또는  $HCO_3^-$ ); 2) 증가된 전기발생  $Na^+$  흡수; 또는 3) 증가된 전기 발생  $K^+$  흡수. 조사가, 마우스 소장에서의 전기발생  $Na^+$  흡수 과정을 야기하는 것 같지 않다. 게다가, 조사가  $K^+$  흡수가 아닌  $K^+$  손실을 야기하는, 설사를 일으키는 바와 같이,  $I_{sc}$  에서의 증가가 증가된  $K^+$  흡수 때문이지 않을 수 있다(as irradiation causes diarrhea, which results in  $K^+$  loss and not  $K^+$  absorption, the increase in  $I_{sc}$  cannot be due to increased  $K^+$  absorption).

[0158] 실시예 3 -  $Na^+$  및  $Cl^-$  흡수에서의 감소

[0159] 본 실시예는, 조사가  $Na^+$  및  $Cl^-$  흡수를 감소시킴을 나타낸다. 표 2에 나타난 바와 같이,  $^{22}Na$ -치환(substitution)을 사용한 유싱 챔버 흐름 연구는, 장막의 흐름에 대한 점막( $J_{ms}$ )이 점막의 흐름에 대한 장막( $J_{sm}$ )을 능가함에 따라, 비-IR(0 Gy) 마우스에서의  $Na^+$ 의 순 흡수가 있음을 나타낸다(표 2)[Ussing chamber flux studies using  $^{22}Na$ -substitution revealed that there is a net absorption of  $Na^+$  in non-IR mice, as the mucosal to serosal flux ( $J_{ms}$ ) outperforms serosa to mucosa flux ( $J_{sm}$ )]. 조사는 투여량-의존적인 방식으로  $J_{ms}$  을 감소시키고, 감소된 순  $Na^+$  흡수를 야기한다( $J_{net}Na$ ).  $J_{sm}$  는, 순 분비를 발생하는 투여량 7 Gy 및 9 Gy에서  $J_{ms}$ 를 더 초과하였다. 게다가, 마우스 대변 샘플은, 전해질의 감소된 흡수 및 증가된 분비를 추가적으로 입증하는, 높은 투여량 조사에서 단단하지 않거나(loose) 또는 불완전하게 형성되었다(poorly formed). 유사하게, 순  $Cl^-$  흡수(net  $Cl^-$  absorption)가 증가된 IR 투여량으로서 또한 감소된다. 순  $Cl^-$  분비는 9 Gy에서 관찰되었다.  $Cl^-$  흡수에서의 감소는  $J_{ms}Cl^-$  에서의 감소때문이다.

[0160] [표 2]

**$Na^+$  및  $Cl^-$ 의 단일방향 및 순 흐름(Unidirectional and net flux)( $J_{net}=J_{ms}-J_{sm}$ )**

Na 흐름 (Flux)	IR			Cl 흐름	IR		
	Gy	$J_{ms}$	$J_{sm}$		Gy	$J_{ms}$	$J_{sm}$
0	16.4 ± 0.9	7.1 ± 0.8	9.8 ± 0.8	0	17.3 ± 1.1	7.1 ± 0.6	10.2 ± 0.8
1	15.6 ± 1	7.1 ± 1.1	8.6 ± 0.9	1	12.8 ± 0.9	7.6 ± 1.3	5.2 ± 0.9
3	6.8 ± 0.7	3.5 ± 0.3	2.6 ± 0.5	3	16.8 ± 0.7	9.3 ± 0.8	7.5 ± 0.8
5	5.2 ± 0.6	4.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2	5	14.2 ± 1.2	10.3 ± 0.9	3.9 ± 0.7
7	4.8 ± 0.4	5.4 ± 0.4	-0.6 ± 0.3	7	7.1 ± 0.5	6.9 ± 0.3	0.3 ± 0.2
9	4.3 ± 0.7	4.7 ± 0.6	-0.4 ± 0.2	9	-9.2 ± 0.8	0.1 ± 0.1	-9.3 ± 0.9

[0161]

[0162] 실시예 4 - 조사는 증가된 세포주위 투과성(increased paracellular permeability)을 야기한다.

- [0163] 본 실시예는, 손상된 소장 장벽 기능을 유도하는, 소장 이장 점막(small intestine lining mucosa)의 손실을 야기함을 나타낸다. 이는 증가된 소장 투과성이 조직 구획(systemic compartment)에 장내 공생하는 박테리아, 펩티드 및 독소의 쉬운 접근을 제공하여, 이로 인하여 내독소혈증(endotoxemia)을 일으킨다. 도 4A 에 나타낸 바와 같이, 조사는 타키플루스 아메보사이트 용해물 키트(tachypleus amebocyte lysate kit)에 의해 측정된 바와 같은 플라즈마 엔도독신 레벨(plasma endotoxin levels)을 증가시킨다.
- [0164] 유성 챔버 연구에서 측정된 회석 포텐셜의 변화에 의해 나타낸 바와 같이, 조사는  $\text{Cl}^-$  &  $\text{Na}^+$  (PCl/PNa) 투과성을 또한 증가시킨다. 막 투과성의 지표로서 회석 포텐셜의 사용은, 원칙 이하(the below principles)를 기초로 한다. 명확하게, 소장 점막과 같은 온전한 반투과막(intact semi-permeable membrane)이, 상이한 이온 강도와 함께 점막 및 장막 사이드 용액(mucosal and serosal side solutions)을 배성함으로써 인공적으로 생성된 전기 화학 포텐셜 기울기(electrochemical potential gradient)를 유지한다. 그러나, 막을 가로질러 쉬운 확산을 가능하게 하는 구멍난 막(leaky membrane)은 감소된 전기 화학 포텐셜을 갖는다. 따라서, 막을 가로지르는 투과성이 보다 높을수록, 전위 기울기가 보다 낮다(the higher the permeability across the membrane, the lower the potential gradient is). 자유로운 투과성 막은 선택성의 완전한 손실을 나타내는, 1 에서  $\text{Cl}^-$  및  $\text{Na}^+$  (PCl/PNa)의 상대적인 투과성을 갖는다.
- [0165] 비-IR 마우스에서, 막 선택성(membrane selectivity)을 보존하고,  $\text{Na}^+$ 는 막을 가로질러  $\text{Cl}^-$  보다 더 투과성이 있다. 조사는 막 회석 포텐셜(membrane dilution potential)을 감소시킨다. 특히,  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$ 는, 선택성의 현저한 손실을 나타내는, 7 Gy에서의 막을 가로질러 동일하게 투과될 수 있다(도 4B). 조사로 인한 전해질 투과성에서의 증가는, 도 4A 에 나타낸 플라즈마 엔도독신 레벨에서의 증가와 일치한다. 막 투과성에서의 모니터링 변화(Monitoring changes)가 본 경구 조사 식단(the subject oral radiation diet)에 의해 점막의 장벽 기능(mucosal barrier function)에서의 개선을 모니터링하기 위해, 민감한 도구(sensitive tool)로서 사용될 수 있다.
- [0166] 실시예 5 - 조사 때문에 염증성 매개자(inflammatory mediators)의 레벨에서의 증가
- [0167] IR-노출된 및 비-IR 노출된 마우스에서의 염증성 매개자의 레벨을, LUMINEX 멀티플렉스 비드 어레이 기술(LUMINEX multiplex bead array techniques)을 사용하여 측정하였다. 도 5 에 나타낸 바와 같이, 조사는 IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 MIP- $\alpha$ 의 생산을 증가시킨다(도 5).
- [0168] 실시예 6 - 조사로 인하여 음이온 분비에서 감소는 NKCC1-의존적인 및 CFTR-의존적이다.
- [0169] 본 실시예는, 조사 하의 음이온 분비가 NKCC1-의존적이고, CFTR-의존적임을 나타낸다. 기초  $I_{sc}$  에 대한 NKCC1의 제공을 측정하기 위해, 100  $\mu\text{M}$  부메타니드(Sigma-Aldrich Co., USA)가 배스 용액(bath solution)에 첨가된다. 도 3C 는, 조사된 조직(irradiated tissues)( $5.5 \pm 0.5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )에서 부메타니드-저해할 수 있는 흐름(bumetanide-inhibitable current)을 나타내지만, 0 Gy 마우스( $1.6 \pm 0.2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )에서는 없는 부메타니드-저해할 수 있는 흐름을 나타낸 것이다(Figure 3C showed a bumetanide-inhibitable current in irradiated tissues, but not in 0-Gy mice). 게다가, cAMP-자극(cAMP-stimulation)은, 0-Gy( $1.6 \pm 0.2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $6.9 \pm 0.6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ,  $P < 0.001$ ) 및 3-Gy( $5.5 \pm 0.5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $7.3 \pm 0.5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ,  $P < 0.05$ ) 둘 다에서 증가를 일으킨다.
- [0170] 게다가, 포스콜린(Sigma-Aldrich Co., USA)-자극된  $I_{sc}$  가, 3 Gy( $7.3 \pm 0.5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.4 \pm 0.1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )에서의 부메타니드(bumetanide)에 의해 감소되고, 0 Gy( $6.9 \pm 0.6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )에서는 아니다(forskolin-stimulated  $I_{sc}$  was abated by bumetanide in 3 Gy, but not in 0 Gy). 이는, 조사 없이 보다 큰 NKCC1-독립적인 음이온 분비를 나타낸다( $P < 0.05$ ).
- [0171] 결과는, 조사 하의 음이온 분비가 CFTR-의존적임을 또한 나타낸 것이다.  $I_{sc}$  의 부메타니드-무감각한 부분(bumetanide-insensitive portion)이 애피컬 막 음이온 채널(apical membrane anion channel)을 통해 발생하는지를 측정하기 위해, 비-특이적인 음이온 채널 차단제(non-specific anion channel blocker), 5-니트로-2-(3-페닐프로필아미노)-벤조산(Sigma-Aldrich Co., USA)(10  $\mu\text{M}$  NPPB), 및 특정한 낭포성 섬유증 막관통 전도도

조절자(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 차단제(blocker)[100 μM 글리벤클라마이드(glibenclamide), Sigma-Aldrich Co., USA]가 적용된다. 0-Gy 마우스에서 부메타니드-무감각한  $I_{sc}$  가, 비-특정 음이온 채널 저해제(non-specific anion channel blocker)(NPPB)( $0.1 \pm 0.01 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 및 글리벤클라마이드( $0.1 \pm 0.01 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )의 점막 첨가에 의해 파괴된다. 이는, 음이온 분비가 음이온 채널 또는 CFTR을 통해 발생됨을 나타낸다(도 3B).

[0172]

실시예 7 - 조사로 인한  $\text{HCO}_3^-$  분비에서의 감소

[0173]

콜레라와 같은, 전염성 설사는, 대변에서의  $\text{HCO}_3^-$ -풍부한 유동체( $\text{HCO}_3^-$ -rich fluid)의 손실을 야기하고, 대사성 산증(metabolic acidosis)을 유도한다. 이러한 실시예는, 전염성 설사와 대조적으로, IR 은, 증가된  $\text{Cl}^-$  분비 및 감소된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 유도함을, 나타낸다.

[0174]

순 음이온 분비에 대한  $\text{Cl}^-$  제공을 결정하기 위해, 세포[Na-K-2Cl 공수송 차단제(cotransport blocker)] 내로  $\text{Cl}^-$  흡수를 위한 차단제가 사용된다. 10 μM 부메타니드의 첨가는, IR-유도된 음이온 분비가 주로 증가된  $\text{Cl}^-$  분비로 인하고, 이러한 증가는 NKCC1-의존적임을 제시하는, IR과 관련된  $I_{sc}$ 의 대부분의 모두를 파괴한다(도 3A 내지 C).

[0175]

pH stat 실험(pH stat experiments)은, IR이  $\text{HCO}_3^-$  분비를 감소시킴을 확인하였다(표 3). 장막 배성 용액(serosal bathing solution)에서  $\text{Na}^+$ 가 불투과성 양이온 NMDG으로 대체된 경우, 기저외측막에서의 세포 내로  $\text{HCO}_3^-$  수송이 배스  $\text{Na}^+$  의존적임을 나타내는,  $\text{HCO}_3^-$  분비가 파괴된다( $\text{HCO}_3^-$  secretion was abolished). 유사한 실험은, IR 마우스 후의 6일에 5 Gy에서 반복된다. 배스  $\text{Na}^+$ 의 존재에서,  $\text{HCO}_3^-$  분비는 현저하게 낮다.

[0176]

비-IR 및 IR 마우스 둘 다로부터 수득한 냉동된 조직의 슬라이스의 면역형광 염색(Immunofluorescence staining)은, NBCe1a/b 항체를 사용하여 실시된다(도 6B-E). NBCe1a/b 항체-특이적인 염색은, NBCe1a/b가 용모의 상피 세포에서 표현되지만, 크립트 세포에서는 표현되지 않음을 나타낸다. IR 마우스로부터 조직의 면역염색(Immunostaining)은, NBCe1a/b 항체가 용모 또는 크립트에서 인식되지 않음을 나타내었다. 3 Gy로 조사된 마우스로부터의 조직은 용모 또는 크립트에서 NBCe1-A/B-특이적인 염색으로 표현하는데 실시하였다. IR의 높은 투여량에서의 감소된  $\text{HCO}_3^-$  분비 작용은, 용모 상피 세포의 손실 때문이다.  $\text{Na}^+$  및  $\text{HCO}_3^-$  분비에서의 변화를 모니터링하는 것은, 본 경우 방사선 식단(subject oral radiation diet)에 의해 점막 장벽 기능의 개선을 모니터링하기 위해 민감한 도구(sensitive tool)가 될 수 있다.

[0177]

조사 하에  $\text{HCO}_3^-$  분비는 NKCC1-독립적이다.

[0178]

$\text{HCO}_3^-$ 이 음이온 분비에 기여하는지를(if  $\text{HCO}_3^-$  contributed to anion secretion) 측정하기 위해, 실험은 배스  $\text{Cl}^-$ 의 부재에서 실시된다. 조사 또는 포스콜린-자극에 대한 이차적인  $I_{sc}$ 에서의 증가는,  $\text{HCO}_3^-$ 에 의해 제공될 것으로 고려된다. 조사에서  $\text{HCO}_3^-$  분비가 배스  $\text{Cl}^-$ -의존적이지 않음을 결과는 나타낸다; 따라서, 조사에서  $\text{HCO}_3^-$  분비는 애피컬 막(apical membrane)에서  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환 수송체( $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange transporter)(AE1)를 포함하지 않는다.  $\text{Cl}^-$ -유리 용액에서, 기초(basal)( $1.0 \pm 0.2 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  vs  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $P = \text{ns}$ ) 및 포스콜린-자극된( $1.7 \pm 0.2 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $P < 0.001$ )  $I_{sc}$ 는 3-Gy 조사된 마우스에서 보다 낮다(Fig. 3D). 포스콜린-자극된  $I_{sc}$ 는, 조사로 인하여  $\text{HCO}_3^-$  분비에서의 감소를 나타내는, 3 Gy에서 보다 0 Gy에서 보다 높다( $P < 0.001$ ).

[0179]

만약 기초(basal) 및 포스콜린-자극된 조건 하에서의 NKCC1가  $\text{HCO}_3^-$  움직임을 매개하는지를 확인하기 위해, 부메

타니드를, 둘 다의 사이드(both sides)에서  $\text{Cl}^-$ -유리 용액에서 균형이 유지된 조직의 배스 사이드에 첨가하였다. 결과는, 부메타니드가  $I_{sc}$  에서의 기초 및 포스콜린-자극된 증가를 저해하지 않음을 나타낸다; 저해의 이러한 결핍(lack)은, 기저외측 막에서  $\text{HCO}_3^-$  흡수를 위한 NKCC1-독립된 매커니즘을 나타낸다.

[0180] 조사 하의  $\text{HCO}_3^-$  분비가 루멘  $\text{Cl}^-$ -독립적이다.

[0181] 조사된 마우스에서  $\text{HCO}_3^-$  분비의 직접적인 측정, 조사되지 않는 마우스(non-irradiated mice)와 비교된 감소된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 나타낸다( $0.8 \pm 0.2 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  vs.  $6.7 \pm 0.2 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). 조사된 마우스에서  $\text{HCO}_3^-$  분비는, 루멘  $\text{Cl}^-$ 의 제거에 의해 바뀌지 않았다(표 3). DIDS가 아닌, NPPB ( $0.2 \pm 0.01 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 및 글리벤클라마이드(glibenclamide)( $0.11 \pm 0.1 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )의 첨가 조사된 마우스에서  $\text{HCO}_3^-$  분비를 끝낸다(The mucosal addition of NPPB and glibenclamide, but not DIDS, ended  $\text{HCO}_3^-$  secretion in irradiated mice). 이는,  $\text{HCO}_3^-$  분비가,  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환을 통하지 않고, 음이온 채널(CFTR 채널)에 의해 매개되지 않음을 나타낸다(Fig. 19B).

[0182] 비교하여, 비-조사된 마우스에서의  $\text{HCO}_3^-$  분비는, 둘 다 루멘  $\text{Cl}^-$ -의존적인 및  $\text{Cl}^-$ -독립적(lumen  $\text{Cl}^-$ -dependent and  $\text{Cl}^-$ -independent)이다. 경상피 전기 측정(Transepithelial electrical measurements)은 전기발생적  $\text{HCO}_3^-$  분비를 나타내고; 그러나 이는  $\text{HCO}_3^-$  분비가 채널-매개되고 및/또는 전기적 중성의  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환을 통하는지 (whether  $\text{HCO}_3^-$  secretion was channel-mediated and/or via electroneutral  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange)를 나타내지 않는다.

[0183] pH-stat 실험은, 조사되지 않는 마우스에서  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환을 연구하기 위해 루멘  $\text{Cl}^-$ 의 부재에서 실행된다. 루멘  $\text{Cl}^-$ -유리 용액에서,  $\text{HCO}_3^-$  분비는 보다 낮다( $4.5 \pm 0.1 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $P < 0.01$ ). 조사되지 않는 마우스에서 기초  $\text{HCO}_3^-$  분비(basal  $\text{HCO}_3^-$  secretion)는 부분적으로 루멘  $\text{Cl}^-$ -의존적이고 및 부분적으로  $\text{Cl}^-$ -독립적임을 나타낸다(표 3).  $100 \mu\text{M}$  4,4-다이소티오시아노-2,2'-스틸벤 디술포산(4,4-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid)(DIDS)(Sigma-Aldrich Co., USA)의 첨가는, 부분적으로  $\text{HCO}_3^-$  분비를 저해하고( $P < 0.001$ ), 이러한 저해는 루멘  $\text{Cl}^-$  제거와 함께 관찰되는 것과 유사하다.

[0184] 포스콜린은 루멘  $\text{Cl}^-$ -독립적인  $\text{HCO}_3^-$  분비를 자극한다.

[0185] 0-Gy 마우스에 대해, 배스 용액에 포스콜린의 첨가는, 루멘  $\text{Cl}^-$  제거에 의해 변하지 않는, 기초  $\text{HCO}_3^-$  분비( $P < 0.001$ )에서의 현저한 증가를 나타낸다( $8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  vs.  $8.7 \pm 0.4 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n = 6$ ). NPPB는 포스콜린-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 파괴한다(abolished)( $0.2 \pm 0.01 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n = 6$ ); 이는 cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비에서의 음이온 채널에 대한 역할을 나타낸다.

[0186] cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비는 NKCC1-독립적이다.

[0187] 만약 cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비가 에피컬 CFPR 채널(apical CFTR channel)을 필요로 하는지를 측정하기 위해, 글리벤클라마이드(glibenclamide)가 루미날 사이드(luminal side)에 첨가하였다. 글리벤클라마이드가, cAMP 가순  $\text{HCO}_3^-$ 의 분비의 기저(basal)  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환 성분을 저해할 뿐만 아니라, 또한 음이온 채널-매개된  $\text{HCO}_3^-$  분비

를 유도하는 것을 나타내는,  $\text{HCO}_3^-$  분비를 저해한다( $0.1 \pm 0.1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )(표 3 및 Fig. 19A). 조사된 마우스에서 포스콜린 자극은, 기저(basal)  $\text{HCO}_3^-$  분비와 비교하여 적은 증가를 나타낸다( $0.6 \pm 0.2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.78 \pm 0.2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ). 이는, 루멘  $\text{Cl}^-$ -독립적인  $\text{HCO}_3^-$  분비 또는  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환의 저해를 또한 나타낸다.

[0188] 정상피 전기적 측정은,  $\text{HCO}_3^-$  움직임에서의 감소가 또한 NKCC1-독립적임을 나타낸다. 기초 및 포스콜린-자극된 조건 하의 조사된 마우스에서의 최소한의  $\text{HCO}_3^-$  분비는, 부메타니드(forskolin)의 첨가에 의해 영향을 받지 않는다(표 3). 유사하게, 조사되지 않은 마우스에서, 부메타니드가, cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비가 NKCC1-독립적임을 나타내는, 포스콜린-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 바꾸지 않는다( $8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $8.6 \pm 0.4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )(표 3 및 Fig. 3B).

[0189]  $\text{HCO}_3^-$  분비는 배스  $\text{Cl}^-$ -독립적이다.

[0190] 기저외측  $\text{HCO}_3^-$  흡수(basolateral  $\text{HCO}_3^-$  uptake)에 대한 배스  $\text{Cl}^-$ 를 필요로 하는 수송 과정을 도 3B 에 나타내었다. 결과는, 부메타니드가 cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 변화시키지 않음을 나타낸다. 이는,  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환(AE2) 수송자가 조사 하에서 저해됨을 나타낸다. 배스  $\text{Cl}^-$ 의 제거는, NKCC1 및 AE2-연결된  $\text{HCO}_3^-$  흡수를 또한 저해할 수 있다(표 3). 배스 용액으로부터  $\text{Cl}^-$ 의 제거는,  $\text{HCO}_3^-$  분비를 바꾸지 않는다( $6.7 \pm 0.3 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $7.1 \pm 0.6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ).

[0191]  $\text{HCO}_3^-$  분비는 배스  $\text{Na}^+$ -의존적이다.

[0192]  $\text{Na}^+$ -결합된, 기저외측,  $\text{HCO}_3^-$  입장을 위한 수송 과정(Transport processes for the  $\text{Na}^+$ -coupled, basolateral,  $\text{HCO}_3^-$  entry)은 도 3B에 나타내었다. 도 3C 및 3D는, NKCC1가  $\text{HCO}_3^-$  분비에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 상기 배스 사이트에 1 mM 3-메틸술폰닐-4-피페리디노벤조일(piperidinobenzoyl), 구아니딘 히드로클로라이드(guanidine hydrochloride) (HOE694)의 첨가는,  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환에 결합된 NHE1를 통해  $\text{HCO}_3^-$  흡수가 제거된다(Addition of 1mM 3-methylsulphonyl-4-piperidinobenzoyl, guanidine hydrochloride (HOE694) to the bath side eliminated  $\text{HCO}_3^-$  uptake via NHE1 coupled to  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange). Counillon, Scholz *et al.* (1993)는, 1 mM 3-메틸술폰닐-4-피페리디노벤조일, 구아니딘 히드로클로라이드(HOE694)가  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  교환을 저해함에 대해 또한 기재되어 있다.

[0193] HOE694는 cAMP-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 저해하지 않는다( $8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $7.2 \pm 0.9 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ). 배스  $\text{Na}^+$ 를 N-메틸-D-글루카민(NMDG)로 교체하는 것은,  $\text{Na}^+$ -결합된  $\text{HCO}_3^-$  공동수송을 나타내는, 조사되지 않는 마우스에서 포스콜린-자극된  $\text{HCO}_3^-$  분비를 파괴한다( $8.4 \pm 0.4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$  vs.  $0.3 \pm 0.01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ )(Fig. 3E).

[0194] [표 3]

조사되지 않는(0 Gy) 및 조사된(3 Gy) 마우스의 빈창자에서 측정된 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비

루멘 용액 (Lumen solution)	Cl <sup>-</sup> 포함하는	Cl <sup>-</sup> -유리(free)	100 μM DIDS	100 μM
				글리벤클라마이드 (glibenclamide)
0 Gy	6.7 ± 0.3	4.5 ± 0.1 <sup>†</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>†</sup>	0.5 ± 0.1
3 Gy	0.8 ± 0.2 <sup>*</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>*ns</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>*ns</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>ns</sup>
0 Gy + 포스콜린(forskolin)	8.4 ± 0.4	8.7 ± 0.4	-	0.1 ± 0.1
3 Gy + 포스콜린	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	-	-
0 Gy + 부메타니드 (bumetanide)	8.6 ± 0.4	8.4 ± 0.4	7.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1
3 Gy + 부메타니드	0.8 ± 0.14 <sup>*</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>ns</sup>	0.7 ± 0.12 <sup>ns</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>ns</sup>

참고: 수치는 평균±SEM, n=6 조직을 나타낸다. \*p < 0.001, 0 Gy 및 3 Gy 그룹 사이의 비교.

