



등록특허 10-2293438



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월25일
(11) 등록번호 10-2293438
(24) 등록일자 2021년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A61B 5/03* (2006.01)
A61B 5/24 (2021.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 49/00 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
G01N 27/26 (2006.01) *G01N 3/12* (2006.01)
G06T 17/00 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
A61B 5/03 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7007682
- (22) 출원일자(국제) 2013년09월03일
심사청구일자 2018년06월05일
- (85) 번역문제출일자 2015년03월26일
- (65) 공개번호 10-2015-0048201
- (43) 공개일자 2015년05월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/068202
- (87) 국제공개번호 WO 2014/033330
국제공개일자 2014년03월06일
- (30) 우선권주장
61/696,277 2012년09월03일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌

R Wu et al., 'SPATIOTEMPORAL MAPS OF EX VIVO PERISTALSIS REVEAL DETAILS OF PROBIOTIC EFFECTS ON MOUSE JEJUNUM MOTILITY' , Canadian Journal of Gastroenterology, 2012, Vol. 26, page 526.

B.Wang et al., The FASEB Journal, Vol. 24, No. 10, 2010, pp. 4078-4088.

B.Wang et al., Neurogastroenterology & Motility, Vol. 22, No. 1, 2010, pp. 98-107.

Lammers et al., Biomedical Engineering Online, Vol. 7, No. 2, 2008, pp. 1-11.

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이민영

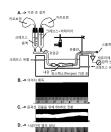
(54) 발명의 명칭 장 운동 질환 및 통증에 영향을 주는 작용제의 선별을 위한 방법

(57) 요약

뇌와 교신하는 GI 관의 근육계 및 신경과 관련된 별개의 방법론적 부분을 이용하여, 상이한 장 운동 질환의 치료를 위한 작용제를 평가하기 위한 방법이 제공된다. 특히, 본 발명은 장 운동 질환의 치료에 효과적인 작용제의 선별을 위한 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 다음을 포함한다:

(뒷면에 계속)

대 표 도



a) 위장 운동에 미치는 상기 작용제의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 시공간 (ST) 맵핑(mapping)의 단계; 및

b) 장간막 구심성 신경 빌화에 미치는 상기 작용제의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 생체외 신경 다발 기록의 단계. 본 발명의 방법에 의해 선별된 박테리아 균주 및 장 운동 질환의 치료에서 박테리아 균주의 용도가 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61B 5/24 (2021.01)

A61K 35/74 (2013.01)

A61K 35/747 (2013.01)

A61K 49/0004 (2013.01)

C12N 1/20 (2021.05)

G01N 27/26 (2020.05)

G01N 3/12 (2020.05)

G06T 17/00 (2013.01)

C12R 2001/225 (2021.05)

명세서

청구범위

청구항 1

이동성 복합 운동 (MMC) 빈도, MMC 속도를 증가시키고, 장간막 구심성 신경 발화(mesenteric afferent nerve firing)를 감소시키는 세균 균주에 있어서, 이때 상기 세균 균주는 DSMZ 기탁 번호. DSM 17938의 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)인, 박테리아 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면, 통증 신호 전달을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면 위장 운동성을 증가시키고, 이로 인하여 전술한 개체의 내장을 통하여 물질의 통과 시간을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 전술한 개체의 내장을 통한 물질의 통과 시간 감소는 전술한 개체에서 변비 또는 산통을 치료, 또는 발달의 위험을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 5

청구항 1에 따른 박테리아 균주와 약제학적으로 수용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 장 운동 질환 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 따른 박테리아 균주와 식품 또는 식품 보충물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 장 운동 질환을 치료 또는 장 운동 질환 발달 위험을 감소시키는 용도의 식품 조성물.

청구항 8

이동성 복합 운동 (MMC) 빈도, MMC 속도 및 내강내 피크 압력을 증가시키고, 장간막 구심성 신경 발화(mesenteric afferent nerve firing)를 감소시키는 박테리아 균주에 있어서, 이때 상기 박테리아 균주는 DSMZ 기탁 번호. DSM 27123의 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 345A (LG345A)인, 박테리아 균주.

청구항 9

MMC 속도를 감소시키고, 장간막 구심성 신경 발화(mesenteric afferent nerve firing)를 감소시키는 박테리아 균주에 있어서, 이때 상기 박테리아 균주는 DSMZ 기탁 번호. DSM-27126의 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A (LG621A)인, 박테리아 균주.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면, 통증 신호 전달을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면 위장 운동성을 증가시키고, 이로 인하여 전술한 개체의 내장을 통하여 물질의 통과 시간을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면, 통증 신호 전달을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 박테리아 균주는 개체에게 투여되면 위장 운동성을 감소시키고, 이로 인하여 전술한 개체의 내장을 통하여 물질의 통과 시간을 증가시키는, 박테리아 균주.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 전술한 개체의 내장을 통한 물질의 통과 시간 감소는 전술한 개체에서 변비 또는 산통을 치료, 또는 발달의 위험을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 전술한 개체의 내장을 통한 물질의 통과 시간 증가는 전술한 개체에서 설사 또는 과민성 대장 증후군(IBS)을 치료하거나, 또는 이의 발달의 위험을 감소시키는, 박테리아 균주.

청구항 16

청구항 8에 따른 박테리아 균주와 약제학적으로 수용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 장 운동 질환 치료용 약학조성물.

청구항 17

청구항 8에 따른 박테리아 균주와 식품 또는 식품 보충물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 18

청구항 9에 따른 박테리아 균주와 약제학적으로 수용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 장 운동 질환 치료용 약학조성물.