<sup>†</sup> p < 0.001 존재하는 그룹 사이의 비교. 조사되지 않는 마우스에서의 부메타니드 실험에서, 상기 조직은 10 mM 포스콜린으로 처리된다.

약어 : ns, 그룹 사이의 의미 없음(no significance between the groups);

4,4-디이소티오시아노-2,2'-스틸벤 디술폰산(4,4-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid), DIDS

[0195]

[0196]

에피컬 막(apical membrane)에서의 활성의 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비에 대해, 이의 기저외측 흡수에 대한 필요가 있다. 4 가지 알려진 교환 매커니즘은, 기저외측 막(basolateral membrane)에서 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 움직임을 직접적으로 또는 간접적으로 포함한다: 1) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 가능한 수송으로서, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 공동-수송 (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 2) NKCC1을 통해 세포 내로 흡수된 Cl<sup>-</sup>가, 기저외측막에서 순 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 흡수(net HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake)를 야기하는, 기저외측 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 교환(AE2)을 통해 재활용된다; 3) 감소된 세포사이의 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 농도를 야기하는, 세포사이의 공간(intercellular space) 내로 양성자를 내보내는 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 교환, 그리고 난 다음에 에피컬 전자중성의 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 교환을 자극한다(Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange extruding protons into intercellular space, resulting in decreased intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration, which then stimulates apical electroneutral Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange); 및 4) Na<sup>+</sup> 결합된 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 공동수송. 이러한 공동수송은, Na<sup>+</sup>의 분자 당 수송된 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분자의 수에 따라, 전기중성(electroneutral) 또는 전기발생(electrogenic)으로서 작용할 수도 있다(도 3B).

[0197]

조사되지 않는 마우스에서, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 흡수는, 기저외측 표면에 위치한 Na<sup>+</sup>-결합된 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 공동수송체(Na<sup>+</sup>-coupled HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter)(NBCe1-A/B)을 통해 발생된다. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 교환과 결합되고 CFTR을 통해[전기발생 음이온 분비(electrogenic anion secretion)] 전기중성의 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 교환을 통해 에피컬 출구(Apical exit)가 발생된다. 포스콜린의 첨가에 의해 성취된, 세포사이의 cAMP에서의 증가는, 동시에 전기중성의 Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup> 흡수의 저해와 함께 증가된 Cl<sup>-</sup> 및 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비를 야기한다[Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 교환 결합된 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 교환(Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange coupled to Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange)]. Cl<sup>-</sup> 흡수는 NKCC1을 통해 발생되고, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 흡수는 NBCe1-A/B을 통해 발생되고; Cl<sup>-</sup> 및 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 둘 다는 에피컬 표면(apical surface)에서 CFTR을 통해 나간다(exit).

- [0198] 본 발명에 따라, 조사는 전기중성의  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$  흡수를 저해하는 것으로 발견되고 있다. 조사는 NBCe1-A/B을 또한 저해하고, 이러한 저해는 기저외측막에서  $\text{HCO}_3^-$  흡수의 감소를 야기하고, 최종적으로 애피컬 막에서 나간다. 따라서, 조사는 전기중성 및 전기발생의  $\text{HCO}_3^-$  분비 둘 다의 선택적인 저해와 함께 전기발생의  $\text{Cl}^-$  분비를 야기한다(Fig. 19B).
- [0199] 조사는 소장 상피 조직에서 증가된 NKCC-1 단백질 발현을 일으키고, NBCe1-A/B 발현을 감소시킨다. 조사는, 애피컬  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환 수송(apical  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange transporter)(AE1)을 또한 저해한다. 방사선 설사(radiation diarrhea)에서  $\text{HCO}_3^-$  분비는  $\text{Na}^+$ -의존적이지만, 루멘  $\text{Cl}^-$  독립적이고, NKCC-1-독립적이다. 조사 하의  $\text{Cl}^-$  수송은,  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  교환 수송(AE1) 대신에 기저외측 NKCC-1 수송을 포함한다.
- [0200] 도 19B에 나타낸 바와 같이, 조사는 위장관(gastrointestinal tract)에서 전해질( $\text{HCO}_3^-$  및  $\text{Cl}^-$  와 같은) 수송을 또한 바꾼다. 조사된 마우스는 주로  $\text{Cl}^-$  분비 및 최소한의  $\text{HCO}_3^-$  분비를 나타낸다. 조사로 인한 최소한의  $\text{HCO}_3^-$  분비는,  $\text{HCO}_3^-$  흡수의 저해에 의해 야기하는 것으로 가정된다. 대조적으로, 분비촉진-유도된 설사(secretagogue-induced diarrhea)에서  $\text{HCO}_3^-$  분비 뿐만 아니라 유효한  $\text{Cl}^-$  이 있다.
- [0201] 실시예 8 - 조사는 감소된 글루코스 흡수를 야기한다.
- [0202] 본 실시예는, IR-유도된 장염에서, 글루코스 흡수에서의 투여량-의존적인 감소가 있음을 나타낸다. 게다가, 위장 루멘(gut lumen)에서의 흡수되지 않는 글루코스의 존재는, IR과 관련된 설사의 조건을 더 악화시키는 삼투성 설사(osmotic diarrhea)를 유도할 수 있다. 도 7A는, 조사가  $I_{sc}$  에서의 투여량-의존적인 감소를 일으킴을 나타낸 것이다. 도 7B는, 조사가 투여량-의존적인 방식에서 글루코스 수송에서의  $K_m$  을 증가시킴을 나타낸 것이다.
- [0203] SGLT1은 다용도의 수송체(versatile transporter)이다. SGLT1는 콜레라와 같은 전염성 설사에서의 이의 작용을 유지한다. 전염성 설사에서의 SGLT1 작용의 보존이  $\text{Na}^+$  흡수에 대한 경구 수분 보충 치료(oral rehydration therapy)에 사용된다.
- [0204] 조사 후의 글루코스 흡수에서의 SGLT-1 작용 및 이의 효과를 조사하기 위해, 스위스 마우스(Swiss mice)의 소장 점막을, 0, 1, 3, 5, 또는 7 Gy에서 IR 노출 후 6 일에 수득하였다. 글루코스-자극된 단락 전류(Glucose-stimulated short-circuit current)( $I_{sc}$ )는, SGLT1 수송 작용을 연구하기 위해 유성 챔버에서 측정되었다. 생존 연구는 9-Gy TBI 및 15.6-sub-TBI 마우스에서 실시된다.
- [0205] 명확하게, 미국 국립 보건원으로부터 수득된 8 주된 Balb/c 마우스는, 137Cs 서브-토탈 바디 조사(137Cs sub-total body irradiation, Sub-TBI)[하나의 다리가 조사로부터 보호된다] 및 전체-바디 조사(total-body irradiation)(TBI)하였다.
- [0206] 동물 생존 연구에서, 마우스를 2 그룹으로 나누었다: 9-Gy TBI 및 15.6-Gy Sub-TBI. 대조군 마우스는 일반적인 식염수로 처리하고; 그 밖의 마우스는 5% 글루코스로 처리하였다. 튜브식(Gavage)이 실험 동안에 사용되었고, 처리는 조사후 첫 번째 5 일에 주고, 조사 후 10 일 까지는 이틀에 한 번씩 주었다.
- [0207] 멀티채널 전압/전류 클립프(Multichannel Voltage/Current Clamp)(Physiological Instruments, San Diego, CA)가 유성 챔버 연구(Ussing chamber study)에 사용되었다. 판에 사용된 마우스 빈창자 부분을 변형된-보통의 링거 용액에 중탕시키고(bathed), 짧은  $I_{sc}$ 를 측정하기 위해 95% O<sub>2</sub> & 5% CO<sub>2</sub>로 가스를 공급하였다. 모든 마우스는 조사 후에 6 일에 희생되었다.
- [0208] SGLT-1 동력학(SGLT-1 kinetics)을 조사하기 위해, 상기 기질(글루코스) 농도는 0.05 mM에서 시작하고 10 mM에서 끝났다. 글루코스는 0.05 mM로부터의 출발 비율로 첨가되고, 0.1 mM, 0.5 mM 및 1 mM로 진행된다. 결과를 Origin 8 소프트웨어(OriginLab Corp., Northhampton, MA)로 분석하였다.  $I_{sc}$ 는 Y-축에 나타내고, X-축 내

에 나타낸다. 상기 곡선은 Hill 방정식(Hill's equation)으로 고정시켰다.

- [0209] 빈창자 전체-세포 용해물(Jejunal whole-cell lysates)을 제조하기 위해, 정상 및 조사된 마우스의 점막 스크레핑(mucosal scrapings)을, 25-mM HEPES, 10 % 글리세롤, 1% Triton X-100 및 프로테아제 저해 혼합물(protease inhibitor mixture)[10 mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide), 1 mM 페닐메틸술폰일 플루오라이드(phenylmethylsulphonyl fluoride), 및 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 류펩틴(leupeptin), pH 7.4]을 포함하는 트리아실글리세롤 히드롤라아제 완충용액(triacylglycerol hydrolase buffer)에 용해시켰다.
- [0210] 브러시-보더 막 소포 용해물을 제조하기 위해, 정상 및 조사된 마우스의 점막 스크레핑을 2-mM Tris-HCl(pH 7.1)/50-mM KCl/1M PMSF 용액에 균질화시켰다. 상기 샘플을 8000 RPM 에서 원심분리하고 또 다시 13,000 RPM 에서 원심분리한 다음에, 튜브쿨린 시린지(tuberculin syringe)(27G 바늘) 및 TEFLON 균질기로 또 다시 균질화시켰다. 상기 샘플을 4,000 RPM으로 원심분리하고 또 다시 15,000 RPM으로 원심분리하였다. 상기 샘플을, 보통의 링거 용액을 포함하는 프로테아제 저해 혼합물[10 mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide), 1 mM 페닐메틸술폰일 플루오라이드(phenylmethylsulphonyl fluoride), 및 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 류펩틴(leupeptin), pH 7.4]로 재현탁시켰다(resuspend).
- [0211] 빈창자 전체-세포 용해물 및 브러시보더 막 소포의 둘 다의 단백질 농도를 웨스턴 블롯에 의해 SGLT-1에 대해 분석하였다. 조사된 및 대조군 샘플로부터의 단백질의 동등한 로드(Equivalent loads)를, 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)(SDS-PAGE)에 의해 분석하였다. 단백질을 폴리비닐리덴 플로라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF) 내로 이동시키고, SGLT-1 단백질은 친화성-정제된 폴리클로날 항체를 사용하여 측정되었다.
- [0212] 도 8 내지 14에 나타낸 바와 같은 결과는, 하기를 나타낸다: 1) 조사는, 투여량-의존적인 방식으로 글루코스-자극된  $I_{sc}$  을 감소시키고; 2) 글루코스에 대한  $K_m$  수치는, 0, 1, 3, 5, 및 7 Gy에서 각각 (mM)  $0.38 \pm 0.04$ ,  $0.49 \pm 0.06$ ,  $1.76 \pm 0.16$ ,  $1.91 \pm 0.3$ ,  $2.32 \pm 0.4$  이고; 3) 글루코스에 대한  $V_{max}$  값은 0, 1, 3, 5, 및 7 Gy에서 각각  $387.4 \pm 16.2$ ,  $306.6 \pm 16.4$ ,  $273.2 \pm 14.9$ ,  $212.9 \pm 9.14$ ,  $188.1 \pm 9.12$ 이고; 4)  $K_m$  및  $V_{max}$  값은 IR 후의 대략 14 일에 정상의 레벨로 돌아오고; 5) 조사 후 첫 번째 10일 동안 글루코스 섭취의 저해(withholding glucose intake)는 생존을 증가시키고; 6) SGLT-1 브러시-보더 막의 웨스턴 블롯 분석은 IR 투여가 증가됨에 따라 증가된 SGLT-1 단백질 레벨을 나타낸다.
- [0213] SGLT-1  $K_m$  에서의 증가는, 조사로 인하여 글루코스에 대한 SGLT-1 친화성의 감소를 나타낸다.  $V_{max}$  에서의 감소는, 조직병리학적 조사에 의해 또한 입증된 바와 같이, 조사로 인한 용모 상피 세포의 손실을 나타낸다. IR로 처리된 마우스 조직에서의 단백질 레벨에서의 증가는, 웨스턴 블롯 분석에 나타낸 바와 같이, SGLT1 수송은 발현되지만 기능적이지 않음(SGLT1 transporters are expressed but non-functional)을 나타낸다.
- [0214] 결과는, 삼투성 설사를 유도하고, 따라서 IR-유도된 GI 독성(IR-induced GI toxicity)을 증가시키는, 경구의 글루코스 흡수가 글루코스 및 전해질의 흡수불량을 야기함을 또한 나타낸다. 대조적으로, IR 후의 첫 번째 14일 동안 경구 흡수로부터 글루코스 저해는 설사의 증후군을 예방하거나 또는 완화시키고, 전체적인 생존을 증가시킨다.
- [0215] 실시예 9 - 조사는 감소된 글루타민 수송을 야기한다.
- [0216] 글루타민은 비-필수 아미노산일지라도, 이는 장세포의 1차 영양소(primary nutrient)이고, 골격근(skeletal muscle)(75 %)에서 높은 농도로 존재한다. 글루타민 레벨은, 수술-후(post-operative), 트라우마(trauma) 또는 글루타민에 대한 증가에 대한 몸의 요구로서 중요한 환자에서 감소된다(Glutamine levels decrease in post-operative, trauma, or critical patients as the body's demand for glutamine increases). 따라서, 글루타민은, 소화, 신장, 면역 및 뉴런 시스템(neuronal systems)의 정상적인 기능에 중요한 것으로 간주되고 있다.
- [0217] 본 실시예는, 조사가 세포 내로의 글루타민 수송에서의 투여량-의존적인 감소를 야기함을 나타내는 것이다. IR  $\geq 7$  Gy에서, 글루타민은, 위 루멘(gut lumen)에서 크게 존재할 수 있고, 이로 인하여 삼투압성 설사를 유도한다. 글루타민 수송의 포화된 반응속도(Saturation kinetics)는, 글루타민에 대한 글루타민 수송체의 감소된 친화성을 나타내는  $K_m$  에서의 IR 투여량-의존적인 증가를 나타낸다(Fig. 15).
- [0218] 실시예 10 - 조사는 리신 수송(lysine transport)에서의 투여량-의존적인 증가를 야기한다.

- [0219] 소장 루멘 사이드에 리신의 첨가는, 리신의 전기발생적 수송을 제시하는,  $I_{sc}$  에서의 증가를 야기한다(Fig. 16). 조사하지 않는 마우스로부터의 조직은,  $1.16 \pm 0.04$  mM의  $K_m$  을 나타내는 반면에, 3 Gy IR 조직은  $0.27 \pm 0.01$  mM의  $K_m$  을 갖는다. 글루코스 및 글루타민과 달리, 결과는, 조사는 리신에 대한 리신-수송체 친화성을 증가시키고, 따라서 리신 흡수를 증가시킴을 나타내었다.
- [0220] 실시예 11 - 마우스의 생존에서의 경구 리신 섭취(oral lysine feeding )의 효과
- [0221] 본 실시예는, 경구 섭취로부터 비-흡수된 영양소가 저해되는 반면에, 선택적인 섭취 흡수된 영양소가 조사 후에 실사를 예방하거나 또는 완화하고 생존을 증가시킴을 나타낸 것이다.
- [0222] 실험의 첫 번째 시리즈에서, 글루코스[5 일 동안 10 mM i/m 및 그리고 난 다음에 격일로(every alternate day)]가 IR 마우스에 경구적으로 투여되었다. 결과는, 글루코스 투여가 전체적인 생존을 감소시킴을 나타낸다(Fig. 17B). 비교하여, 리신(20 mg/mice/day)은 위세척(gastric lavage)으로 5 일 동안 및 그 후에 격일로 IR 마우스에 경구적으로 투여된다. 리신과 함께 처리된 마우스는, 대조군과 비교한 경우 증가된 생존을 나타내었다(Fig. 17A). 따라서, 리신과 같은 흡수된 영양소의 증가된 경구 섭취와 함께, 글루코스와 같은 흡수되지 않는 영양소(non-absorbed nutrients)의 경구 섭취의 감소 또는 제한은, 조사된 환자에서의 생존을 지속시킬 수 있다.
- [0223] 실시예 12 - 조사로 인한 이온 수송 단백질 발현 레벨에서의 변화
- [0224] 본 실시예는, 조사로 인한 수송 단백질 발현 레벨에서의 변화를 나타낸 것이다. 명확하게, 조직은 조사 후 6 일에 웨스턴 블롯을 위해 채취하였다. 도 18에 나타낸 바와 같은 회장의 웨스턴 블롯은, 1-5 Gy로부터의 조사가 증가된 NKCC1 단백질 레벨을 결과적으로 나타내고; 반면에 조직에서의 이러한 증가는, 1-5 Gy IR을 받은 조직과 비교한 바와 같이, 7 Gy IR을 받은 조직에서 감소됨을 나타낸다(A).
- [0225] NBCe1-A/B 단백질 레벨은 1 Gy와 같은 낮은 투여량에서 조차도 조사 후에 현저하게 감소된다(B). 빈창자 조직에서의 CFTR 단백질 레벨은, 0 Gy 빈창자 조직과 비교한 바와 같이, 3 Gy 조사 후에 현저하게 증가된다(C). NBCe1-A/B 특정한 한체는, 조사되지 않는 마우스에서의 십이지장, 회장(ileum) 및 결장과 비교한 빈창자에서의 증가된 발현 레벨을 나타낸다(D). 빈창자 조직은, 십이지장, 회장 또는 결장에서 비교한 바와 같이, 가장 높은 NBCe1-A/B 단백질 레벨을 갖는다(D). 수송 단백질의 레벨에서의 변화는, IR 후에 관찰된 기능적인 변화에 부합한다. 조사하지 않는 IR 조직과 비교하여, 조사 후 수송 단백질의 발현 패턴은 경구 방사선 다이어트(oral radiation diet)의 효율성을 모니터하기 위해 사용될 수 있다.
- [0226] 실시예 13 - 소장 점막에 대한 손상을 갖는 마우스에서 영양소 및 전해질 흡수 능력에서의 변화
- [0227] 소장 흡수 능력에서의 변화의 유사한 패턴은, 소장에서의 염증으로 고통받고, 방사선, 화학요법(chemotherapy)으로 처리된 C57BL/6 마우스에서 관찰된다. 방사선 모델(radiation model)은 실시예 1 내지 12 에 기재된 바와 같이 구성된다.
- [0228] 화학요법 모델에서, 모든 마우스는 5-FU 또는 시스플라틴(cisplatin)의 단일 투여량을 주사한다. 몇몇 마우스에서 첫 번째 투여 후 3 일, 5-FU 또는 시스플라틴의 두 번째 투여를 주사한다. 각각의 주사 후에, 경장피  $I_{sc}$ (transepithelial  $I_{sc}$ ), 순 음이온 분비(net anion secretion)의 지표들, 도 20에 나타낸 바와 같은 시점에서 유성 챔버를 사용하여 측정하였다. 각각의 측정에 대해, 32 조직의 최소한이 검사되었다(examined).
- [0229] 결과는, 시스플라틴(Fig. 20B) 또는 5-FU(Fig. 20A)의 단일 투여량으로 주사된 마우스에서 3 일에 순 음이온 분비에서의 현저하게 증가되었음을 나타낸다. 또한, 화학 치료제의 두 번째 투여량으로 주입된 마우스는, 단일 투여량을 받은 마우스 보다, 순 음이온 분비에서 현저하게 보다 높이 증가됨을 나타낸다.
- [0230] 크론 질병 모델에서, 마우스는 항-CD3 mAb[크론 질병의 유사한 증상에 대한 급성 염증성 모델(acute inflammatory model to mimic conditions of Crohn's disease)]을 주사하였다. 소장의 순 음이온 분비[세포주위의 전도도(paracellular conductance)를 기초로 측정] 및 세포주위의 투과성에서 현저하게 또한 증가되었다. 또한, 영양소 및 전해질 흡수 능력에서의 변화가 관찰되었다.
- [0231] 영양소의 흡수 능력의 변화는, 소장 점막에 대한 손상을 갖는 질병 모델, 즉 방사선 모델, 화학요법 모델 및 크론 질병 모델을 사용하여 측정하였다. 명확하게, 후보 영양소는, 조사, 화학요법 및 항-CD3 mAb를 각각 받은 마우스 및 대조군 마우스에 경구적으로 투여되었다. 게다가, 후보 영양소의 다양한 조합을 포함하는 조성물은 경구적으로 투여되었다.

- [0232] 후보 영양소는, 리신, 히스티딘, 발린, 류신, 페닐알라닌, 시스테인, 티로신, 아르기닌, 이소류신, 트레오닌, 글리신, 알라닌, 메티오닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산 및 글루코스로부터 선택된 것이다.
- [0233] 각각의 영양소의 흡수 능력을 측정하기 위해, 생체 전기 측정(bioelectric measurement)은 유성 챔버를 사용하여 실행된다. 상기 측정은 다음을 포함한다: a) 나트륨 결합된-아미노산 전류(*I<sub>sc</sub>*) 및 전도도에서의 변화, b) 각각의 영양소의 투여 후의 각각의 영양소의 포화 동력학(saturation kinetics)에서의 변화 및 *I<sub>sc</sub>*에서의 변화; 및 c) 특정한 후보 영양소의 존재 및 부재에서의 동위원소 흐름 연구(isotope flux studies)를 사용한 전해질 흡수 연구. 결과는, 방사선 모델, 화학요법 모델 및 크론 질병 모델에서 조사된 모든 아미노산 및 글루코스에 대한 흡수 능력에서의 변화의 유사한 패턴에 있음을 나타낸다. 명확하게, 결과는, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴 및 세린으로부터 선택된 하기의 아미노산의 각각의 경구 투여는, 소장 치유를 개선하고, 세포주위의 전도도를 감소시키고[이로 인하여 소장 점막 장벽 매커니즘(small intestine mucosal barrier mechanism)을 개선시킴], 전해질의 흡수를 증가시키고, 및/또는 동물에서의 생존을 개선시킴을 나타낸다. 결과는, 글루코스 및/또는 글루타민의 경구 투여는 소장 점막 장벽을 손상시키고, 방사선 모델, 화학요법 모델 및 크론 질병 모델에서 마우스의 생존에 부정적인 효과를 가짐을 또한 나타낸다.
- [0234] 실시예 14 - 화학요법을 받은 마우스에서의 소장 기능의 개선
- [0235] 본 실시예는, 본 발명의 치료학적 조성물이 화학요법을 받은 마우스의 소장을 개선시킴을 나타낸다. 연구된 모든 화학요법 약물 중, 5-FU는 소장에 대한 최대한의 독성을 나타내었다. 따라서, 5-FU는 화학요법 모델에서 전해질 및 영양소 수송의 변화를 특징짓는데 사용된다.
- [0236] NIH 스위스 마우스는 5-FU로 주사되었다. 주사 후 5 일 또는 6일에, 마우스로부터 소장 조직을 분리하고, 링거 용액(Ringer solutions) 또는 본 발명의 치료 조성물(therapeutic composition)에 노출시켜 유성 챔버에서 연구되었다. 치료 조성물은, 리신, 글리신, 트레오닌, 발린, 티로신, 아스파르트산, 이소류신, 트립토판, 아스파라긴 및 세린; 물; 및 치료학적으로 수용가능한 담체, 전해질 및 완충제(buffering agents)를 포함한다. 치료 조성물은 약간 알칼리성이다(pH 7.4). 상기 치료 조성물은 글루코스, 글루타민 또는 메티오닌을 포함하지 않는다.
- [0237] 결과는, 치료 조성물이 5-FU를 받은 마우스의 소장 기능을 현저하게 개선시킴을 나타낸다. 명확하게, 상기 치료 조성물은, 5-FU 주사된 마우스의 소장에서 정상피 *I<sub>sc</sub>* (Fig. 21A) 및 정상피 전도도에서 병리학적 증가(pathological increase)를 현저하게 감소시켰다.
- [0238] 실시예 15 - 조사로 인한 GI 기능에서의 변화의 측정
- [0239] 주요한 GI 기능(major GI function)은, 영양소, 전해질 및 물의 흡수를 포함하고, 이러한 흡수는 잘-분화된(well-differentiated) 및 성숙한 용모의 상피 세포에서 발생된다. 80 %의 유동액 및 전해질 흡수는 소장에서 발생된다. 본원에서 설명된 바와 같이, IR 결과는, IR의 투여량에 따라 용모 및/또는 크립트의 선택적인 손실을 야기하고, 이로 인하여  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  및 영양소의 감소된 흡수를 야기한다. 본 실시예는, IR 시간 동안 다양한 투여량에 의해 발생된 GI 기능에서의 변화를 측정하기 위해 실험적인 계획에 대해 설명한다.
- [0240] 방법
- [0241] NCI로부터의 C57BL/6 마우스(8 주, 수컷)를 사용하였다. 물리적인 관찰, 세포학(cytology), 면역조직화학(immunohistochemistry), 웨스턴 분석, 플라즈마 대용 마커(plasma surrogate markers) 및 기능적인 연구가 IR-유도된 GI 독성(IR-induced GI toxicity)에 대한 특이적인 지표로서 측정된다. 마우스는 그룹으로 임의적으로 나누고, 복부는, 복부에 1.84 Gy/min 투여 비율(dose rate)로 IR을 전달하는 Cs 소스(Cs source)를 사용하여 Shepherd Mark-I로 조사되었다(irradiated). 마우스는 0, 1, 3, 5, 7 및 9 Gy로 IR을 받았다. 글루코스 및 아미노산 수송에서의 변화를, 각각의 그룹에서의 10 마리의 마우스에서 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 및 30 일에 실시하였다. 플라즈마 샘플은, 조직을 채취하기 전에 수집되었다. 회장(Ileum) 및 빈창자 조직(jejunum tissues)은, 조직병리학(histopathology), 웨스턴 블롯, 면역조직화학 및 유성 챔버 연구를 위해 채취되었다[분리된 평가를 받음(subjected to separate evaluation)]
- [0242] A) 전해질에서 기능적인 변화의 측정( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  &  $\text{HCO}_3^-$ )

[0243] 본 실시예는, IR 후의 전해질 흡수와 관련된 수송 단백질 기능에서의 변화를 측정하기 위해 실험적인 계획에 대해 설명한다. 그리고 난 다음에 전해질 수송 기능에서의 변화는, 플라즈마 마커, 세포학(cytology) 및 일일 활동, 몸무게, 대변 형성(stool formation) 및 대변 잠혈(fecal occult blood)과 같은 물리적인 관찰과 관련된다. 세포 검사는 크리프트 검정, H&E 염색(staining), BrdU 염색, 면역조직검사 및 웨스턴 블롯 검정을 사용하여 실시한다.