청구항 19

청구항 9에 따른 박테리아 균주와 식품 또는 식품 보충물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 배경

[0002] 발명의 분야

[0003] 용어, 장 운동 질환은 통증, 변비 또는 설사와 종종 연관되는 비정상적인 장 수축에 해당된다. 이 구절은 내장이 적절하게 발달하지 않았거나 다양한 원인으로 인해 근육 활성을 조정하는 이의 능력을 상실한 여러 가지 질환을 설명하는 데에 이용된다. 이러한 질환은 여러 가지 방식으로 명시할 수 있고 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다:

[0004] ● 복부 팽만

[0005] ● 재발성 폐색

[0006] ● 급경련 복통

[0007] ● 변비

[0008] ● 위식도 역류병

[0009] ● 난치성, 재발성 구토

[0010] ● 설사

[0011] ● 과민성 대장 증후군 (IBS)

[0012] ● 염증성 장 질환

[0013] ● 변설금

[0014] ● 영아 산통

[0015] ● 빈번한 재발성 복통 (FRAP)

[0016] ● 구토

[0017] ● 음식 불내증

[0018] 넓은 의미에서, 음식의 통과 및 소화관 내로 분비에서 임의의 유의적인 변경은 장 운동 질환으로 고려될 수 있다.

[0019] 위와 장의 적절한 공동작용 운동은 소화관을 따라 장 함유물을 소화시키고 추진시키는 데에 요구된다. 위장 (GI) 관의 적절한 운동에 필수적인 수축 및 이완의 패턴은 복잡하고 GI 벽 내에서 신경과 근육을 이용한다. 매일, 언제라도, 많은 요인이 GI 운동에 영향을 미칠 수 있다 (가령, 신체적 운동, 감정적인 피로움). 신생아는 GI 관에서의 운동의 복합 시스템을 발달시켜야 한다. 장 운동 질환의 발병은 대부분의 경우 다인성이다.

[0020] 신경과 근육계의 전반적인 구조 조직화는 소장과 대장의 모든 부분에서 유사하지만, 각각의 부분은 뚜렷한 운동 활성을 갖는다. 때때로 더 긴 연동 및 반연동 복합과 함께 정지된 또는 짧은 전파 수축은 먹는 동안 및 먹은 후에 일어나고 그리고 이것은 음식 볼러스(food bolus)가 분해되고 적절한 흡수를 위해 소화액과 혼합되도록 한다. 소화 후, 운동 프로그램은 항문 방향으로 소화된 산물을 이동시키는 더 긴 전파 수축을 가진 것으로 변화 한다. 다른 운동 활성이 발생하는데, 이는 더 정기적이고 장을 통해 소화되지 않은 음식의 전진을 허용하는 연동파 (즉, 소장의 순환 근육계의 수축)를 만든다.

[0021] 노화, 치매, 뇌졸중, 파킨슨 병, 척수 손상, 분만 중 직장 찢김, 당뇨병, 수술 합병증, 및 신경근 질환 (가령, 종종 근무력증)은 운동성 질환을 야기할 수 있다.

[0022] 일반적으로 진단되는 장 운동 질환, IBS는 수십 년간 결장의 질병으로 간주되었지만, GI 운동에 대한 연구는 기초 운동성 장애가 소장에서도 또한 생길 수 있다는 점을 증명하였다. IBS는 복통을 동반할 수 있다.

[0023] 과민성 대장 증후군 (IBS)의 원인은 아직 알려지지 않았다. 몇 가지 보고서에 따르면, IBS를 가진 환자의 소장과 결장은 더 예민하고 평소보다 약한 자극에도 반응한다.

- [0024] 가끔, 특정한 음식의 섭취 후 변실금이 생길 수 있다. 당, 불용성 섬유, 및 전분 (쌀은 제외)은 일반적으로 장에서 분해되고 반드시 방출되어야 하는 가변량의 가스를 형성한다. 락타아제 결핍증을 가진 대부분의 사람은 여러 가지 음식 (가령 우유, 케이크)내 일반적인 당인, 락토오스를 소화시킬 수 없다. 락토오스 결핍증을 가진 사람은 락토오스 섭취 후 제어되지 않는 묽은 설사를 경험할 것이다.
- [0025] 변비는 미국에서 가장 일반적인 소화성 불편사항이지만, 이의 빈도에도 불구하고, 환자에서 이차 질환, 가령 항문과 직장 질환 또는 계실병이 발병할 때까지 인식되지 않은 채로 남아 있다.
- [0026] 일반적으로 받아들여지는 임상적으로 유용한 변비의 정의는 없다. 의료인은 변비를 정의 하는 데에 장 운동의 빈도를 주로 이용한다 (즉, 주당 3회 미만의 장 운동). 하지만, 1988년에 처음 도입되고 차후 2회 변경되어 로마 III 기준이 된, 로마 기준은 변비의 연구-표준 정의가 되었다.
- [0027] 변비에 대한 로마 III 기준에 따르면, 환자는 앞서 3개월에 걸쳐 다음 증상 중 적어도 두 가지를 경험하여야 한다:
- 주당 3회 미만의 장 운동
 - 긴장
 - 덩어리진 또는 딱딱한 대변
 - 항문과 직장 패색의 느낌
 - 불완전한 배변의 느낌
 - 배변하기 위해 요구되는 수동 조작
- [0034] 변비는 흔히 만성이고, 개인의 삶의 질에 상당히 영향을 줄 수 있고, 그리고 상당한 건강 관리 비용과 연관될 수 있다. 전년도 동안 적어도 12주 간 (통틀어서, 연속적일 필요는 없음) 변비가 발생했다면 만성으로 간주된다.
- [0035] 변비에는 일반적으로, 일차 또는 이차적인, 여러 가지 원인이 있다. 이를 중 가장 흔한 것은 다음과 같다:
- 섬유질이 너무 부족한 식이요법
 - 임신
 - 생활방식 변화 (가령, 여행, 새로운 직장, 또는 이혼)와 관련된 심리적 변비 및 임상적 우울감, 이때 환자는 배변하려는 충동을 무시함
 - 갑상선기능저하증
 - 전해질 불균형, 특히 Ca^{++} 또는 K^+ 를 수반하는 경우
 - 내부적으로 또는 외부적으로, 장관에 기계적인 압박을 야기하는 종양
 - 신경계 손상
 - 노화
 - 파킨슨 병
 - 납, 수은, 인, 또는 비소에 중독
- [0046] 임신 중에 변비는 꽤 일반적이다. 소장을 통해 음식을 정상적으로 이동시키는 근육 수축은 고수준의 호르몬 프로게스테론 및 태아기 비타민으로서 흡수되는 가능한 한 추가 철분 때문에 둔화된다.
- [0047] 변비는 증가되는 연령 및 장기 요양시설에서 그리고 특히 70세 이상의 사람에서 일반적으로 찾아볼 수 있는 소위, "노화 내장"과 또한 연관된다. 이 상태는 다음을 동반한다:
- 장관근 기능장애를 초래하는 직접적인 자극에 반응하여 손상된 근총간신경총에서 감소된 뉴런수
 - 결장과 직장의 순응도에서의 이상 및 운동성 장애를 초래하는 왼쪽 결장의 증가된 콜라겐 축적
 - 결장의 환상근 층에 대한 억제 신경 입력(input)의 진폭에서의 감소, 이는 분절 운동 협응을 야기함