[0244] 첫째로,  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$ 의 경상피 흐름(transsepithelial flux)은, IR 후의 전해질 흡수를 평가하기 위해 유성 챔버에서 실시하였다. 마우스를 희생시키고, 조사하지 않는 마우스 및 다양한 투여량으로 IR 처리된 마우스에서의 기초 이온 수송(basal ion transport)에서의 변화를 실시하였다.  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$  흡수는 표준의 상피(regular epithelium)에서 전기적인 중성(electroneutral)이다.

[0245] 본 실시예에서, 동위원소( $^{22}\text{Na}$  및  $^{36}\text{Cl}$ ) 치환 연구를, 기초  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$  움직임(basal  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  movement)을 측정하기 위해 실시하였다. 간단하게,  $^{22}\text{Na}$  및  $^{36}\text{Cl}$ 을 점막 또는 장막 사이드(serosal side)에 첨가하였다. 0.5 ml 샘플을 매 20 분의 끝에 콜드 사이드(cold side)로부터 수집된다. 단일방향의 흐름을 표준 화학식을 사용하여 계산하고,  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ 로서 표현된다. 순 흐름(Net flux)( $J_{\text{Net}}$ )은, 조직 쌍(tissue pairs)을 가로질러  $J_{\text{ms}}$ 와  $J_{\text{sm}}$  사이의 차이점으로서 계산된다. 실험은 단락 조건(short-circuit conditions) 하에서 실행된다.

[0246] 게다가, pH stat 기술(pH stat techniques)은,  $\text{HCO}_3^-$  분비에서의 변화를 측정하는데 사용된다. 본원에 기재된 바와 같이, IR은 빈창자에서  $\text{HCO}_3^-$  분비를 감소시킨다.  $\text{HCO}_3^-$  분비는, gut<sup>72-74</sup>의 상부 세그먼트(upper segment)에서의 산성 염기성 균형(acid base balance) 및 산성 중화에 중요하다. 이러한 실험은,  $\text{HCO}_3^-$  분비의 가능한 메커니즘을 제시하고, 정상 마우스 및 조사된 마우스에서 1) 루멘  $\text{Cl}^-$ -의존적인  $\text{HCO}_3^-$  분비 및 2) 루멘  $\text{Cl}^-$ -독립적인  $\text{HCO}_3^-$  분비를 나타낸다. 중탄산염 분비(Bicarbonate secretion)는 하기에 나타낸 바와 같다:

[0247] 전체 중탄산염 분비 ( $\mu\text{eq}/\text{h}/\text{cm}^2$ ) = 
$$\frac{(D2-D1)\times 0.025\times 2\times 60}{1.13\times (t)}$$

[0248] 이 식에서, D2 및 D1 은, 두 시점 사이에 첨가된 전체 산 사이의 차이점을 나타낸 것이고, 0.025 는 첨가된 산의 노르말 농도(normality)를 나타낸 것이고, 2 는  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 의 원자가이고(2 the valency of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 60은 시간 당 최종적으로 발현된 분비에 대한 분 당의 시간을 나타낸 것이다. 1.13 은 유성 챔버에 사용된 조직의 표면적(surface area)을 나타낸 것이고, t 는 시간이다. pH stat 기술에 사용된 연구  $\text{HCO}_3^-$  는 경상피  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cl}^-$  흐름 측정을 보완할 수 있을 것이다.

[0249] 이온 흐름 실험, pH stat 연구 및 경-상피 전기적 측정은 조사되지 않는 마우스 및 조사된 마우스에서 수송 과정을 설명할 수 있다.

[0250] B) 조사(Irradiation)로 인한 영양소 흡수에서의 기능적인 변화의 측정

[0251] 영양소의 장의 흡수 불량은 IR 후의 영양상의 상태에 영향을 미친다. 본원에 설명된 바와 같이, 영양소의 선택적인 흡수는 IR 후에 발생된다. 소화관(gut)에서의 흡수되지 않는 영양소의 존재는, 조사에 의해 발생된 손상을 더 복잡하게 하는, 삼투압성 설사를 유도한다. 본 실시예는, IR 후의 장으로부터의 흡수된 영양소를 측정하기 위해 실험적인 계획을 설명한다.

[0252] 쉽게-흡수된 영양소는, 시간 동안 글루코스 흡수에서의 다양한 IR 투여량의 효과를 실행하기 위해 본 치료/식이요법 조성물(therapeutic/dietary composition) 내에 포함될 수 있다.

[0253] 명확하게, 글루코스 수송에서의 변화는 IR 후의 유성 챔버에서 측정되었다. 이들의 정상 기능[비-IR 레벨(non-IR levels)]으로 회복되기 위한 글루코스 수송 단백질에 요구된 시간을 또한 조사하였다. 공식화(formulation)(ORD)은, 경구 글루코스를 용인하기(tolerate) 위한 마우스의 능력에 따라 유도된다. 글루코스가 개선되기 시작할 때까지, 경구 지원하는 식이요법(oral supportive regimen)에 글루코스를 제공하지 않는다.

[0254] 게다가, IR 후의 아미노산 (a.a) 수송에서의 변화를 실시하였다. 전기적 아미노산 수송(Electrogenic amino acid transport)은, 아미노산이 수송된 경우 발생하는 순 전하 움직임(net charge movement)으로서 유성 챔버에서 측정될 수 있다. 전기적 중성의 a.a와 관련된 어떠한 전하 움직임이 없고, 따라서, 이러한 수송은 브러시 보더 막 소포 연구(brush border membrane vesicle studies, BBMV)에서 연구된다. 전기발생적 및 전기중성의 a.a(electrogenic and electroneutral a.a) 둘 다는 상이한 실험적인 방법 사이의 비교를 위해 BBMV에서 연구된다.

[0255] 명확하게, 아미노산 수송 시스템의 4 가지 주요한 타입은, 조사되지 않는 마우스 및 조사된 마우스로부터 브러시 보더 막 소포(brush-border membrane vesicles)(BBMV)에서 대표적인 아미노산 L-류신(중성의 아미노산), L-프롤린[IMINO 산(IMINO acid)], L-글루탐산(산성 아미노산) 및 L-시스테인[황산염 아미노산(sulfurate amino acid)]의 흡수를 테스트함으로써 연구된다.

[0256] IR로 인한 전기발생의 a.a 수송에서의 변화

[0257] 아미노산은, 이들의 수송 특성이 주로 전하(charge)에 기초하는 바와 같이, 중성(neutral), 양이온(cationic) 및 음이온(anionic)으로 대략 분류된다(표 4). 전기발생적 a.a 수송은  $B^{0/+}$  (중성 및 양성의 a.a) 또는  $X_{AG}^-$ 를 통해 발생할 수 있다. Na-결합된 및 Na-독립적인 a.a 수송은 루멘  $Na^+$ 의 존재 및 부재에서 실험에 의해 측정된다. 게다가, 전기중성의 a.a 수송은  $^{14}C$  표지된 아미노산을 사용하여 BBMV에서 연구된다.

[0258] [표 4]

소장의 브러시-보더 막에서의 아미노산 수송 시스템

수송 시스템	분자의 확인 (Molecular identity)	대체 확인 (Alternate identity)	기질	Na에 대한 의존성	그밖의 이온의 관여
$B^0$	$B^0AT1$	SLC6A19	중성의 a.a	Yes	No
$B^{0/+}$	$AT1B^{0/+}$	SLC6A14	중성의 a.a, 양이온의 a.a	Yes	Cl
$b^{0/+}$	$b^{0/+}AT$	SLC7A9	중성의 a.a, 양이온의 a.a 시스틴	No	No
	rBAT	SLC3A1	이 자체의 수송 능력 없음, 이는 $b^{0/+}AT$ 의 수송 기능의 동력학 파라미터(kinetic parameters)에 영향을 준다		
PAT	PAT1	SLC26A6	중성의 짧은 사슬 (Neutral short chain) a.a (글리신, 알라닌 및 프롤린)	No	$H^+$
$X_{AG}$	EAAT3	SLC1A1	음이온의 a.a (아스파르트산염, 글루타민산염)	Yes	$K^+, H^+$

[0259]

[0260] a.a 수송 및 웨스턴 블롯을 연구하기 위해 BBMV의 제조

[0261] BBMV를 마그네슘 침강방법<sup>75</sup>(magnesium precipitation method)를 사용하여 분리하였다. BBMV의 전체적인 단백질을 브래드퍼드 방법<sup>76</sup>(Bradford method)을 사용하여 측정하였다. 소포(Vesicle)를  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 또는 액체  $N_2$ 에 저장하였다.

[0262] BBMV에 의한 아미노산 흡수(Amino acid uptake)의 평가

[0263] BBMV에 의한 아미노산 흡수가 약간의 변형을 갖는 Hopfer *et al.*<sup>75</sup>에 의해 기재된 빠른 여과 기술을 사용하여  $25\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다. BBMV 현탁액(BBMV suspensions)( $5\text{ }\mu\text{l}$ )을,  $1\text{ mmol/l}$ 의 표지되지 않는 아미노산,  $25\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ 의 방사선 표지된 기질(radiolabeled substrate) L-[ $U\text{-}^{14}C$ ] 류신, L-[ $U\text{-}^{14}C$ ] 프롤린, L-[ $U\text{-}^{14}C$ ] 글루탐산, 또는 L-[ $^{35}S$ ]시스테인,  $100\text{ mmol/l}$  NaSCN 또는 KSCN,  $100\text{ mmol/l}$  만니톨,  $0.1\text{ mmol/l}$   $MgSO_4$  및  $10\text{ mmol/l}$  HEPES (pH 7.4)를 포함하는 배양 배지( $45\text{ }\mu\text{l}$ )에 첨가하였다. 아미노산의 흡수의 시간 코스(time courses)는,  $Na^+$  기울기(NaSCN을 포함하는 배지를 사용함)의 존재 및  $Na^+$  기울기(KSCN을 포함하는 배지)의 부재에서 측정되

었다. 특정한 시간 간격에서, 흡수 과정은, 150 mmol/l KSCN and 10 mmol/l Tris-HEPES (pH 7.4)을 포함하는 얼음-냉각 스톱 용액(ice-cold stop solution)의 5 ml를 첨가함으로써 중단된다. 상기 현탁액을, 3 ml의 얼음-냉각 스톱 용액으로 세 번 세척하고, 5 ml의 신틸레이터 Hisafe 3 유동체(LKB Products, Bromma, Sweden)에 담긴 예비-습윤시킨 Millipore 필터(pre-wetted Millipore filter) 내로 즉시 부었다. 그리고 난 다음에 상기 필터는 Liquid Scintillation Counter에서 계수된다. 필터에 결합된 비특이적인 결합은 사전에 측정되고, 전체적인 흡수로부터 뺀다(subtracted). 결과는 단백질의 밀리그램(milligram) 당 아미노산 흡수의 피코몰(picomole)로서 표현된다.

[0264] C) IR로 인한 세포주위 투과성(Paracellular Permeability)에서의 변화의 측정

[0265] 세포주위 투과성에서의 변화는, 하기의 기술을 사용하여 측정된다. i) 희석 포텐셜(Dilution potential); ii) TEER; iii) 상이한 크기의 큰 비 이온성 용질의 침투(permeation of large non ionic solutes of different sizes); FITC-접합된 텍스트란 및 로다민 B 이소티오네이트-텍스트란(Rhodamine B isothionate-Dextran).

[0266] IR 후의 경감과 함께 희석 포텐셜(dilution potential)에서의 변화

[0267] 희석 포텐셜 측정은, 네른스트 방정식(Nernst equation)을 사용하여  $Na^+$ 와  $Cl^-$  사이의 투과성 비율(permeability ratio)에서의 변화를 측정하기 위해 사용된다. 이러한 실험으로부터의 결과는 비-IR과 IR 마우스 그룹 사이를 비교한다. 세포사이의 투과성(paracellular permeability) 및 플라즈마 엔도톡신 연구(plasma endotoxin studies)로부터의 결과는 전기 생리학(electrophysiology data) 및 생존 데이터와 연관성이 있다.

[0268] 희석 포텐셜은, 다양한 농도의  $Na^+$ 를 포함하는 표준의 용액과 함께 점막 관류(mucosal perfusion)에 의해 유도되고, 전체적인 삼투압은 실험 사이에 동일한 삼투압을 유지하기 위해 만니톨(mannitol)로 조절된다. 전도도에 대한 그 밖의 이온의 제공은 5% 미만이 되도록 측정되고, 따라서 방치된다(The contribution of other ions to the conductance is estimated to be less than 5% and therefore is neglected). 막을 가로지른 포텐셜의 차이는, AgCl-AgCl 전극 및 멀티미터(multimeter)(VCC MC8, Physiologic instruments Inc.)을 사용하여 측정된다. 희석 포텐셜은, 접점 포텐셜(junction potential)에서의 변화(일반적으로 1 mV 미만)와 관련되어 있다. 이러한 실험은, 하기의 화학식을 사용한 세포주위 경로의 염화물 및 나트륨 전도도의 계산을 허용한다(These experiments permit calculation of chloride and sodium conductance of the paracellular pathway using the following formula).

$$Em = RT/F * 2.303 \log_{10} \{ P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl] / P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o \}$$

$$R = 8.314472 \text{ (J/K/mol)}; F = 96.48531 \text{ (KJ/mol)}; \text{투과성 정량(Permeability ration) } (\beta) = P_{Cl} / P_{Na}; T = 310 \text{ (Kelvin)}$$

[0269]

[0270] IR 조사후 세포주위 공간을 통한 비-이온성 용질 침투(non-ionic solute permeation)에서의 변화

[0271] 다양한 크기의 수용성(water-soluble), 충전되지 않는 용질에 대한 세포주위 투과성은 FITC-접합된 텍스트란 및 로다민 B 이소티오네이트-텍스트란(Rhodamine B isothionate-extran)(Sigma)을 사용한 유성 챔버에서 증가된 소장 조직에서 연구된다. 이러한 연구는, IR 로 인한 세포주위 투과성 변화의 측정을 가능하게 한다.

[0272] 밀착 연결(tight junctions)에 의해 형성된 세포 사이의 장벽(Intercellular barrier)은 매우 조절되고, 크기 및 이온-선택적이다. 따라서, 이러한 세포 사이의 장벽은, 반-투과성 확산 장벽(semi-permeable diffusion barrier)을 나타낸다. 실험은, 일반적인 상피 및 방사선에 노출된 상피 둘 다에서의 기초 조건(basal conditions) 하의 유성 챔버에서 증가된 회장 또는 빈창자 조직(ileal or jejunal tissues)에서의 다양한 크기의 수용성, 전하되지 않는 용질(uncharged solutes)에 대한 세포주위의 투과성을 측정하기 위해 설계되었다.

[0273] 표준의 용액에 용해시킨 3 mg/ml의 농도로 FITC-결합된 텍스트란 및 로다민 B 이소티오네이트-텍스트란(Rhodamine B isothionate-Dextran)(Sigma)을 유성 챔버의 점막 사이트에 첨가하고, 60 min 동안 37 °C에서 유지시켰다. 기저외측 배스 용액에서의 용액(The solution in the basolateral bath solution)은 형광성의 표지된 텍스트란을 정량하기 위해 표본 조사되었다. FITC-텍스트란 : Exc 485 nm 및 Em: 544nm 및 로다민 B 이소티오네이트-텍스트란 : Exc 520nm 및 Em 590nm. 표준 곡선은 시간에 따른 투과성에서의 어떠한 변화를 체크하기 위해 유성 챔버에서 상승된 마우스 회장 또는 빈창자 조직으로부터 획득되었다. 그리고 난 다음에 이러한 수치를 IR- 및 비-IR 마우스(non-IR mice)로부터의 조직과 비교하였다.

- [0274] D) 조사 효과의 측정
- [0275] 유성 챔버 및 pH stat 연구를 위해 희생된 마우스로부터의 조직은 H&E 염색, BrdU, 대변 형성, 잠재 출혈 (occult blood), 몸무게, 면역조직화학 및 웨스턴 분석을 위해 사용되었다. 그리고 난 다음에 이러한 결과는 비-IR 및 IR 마우스에서의 전해질, 영양소 및 세포주위 투과성 변화에서의 기능적인 변화를 비교하였다.
- [0276] *크립트 검정, H&E, BrdU 염색에 의한 병리학적 분석*
- [0277] a) 크립트 검정(Crypt assay)/미소군락 생존 검정(microcolony survival assay)
- [0278] 객관적인 곡선(Objective curves)은, 다세포의 구조에서의 집락형성(clonogenic) ['구조-구조(structure-rescuing)'] 세포가 포이손 통계(Poisson statistics)에 따라 행동함을 추정할, 세포 사멸을 위한 모델을 사용한, 데이터에 적합하다. 이는, 상기 구조가 평균적으로, 구조 당 세 개의 세포 생존 보다는 더 작아질 때까지, 온전히 남아있고; 세포의 생존이 분석될 투여량의 범위 상에 지수적이고(survival of cells is exponential over the range of doses being analyzed); 및 구조는 하나 또는 그 이상의 생존 세포로부터 재성장을 가정한다. 각각의 상피 초점은, 대표적인 크립트가 생기게 할 수 있는 하나 또는 그 이상의 증식성 줄기 세포의 생존을 나타내는 것이라고 여겨진다.
- [0279] 마우스는 크립트 미소군락 검정(crypt microcolony assay)을 위해 IR 후에 3.5 일에 희생시켰다. 이러한 간격은, IR 후의 크립트에서 분열 회복(mitotic recovery)의 피크에서 또는 가까운 것이다. 이는 IR의 급성 효과를 연구하는데 사용된다.
- [0280] 방사선에 대한 생물학적 응답에 대해,  $D_0$  및  $D_{10}$  값을 계산하였다. 연구는,  $D_0$  값 사이의 통계학상으로 현저한 차이의 결핍에도 불구하고, 변화량 약  $D_0$ 는 기준점(datum point) 당 마우스 및 분비의 수에 달려있음을 나타낸다. 변화량(~ 5 %)의 계수(coefficient)의 감소된 수치는, 4 마리 이상의 마우스의 수 및 2 마리 이상의 섹션 (sections)의 수를 증가시킴으로써 수득될 수 없다. 따라서, 본 연구는, 마우스 당 3 가지 섹션 및 기준점 당 6 마리의 마우스와 함께 설계되었다.
- [0281] b) IR 후의 분열 활성화도(mitotic activity)를 측정하기 위한 BrdU 염색(staining)
- [0282] 마우스는 BrdU (30 mg/kg 몸무게)로 주사하고, 조직이 기능적인 연구를 위해 수득된 경우, 동물을 12, 24, 48 or 72 시간에 희생시켰다. BrdU 라벨링 연구(BrdU labeling studies)가 이들의 주사 후 24 hrs 동안 계속된 경우, BrdU 주사는 매 24 hrs에 한번 반복되었다. BrdU 라벨링 후에, 마우스 소장으로부터의 파라핀 섹션 (paraffin sections)은 제조되고, 항-BrdU 항체(Ab)로 염색시켰다. 세포를 전체 크립트 및 용모 유닛 당 기록하였다(Cells were scored per entire crypt and villous unit). 적어도 60 개의 크립트 및 상응하는 용모(corresponding villi)는 마우스 당 분석되었다. BrdU-표지된 세포는, 크립트 또는 용모 당 전체 세포의 수로 정상화되었다(normalized). 그리고 난 다음에, 결과적으로 생성된 퍼센트는 유도 시간(induction time)에 대해 나타내었다(plotted). 이러한 연구는, 증식기가 지난 용모 구획(postmitotic villous compartment) 내로의 크립트 전구세포(crypt progenitor cells)의 수송, 크립트에서의 세포 분열 비율과 직접적인 연관성 및 이동된 크립트 세포<sup>77</sup>의 동력학(kinetics)에서의 비율의 확인을 가능하게 한다(These studies allow for the determination of the rate at which crypt progenitor cells transit into the postmitotic villous compartment, a direct correlation to the rate of cell division in the crypt and kinetics of the migrating crypt cells<sup>77</sup>).
- [0283] *IR과 함께 물리적인 파라미터에서의 변화*
- [0284] 몸무게, 대변 형성 및 대변 잠혈(fecal occult blood)은, IR과 함께 동물의 영양상의 상태(nutritional status)에서의 변화를 측정하기 위해 마우스에서 연구된다. 일일 활동성 및 질병의 징후에 대해, 모든 마우스는, 설사, 털손질(grooming)의 결핍, 헝클어진 헤어(ruffled hair), 감소된 식사(decreased eating) 및 음용 습관(drinking habits), 무기력(lethargy) 등에 대해 하루에 한번 관찰하고, 조심스럽게 기록하였다.
- [0285] 이러한 연구로부터의 발견은, 대용 마커에 대한 플라즈마 분석(plasma analysis for surrogate markers), 병리학적 관찰, 웨스턴 블롯, 면역 조직 화학 및 작용 연구에 대해 비교하였다.
- [0286] 전해질 및 영양소 수송에 포함된 수송 과정(transport processes)의 분자 변화(molecular alterations)를 측정