- [0051] ● 60세 이상의 사람에서 장 수용체에 혈장 엔도르핀의 결합 증가

[0052] 노화의 장 운동 질환과는 반대의 경우에서, 영아 산통으로 인한 지속적이거나 지나친 울음은 영아의 가장 괴로운 문제 중 하나이다. 이는 영아, 부모, 그리고 개입된 의료진들에게도 괴로운 일이다. 과민성 영아의 부모는 울음소리를 그들의 부양 능력의 비난으로서 또는 그들의 자녀에게서 병의 증거로서 판단할 수 있다. 영아 산통은 시간에 따라 해결되는 병이다.

[0053] 산통에 대해 가장 널리 허용되는 정의는 베셀 (Wessel) 기준 또는 "3의 법칙"이다: 하루 3시간 이상 지속되는 울음은 주당 3일이 넘게 발생하고, 그리고 3주 넘게 지속된다. 이 정의는 또한, 유아가 "그 외에는 건강하고 잘 먹는다"라는 점을 필요로 한다.

[0054] 추정 자율신경 불균형에 부차적인 장 과다운동은 또한, 산통에 대한 하나의 병인학으로서 제안되었다. 운동 활성을 조절하는 많은 메커니즘은 영아에게서는 미숙하다. 이를 메커니즘의 미숙함은 음식섭취 과민증에 대한 증가된 취약성을 야기할 수 있다. 따라서, 산통은 운동 조절의 측면 중 하나 이상에서 성숙 기능장애를 가진 영아의 하위모집단에서 일반적인 임상 징후가 될 수 있다.

[0055] 몇 가지 유행병학의 보고에 따르면, 무려 3000 만 명의 미국인들이 장 운동 질환을 갖는다. 의학 문헌에서 이용 가능한 데이터는 전세계적으로, 모든 GI 병 중 30-45%가 장 운동 질환이 원인이라는 점을 명시한다.

[0056] 현재 치료와 권장사항은 운동성 질환의 유형에 따라 달라지고, 변비의 경우 몇몇 예시는 다음과 같다:

- 섬유질 또는 팽화제 (서행성 변비에는 유용하지 않음)

- 배변 연화제

- 차극성 완화제

- 삼투성 완화제 (예를 들어 폴리에틸렌 글리콜)

- 염화물-채널 활성자 (예를 들어 루비프로스톤(Lubiproston))

- 세로토닌 약물 (5-HT4 수용체 작동제).

[0063] 추가로, 유산균 (Lactic Acid Bacteria, LAB)의 용도는 랜덤화된 임상 실험에서 연구되었다: 기능적 변비를 가진 환자의 치료에서 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)-풍부 아티초크(Artichoke)의 효능 (Riezzo et al; Aliment Pharmacol Ther. 2012 Feb;35(4):441-50).

[0064] 또한, 모유를 먹고 산통을 일으킨 영아는 실험에서 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 또는 시메티콘으로 치료를 랜덤으로 받았다. 기선에서, 매일 우는 시간의 중앙값은 두 군에서 모두 197분이었다. 실험을 완료한 83명의 영아 중에서, 매일 우는 시간의 중앙값은 제7일 (159분 대 177분)과 제28일 (51분 대 145분)에 시메티콘 군에서보다 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)에서 더 낮았다. (Savino F et al, Pediatrics. 2007;119(1):e124).

[0065] 장 운동 질환은 종종 통증을 동반한 비정상적인 장 수축에 해당되고, 상이한 질환에 대해 상이하고 많은 종류의 치료와 권장사항이 있으며, 몇 가지는 다른 많은 것들보다 더 양호하게 기능한다.

[0066] 따라서 다양한 운동성 질환에 대해 해결해야 할 전반적인 요구 및 특이적인 문제점이 있다, 다시 말해; 장 운동 질환 및 내장/장 통증을 정상화시키거나 치료하기 위한 작용제를 어떻게 가장 잘 선별해야 하는가?

배경기술

- [0067] 발명의 요약

[0068] 본 명세서에서 본 발명의 발명자는 GI 관의 근육계 및 신경 그리고 뇌와 그들의 교신과 관련된 별개의 방법론적 부분을 이용하여, 상이한 장 운동 질환의 치료를 위한 작용제를 평가하기 위한 새로운 방법을 개발하였다.

[0069] 따라서, 본 발명은 장 운동 질환의 치료에 효과적인 작용제의 선별을 위한 방법과 관련되며, 여기서 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0070] a) 위장 운동에 미치는 작용제의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 시공간 (ST) 맵핑(mapping)의 단계; 및

[0071] b) 장간막 구심성 신경 발화에 미치는 작용제의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 생체외 신경 다

발 기록의 단계.

[0072] 바람직한 구체예에서, 단계 a)에서 ST 맵핑은 비디오 이미징(video imaging) 또는 기록에 의해 수행된다. 본 발명의 방법에서, 단계 a)는 바람직하게도, 위장 분절에서 이동성 복합 운동 (MMC) 빈도 및/또는 이동성 복합 운동 (MMC) 속도를 측정하기 위해 단계 a)에서 생성된 ST 맵(map)을 이용하는 단계를 포함한다.

한 양상에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 장 운동 질환의 치료에 효과적인 박테리아 균주의 선별을 위한 생체외 방법에 관한 것이다: (a) 위장 운동에 미치는 박테리아 균주의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 시공간 (ST) 맵핑(mapping)의 단계; 및 (b) 장간막 구심성 신경 발화에 미치는 박테리아 균주의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 생체외 신경 다발 기록의 단계.

또 다른 양상에서, 본 발명은 필요로 하는 개체의 장 운동 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서, a) 위장 운동에 미치는 박테리아 균주의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 시공간 (ST) 맵핑(mapping)의 단계; 및 b) 장간막 구심성 신경 발화에 미치는 박테리아 균주의 효과를 분석하기 위해 위장 분절에서 수행되는 생체외 신경 다발 기록의 단계를 포함하는 방법에 의해 선별된 박테리아 균주의 용도를 제공한다.

[0073] 본 발명의 방법에서, 단계 a)는 바람직하게도, 내강내 압력, 예를 들어 내강내 피크 압력 (PPr)의 측정을 추가로 포함한다.

[0074] 본 발명의 방법에서, 바람직하게, 단계 b)는 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도를 측정하는 단계를 포함한다.

[0075] 바람직한 측면에서, 본 발명은 운동성 질환에 효과적인 작용제의 선별을 위한 두-단계 방법을 개시한다. 첫 번째 단계에서 발명자는 운동성에 미치는 상이한 작용제의 효과를 분석하기 위해 시공간 맵과 내강내 압력 기록을 조합하였다. 이 단계에서, 내강내 피크 압력 (PPr)은 바람직하게 측정되고 작용제의 내강내 적용 전과 후에 생쥐 생체외 공장 및 결장 분절에서 비디오 기록이 이루어진다. 이동성 복합 운동 빈도와 속도도 또한, 상기 방법의 첫 번째 단계에서 계산된다. 두 번째 단계에서, 장 신경 신호전달이 분석되고 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도가 측정된다. 따라서, 본 발명은 운동성 질환에 효과적인 작용제의 선별을 위한 방법을 개시하며, 상기 방법은 비디오 기록 및 시공간 맵뿐만 아니라 내강내 압력 변화의 동시 기록을 이용하는 첫 번째 단계 그리고 예를 들어 장간막, 가령, 세포외 장간막을 채취함으로써, 신경 신호전달의 분석, 신경 기록인, 두 번째 단계를 포함한다.

[0076] 따라서, 추가적인 구체예에서, 본 발명은 장 운동 질환의 치료에 효과적인 작용제의 선별을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0077] (a) 내강내 압력을 기록하고, 위장 운동에 미치는 상이한 작용제의 효과를 분석할 수 있도록 시공간 (ST) 맵을 형성하는 단계, 여기서 상기 시공간 맵은 검사 작용제의 존재 및 부재시 장 샘플에서, 이동성 복합 운동 빈도와 속도를 측정하는 데에 이용됨; 및

[0078] (b) 검사 작용제의 존재 및 부재시 장 샘플에서 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도를 측정함으로써 장 신경 신호전달을 분석하는 단계.

[0079] 단계 (a)에서의 이 방법의 바람직한 구체예에서, 내강내 피크 압력 (PPr)이 측정된다.

[0080] 본 발명은 설명된 두-단계 방법 그리고 또한 새로운 박테리아 균주와 관련된다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0081] 도면의 설명

도 1 기관 운동 기록

도 2 운동 기록으로부터의 사진과 데이터 출력

도 3 운동 기록으로부터의 사진과 데이터 출력

도 4 장간막 신경 기록; 장의 신경분포

도 5 세포외 기록

도 6 StMAP 플러그-인 소프트웨어의 세부사항

도 7 단계 a)의 결과를 보여주는 그래프. 검사되는 작용제는 (A) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 345A (DSM 27123), (B) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 621A (DSM 27126), (C) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T1, (D) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T2, (E) 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC PTA 6475, (F) 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938 및 (G) 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) (JB-1)이다.

도 8 단계 b)의 결과를 보여주는 그래프, 검사되는 작용제는 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) (JB-1), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC PTA 6475, 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 345A (DSM 27123), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 621A (DSM 27126), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T1 및 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T2이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082]

본 발명의 상세한 설명 및 이의 바람직한 구체예

[0083]

본 발명의 이해를 돋기 위하여, 많은 용어가 아래에서 정의된다.

[0084]

본 명세서에서 이용된 바와 같은 용어 "내강내 피크 압력" (PPr)은 내강내 압력 기록에 기반하며, 여기서 내강내 압력 변하는 내장 분절의 세로축의 중심점에서 측정된다. 압력 신호가 분석되고 내강내 피크 압력 (PPr)이 식별되고 측정된다.

[0085]

본 명세서에서 이용된 바와 같은 용어 "이동성 복합 운동 빈도" (MMC 빈도)는 시공간 맵에서 어두운 MC 밴드의 수를 셈으로써 계산된다.

[0086]

본 명세서에서 이용된 바와 같은 용어 "이동성 복합 운동 속도" (MMC 속도)는 이동성 복합 운동에 의해 생성된 시공간 맵에서 각각의 밴드의 경사(들)로부터 측정된다.

[0087]

본 명세서에서 이용된 바와 같은 용어 "발화 빈도"는 뇌에 대한 감각 스파이크 트레이인(sensory spike train)을 측정하는 데에 이용된다.

[0088]

본 명세서에서 이용된 바와 같은 용어 "작용제"는 전세포, 미생물, 단백질, 웨티드, 효소, 분자 또는 포유류의 위장계내 운동성 및/또는 통증에 영향을 주는 데에 이용될 수 있는 다른 생물학적 또는 화학적 물질을 비롯한 임의의 재료 또는 물질을 의미하는 데에 이용된다. 바람직한 작용제는 박테리아 균주, 가령 프로바이오틱 (probiotic) 박테리아 균주이다.