하기 위한 웨스턴 블롯 분석

- [0287] 전해질 및 영양소 흡수에 직접적으로 또는 간접적으로 포함된, 하기의 수송 단백질의 활성도에서의 변화를 조사하였다. 수송 단백질은, CFTR 활성도[전기발전의  $Cl^-$  분비와 관련있음(correlating with electrogenic  $Cl^-$  secretion)], NHE3 활성도( $Na^+$  흡수와 관련있음), 용모에서 NBCe1-A/B 활성도( $HCO_3^-$  분비와 관련있음), NKCC1[세포 내로의  $Na^+$ ,  $K^+$  및  $Cl^-$ 에 대한 기저외측 흡수(basolateral uptake)], SGLT-1(글루코스 흡수),  $B^0$ ,  $B^{0/+}$ ,  $b^{0/+}$ , PAT[양성자-결합된 전기발생의 수송 시스템(proton-coupled electrogenic transport system)] 및  $X_{AG}^-$ 을 포함한다(표 2). 이러한 연구는, 비-IR(non-IR), IR 및 ORD 처리 후에 기능적인 데이터와 비교하였다.
- [0288] 수송 단백질, 크립트 및 용모 세포 마커(villous cell markers)의 발현 패턴에서의 변화의 검출에 대한 면역조직화학
- [0289] 냉동된 섹션(Frozen sections)을, 기능적인 연구를 위해 동물을 희생시켰을 때 제조하고, 이를 다양한 수송체(transporters)(CFTR, NHE3, NKCC, NBCe1-A/B, SGLT,  $B^0$ ,  $B^{0/+}$ ,  $b^{0/+}$ , PAT1, 및  $X_{AG}^-$ )에 대해 특이적인 다양한 항체를 사용하여 면역-염색(immuno-staining)을 위해 사용하였다. 게다가, 세포 표면 마커 발현 패턴은, 크립트 및 용모 세포 비율에 대해 이해(insights)를 제공하기 위해 조사되었다. 이러한 연구는, IR 및 ORD 처리와 함께 수송체의 발현 패턴에서의 변화의 검출을 가능하게 한다.
- [0290] E) 방사선 효과에 대한 대용 마커[Surrogate Marker(s)]의 확인
- [0291] GI 독성의 시작을 측정하기 위한 방사선 이후의 방사선 투여량 및 시간을 측정하기 위해 대용 마커를 확인하기 위한 시도의 몇몇의 연구가 있을지라도, 이러한 연구는 주로 성공적이지 않았다. 본 실시예는, 다중 기관(multiple organs)이 포함된 시나리오(scenarios)에서의 유용함을 또한 입증할 수도 있는, GI 독성의 발병(onset)을 예측하기 위해, 대용 마커의 확인을 가능하게 하도록 실험적인 설계를 보여준다.
- [0292] 명확하게, 플라즈마는, 상기 동물을 기능적인 평가(functional evaluation)를 위해 희생시키고 수집하였다(유싱 챔버). 0, 1, 3, 5, 7 또는 9 Gy의 IR 투여량에 대한 노출 후에, 마우스는 1, 2, 3, 6, 또는 9 일에 희생시켰다. 대용 마커(surrogate marker)를 확인하기 위해, 소화관 펩티드(gut peptides), 사이토카인, 및 엔도독신을 연구하였다.
- [0293] 엔도독신을 위한 플라즈마 분석
- [0294] 플라즈마 엔도독신 레벨을 측정하였다. 플라즈마 엔도독신 레벨에서의 변화를, 세포주위 투과성, 플라즈마 소화관 펩티드 레벨(plasma gut peptide levels), 질병(sickness) 및 생존 비율에서의 변화와 연관되어 있다.
- [0295] 사이토카인에 대한 플라즈마 분석
- [0296] 플라즈마 사이토카인 레벨에서의 변화를, IR 및 비-IR 마우스에서의 루미넥스 멀티플렉스 비드 어레이 기술(luminex multiplex bead array technique)을 사용하여 조사하였다.
- [0297] 소화관 펩티드(gut peptides)에 대한 플라즈마 검정
- [0298] 인슐린, 글루카곤, 세크레틴, 콜레시스토키닌(cholecystokinin), 시트룰린(citrullin), 소마토스타틴(somatostatin), 펩티드 YY, 그렐린, NPY, 및 GLP-2를 포함하는 소화관-특이적인 펩티드(gut-specific peptides)가 조사되었다. 모든 소화관 펩티드 키트를 Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (CA, USA)로부터 구매하였다. 실험을 제조업자의 지시에 따라 실시하였다.
- [0299] 통계 분석
- [0300] 정상 및 IR 조직 중에서의 기능적인 차이를 비교하였다. 통계적인 중요성을 변화량(variance)(ANOVA)의 분석을 사용하여 계산하였다. 데이터를 상기 분석 중에서 비교하였다. 상관 계수(correlation coefficient) (R)을 최고의 기능적인 마커를 측정하기 위해 분석하였다. 모든 통계적인 분석을 SAS System for Windows(Copyright© 2002-2003 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.)의 버전 9.1을 사용하여 안내하였다. 만약 특정한 통계적인 절차와 연관된 분포 추정(distributional assumption)을 훼손한다면, 적절한 변화(appropriate transformations) 또는 비-매개변수의 대안(non-parametric alternatives)이 사용된다. 수신자 조작 특성(ROC) 곡선(Receiver Operating Characteristic curves)이 그려지고, ROC 곡선(AUCs) 하의 영역이, DeLong et

al. (1988)의 비-매개변수 방법(non-parametric method)을 사용한 다양한 기능적인 테스트(functional tests) 중에서 비교된다. 패밀리-와이즈 타입 1 에러 비율(family-wise Type 1 error rate)은, 다수의 비교를 위한 Tukey's 방법을 사용하여 0.05 로 조절된다. 연관된 p-수치 및 95 % 신뢰 구간(confidence interval)과 함께 피어슨 상관 계수(Pearson correlation coefficients)를 보고한다.

- [0301] 실시예 16 - IR-유도된 위장 손상(gastrointestinal injury)의 치료를 위한 이상적인 경구 식이요법의 개발 (Development of ideal oral regimens)
- [0302] 본 실시예는, 방사선-유도된 GI 독성의 치료 또는 완화를 위한 경구의 치료 조성물을 개발하기 위해 실험적인 설계를 보여준 것이다. 이는, 다양한 투여량의 IR에 노출된 후 경구 재수화 식단(oral rehydration diet, ORD)이 시작되어야 한 시간 및 상기 조성물이 얼마나 오랫동안 투여되어야 할지를 또한 측정하였다. 투여될 필요가 있는 ORD에 대한 시간은 기초 레벨로 회복되기 위한  $K_m$  에 대한 요구된 시간에 달려있다(The time for which ORD needs to be administered depends on the time needed for the  $K_m$  to return to the basal levels).
- [0303] 방법
- [0304] NCI로부터의 C57BL/6 마우스(8 주된, 수컷)을 사용하였다. 상기 수송체의 친화도(affinity of the transporter)를 측정하기 위해, 포화 동력학(saturation kinetics)이 각각의 영양소(respective nutrients)의 증가된 농도를 사용하여 계산하였다. 예비 조사(Preliminary studies)는, IR 후  $K_m$  and  $V_{max}$ 에서의 변화와 함께, 몇몇 a.a 가 흡수를 증가시키는 반면에, 몇몇은 감소된 흡수를 나타냄을 나타내었다. a.a의 증가된 농도는,  $I_{sc}$ 에서의 증가를 끌어내는, 회장 또는 빈창자[분리 평가를 받음(subjected to separate evaluation)]에 첨가되었다.  $I_{sc}$ 에 대한 a.a의 그려진 알려진 농도(Plotting known concentration)가, 포화 동력학(saturation kinetics)의 측정을 가능하게 한다. 위 세척(gastric lavage)을 통한 IR 후에 선택적으로 흡수된 a.a를 투여하는 것은 마우스의 생존을 증가시킨다. 영양소에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ 는, 각각의 그룹에서 10 마리의 마우스와 함께 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 및 30 일에 0, 1, 3, 5, 7 또는 9 Gy로 마우스 IR 에서 측정되었다.
- [0305] A) 이상적인 경구 방사선 식단(Ideal Oral Radiation Diet, ORD)의 개발을 위한 필수 아미노산 및 글루코스의  $K_m$  및  $V_{max}$ 의 측정
- [0306] 본원에 설명된 바와 같이, 방사선은, 각각의 수송체에 대한 변화된 친화도를 나타내는, 영양소의 수송 동력학(transport kinetics)에서의 변화를 유발한다. 이러한 기술을 사용하여 측정된 글루코스 수송체에 대한 친화도는 현저한 감소를 나타내고, 기초 레벨로 회복하는데 대략 2 주가 걸렸다. 소화관 루멘(gut lumen)에서의 흡수 되지 않는 글루코스 또는 영양소의 존재는 설사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 영양소에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ 는, IR의 상이한 투여량에 노출된 마우스에서 측정되었고, IR 후 30일까지의 기간 동안 측정되었다( $K_m$  and  $V_{max}$  for the nutrients are determined in mice exposed to different doses of IR and followed up for a period up to 30 day after IR). 이러한 연구는, 시간 및 방사선 투여량과 함께 이들의 흡수 패턴을 기초로 한 ORD를 제형화(formulating)하는데 유용하다. 게다가, IR 후의 증가된 흡수를 나타내는 영양소는, 시스템을 위한 에너지의 교체 소스(alternate sources)로서 사용될 수도 있다. 그리고 난 다음에 상기 제형(formulation)(ORD)은 생존 연구에 사용될 것이다.
- [0307] IR 후의 유실 챔버에서의 글루코스 수송을 위한  $K_m$  및  $V_{max}$ 에서의 변화
- [0308] 글루코스 수송이 연구되었다. 명확하게, 글루코스에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ 가 연구되었다. 글루코스의 증가된 농도가 유실 챔버 실험에서의 루멘 사이드(lumen side)에 첨가되었고, 기록된  $I_{sc}$ 에서의 증가되었다. 글루코스 수송이 개선되기 시작할 때까지, 글루코스를 경구의 보조적인 식이요법을 제공하지 않았다. 제형화는 경구 글루코스를 용인하도록 마우스의 능력을 기초로 하였다(The formulation is based on the ability of the mice to tolerate oral glucose).
- [0309] IR 후의 아미노산(a.a) 수송에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ 에서의 변화
- [0310] IR 다음의 IR 투여량 및 시간에 기초한 아미노산의 동력학 패턴을, 각각의 a.a 를 위해  $K_m$  및  $V_{max}$  을 측정함으로써 연구하였다. 전기발생의 a.a의 동력학 지표가 기재된 바와 같이 유실 챔버 세팅(Ussing chamber setting)

g)에서 측정되었다. 간단하게, 루멘 용액에 첨가된 a.a.의 농도를 증가시키는 것은, 특정한 a.a 농도에서의 포화와 함께, 증가된  $I_{sc}$  반응을 야기한다.  $K_m$  및  $V_{max}$ 은 포화 곡선으로부터 계산된다.

[0311] 전기적 중성의 a.a가 BBMV를 사용하여 연구되었다. BBMV에 의한 아미노산 흡수는, 3s(19)의 고정된 수송 시간에서, 0.025 부터 7 mmol/l까지, 상이한 농도의 기질의 존재에서 실시된다. 각각의 검정은, 각각의 실험 그룹으로부터 BBMV의 풀(pool of BBMV)( $n = 12$ )을 사용하여 3배로 실시된다. 최대한의 속도(Maximal velocity) ( $V_{max}$ )는, 3s에서 단백질의 밀리그램 당 기질의 피코몰로서 표현되고, 수송체 친화 상수(transporter affinity constant)( $K_m$ )가 리터 당 밀리몰로서 표현된다.

[0312] GI 독성을 완화시키고 생존을 개선하기 위한 ORD 치료의 최적화

[0313] 20 mg/mice/day 투여량 범위에서의 리신은 마우스에서 생존을 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 적절한 투여량, 빈도 및 간격을 선택함으로써 ORD 치료 식이요법을 최적화하기 위해, 7 일에서의 생존, 대변 형성, 잠재 출혈 및 몸무게에서의 ORD의 효과의 분석이 실시되었다. ORD는, 각각의 a.a 또는 글루코스의  $K_m$  수치로부터 측정된 투여량 범위에서 IR(15.6 Gy = 1.2x  $LD_{50/7}$  value)의 치사량 후에 이미 3 시간 일찍 개시되었다(ORD is initiated as early as 3 hours after a lethal dose of IR at a dose range determined from  $K_m$  values of respective a.a or glucose). 위세척에 사용된 글루코스 또는 a.a.의 농도는, 성인 인간에서 글루코스 및 필수적인 아미노산을 위해 현재 사용된 추천된 하루 양을 기초로  $K_m$ 으로부터 계산된다. 인간에서 마우스로의 투여량의 변형(dose translation)은  $K_m$  요소<sup>78</sup> ( $K_m$  factors)를 기초로 한다. 따라서, 반대의 관계가 영양소에 대한  $K_m$  및 일일 투여량 사이에 존재한다. 만약, IR이  $K_m$ [수송체에 대한 감소된 친화도(decreased affinity for the transporter)를 나타냄]을 증가시킨다면, 각각의 영양소에 대한 일일 투여량(daily dose)에서 비례하여 감소된다. 두 가지의 추가적인 ORDs가, 계산된 투여량의 상하로 즉 3 번의 투여량으로 제형화된다(formulated). 최상의 ORD 투여량은 생존 연구를 기초로 측정된다.

[0314] 위세척(gastric lavage)은 7일에 한 번 반복된다. ORD 위세척의 투여량 빈도 및 간격을 생존 연구의 결과에 따라 변화를 받았다. 만약 ORD가 효과적이라면, GI 독성이 IR 후 2 내지 3 일에 절정이고, 그리고 난 다음에 7 일까지 서서히 회복된다. 상기 마우스를, 이들의 생존을 모니터하기 위해 IR 후 7 일까지 매일 관찰하였다.

[0315] 일정한 식단을 받은 마우스가 IR 후 7일 내에 죽거나 또는 회생시켰다[소멸 직전의(moribund); 20 % 무게 손실, 손질의 실패(failure to groom), 감소된 활성화 및 감소된 호기심(decreased inquisitiveness)의 조합으로 나타냄]. 만약 ORD 처리를 받은 마우스가 IR-유도된 치사율로부터 보호된다면, 생존 실험을, 결과를 재현할 수 있는지를 보장하기 위해, 동일한 처리를 추가적인 10 마리의 마우스/그룹에서 반복할 것이다. 생존 데이터는 Fisher's 정확테스트(Fisher's exact test)에 의해 분석할 것이다.

[0316] 그룹 당 10 마리의 동물의 샘플 크기가, 5 %의 전체적인 알파 레벨을 확인하기 위해, [0.017~0.05/3의 조정된 알파 레벨에서 실시된 쌍으로 비교에서(in a pair-wise comparison carried out at the adjusted alpha level of 0.017 ~ 0.05/3)] 각각의 조정을 위위해, 비히클 그룹에 대해 0 % 내지 60 % 또는 그 이상에 가까워지는 사이의 생존 차이점을 발견하기 위해 충분히 높은 파워(high power)(>80%)를 보장한다[The sample size of 10 animals per group ensures sufficiently high power (>80%) to detect survival differences between close to 0% for the vehicle group and 60% or higher for each of the intervention to ensure an overall alpha level of 5%]. 통계적으로 현저한 차이는 관찰되지 않거나 또는 오직 부분적인 완화가 ORD 처리에 의해 성취될 경우에, 식이요법의 새로운 사이클이 IR-유도된 치사율에 대항한 최대한의 완화를 보장하기 위해 상기에 기재된 바와 같이 착수될 것이다. 최적의 투여량의 선택 후에, 보다 빈번한(하루에 두 번) ORD 위세척이 요구되는지를, 보다 높은 방사선 완화(greater radiation mitigation) 및 보다 빠른 크립트 회복을 성취하기 위해 평가하였다.

[0317] 포스트-IR 치료(post-IR therapy)를 위해 ORL의 유효성의 윈도우(window) 및 DMF의 측정

[0318] 투여량 변경 인자(Dose modification factor, DMF)가,  $DMF=LD_{50}^T/LD_{50}^C$ 에 의해 나타낸, 방사선 완화제(radiation mitigator)의 효율성을 측정하기 위해 가장 중요한 파라미터 중의 하나이고, 상기 T는 ORD 처리 그룹이고, C는 일반적인 식단<sup>51</sup>(regular diet)에서의 대조군을 나타낸 것이다. IR-유도된 치사율을 완화시키는데 ORD 처리의

효율성을 측정하기 위해, 평균 10 마리의 C57BL/6 마우스의 그룹(다양한 IR 투여량의 10 내지 20 마리/그룹)을, 이전의 실험에 나타난 최적의 식이요법을 사용하여 비히클 또는 ORD로 처리하였다. 비히클-처리된 마우스는, 0.5 내지 1 Gy의 증가를 사용하여 11 Gy 내지 13 Gy IR로 노출시켰다. 이러한 마우스의 생존이, IR 후 7 일 관찰 기간 동안 기록되었다. 마우스가, 이들이 소멸직전이 되거나 또는 관찰 기간의 말단에 안락사시켰다.

- [0319] 소장 및 플라즈마를 안락사 후에 수집하였다. 혈액 샘플을 위장의 펩티드 분석을 위해 사용한 반면에, 소장 조직 표본(small intestine tissue specimens)을 IR-유도된 소장의 손상을 조사하기 위해 사용하였다. LD<sub>50/7</sub> 수치는 IR-유도된 GI 독성의 좋은 지표(good indicator)이다.
- [0320] 우리의 실험실에서 이전에 관찰된 것을 기초로 비히클-처리된 마우스(vehicle-treated mice)에 대한 LD<sub>50/7</sub>가 13 Gy에 가깝다. ORD 처리된 그룹은, 0.5 내지 1 Gy 증가와 함께 14.5 에서 16.5 Gy 까지의 IR 범위에 노출시키고, 비히클-처리된 마우스(vehicle-treated mice)에 대해 상기에 기재된 바와 같이 관찰하고, 검토하였다. ORD 처리 그룹에서의 실질적인 다수의 마우스가 16.5 Gy에 노출된 후조차도 생존한다면, 보다 높은 IR 투여량이 다음의 연구에서 마우스에게 제공된다. LD<sub>50/7</sub> 수치는 이들의 생존 곡선을 기초로 ORD-처리된 동물에 대해 계산한 다음에, ORD에 대한 DMF 가 계산되었다. ORD-처리된 마우스는 1.2 보다 큰 LD<sub>50/7</sub> 에 대한 DMF 를 갖는다.
- [0321] IR 후에 언제까지 ORD 처리가 제공되어야하는지를 측정하기 위해(To determine how soon the ORD treatment should be given after IR), 동물의 5 그룹을 IR 후 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 및 24 시간에 ORD로 처리하고, 그 다음에 계획된 ORD 처리를 하고, 양성 대조군[IR 처리 후 3 h(3h post-IR treatment)] 및 음성 대조군[염분 비히클(saline vehicle)]을 7 일 동안 관찰하였다. 동물의 생존을 7 일 시점에 생존을 기초로 비교하였다.
- [0322] 이러한 모델에서, IR 후의 투여된 ORD를 갖는 8 개의 그룹에서, 로지스틱-회귀 모델의 수(a number of logistic-regression models)[7 일에 가변의 사멸/생존 결과(outcome variable dead/alive)] 및 다양한 시간 경향이 고려된다. 선형[처리 지연으로서 아마도 감소된 생존(most likely decreasing survival as treatment delay increases)] 및 비-선형 모델[급격한 생존 감소(exponential survival decreases)] 둘 다가 고려된다.
- [0323] 비교 대 IR 투여 후 3 h 및 비히클(Comparisons versus 3h post-IR administration and vehicle)을, Fisher's 정확도 테스트(Fisher's exact test)를 사용한 한 쌍 방식(a pair-wise fashion)으로 실시되었다. 한 쌍 비교(a pair-wise comparison)(상이한 시간 그룹 vs the 3h post-IR, ORD 그룹 및 vs. 비히클) 및 개별적인 테스트 결과 레벨이 0.005에서 유지될 것이다(0.05/10)( $\approx 0.05/10$ ).
- [0324] a) 생존 비율:
- [0325] ORD의 처리 효과를 위한 주요한 지표(index)는, 생존 비율을 측정하기 위한 것이다. 하루에 두 번 기록하고, 생존 곡선이 생성된다(created).
- [0326] b) 일일 활동성 또는 질병의 징후(Signs of sickness)
- [0327] 마우스의 모두를, 설사, 털손질(grooming)의 결핍, 헝클어진 헤어(ruffled hair), 감소된 식사(decreased eating) 및 음용 습관(drinking habits), 무기력(lethargy) 등에 대해 하루에 한번 관찰하고, 조심스럽게 기록하였다.
- [0328] c) 몸무게, 대변 형성 및 잠재 출혈
- [0329] 만약 ORD가 IR-유도된 GI 독성으로부터의 몇몇의 효과를 바꿀 수 있는지를 측정하기 위해, 상기 결장(colon)은 제거될 것이고, 이러한 동물은 본원 기재된 바와 같이 기능적인 연구를 위해 희생된 경우에, 대변 형성 및 잠재 출혈에 대해 분석될 배설물에 대해 나타낼 것이다. 만약 완화 제제(mitigation agents)가, 육안으로 볼 수 있는 이들의 기능 및 GI 점막의 온전함(integrity)을 유지할 수 있다면, 이러한 연구가 측정에 대해 가능하게 한다.
- [0330] d) 면역조직화학
- [0331] 라미나 프로피리아(lamina propria)에서의 염증성 세포 침투(Inflammatory cell infiltration)가 빈창자 또는 회장으로부터의 H&S 염색된 섹션(H&E stained sections)을 사용하여 분석하였다. 림프여포(lymphoid follicles)의 분포 빈도(distribution frequency)를 측정하기 위해, 주의가 취해져야 할 것이다(Care will be

taken to determine the distribution frequency of lymphoid follicles).

- [0332] 최적의 투여량, 출발 시간 및 급성 GI 독성에 대한 ORD의 스케줄이 연속적으로 측정된다. 마우스는, IR 노출 후에 ORD의 상이한 투여량 제형(different dose formulation)으로 처리되었다. 최적의 투여량은, 응답 변수(response variable)로서의 7 일 간의 생존[yes 대 no] 및 설명 변수(explanatory variable)로서의 투여량 레벨을 측정함으로써 로지스틱-회귀 모델(logistic regression models)에서 측정되었다. 투여량-반응 곡선(dose-response curve)의 불확실성 때문에, 몇몇의 타당할 것 같은 투여량-반응 모델이 제안된다. 투여량-반응의 모델을 측정된 후에, 최소한의 효과적인 투여량(minimum effective dose, MED)을 계산하였다. 치료의 출발 시간 및 최적의 지속시간이, ANOVA 모델에서 추정된 평균 반응 및 변화량을 사용하여 등가 테스트에 의해 대응된다.
- [0333] 실시예 17 - GI 기능에서의 기능적인 개선의 측정
- [0334] 본 실시예에서, ORD가 전해질 및 영양소를 흡수하는 것이 IR-주사된 위장관 점막을 회복시키는데 얼마나 도움이 되는지를 측정하기 위해, 전기생리학적 실험(electrophysiology experiments)을 실행하였다. 기능적인 변화는, 플라즈마 대용 마커(plasma surrogate marker), 세포학 및 일일 활성도, 몸무게 및 대변 형성과 같은 물리적인 관찰과 연관되어 있다. 배설물의 잠재 출혈(Fecal occult blood), 크립토크 검정, H&E 염색, BrdU염색과 같은 세포학, 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석. 이러한 연구는, 분자의, 세포의 및 기능적인 레벨에서의 GI 기능에서의 ORD의 보호적인 효과(protective effects)의 관찰을 가능하게 한다.
- [0335] 방법
- [0336] NCI로부터의 C57BL/6 마우스(8 주된, 수컷)를 사용하였다. 기능적인 연구, 물리적인 관찰, 세포학, 면역조직화학, 웨스턴 분석을 실시하였고, 플라즈마 대용 마커는 IR 유도된 GI 독성에 대한 특정한 지표로서 사용된다. 마우스를 임의적으로 그룹으로 나누고, 복부를, 1.84 Gy/min 투여량 비율에서 IR을 전달하는 Cs 소스(Cs source)를 사용한 Shepherd Mark-I으로 조사하였다. 마우스를 1, 3, 5, 7 또는 9 Gy로 조사하고, 그리고 난 다음에 ORD로 투여하였다. 마우스를 6 일에 희생시키고, 조직을 기능적인, 조직병리학(histopathology), 웨스턴 블롯 및 면역조직화학에 사용하였다.
- [0337] A) 전해질 및 영양소 흡수에서의 기능적인 개선을 갖는 ORD의 효과의 연관성(Correlation)
- [0338] 지표의 세트가 치료 효과를 평가하는데 사용된다: 1) 마우스를 매일 몸무게를 재고, 어떠한 발병 징후에 대해 면밀히 관찰하고; 2) 기능적인 연구(전해질 및 영양소 흡수), 크립토크 검정, 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석을 위해 동물을 희생시킨 때, 혈액 샘플 및 물리적인 파라미터를 관찰하였다. 혈액 샘플을, 플라즈마 엔도톡신[위장 장벽 역기능을 위한 지표(an index for gut barrier dysfunction)], 사이토카인, 위장관 펩티드[인슐린, 글루카곤, 세트레틴(secretin), 콜레시스토키닌(cholecystokinin), 시트룰린(citrullin), 소마토스타틴, 펩티드 YY, 그렐린, NPY 및 GLP2], 스트룰린(citrulline), 글루코스 및 인슐린을 측정하기 위해 사용된다.
- [0339] 유성 챔버 연구에서  $Na^+$  및  $Cl^-$ 의 경사피 흐름(transsepithelial flux)의 측정
- [0340] 마우스로부터 수득한 ORD의 기능적인 개선을 조사하기 위해, 빈창자 및 회장 시트(jejunum and ileum sheets)를 유성 챔버에 고정시키고(mounted), 실험을 실시예 15에 기재된 바와 같이 실시하였다.  $Na^+$  및  $Cl^-$  흡수가 비-IR(non-IR), IR 및 ORD 처리된 마우스 그룹 사이에서 비교하였다.
- [0341] pH stat 기술을 사용한  $HCO_3^-$  분비의 결정
- [0342] 실험을 실시예 15 에 기재된 바와 같이 실시하였다. ORD 처리와 함께  $HCO_3^-$  분비의 복구가 기능적인 향상(functional improvement)을 제안한다.  $HCO_3^-$  분비는, 비-IR, IR 및 ORD 처리된 마우스 그룹 사이에서 비교하였다.
- [0343] 유성 챔버 및 비히클 연구(vesicle studies)에서 영양소 흡수의 측정
- [0344] 실시예 15에 기재된 바와 같이, 글루코스, 전기발생적 a.a 및 전기적 중성의 a.a 흡수가 측정되었다. 이러한 연구로부터의 결과가 비-IR, IR 및 ORD 처리된 마우스 그룹 사이에서 비교하였다.
- [0345] IR 후의 완화와 함께 세포주위의 투과성에서의 변화의 측정(Determination of changes in paracellular permeability with mitigation)