[0089]

본 명세서에서 본 발명의 방법은 생체외 신경 다발 기록에 대해 개선된 기술 (단계 2)과 조합된 시-공간 (ST) 맵핑 방법 (단계 1)에 기반한, 두 단계 방법이며, 여기서 위장 분절은 척수 및 미주신경 섬유 둘 모두로 이루어진 분절을 제공하는 신경 다발을 함유한 장간막 아케이드(arcade)와 함께 또는 상기 장간막 아케이드 없이 잘린다.

[0090]

제시된 바람직한 방법의 첫 번째 단계에서, 내강내 압력 기록은 운동성에 미치는 상이한 작용제의 효과를 분석하기 위해 시공간 (ST) 맵과 조합된다.

[0091]

ST 맵은 시간적으로 전개되는 공간적으로 변화하는 영역을 시각화하기 위한 도구를 제공하며, 이는 건강 및 운동성 질환에서 작용을 비롯한 위장 운동의 분석에서 이용될 수 있다. 시공간 비디오 이미징을 이용하여 본 명세서에서 발명자는 내장 지름에서의 변화의 시공간 맵의 컴퓨터 분석을 이용하는 새로운 방법의 일부를 개발하였다. 이것은 임의의 다른 기술로는 검출하기 매우 어려운 운동 패턴을 나타낸다. 이를 패턴의 파라미터는 생쥐 생체외 장 분절로 얻은 결과와 인간 내장 약물학을 직접적으로 관련시킨다. 연동하는 전파 복합 운동 (MC) 또는 혼합 운동 (정지 MC)은 실시간으로 디지털 방식으로 기록되고 이미지는 저장된다. 아래에서 추가로 설명되는 바와 같은, 분석 소프트웨어는 장의 가장자리를 검출하고 시간이 지남에 따라 분절의 길이대로 지름을 자동적으로 계산할 수 있다. 이 데이터는 운동 패턴; 예를 들면, 이동성 복합 운동 (MMC) 빈도 (신경 의존성 MMC 빈도), MMC 속도 및 수축의 균원성 (관련된 완서파) 수축비에 대해 매우 특이적인 정보를 추출할 수 있는 시공간 맵을 구성하기 위해 프로그램에 의해 이용된다.

[0092]

추가로, 장 미생물이 소위 미생물군집-장-뇌 축의 부분으로서 뇌에 신호를 보내는 것이 허용되기 시작한다. 하지만, 신경계의 발달 또는 기능에서 장내 미생물군집의 역할에 대해서는 알려진 것이 거의 없다. 내장에서 중추 신경계로 전달되는 신경 신호의 정량적 성질에 대해서는 현재 알려진 것이 없다.