- [0346] ORD 처리와 함께 세포주위의 투과성에서의 감소가 상피의 온전함(epithelial integrity)에서의 개선을 제시한다. 이러한 변화는 플라즈마 엔도독신 레벨에서의 수반된 개선(concomitant improvement)을 나타낼 것이다.
- [0347] *크리프트 검정, H&E 염색, BrdU, 대변 형성, 잠재 출혈, 몸무게, 면역조직화학 및 웨스턴 분석과 함께 ORL의 상관 효과(Correlate effect)*
- [0348] 이러한 연구는 실시예 15에서 상기에 기재된 방식과 유사할 것이고, 상기 결과는 비-IR, IR 및 ORD 처리된 마우스 그룹 사이에서 비교할 것이다.
- [0349] *해부학상의 개선(anatomical improvement)을 측정하기 위한 병리조직학적 분석(Histopathological analysis)*
- [0350] 표본은, 실시예 15에 기재된 바와 같이, H&E 염색 및 BrdU 염색, 크리프트 검정을 포함하는 병리학적 분석에 대해 처리될 것이다. 간단하게, 상기 조직은 포르말린(formalin)으로 고정되고, 파라핀 블록(paraffin blocks)에서 진행되고, H & E로 염색될 것이다.
- [0351] *수송 단백질, 크리프트 및 용모 세포 마커의 발현 패턴에서의 변화를 측정하기 위한 면역조직화학(Immunohistochemistry)*
- [0352] 다양한 수송체(NHE3, NBCe1-A/B, SGLT, B<sup>0/+</sup>, b<sup>0/+</sup>, X<sub>AG</sub><sup>-</sup>) 및 세포 표면 마커(Lgr5, EphB2 및 EphB3)에 특이적인 다양한 항체를 사용한 면역-염색을 위해 상기 조직이 사용될 것이다. 상기 방법은 실시예 15에 기재된 것과 유사할 것이다. 이러한 연구는 ORD로 처리된 다음에 용모 및 크리프트 세포 형성의 정도를 측정하는데 도움을 줄 것이다.
- [0353] 전해질 및 영양소 수송에 포함된 수송 과정의 분자의 변화를 연구하기 위한 웨스턴 블롯 분석
- [0354] 상기 방법은 실시예 15에 나타낸 것과 유사할 것이다. CFTR 활성도[전기발생의 Cl<sup>-</sup> 분비와 관련됨], NHE3 활성도(Na<sup>+</sup> 흡수와 관련됨), 용모에서의 NBCe1-A/B 활성도(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비와 관련됨), SGLT-1, B<sup>0/+</sup>, b<sup>0/+</sup> 또는 X<sub>AG</sub><sup>-</sup> 가 조사될 것이다.
- [0355] *대용 마커(surrogate marker)의 플라즈마 분석을 사용한 ORL의 상관 효과(Correlate effect)*
- [0356] 예비 연구가 마우스에서 IR 후의 위장관 펩티드에서의 변화를 나타낸다. 기초 레벨로 향한 대용 마커 레벨에서의 변화를 조사하고, 결과는 ORD 처리와 함께 조직의 개선(systemic improvement)을 나타낼 것이다.
- [0357] *통계적인 분석*
- [0358] 미가공 데이터(raw data)의 평균 및 표준 편차가 계산되고, 막대 도표와 같은 그래픽 기술(graphical techniques)이 적용될 것이다. 이러한 두 가지의 그룹(처리 vs 비처리)을 비교하기 위한 주요한 접근은, 세로 방향의 데이터(longitudinal data)를 기초로 혼합된 효과 모델(선형 또는 비-선형)을 사용한다.
- [0359] 만약 각각의 참고문헌이 참고문헌으로 포함된 개별적이고 특이적으로 나타내고, 본원에 이의 전체를 나타낸다면, 본원에 인용된 공개, 특허 출원 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은, 이와 같은 정도로 이로써 참고문헌에 포함된다(All references, including publications, patent applications and patents, cited herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each reference was individually and specifically indicated to be incorporated by reference and was set forth in its entirety herein).
- [0360] 본 발명의 기재의 문맥에서 사용된 바와 같은 용어 "a" 및 "an" 및 "the" 및 유사한 지시대상은, 다른 방식으로 본원에 나타내거나 또는 문맥에 의해 명확하게 부정하지 않는다면, 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 구성될 것이다.
- [0361] 본원의 수치의 범위의 열거(Recitation)는, 다른 방식으로 본원에 나타내지 않는다면, 범위 내의 각각의 수치에 대한 개별적인 언급의 속기 방법(shorthand method)으로서 역할함을 단지 의도하고(Recitation of ranges of values herein are merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range), 각각의 분리된 수치가 만약 이는 본원에 개별적으로 인용된다면, 명세서 내로 포함된다. 다른 방식으로 나타내지 않는다면, 본원에 제공된 모든 정확한 수치는 상응하는 정확한 수치의 대표적인 것이다[예를 들어, 특정한 요소 또는 측정과 관련하여 제공된 모든 정확한 예시적인 수치는, 적절한 경우 "약(about)"으로 변형되는, 상응하는 근사치의 측정(corresponding approximate measurement)을

또한 제공하는 것으로 고려될 수 있다].

- [0362] 어떠한 및 모든 실시예, 또는 본원에서 제공된 예시적인 언어[예를 들어, "와 같은(such as)"]의 사용은, 단지 본 발명을 보다 분명하게 나타내기 위한 의도이고, 다른 방식으로 나타내지 않는다면, 본 발명의 범위의 한정을 제기하는 것은 아니다. 명세서에서의 어떠한 언어도, 어떠한 요소가, 동일한 것이 명쾌하게 기재된 것이 아닐 지라도, 본 발명의 실행에 필수적인 것으로 나타낸 바와 같이 이해하지는 하지 말아야 한다(No language in the specification should be construed as indicating any element is essential to the practice of the invention unless as much is explicitly stated).
- [0363] 요소 또는 요소들에 관하여 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 또는 "함유하는(containing)"과 같은 용어를 사용한 본 발명의 어떠한 측면 또는 실시형태의 본원의 서술은, 다른 방식으로 나타내거나 또는 문맥에 의해 명확하게 부인되지 않는다면, 특정한 요소 또는 요소들을 "구성된다(consists of)", "기본적으로 구성된다(consisting essentially of)" 및 "실질적으로 포함한다(substantially comprises)" 본 발명의 유사한 측면 또는 실시형태에 대한 지지를 제공하는 것을 의도한다(The description herein of any aspect or embodiment of the invention using terms such as "comprising", "having", "including" with reference to an element or elements is intended to provide support for a similar aspect or embodiment of the invention that "consists of", "consisting essentially of" and "substantially comprises" that particular element or elements, unless otherwise stated or clearly contradicted by context)[예를 들어, 특정한 요소를 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 조성물은, 문맥에 다른 방식으로 기재되거나 또는 명확하게 부인하지 않는다면, 상기 요소로 이루어진 조성물을 또한 기재한 것으로 이해되어야 한다].
- [0364] 본원에 기재된 실시예 및 실시형태는, 단지 설명적인 목적을 위해 것이고, 이의 가벼운 다양한 변형 또는 변화가 본 분야의 숙련자에게 제시될 수 있고, 이러한 출원의 의미(spirit) 및 범위(purview) 내에 포함된 것으로 이해되어야 한다.
- [0365] References
- [0366] 1. Wolfe, B.M., *et al.* Experience with home parenteral nutrition. *Am J Surg* **146**, 7-14 (1983).
- [0367] 2. Beer, W.H., Fan, A. & Halsted, C.H. Clinical and nutritional implications of radiation enteritis. *Am J Clin Nutr* **41**, 85-91 (1985).
- [0368] 3. Donaldson, S.S. Nutritional consequences of radiotherapy. *Cancer Res* **37**, 2407-2413 (1977).
- [0369] 4. Theis, V.S., Sripadam, R., Ramani, V. & Lal, S. Chronic Radiation Enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (2009).
- [0370] 5. Gunnlaugsson, A., *et al.* Dose-volume relationships between enteritis and irradiated bowel volumes during 5-fluorouracil and oxaliplatin based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Acta Oncol* **46**, 937-944 (2007).
- [0371] 6. Dickerson, J.W. Nutrition in the cancer patient: a review. *J R Soc Med* **77**, 309-315 (1984).
- [0372] 7. Bounous, G., *et al.* Dietary protection during radiation therapy. *Strahlentherapie* **149**, 476-483 (1975).
- [0373] 8. Alpers, D.H. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *Gastroenterology* **130**, S106-116 (2006).
- [0374] 9. Hauer-Jensen, M., Wang, J., Boerma, M., Fu, Q. & Denham, J.W. Radiation damage to the gastrointestinal tract: mechanisms, diagnosis, and management. *Curr Opin Support Palliat Care* **1**, 23-29 (2007).
- [0375] 10. Tankel, H.I., Clark, D.H. & Lee, F.D. Radiation enteritis with malabsorption. *Gut* **6**, 560-569 (1965).
- [0376] 11. Yeoh, E.K., *et al.* Gastrointestinal function in chronic radiation enteritis--effects of loperamide-N-oxide. *Gut* **34**, 476-482 (1993).
- [0377] 12. Gavazzi, C., Bhoori, S., Lovullo, S., Cozzi, G. & Mariani, L. Role of home parenteral

nutrition in chronic radiation enteritis. *Am J Gastroenterol* **101**, 374-379 (2006).

- [0378] 13. Traber, P.G., Yu, L., Wu, G.D. & Judge, T.A. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villous axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol* **262**, G123-130 (1992).
- [0379] 14. Minhas, B.S. & Field, M. Localization of bicarbonate transport along the crypt-villous axis in rabbit ileum. *Gastroenterology* **106**, 1562-1567. (1994).
- [0380] 15. Welsh, M.J., Smith, P.L., Fromm, M. & Frizzell, R.A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* **218**, 1219-1221. (1982).
- [0381] 16. Rijke, R.P., van der Meer-Fiegggen, W. & Galjaard, H. Effect of villous length on cell proliferation and migration in small intestinal epithelium. *Cell Tissue Kinet* **7**, 577-586 (1974).
- [0382] 17. Wright, N.A. & Irwin, M. The kinetics of villous cell populations in the mouse small intestine. I. Normal villi: the steady state requirement. *Cell Tissue Kinet* **15**, 595-609 (1982).
- [0383] 18. Roberts, S.A., Hendry, J.H. & Potten, C.S. Intestinal crypt clonogens: a new interpretation of radiation survival curve shape and clonogenic cell number. *Cell Prolif* **36**, 215-231 (2003).
- [0384] 19. Roberts, S.A. & Potten, C.S. Clonogen content of intestinal crypts: its deduction using a microcolony assay on whole mount preparations and its dependence on radiation dose. *Int J Radiat Biol* **65**, 477-481 (1994).
- [0385] 20. Potten, C.S., Owen, G. & Roberts, S.A. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* **57**, 185-199 (1990).
- [0386] 21. MacNaughton, W.K. Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* **14**, 523-528 (2000).
- [0387] 22. Rodier, J.F. Radiation enteropathy--incidence, aetiology, risk factors, pathology and symptoms. *Tumori* **81**, 122-125 (1995).
- [0388] 23. Pia de la Maza, M., *et al.* Acute nutritional and intestinal changes after pelvic radiation. *J Am Coll Nutr* **20**, 637-642 (2001).
- [0389] 24. Leiper, K. & Morris, A.I. Treatment of radiation proctitis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**, 724-729 (2007).
- [0390] 25. Denton, A.S., Andreyev, H.J., Forbes, A. & Maher, E.J. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. *Br J Cancer* **87**, 134-143 (2002).
- [0391] 26. Andreyev, J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* **54**, 1051-1054 (2005).
- [0392] 27. DeCosse, J.J., *et al.* The natural history and management of radiation induced injury of the gastrointestinal tract. *Ann Surg* **170**, 369-384 (1969).
- [0393] 28. Libotte, F., *et al.* Survival of patients with radiation enteritis of the small and the large intestine. *Acta Chir Belg* **95**, 190-194 (1995).
- [0394] 29. Galland, R.B. & Spencer, J. The natural history of clinically established radiation enteritis. *Lancet* **1**, 1257-1258 (1985).
- [0395] 30. Classen, J., *et al.* Radiation-induced gastrointestinal toxicity. Pathophysiology, approaches to treatment and prophylaxis. *Strahlenther Onkol* **174 Suppl 3**, 82-84 (1998).
- [0396] 31. Donaldson, S.S., *et al.* Radiation enteritis in children. A retrospective review, clinicopathologic correlation, and dietary management. *Cancer* **35**, 1167-1178 (1975).
- [0397] 32. Voitk, A.J., Brown, R.A., McArdle, A.H., Hinchey, E.J. & Gurd, F.N. Clinical uses of an

elemental diet: preliminary studies. *Can Med Assoc J* **107**, 123-129 (1972).

- [0398] 33. Klimberg, V.S., *et al.* Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* **66**, 62-68 (1990).
- [0399] 34. Klimberg, V.S., *et al.* Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg* **125**, 1040-1045 (1990).
- [0400] 35. Jensen, J.C., *et al.* Prevention of chronic radiation enteropathy by dietary glutamine. *Ann Surg Oncol* **1**, 157-163 (1994).
- [0401] 36. Kozelsky, T.F., *et al.* Phase III double-blind study of glutamine versus placebo for the prevention of acute diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy. *J Clin Oncol* **21**, 1669-1674 (2003).
- [0402] 37. Silvain, C., *et al.* Long-term outcome of severe radiation enteritis treated by total parenteral nutrition. *Dig Dis Sci* **37**, 1065-1071 (1992).
- [0403] 38. Ekelund, M., Kristensson, E. & Ekblad, E. Total parenteral nutrition causes circumferential intestinal atrophy, remodeling of the intestinal wall, and redistribution of eosinophils in the rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* **52**, 1833-1839 (2007).
- [0404] 39. Jackson, W.D. & Grand, R.J. The human intestinal response to enteral nutrients: a review. *J Am Coll Nutr* **10**, 500-509 (1991).
- [0405] 40. Burrin, D.G., *et al.* Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough? *Am J Clin Nutr* **71**, 1603-1610 (2000).
- [0406] 41. Drucker, D.J., *et al.* Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide-2. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **23**, S98-100 (1999).
- [0407] 42. Niinikoski, H., *et al.* Onset of small intestinal atrophy is associated with reduced intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *J Nutr* **134**, 1467-1474 (2004).
- [0408] 43. Matheson, P.J., Wilson, M.A. & Garrison, R.N. Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* **93**, 182-196 (2000).
- [0409] 44. Nowicki, P.T., Stonestreet, B.S., Hansen, N.B., Yao, A.C. & Oh, W. Gastrointestinal blood flow and oxygen consumption in awake newborn piglets: effect of feeding. *Am J Physiol* **245**, G697-702 (1983).
- [0410] 45. van Goudoever, J.B., *et al.* Secretion of trophic gut peptides is not different in bolus- and continuously fed piglets. *J Nutr* **131**, 729-732 (2001).
- [0411] 46. Knickelbein, R., Aronson, P.S., Schron, C.M., Seifter, J. & Dobbins, J.W. Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO<sub>3</sub> exchange and mechanism of coupling. *The American Journal of Physiology* **249**, G236-245 (1985).
- [0412] 47. Field, M., Fromm, D. & McColl, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am J Physiol* **220**, 1388-1396 (1971).
- [0413] 48. Sellin, J.H. & DeSoignie, R. Rabbit proximal colon: a distinct transport epithelium. *Am J Physiol* **246**, G603-610 (1984).
- [0414] 49. Turnberg, L.A., Bieberdorf, F.A., Morawski, S.G. & Fordtran, J.S. Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum. *J Clin Invest* **49**, 557-567 (1970).
- [0415] 50. Bach, S.P., Renehan, A.G. & Potten, C.S. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* **21**, 469-476 (2000).
- [0416] 51. Kaur, P. & Potten, C.S. Cell migration velocities in the crypts of the small intestine after cytotoxic insult are not dependent on mitotic activity. *Cell Tissue Kinet* **19**, 601-610 (1986).

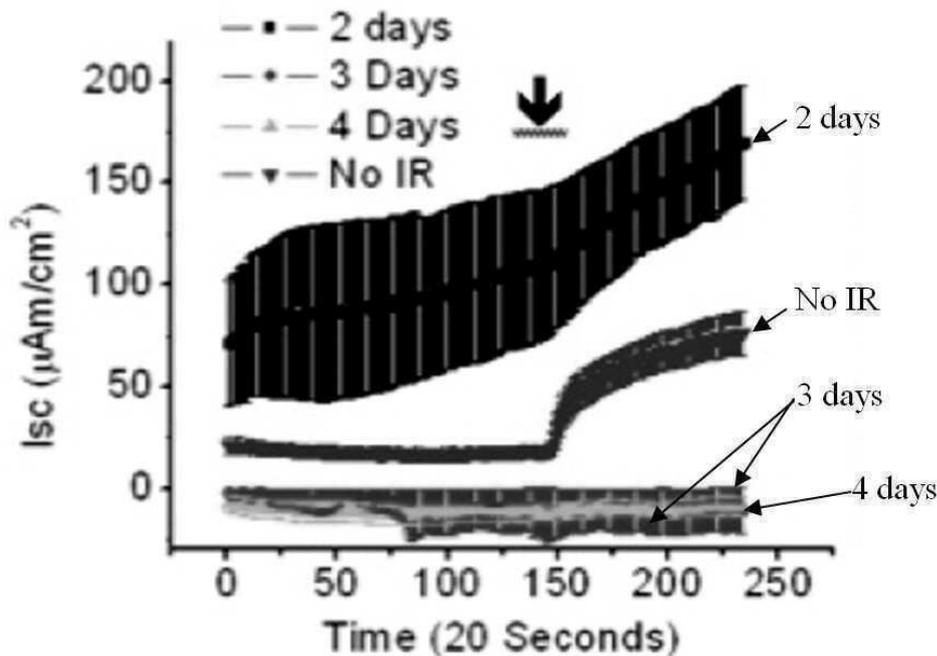
- [0417] 52. Qiu, J.M., Roberts, S.A. & Potten, C.S. Cell migration in the small and large bowel shows a strong circadian rhythm. *Epithelial Cell Biol* **3**, 137-148 (1994).
- [0418] 53. Al-Dewachi, H.S., Wright, N.A., Appleton, D.R. & Watson, A.J. The effect of a single injection of hydroxyurea on cell population kinetics in the small bowel mucosa of the rat. *Cell Tissue Kinet* **10**, 203-213 (1977).
- [0419] 54. Hendry, J.H., *et al.* The response of murine intestinal crypts to short-range promethium-147 beta irradiation: deductions concerning clonogenic cell numbers and positions. *Radiat Res* **118**, 364-374 (1989).
- [0420] 55. Okine, E.K., Glimm, D.R., Thompson, J.R. & Kennelly, J.J. Influence of stage of lactation on glucose and glutamine metabolism in isolated enterocytes from dairy cattle. *Metabolism* **44**, 325-331 (1995).
- [0421] 56. Alpers, D.H. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells? *Curr Opin Gastroenterol* **16**, 155 (2000).
- [0422] 57. Wu, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* **128**, 1249-1252 (1998).
- [0423] 58. Tome, D. & Bos, C. Lysine requirement through the human life cycle. *J Nutr* **137**, 1642S-1645S (2007).
- [0424] 59. Vayro, S., Lo, B. & Silverman, M. Functional studies of the rabbit intestinal Na<sup>+</sup>/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na<sup>+</sup>-activation of the carrier. *Biochem J* **332** ( Pt 1), 119-125 (1998).
- [0425] 60. Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E.M. Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13367-13370 (1996).
- [0426] 61. Benson, A.B., 3rd, *et al.* Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol* **22**, 2918-2926 (2004).
- [0427] 62. Mehta, D.I., Horvath, K., Chanasongram, S., Hill, I.D. & Panigrahi, P. Epidermal growth factor up-regulates sodium-glucose cotransport in enterocyte models in the presence of cholera toxin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **21**, 185-191 (1997).
- [0428] 63. Thomson, A.B., Cheeseman, C.I. & Walker, K. Late effects of abdominal radiation on intestinal uptake of nutrients. *Radiat Res* **107**, 344-353 (1986).
- [0429] 64. Porteous, J.W. Intestinal metabolism. *Environ Health Perspect* **33**, 25-35 (1979).
- [0430] 65. Balda, M.S. & Matter, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* **19**, 2024-2033 (2000).
- [0431] 66. Stefani, E. & Cereijido, M. Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK). *J Membr Biol* **73**, 177-184 (1983).
- [0432] 67. Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., Lazaro, A. & Cereijido, M. Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *J Membr Biol* **107**, 43-56 (1989).
- [0433] 68. Souba, W.W., Scott, T.E. & Wilmore, D.W. Intestinal consumption of intravenously administered fuels. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **9**, 18-22 (1985).
- [0434] 69. Cardona Pera, D. [Administration of glutamine and its dipeptides in parenteral nutrition. Which patients are candidates?]. *Nutr Hosp* **13**, 8-20 (1998).
- [0435] 70. Joiner, W.J., *et al.* Active K<sup>+</sup> secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G185-196 (2003).
- [0436] 71. Vidyasagar, S. & Ramakrishna, B.S. Effects of butyrate on active sodium and chloride transport

in rat and rabbit distal colon. *J Physiol (Lond)* **539**, 163-173 (2002).

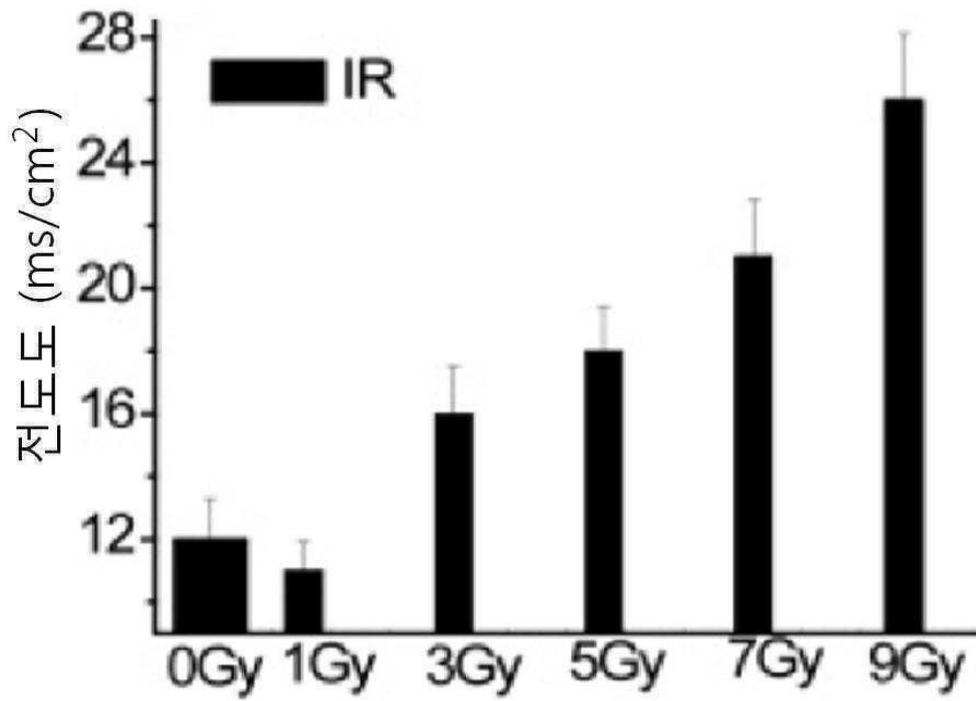
- [0437] 72. Vidyasagar, S., Barmeyer, C., Geibel, J., Binder, H.J. & Rajendran, V.M. Role of Short-Chain Fatty Acids in Colonic HCO<sub>3</sub> Secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G1217-1226 (2005).
- [0438] 73. Vidyasagar, S., Rajendran, V.M. & Binder, H.J. Three distinct mechanisms of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C612-621 (2004).
- [0439] 74. Zhang, H., Ameen, N., Melvin, J.E. & Vidyasagar, S. Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol* **581**, 1221-1233 (2007).
- [0440] 75. Hopfer, U., Nelson, K., Perrotto, J. & Isselbacher, K.J. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *J Biol Chem* **248**, 25-32 (1973).
- [0441] 76. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- [0442] 77. Heath, J.P. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* **20**, 139-146 (1996).
- [0443] 78. Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* **22**, 659-661 (2008).