- [0093] 미주신경 섬유에 속하는 것들을 비롯한, 단일 감각 뉴런은 자극의 성질과 강도를 암호화하는 패턴화된 스파이크 트레인으로서 지속적인 물리적 자극을 나타낸다. 이에 더불어, 자극은 다발내 활성 섬유의 수로 결정된 모집단 코드(population code)에서 나타날 수 있다. 일차 구심신경을 통해 뇌에 도달하는 모든 정보는 뉴런 스파이크 트레인의 언어로 암호화되어야 한다. 따라서, 감각 스파이크 트레인이 어떻게 공생물인, 프로바이오틱균주 및 상이한 물질에 의해 영향을 받는지 아는 것은 새로운 유익 장내 미생물과 그들의 활성 분자를 일차 구심신경 발화에 미치는 그들의 영향 그리고 다양한 방식으로 이 신호전달 시스템에 개입할 수 있는 새로운 약물 및 다른 화합물로 식별할 수 있게 해준다.
- [0094] 상이한 장 운동 질환의 치료를 위한 작용제를 평가하기 위한 본 명세서에서의 본 발명의 새로운 방법은 근육과 신경에 미치는 작용제, 예를 들어 바이오틱 박테리아 균주 또는 또 다른 생물학적 또는 화학적 작용제의 특이적인 효과의 구별을 허용한다. 실험적 데이터는 장 및/또는 중추 신경계와 연관된 통증을 조절하는 데에 가장 효과적이기도 한 GI 관의 특정 부분에서 예를 들어 혼합 패턴 또는 추진 패턴을 조절할 수 있는 동일한 작용제일 필요는 없다는 점을 확인해준다.
- [0095] 뿐만 아니라, 상이한 질병에서 특정한 분자의 효과를 조사하기 위하여, 본 방법은 상피 장벽을 가로지르는 그리고 상피 장벽으로의 내강 관류 및 확산의 상이한 연구를 허용한다.
- [0096] 운동성의 두 가지 근본적인 패턴은 소화관에 의해 시행된다:
- [0097] 추진: 분해와 흡수에 관여하는 순차적인 일련의 가공처리가 되기 위하여 음식물은 전장의 소화관을 따라 추진되어야 한다. 특히 식도와 소장에서 나타나는, 추진 운동의 주된 유형은 연동운동이다 - 근육 수축의 고리는 구강 쪽의 섭취물 볼러스를 항문 쪽으로 이동시켜, 그 쪽 방향으로 내강의 함유물을 추진시킨다; 고리가 움직이면서, 팽창된 영역의 다른 쪽 근육은 이완되어, 볼러스의 순조로운 통과를 촉진시킨다.
- [0098] 혼합: 소화된 물질이 소화관을 통해 단순히 추진된다면, 매우 불량한 소화와 흡수를 예상하는데, 그 이유는 소화 효소가 섭취물과 적절하게 혼합되지 않을 것이고 섭취물 대부분이 수분을 비롯한, 영양분을 흡수하는 상피 세포와 접촉하지 않을 것이기 때문이다. 분절 수축은 특히 소장에서 나타나는 일반적인 유형의 혼합 운동이다 - 수축의 분절 고리는 섭취물을 자르고 혼합한다. 내장 벽내 세로 근육의 수축과 이완의 교대는 또한, 이의 함유물의 효과적인 혼합을 제공한다.
- [0099] 본 명세서에서의 새로운 방법을 이용하여, 중심에 또는 주변에 나타나는, 그리고 상이한 운동성 질환에 의해 야기되는 통증에서의 변화와 조합하여, ST-맵 방법을 이용해 명확하게 나타난, 추진 패턴 또는 혼합 패턴(섭취 후) 중 하나로서 나타나는, 변화된 내장 운동이 검출되고 기록될 수 있다.
- [0100] 한 가지 종류의 통증은 복부 내장(기관)의 침해수용체의 활성화에 기인한 내장통이다. 내장 구조는 팽창(당김), 허혈 및 염증에 매우 민감하지만, 일반적으로 통증을 유발하는 다른 자극에 대해서는 상대적으로 둔감하다. 내장통은 확산되고, 국한시키기는 것이 어려우며 그리고 종종 원위, 주로 피상적인 구조로 언급된다. 메스꺼움, 구토, 생명 징후의 변화 그리고 감정 징후와 같은 증상을 동반할 수 있다. 통증은 구역질 나는 것, 극심한 것, 쥐어 짜는 듯한 것, 그리고 무지근하게 아픈 것으로서 설명될 수 있다. 뚜렷한 구조적 병소 또는 생화학적 이상은 일부의 환자에서만 이러한 유형의 통증을 설명한다. 때로 이를 질병은 위장 신경근 질병(GINMD) 하에 그룹화된다. 사람은 또한, 내장통에 대한 구조적, 생화학적 또는 조직병리학적 원인의 어떠한 증거도 없이, 사실상 종종 매우 극심한, 이러한 증상을 경험할 수 있다.
- [0101] 침해수용체는 척수의 전측 관(플러스 소수의 미주신경 투사)으로 그 다음 시상으로 전하는 특이적인 침해수용 뉴런(A_δ 또는 C), 그리고 섬유질과 대상엽을 비롯한 전뇌에 활동 전위를 보냄으로써 잠재적 손상 자극에 반응하는 감각 수용체이다. 내장 병리에서 비롯한 통증 지각의 중요성은 장간막 구심성 신경 다발에서 돌아다니는 외적인 일차 구심성 섬유를 통한 내장에서 중추신경계로의 통증 메시지의 활성화이다.
- [0102] 본 명세서에서 본 발명의 시스템에서, 운동성과 통증에서의 변화는 내장의 특이적인 및 선별된 부분에 대한 증가된 구심성 장간막 신경 척수 트래픽(traffic) 또는 수축 진폭 또는 운동성 패턴(예를 들어 PPr, MMC 속도 및/또는 MMC 빈도)에서의 변경으로서 판독된다. 상이한 작용제가 GI관의 한 부분에서는 혼합을 또 다른 부분에서는 추진을 촉진할 수 있거나, 전혀 효과가 없고, 그리고 상이한 신경 경로, 가령 미주신경을 통해 또는 내장통인 경우 후근 신경절을 통해, GI-관의 한 부분에서는 통증 신호전달계에 영향을 주지만, 또 다른 부분에서는 그렇지 않다는 점을 밝혀낸 것은 놀라웠다. 이러한 정확한 영역 특이성을 검사 분자의 효과를 평가하는 기법의 권한과 특이성을 강조한다.