도면

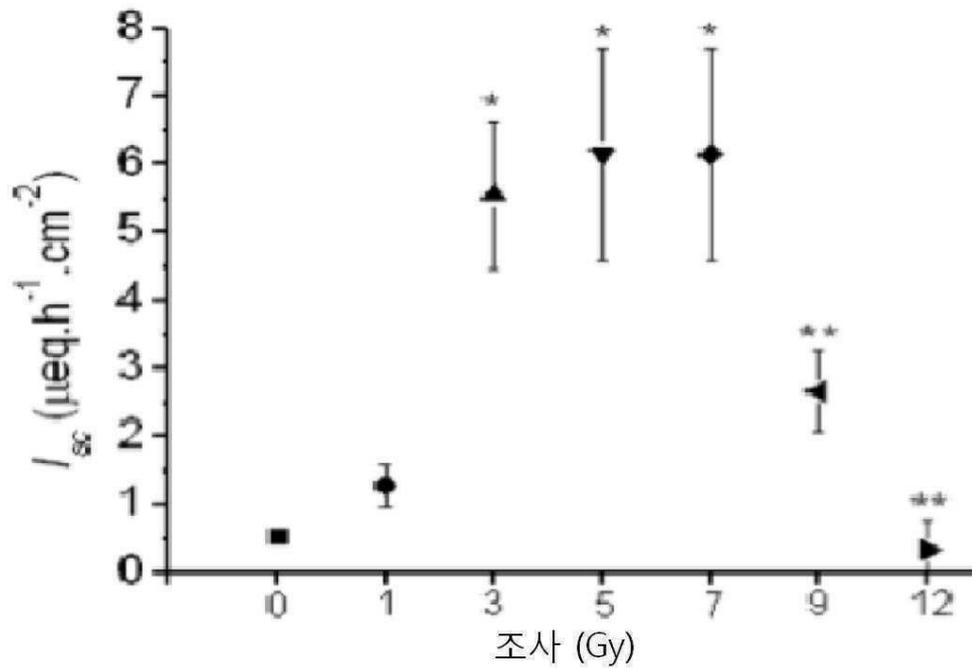
도면1a



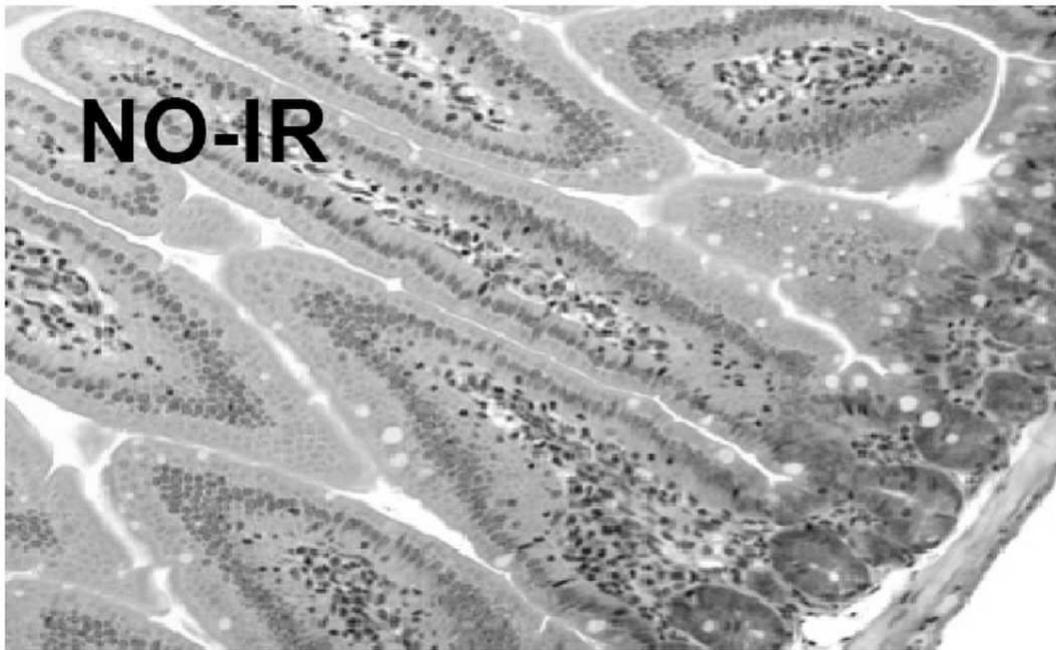
도면1b



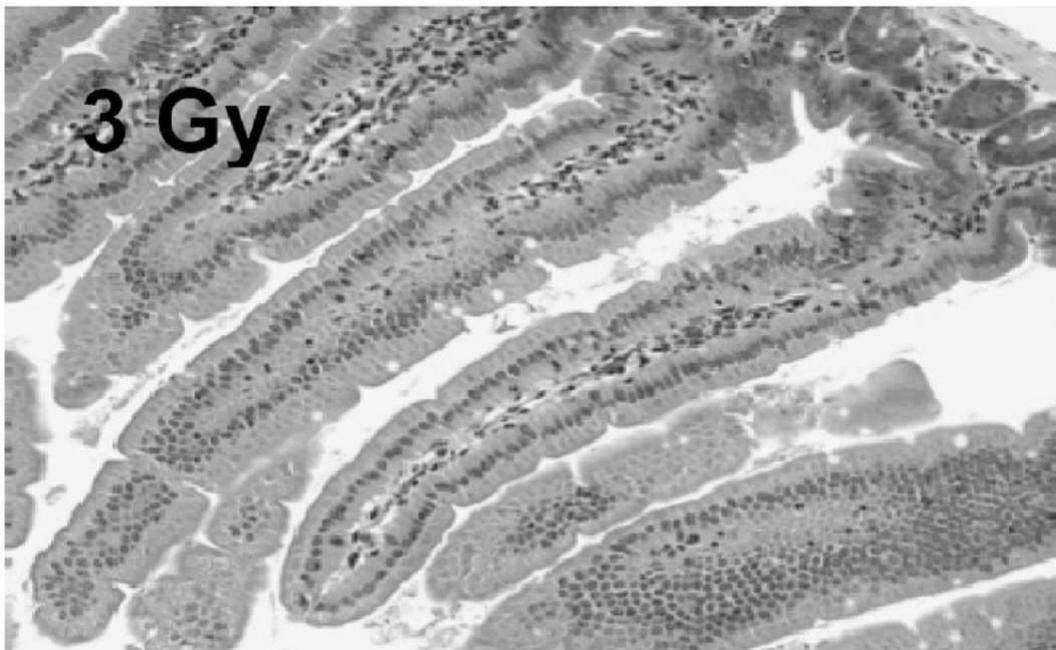
도면2a



도면2b



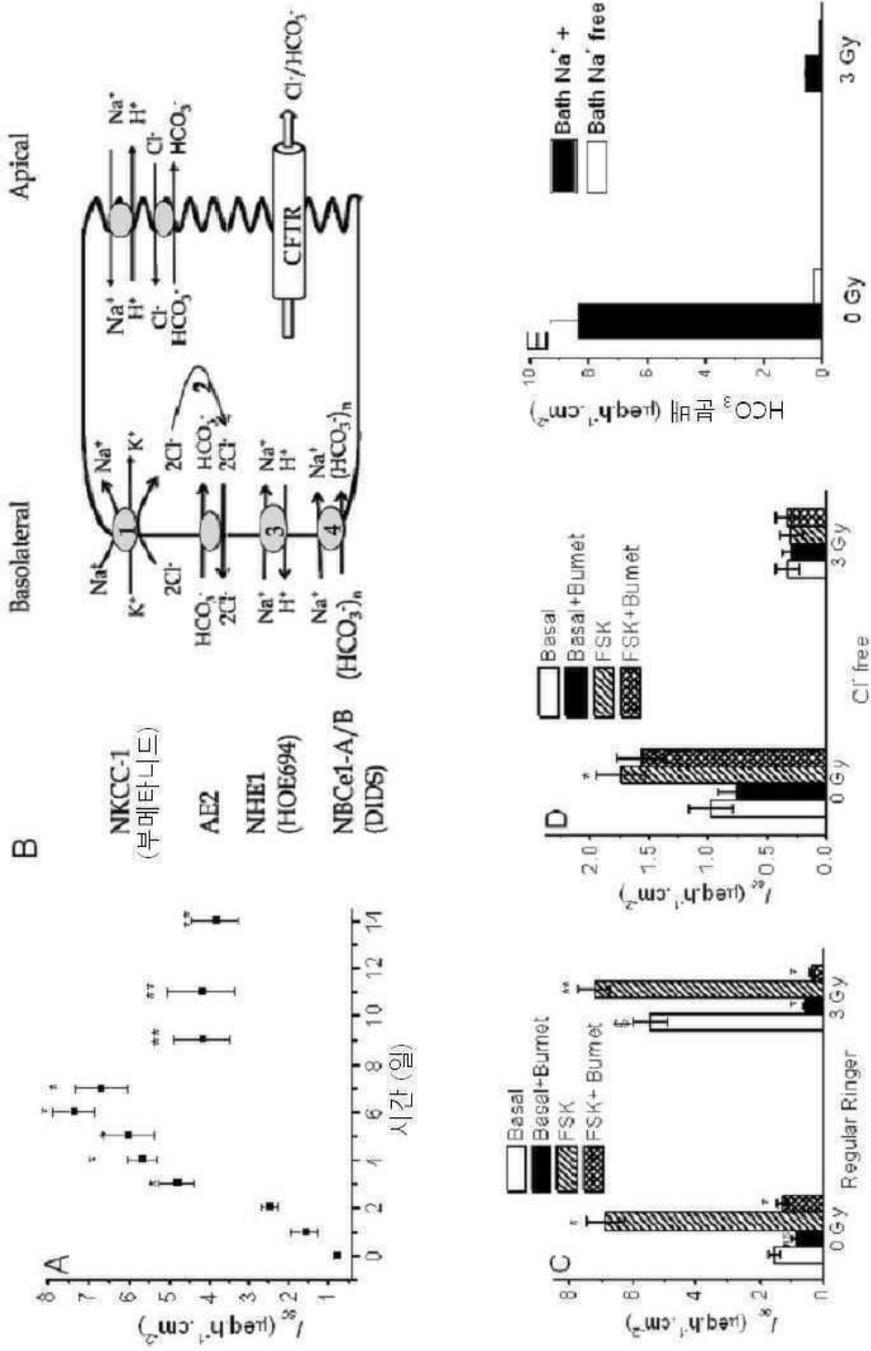
도면2c



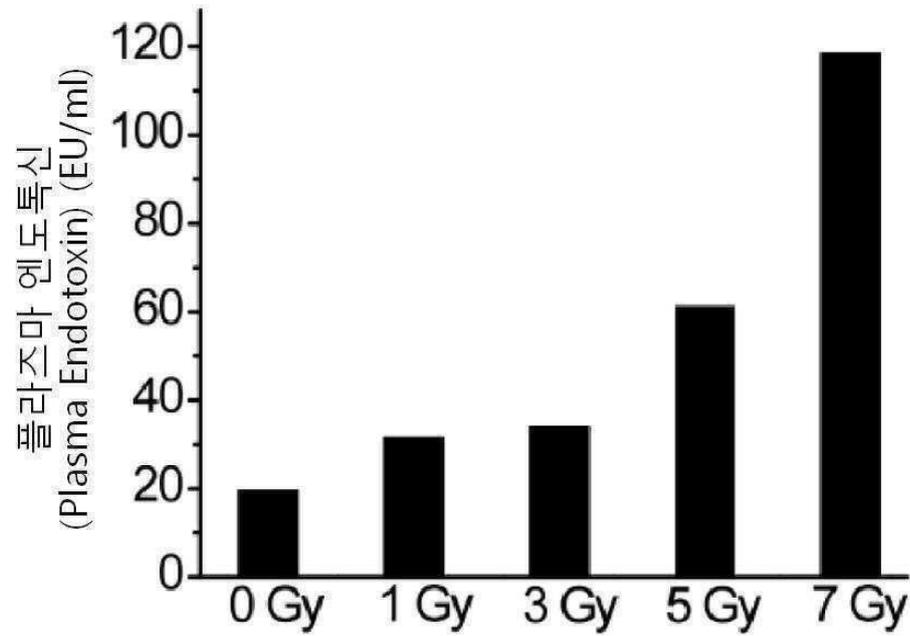
도면2d



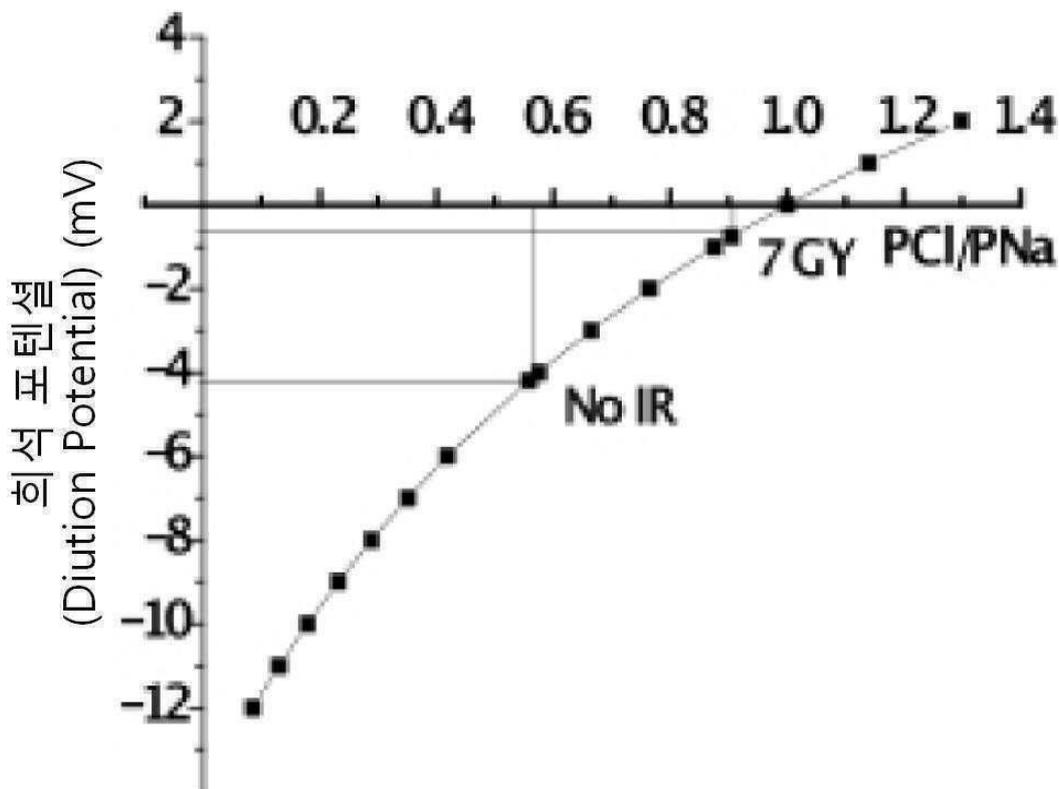
도면3



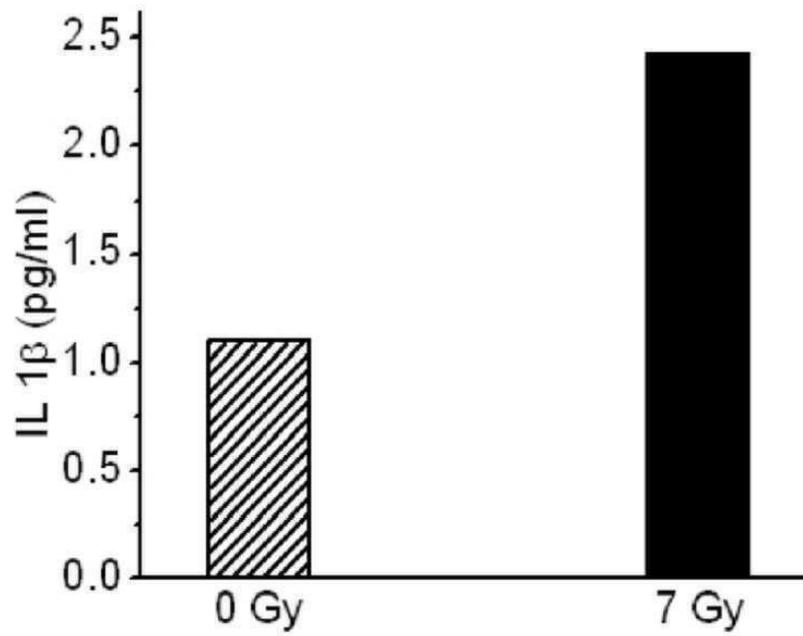
도면4a



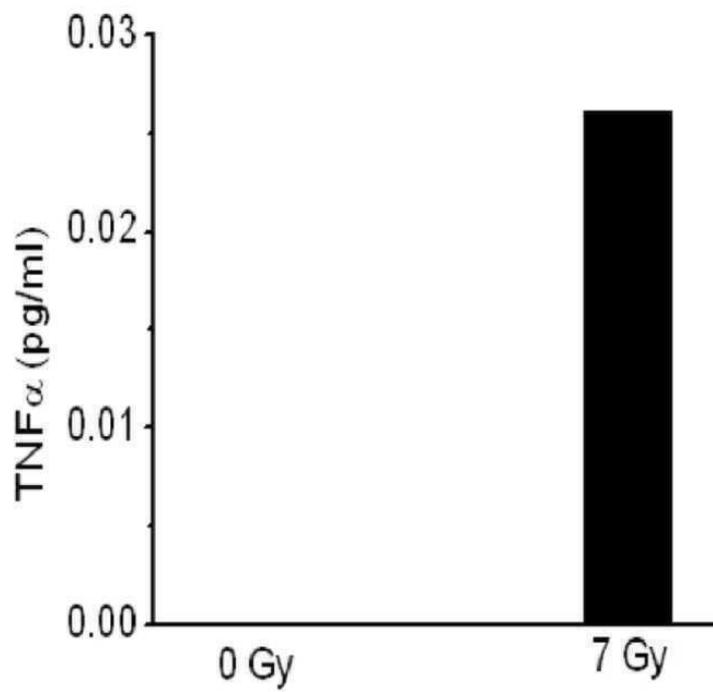
도면4b



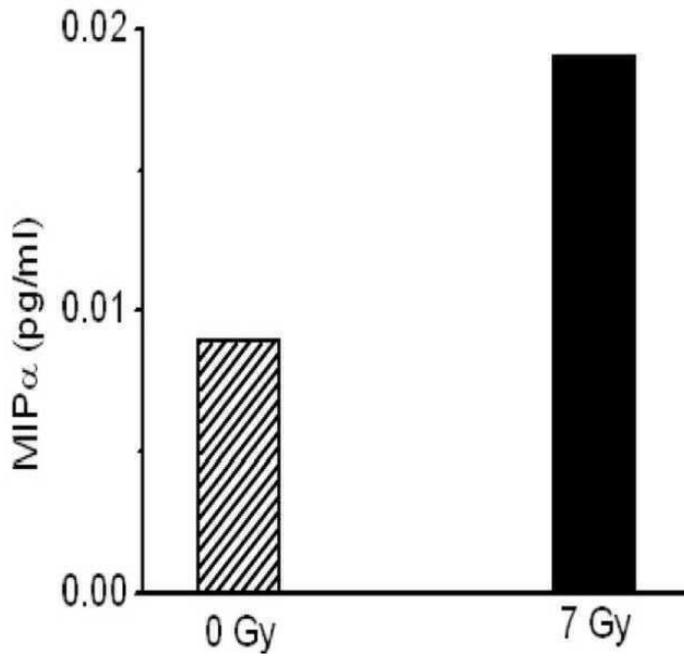
도면5a



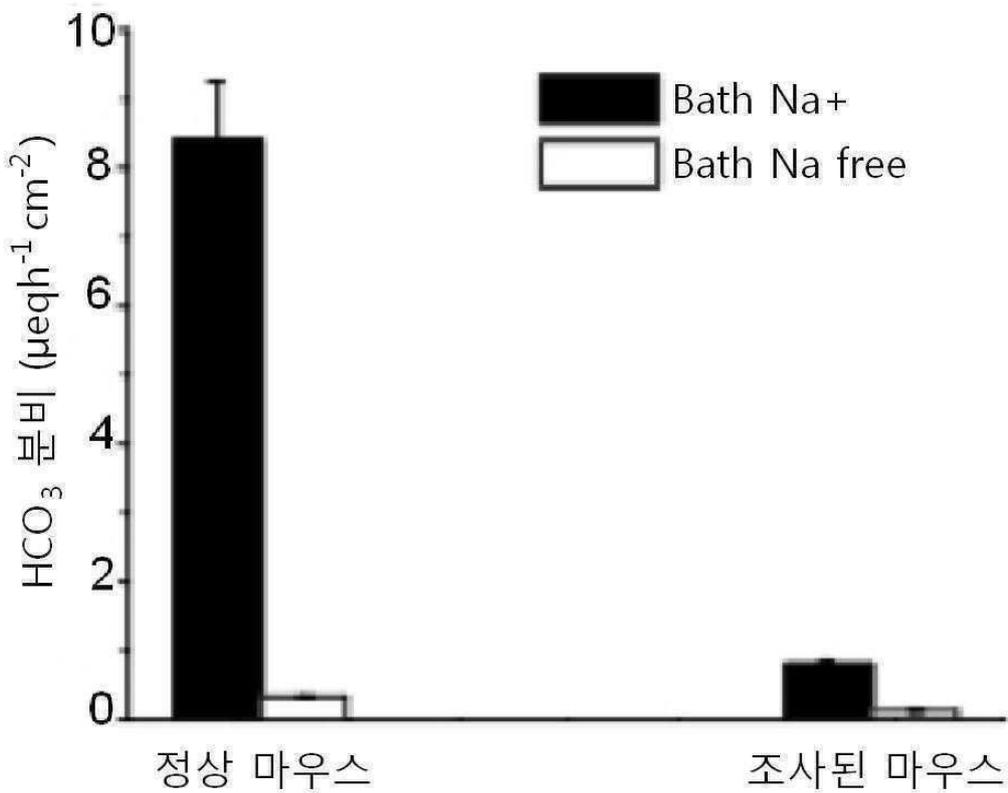
도면5b



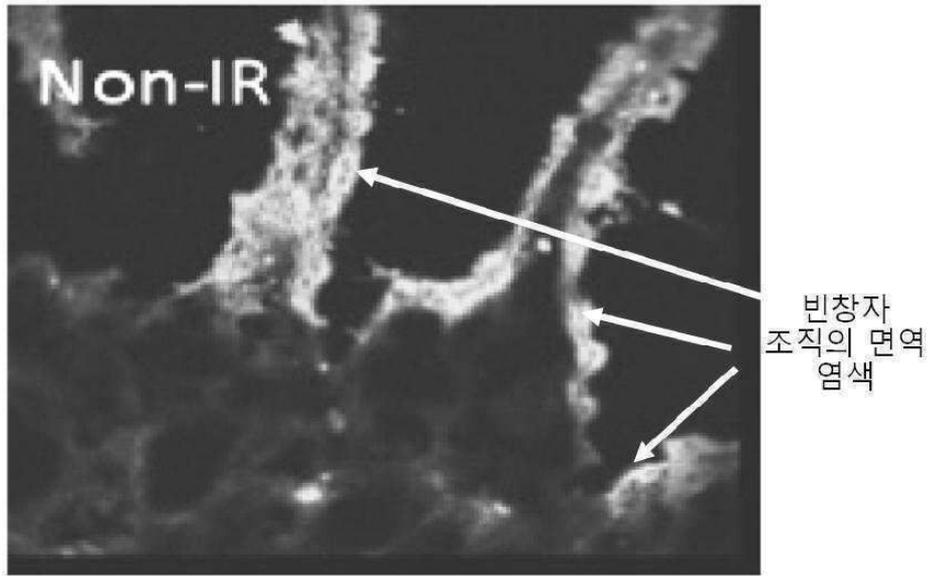
도면5c



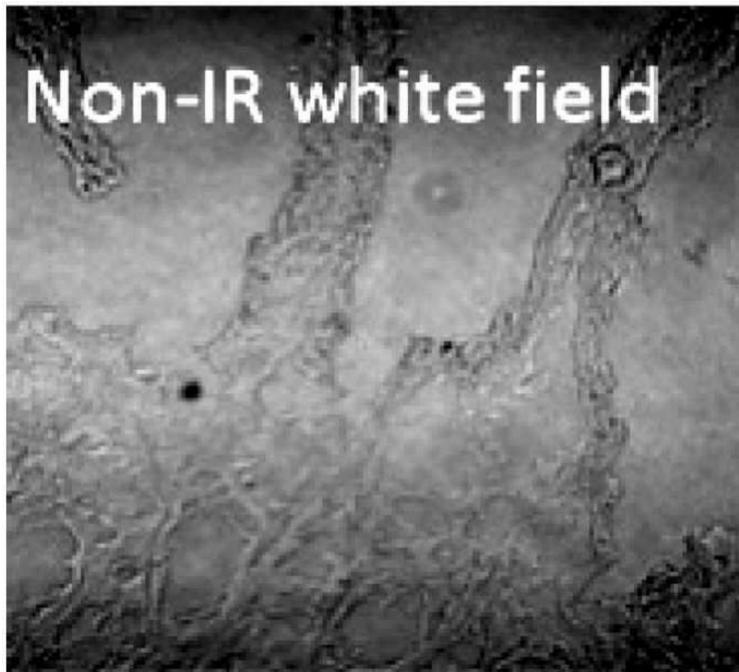
도면6a



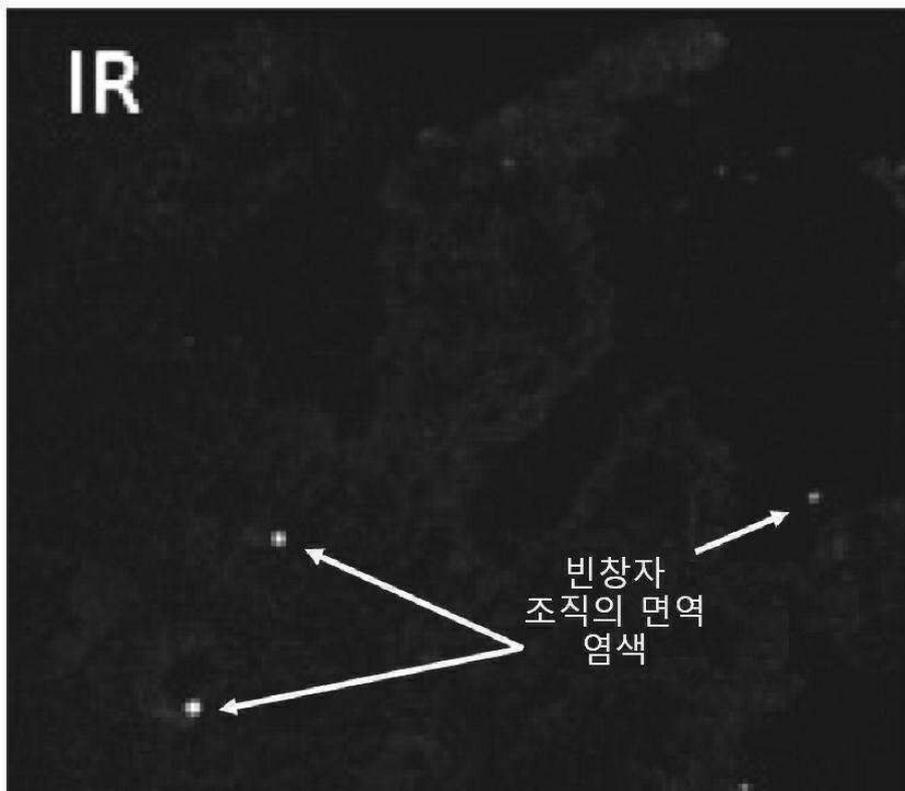
도면6b



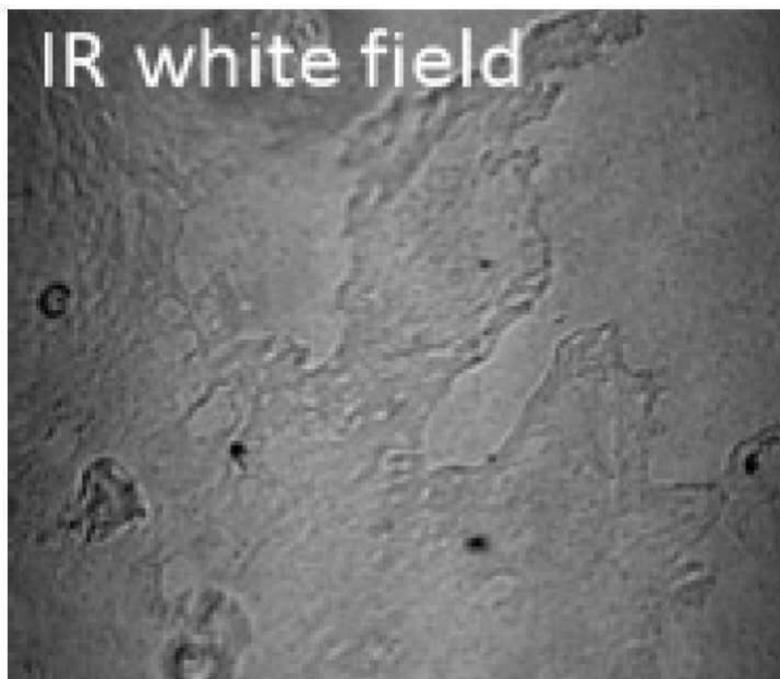
도면6c



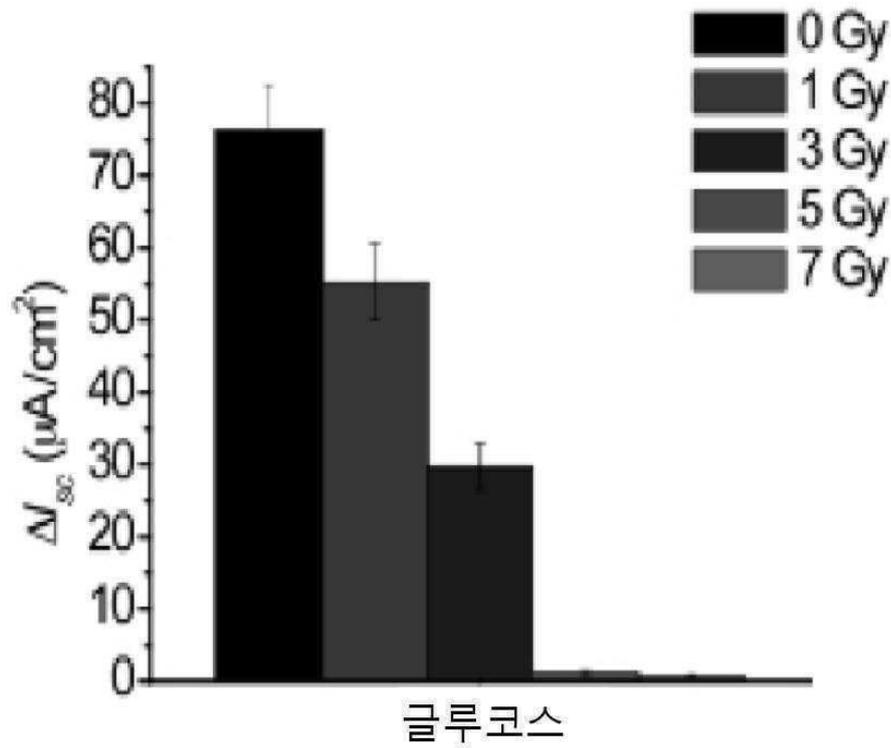
도면6d



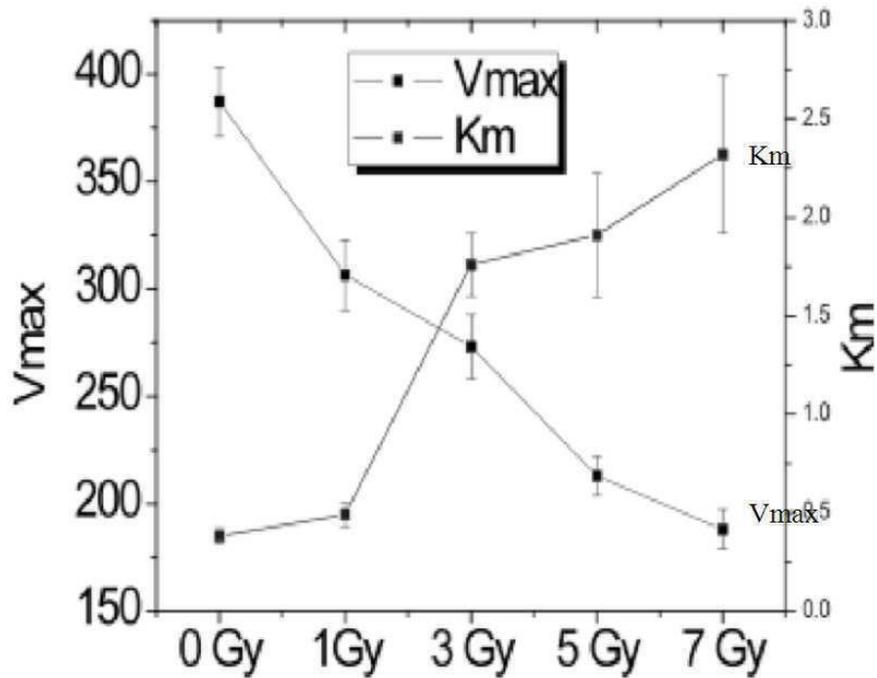
도면6e



도면7a

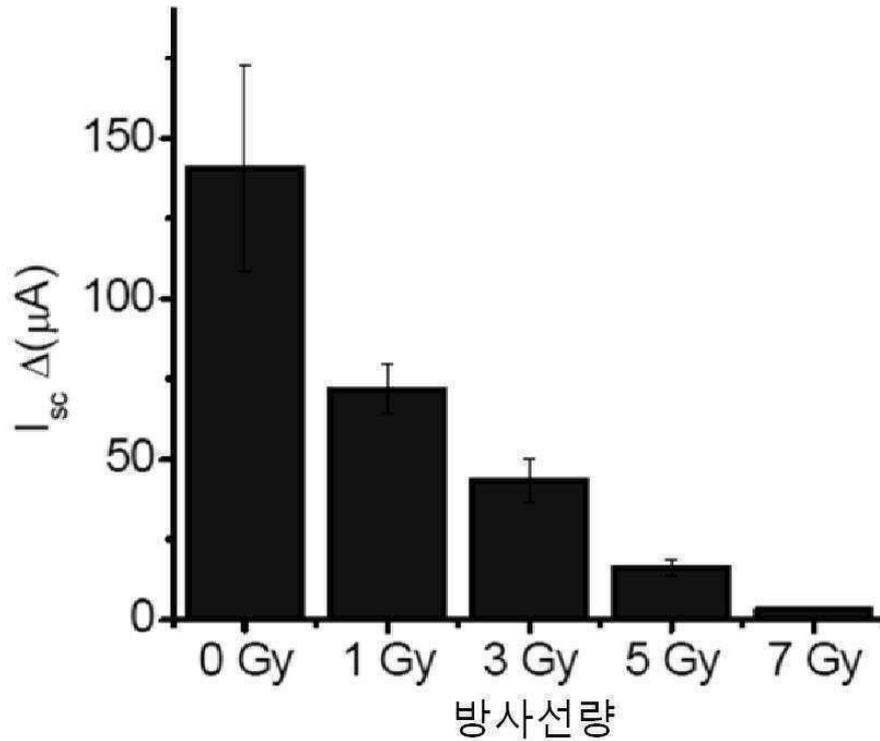


도면7b



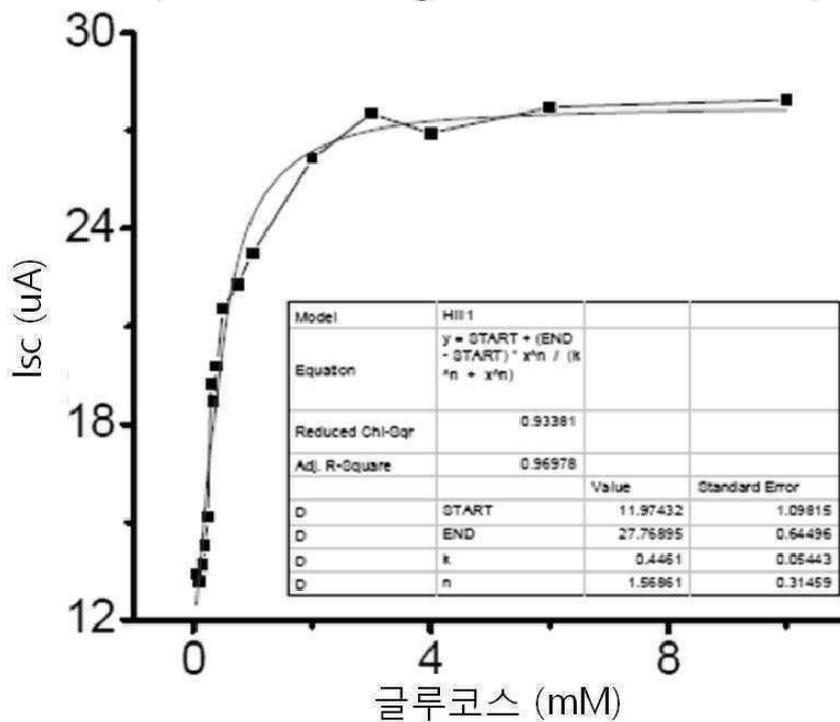
도면8

스위스 마우스에 상이한 방사선 투여 후의  
글루코스-자극된 흐름( $\Delta$ )에서의 변화

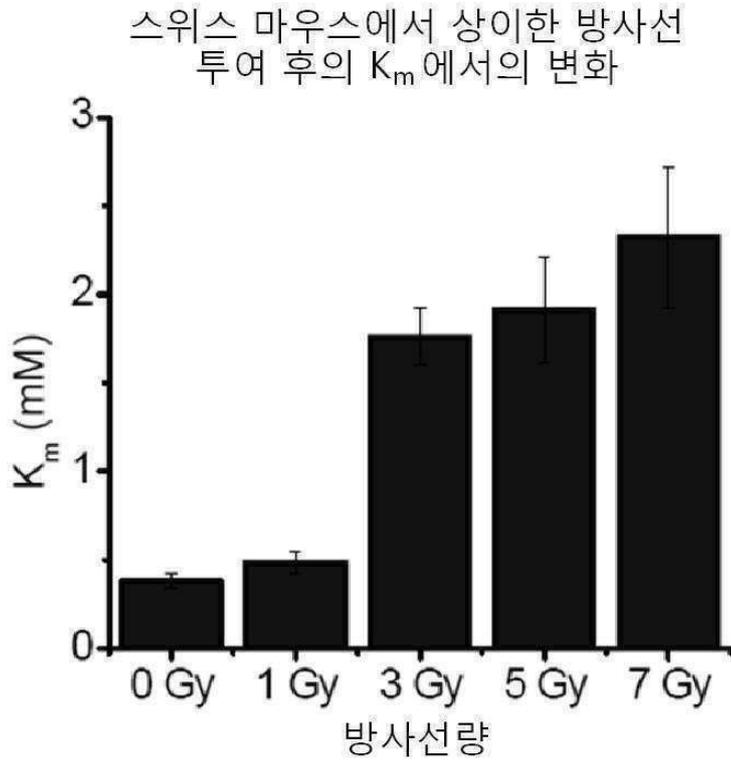


도면9a

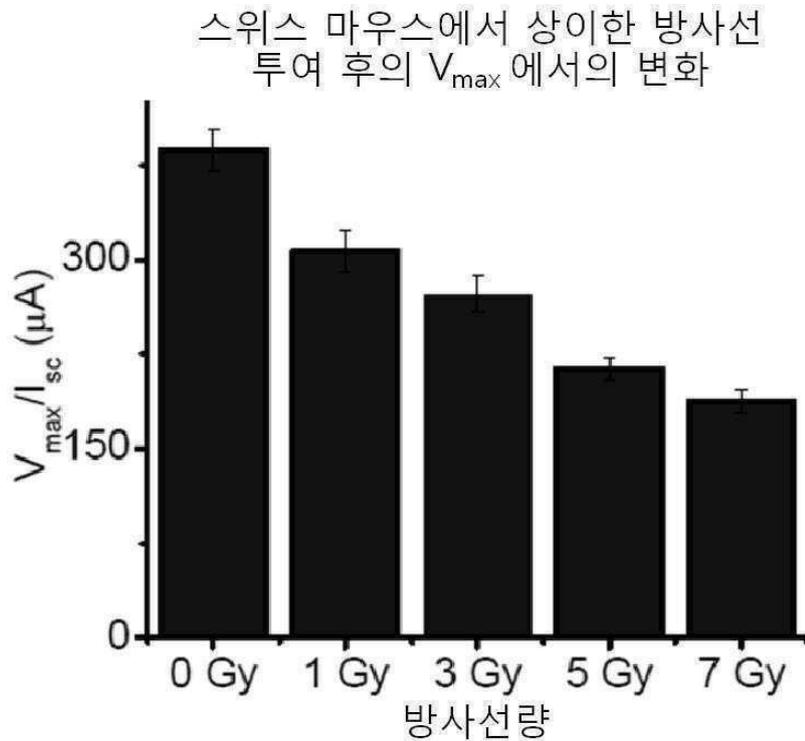
정상 조직 글루코스 포화된 곡선  
(Normal tissue glucose saturated curve)



도면9b

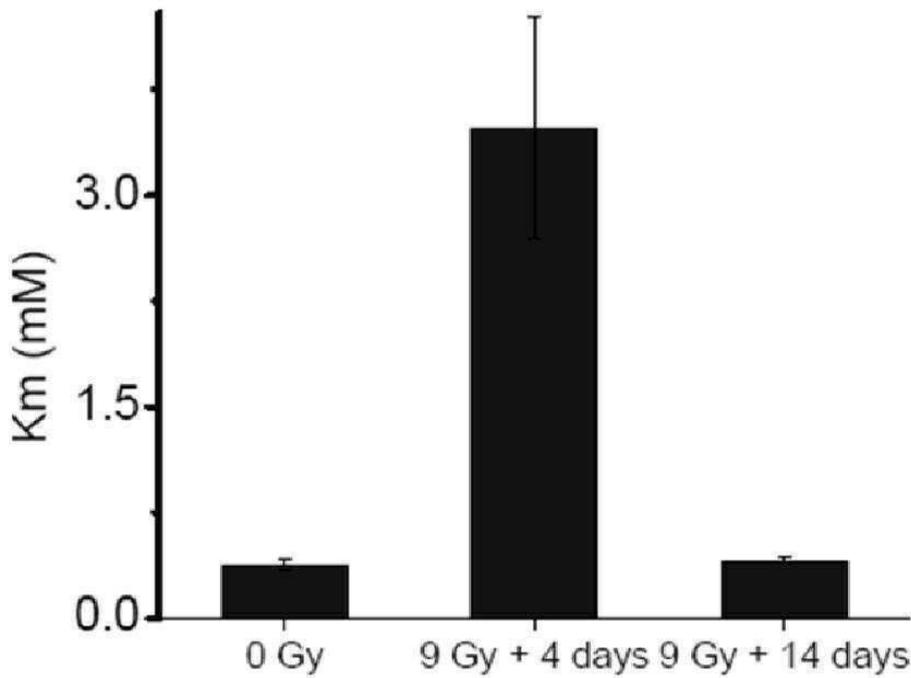


도면10



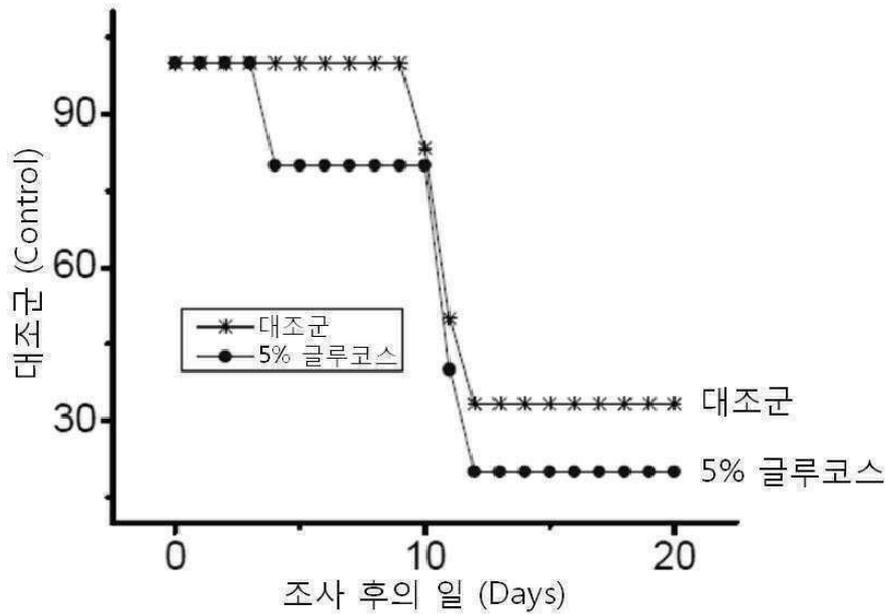
도면11

9Gy 조사 후 상이한 시간에서  $K_m$ 에서의 변화

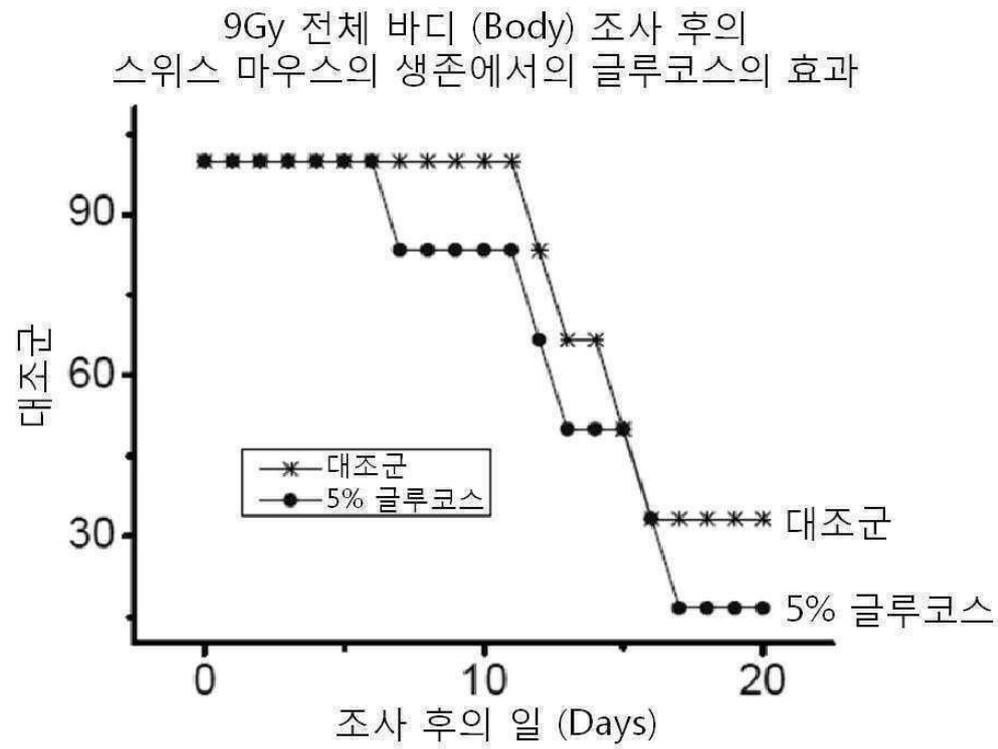


도면12a

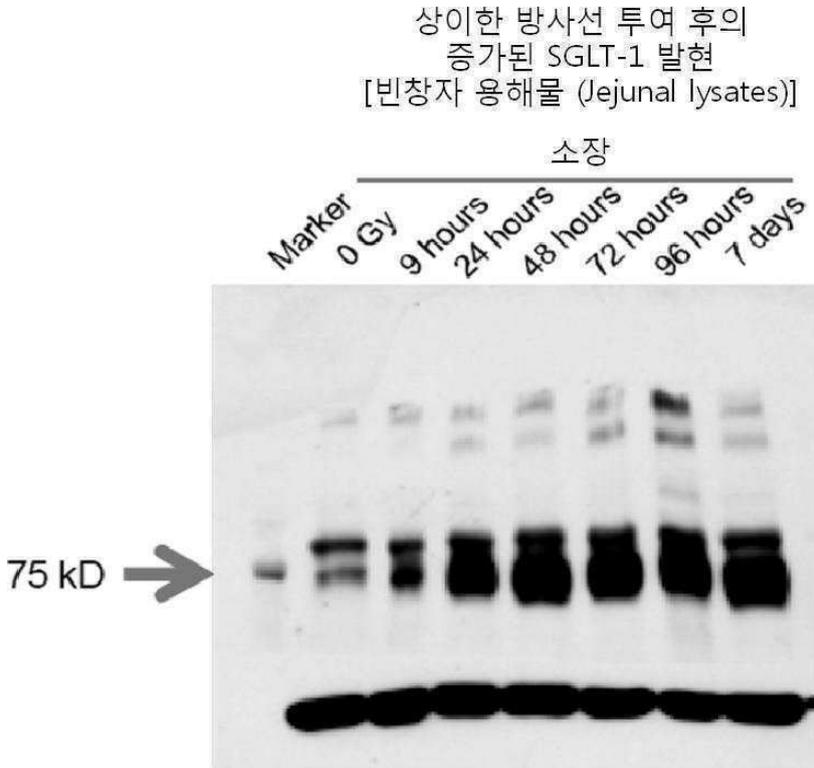
16Gy 서브-토탈 바디(Sub-total body) 조사 후의 스위스 마우스의 생존에서의 글루코스의 효과