- [0103] 따라서 본 발명의 목적은 본 명세서에서의 모델을 이용함으로써, 특이적인 운동성 질환을 치료, 예방 또는 조절하는 데에 적합한 작용제를 찾는 것이다.
- [0104] 제시된 방법에서의 두 단계는 위장 운동과 장간막 구심성 신경 발화에 대한 데이터를 제공할 것이다. 이들 파라미터를 분석하는 것은 장 운동 질환의 치료에 효과적인 작용제를 선별하는 방법을 야기할 것이다. 따라서, 제공된 방법의 단계 a)와 단계 b)에서 작용제의 효과 분석은 작용제가 장 운동 질환의 치료를 위해 효과적인지 아닌지를 결정하는 데에 이용된다.
- [0105] 단계 a)에서 측정되어야 할 바람직한 파라미터는 MMC 빈도 및/또는 MMC 속도이고 이것은 가령 비디오 기록을 이용한, 비디오 이미징으로써 바람직하게 생성된, STmap의 방식으로 편리하게 이루어지고, 그리고 바람직하게는 3 세트의 정보: 내장에 따른 위치 (세로 좌표), 시간 (가로 좌표) 및 내장 지름 (높이 좌표(applicate) 또는 z-축)를 함유한 명 및 암 색조의 교대하는 밴드의 패턴을 포함한다. 이들 변수를 이용하여, 시공간 맵은 운동 "지문(fingerprint)"이 될 수 있으며, 이의 민감성은 특이적인 프로바이오틱 균주와 다른 작용제가 그들 사이를 구별할 수 있는 능력과 운동성을 갖는다는 상세하고 미묘한 효과를 정의하는 데에 중요하다.
- [0106] 단계 a)에서 측정되어야 할 다른 바람직한 파라미터는 내강내 압력, 특히 냉각 피크 압력 (PPr)이다. 예를 들어 실시예에서 설명되는 바와 같은, 다른 파라미터는 방법의 단계 a)에서 그리고 ST맵으로부터 선택적으로 측정될 수 있다.
- [0107] 단계 b)에서 측정되어야 할 바람직한 파라미터는 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도이다. 이 기술은 상이한 치료법에 의해 유도되는 장간막 신경 섬유의 흥분성에서의 변화를 측정하는 데에 이용될 수 있다.
- [0108] 이들 파라미터 중 하나 이상을 분석하는 것은 운동성 질환에 효과적인 작용제를 선별하는 방법을 야기할 것이다. ST 맵을 만들고 이들 파라미터를 측정하기 위한 적절한 방법과 기기는 실험적 실시예와 도면에서 설명된다.
- [0109] 따라서, 바람직한 방법에서, 제시된 방법의 두 단계는 내강내 피크 압력, MMC 빈도, MMC 속도 및 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도에 대한 데이터를 제공할 것이다. 이들 파라미터를 모두 분석하는 것은 운동성 질환에 효과적인 작용제를 선별하는 바람직한 방법을 야기할 것이다.
- [0110] 본 발명의 방법은 상이한 운동성 질환에 대한 적절한 작용제를 찾는 데에 이용될 수 있다. 작용제는 운동성 질환에 영향을 주거나 상기 질환을 예방하거나 치료하기 위하여 유익한 방식으로 환자의 MMC 속도 및/또는 MMC 빈도 및/또는 PPr 및 신경 발화 빈도에 영향을 주는 것으로 선택된다.
- [0111] 방법의 단계 a)는 위장 운동에 미치는 작용제의 효과를 분석하기 위해 위장 분절의 ST 맵핑 (ST 분석)을 이용한다. 이를 위하여 바람직하게 MMC 빈도 및/또는 MMC 속도는 ST 맵을 이용하여 측정된다. 편리하게 ST 맵은 빈도와 속도가 예를 들어 실험적 실시예에서 설명되는 바와 같이, 측정될 수 있는 MC 밴드의 이미지를 보여준다. 추가로, 바람직하게 내강내 피크 압력 (PPr)은 위장 분절 내에서 측정된다.
- [0112] 본 발명의 방법에서 이용하기 위한 위장 분절은 위장관의 적절한 임의의 부분으로부터 비롯될 수 있고, 예를 들어 소장 (가령, 공장)으로부터 또는 대장 (가령, 결장)으로부터의 분절이 될 수 있다. 방법의 단계 b)의 경우 적절한 분절은 장간막 구심성 신경 발화의 측정이 가능하도록 적절한 신경 다발의 존재를 필요로 할 것이다. 이것은 예를 들어 실험적 실시예에서 설명되는 바와 같이, 부착된 장간막 조직과 위장 분절을 가짐으로써 편리하게 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 적절한 실험 동물로부터의 생체외 분절에서, 예를 들어 생쥐 위장 분절 (가령, 생쥐 결장 또는 공장 분절)에서 편리하게 수행된다. 놀랍게도, 본 발명의 방법은 장 분절의 두 유형 모두에서 동일한 작용제의 작용에서의 차이를 검출할 수 있다. 소장 대 대장에 미치는 작용제의 효과 비교를 수행하는 능력은 특히, 치료되어야 할 장 운동 질환, 임상 단계 및 이의 증상에 따라 유익할 수 있고, 영역-특이적인, 가령 소장 또는 대장에 특이적인 치료가 이로울 수 있다.
- [0113] 작용제에 의해 유도되는 위장 운동에서의 변화는 방법의 단계 a)에서 판독으로서, 예를 들어 운동성 패턴 또는 수축 진폭에서의 변경으로서 검출될 수 있다. 몇 가지 작용제는 전혀 효과가 없을 것이다. 예를 들어, MMC 빈도 및/또는 MMC 속도 및/또는 내강내 압력, 가령 PPr을 증가시킴으로써 위장 운동을 증가시킬 수 있는 작용제는 소화관을 따라 추진 운동을 증가시키는 것이 이로울 질환, 가령 변비 및 산통을 치료하는 데에 아마 유용할 것이다. 작용제가 예를 들어 MMC 빈도 및/또는 MMC 속도 및/또는 내강내 압력, 가령 PPr을 감소시키거나 유의적으로 변화시키지 않음으로써, 위장 운동을 감소시키거나 유의적으로 변화시키지 않는다는 것을 보여준다면, 이러한 작용제는 이러한 질환을 치료하는 데에 아마 유용하지 않을 것이고 그리고 특히 측정된 모든 파라미터에서 감소

가 있거나 유의적인 변화가 없다면 선별되지 않을 것이다. 하지만, 예를 들어 MMC 빈도 및/또는 MMC 속도 및/또는 내강내 압력, 가령 PPr 중 하나 이상을 감소시킴으로써 위장 운동에서의 감소를 야기할 수 있는 작용제는 소화관을 따라 추진 운동을 감소시키는 것이 이로울 질환, 가령 IBS 및 설사를 치료하는 데에 아마 유용할 것이다.

[0114] 본 발명의 방법에서 작용제에 의한, 위장 운동에서의 증가, 예를 들어 MMC 빈도 및/또는 MMC 속도 및/또는 내강내 압력, 가령 PPr에서의 증가는 변비 또는 산통을 치료하는 데에 이용하기 위한 작용제를 선별하는 것이 특히 바람직하다.

[0115] 본 발명의 방법의 단계 b)는 장간막 구심성 신경 발화 (통증 신호전달)에 미치는 작용제의 효과를 분석하고 따라서 통증에 대한 판독, 즉 작용제가 통증, 가령 내장통에 미치는 효과를 가질 가능성이 있는지 없는지에 대한 판독으로서 이용될 수 있다. 구심성 신경 발화에 대한 증가 또는 구심성 신경 발화에 미치는 유의적이지 않은 효과는 각각, 통증의 증가, 또는 통증에 미치는 유의적이지 않은 효과를 야기할 가능성이 있는 작용제를 나타내고 반면에 구심성 신경 발화에서의 감소는 통증을 감소시킬 작용제를 나타낸다. 따라서 바람직한 작용제는 구심성 신경 발화에서의 감소, 가령 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도에서의 감소를 야기하는 것들이다. 대안으로, 신경 발화에서의 유의적이지 않은 변화를 야기하는 작용제는 균주가 방법의 단계 a)로 측정된 바와 같은 이로운 특성을 보인다면 선별될 것이다.