도면12b

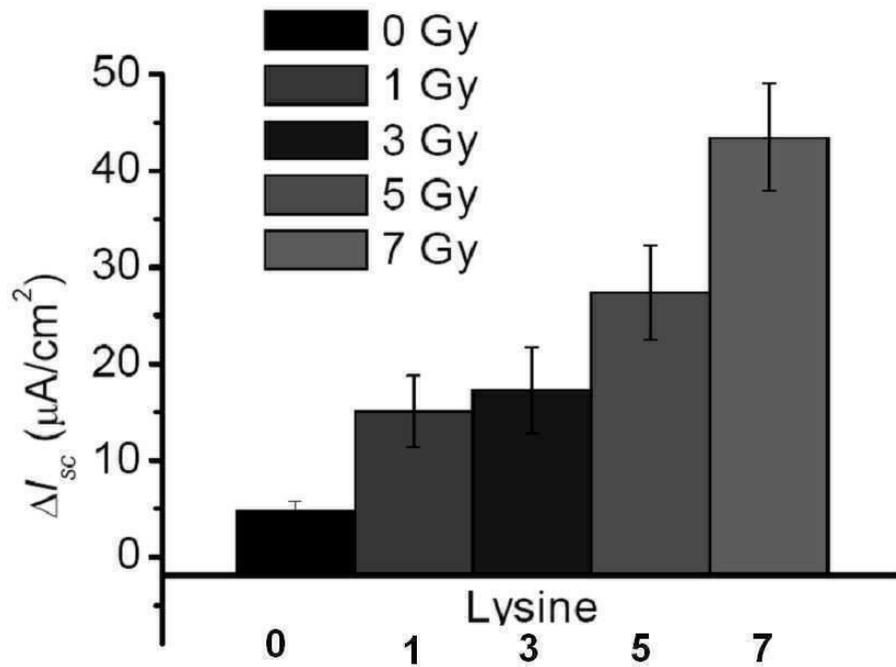


도면13

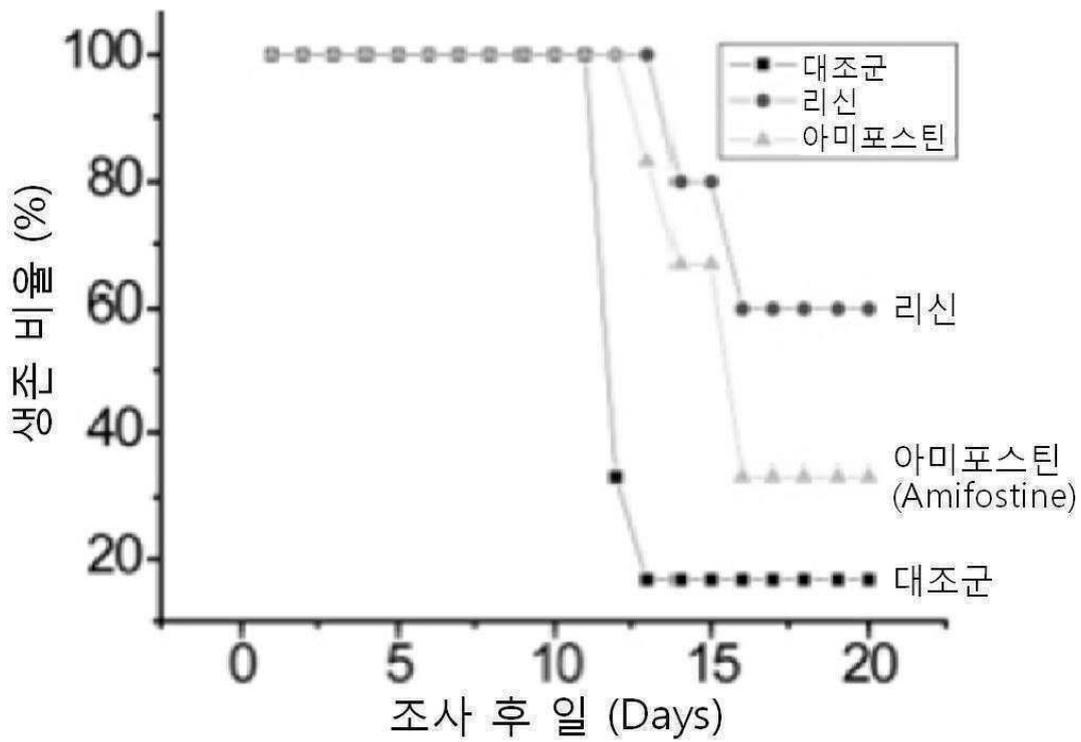




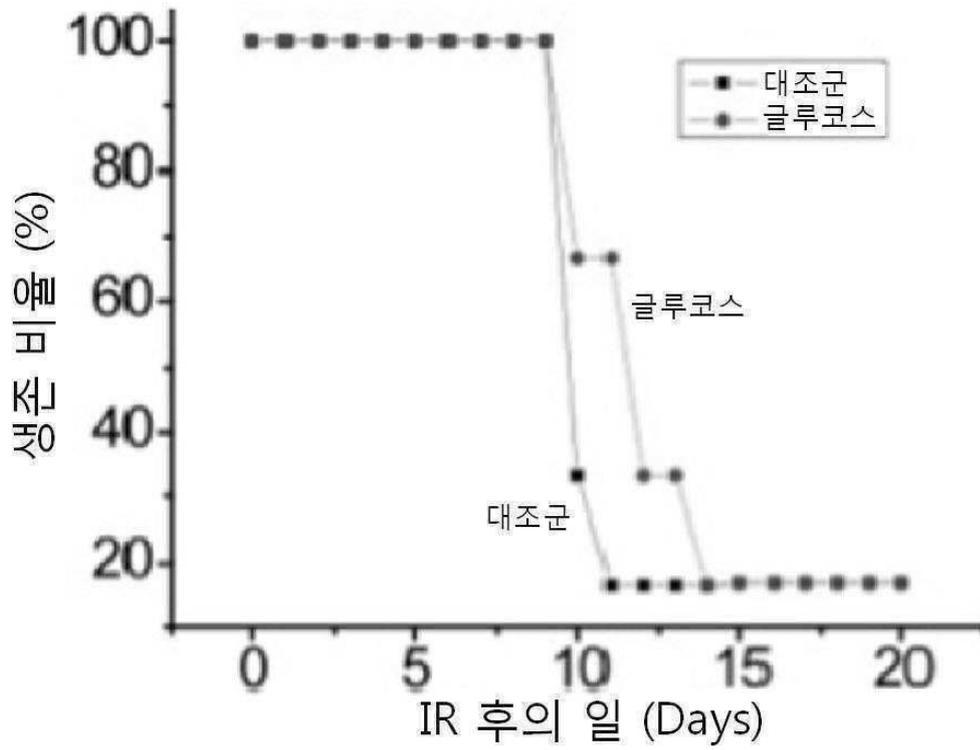
도면16



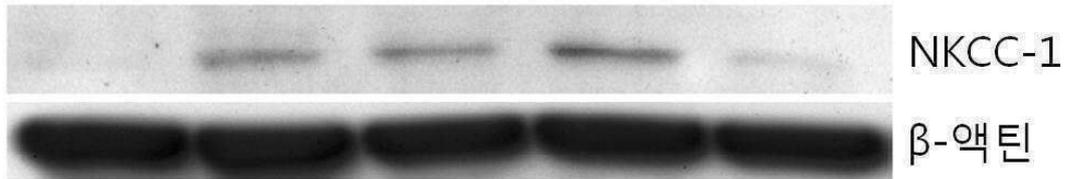
도면17a



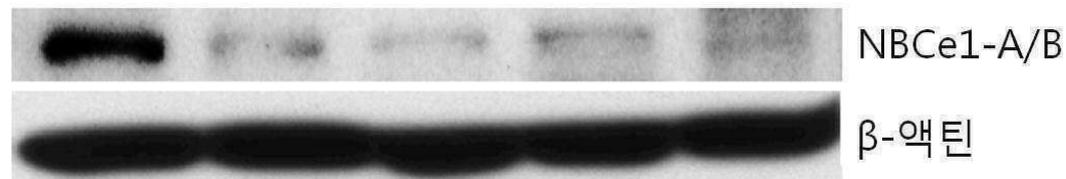
도면17b



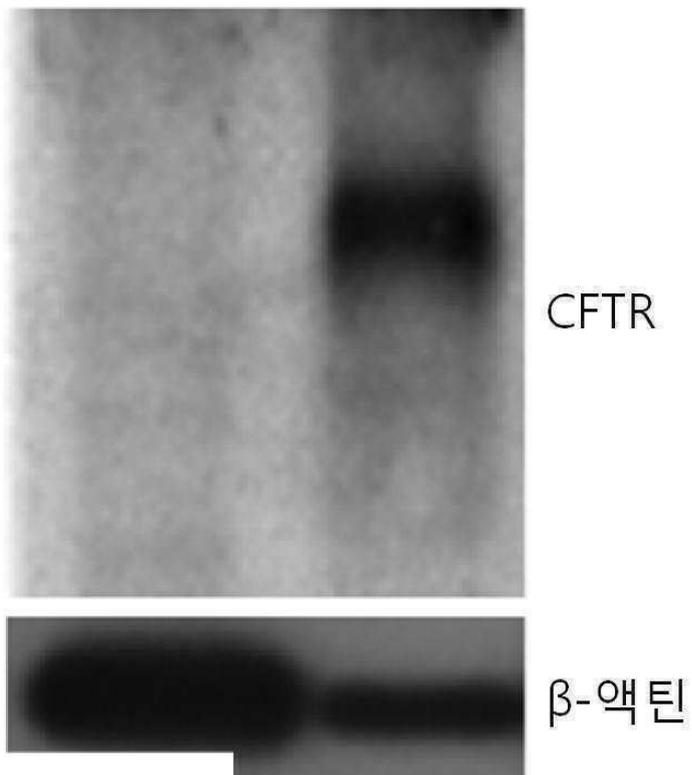
도면18a



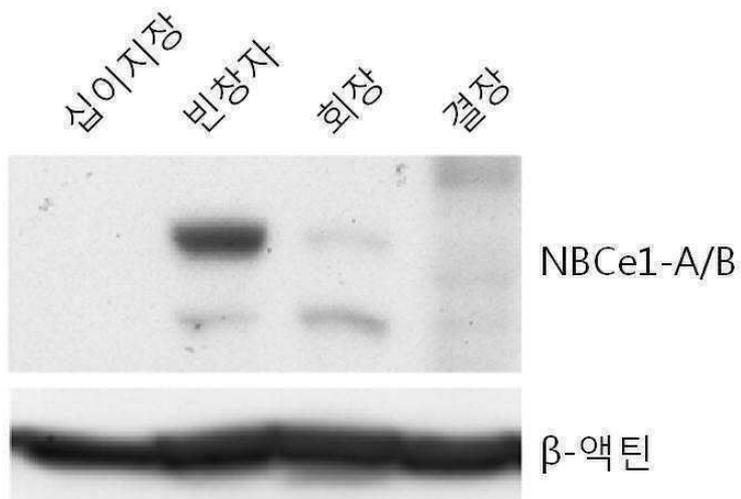
도면18b



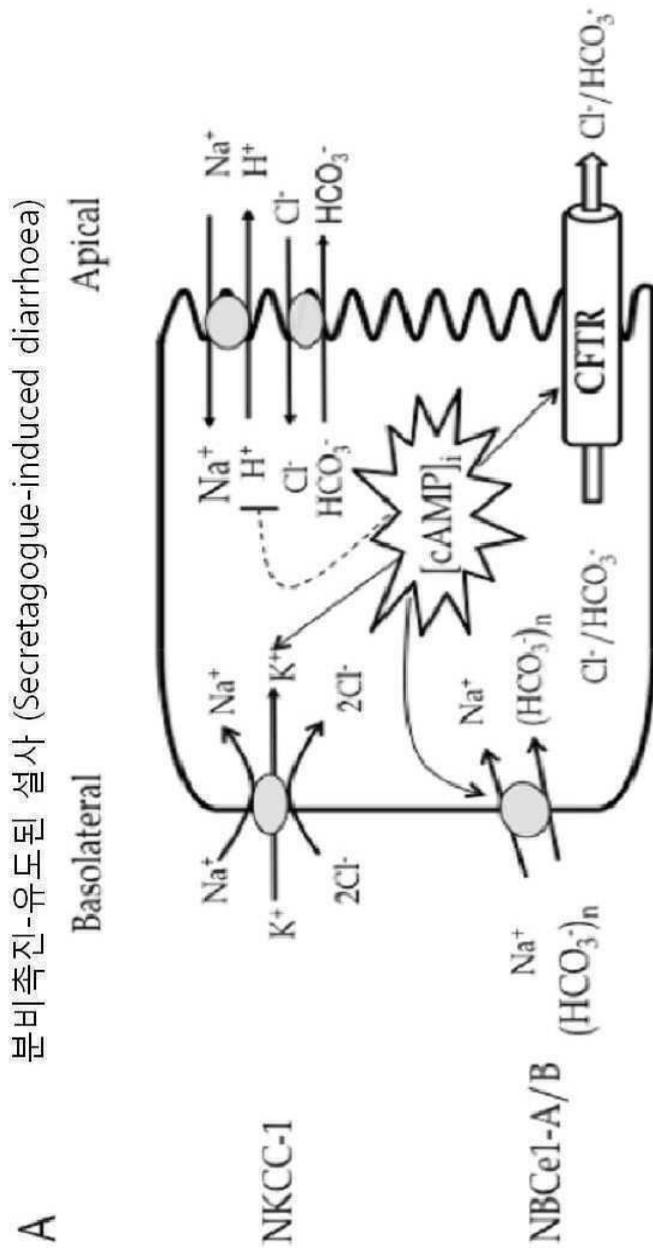
도면18c



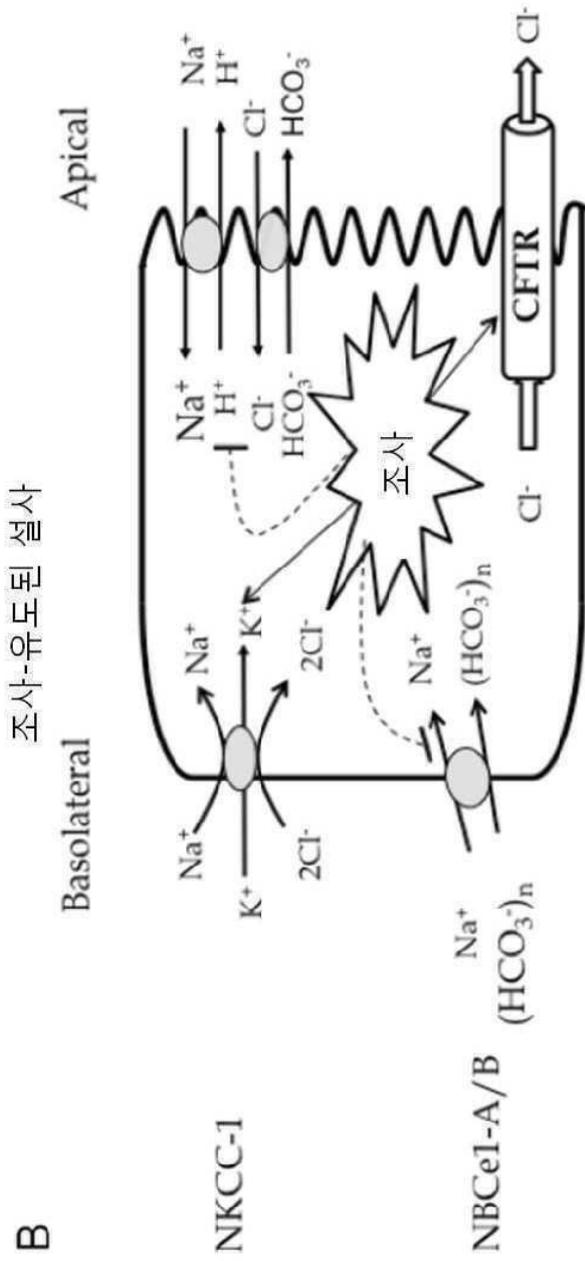
도면18d



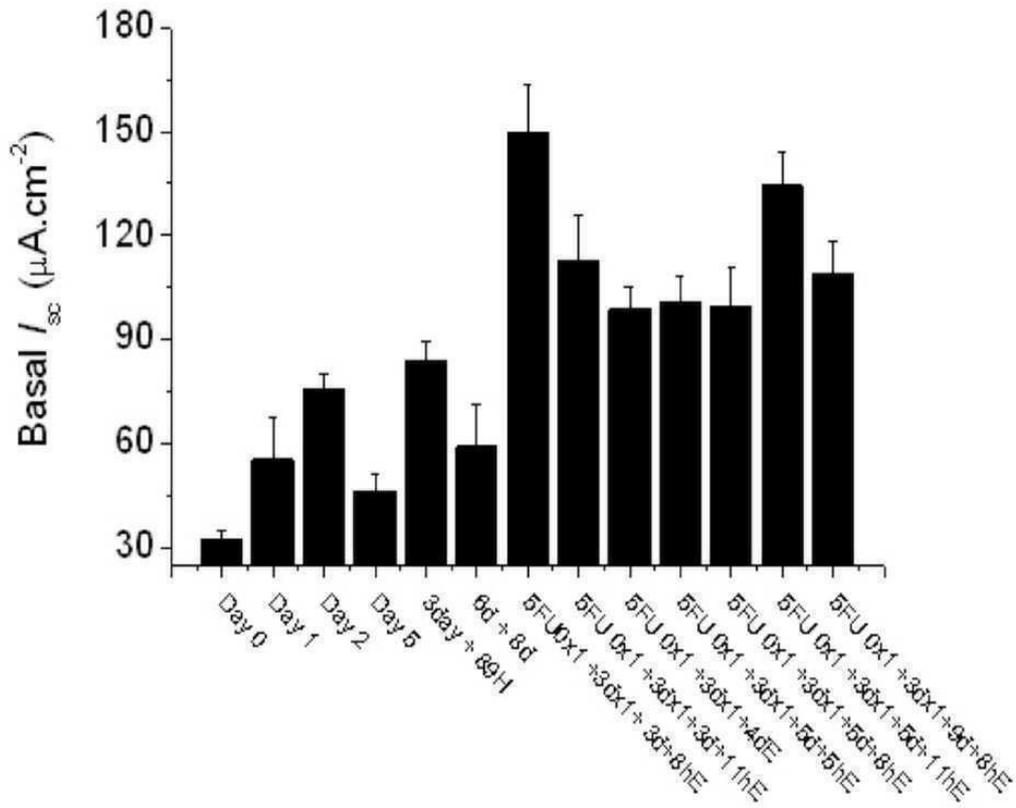
도면19a



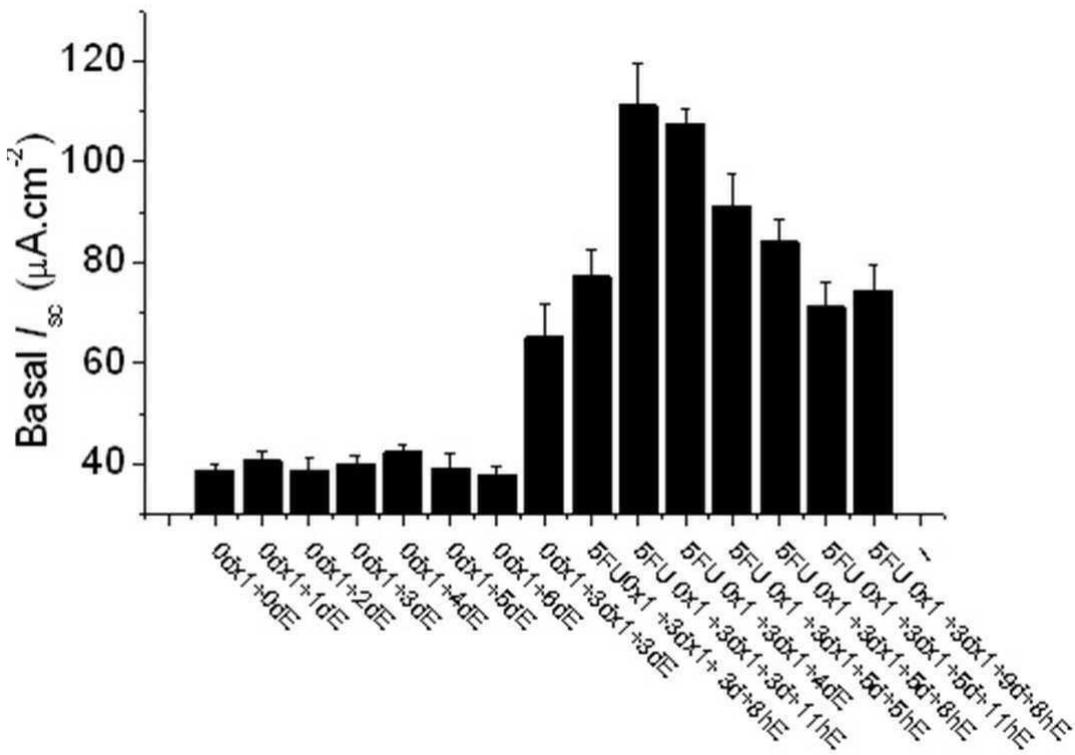
도면19b



도면20a

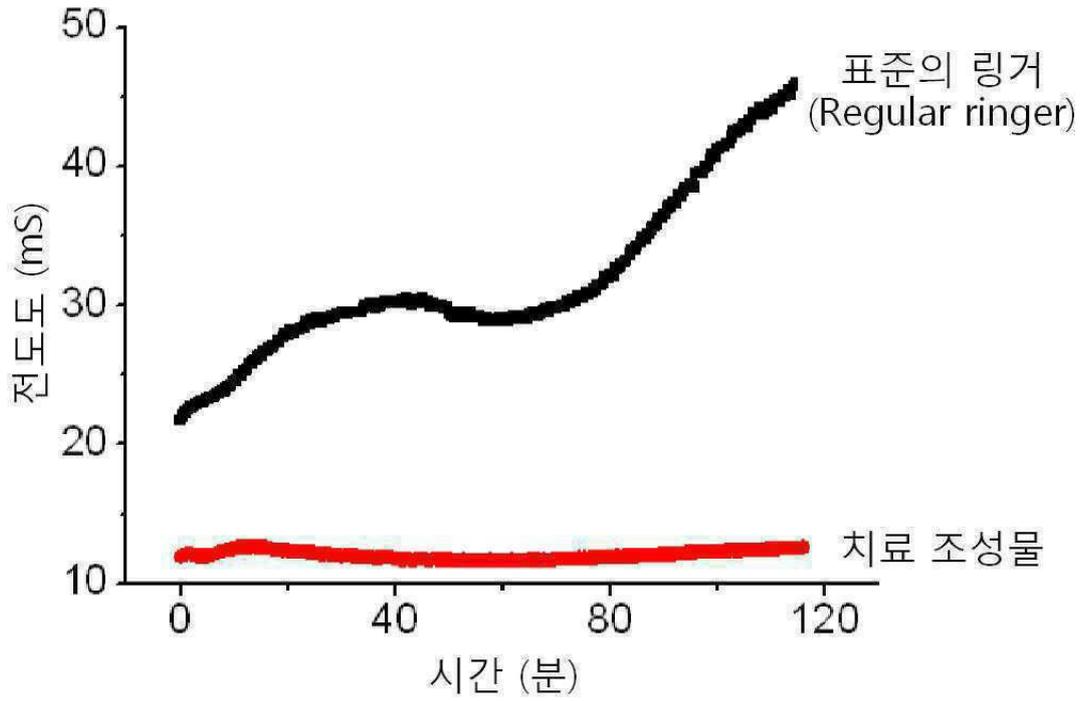


도면20b



도면21a

상이한 조성물에서 기록된  $I_{sc}$  의 기록



도면21b