[0116] 검사되어야 할 작용제는 임의의 적절한 방식으로 선택된 위장 분절에 첨가된다. 편리하게, 작용제는 분절의 내강내 공간에 첨가된다, 즉 내강내로 적용된다. 운동성 (단계 a에서) 또는 통증 신호전달 (단계 b에서)에 미치는 작용제의 역할을 분석하기 위하여, 단계는 작용제의 존재 및 부재에서 편리하게 수행된다. 예를 들어, 단계 a)와 b)는 작용제가 적용되기 전과 후에 수행된다. 따라서, 이러한 방법에서 작용제의 효과는 적절한 대조와 비교되는데, 예를 들어 검사 작용제의 존재에서의 결과는 검사 작용제의 부재에서의 결과, 가령 완충액 플러스 작용제 (가령, 완충액 플러스 박테리아 균주)와는 대조적으로 완충액 단독으로의 결과와 비교된다.

[0117] 따라서, 본 발명의 추가적인 측면은 본 발명의 방법에 의해 선별된 작용제를 제공한다. 바람직한 작용제는 미생물, 더욱 바람직하게는 박테리아 균주, 바람직하게는 프로바이오틱 박테리아 균주이다. 본 발명의 방법에 의해 선별된 작용제는 제약학적 화합물 또는 조성물 또는 영양적 화합물 또는 조성물의 형태를 취할 수 있다.

[0118] 상기 설명된 바와 같이, 치료되는 것이 바람직한 운동성 질환에 따라, 선별 기준은 달라질 수 있다. 예를 들어, 장 운동 질환이 장을 통한 물질의 통과 시간을 감소시키는 것 (또는 소화관을 따라 추진 운동을 증가시키는 것)이 바람직한 것, 가령 변비, 구토 또는 산통이라면, 방법의 단계 a)에서 관심 작용제는 예를 들어 MMC 빈도 또는 MMC 속도 또는 내강내 압력 (가령, PPr)을 증가시킴으로써, 위장 운동을 증가시키도록 작용할 것이다. 바람직한 작용제는 이들 파라미터 중 2개 이상을 증가시킬 것이며, 예를 들어 MMC 빈도 및 MMC 속도를 증가시킬 것이고 또는 MMC 빈도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 증가시킬 것이고, 또는 MMC 속도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 증가시킬 것이다. 가장 바람직한 작용제는 이들 파라미터 모두를 증가시킬 것이며, 예를 들어 MMC 빈도, MMC 속도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 증가시킬 것이다. 방법의 단계 a)는 소장 또는 대장으로부터의 적절한 위장 분절, 예를 들어 소장의 경우 공장 분절 또는 대장의 경우 결장 분절에 대해 평가될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대장, 가령 결장 분절의 용도가 바람직하다.

[0119] 이러한 질환의 치료를 위해, 통증 신호전달을 초래하지 않거나 통증 신호전달을 증가시키지 않고, 또는 바람직하게는 통증 신호전달을 감소시키는 것으로 작용하는 작용제가 선별될 것이다. 방법의 단계 b)에서 이러한 작용제는 장간막 구심성 신경 발화를 감소시키거나 줄이도록 바람직하게 작용할 것이고 또는 이에 미치는 효과가 없을 것이다. 바람직하게 상기 작용제는 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도를 감소시키도록 바람직하게 작용할 것이고 또는 이에 미치는 효과가 없을 것이다. 방법의 단계 b)는 소장 또는 대장으로부터의 임의의 적절한 위장 분절, 예를 들어 소장의 경우 공장 분절 또는 대장의 경우 결장 분절에 대해 평가될 것이다. 몇몇 구체예에서, 소장, 가령 공장 분절의 용도가 바람직하다.

[0120] 본 발명의 방법을 이용하여, 발명자는 새로운 박테리아 균주, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 345A (LG345A)를 선별하였으며, 이는 MMC 빈도, MMC 속도 및 내강내 피크 압력을 증가시키는 것으로 나타나는 방식에 의해 위장 운동을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 균주는 또한, 장간막 구심성 신경 발화를 감소시킴으로써 (장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시킴으로써) 통증 신호전달을 감소시키는 것으로 나타났다. 이 단리된 박테리아 균주 (및 특징, 가령 이 기탁된 균주의 위장 운동 및 통증 신호전달에 미치는 상기 언급된 효과를 유도하는 능력을 가진, 다른 균주, 가령 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 균주)는 본 발명의 바람직한 측면을 형성하고 장 운동 질환, 특히 장을 통한 물질의 통과 시간을 감소시키는 것이 바람직한 것들을 치료하는

데에 이용될 수 있다. 따라서, 이 균주로 치료되어야 할 바람직한 병은 변비 또는 산통이다. MMC 빈도, MMC 속도 및 내강내 피크 압력 각각을 증가시키는 능력을 가짐으로써 위장 운동을 증가시킬 수 있는, 그리고 가령, 장간막 구심성 신경 발화를 감소시키는 능력을 가짐으로써 (가령, 장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시킴으로써) 통증 신호전달을 감소시킬 수 있는, 균주, 가령 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 균주는 본 발명의 바람직한 측면을 형성한다.

[0121] 대안으로, 예를 들어 치료를 위한 장 운동 질환은 장을 통한 물질의 통과 시간을 증가시키는 것이 바람직한 것 (가령, 빠른 관 통과와 관련한 질환), 가령 IBS 또는 설사라면, 방법의 단계 a)에서, 관심 작용제는 예를 들어 MMC 빈도 또는 MMC 속도 또는 내강내 압력, 가령, PPr을 감소시킴으로써, 위장 운동을 감소시키도록 작용할 것이다. 바람직한 작용제는 적어도 MMC 속도를 감소시킬 것이다. 바람직한 작용제는 이들 파라미터 중 2개 이상을 감소시킬 것이고, 예를 들어, MMC 속도 및 MMC 빈도를 가소시킬 것이고 또는 MMC 빈도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 감소시킬 것이고 또는 MMC 속도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 감소시킬 것이다. 가장 바람직한 작용제는 이들 파라미터 모두를 감소시킬 것이고, 예를 들어 MMC 빈도, MMC 속도 및 내강내 압력 (가령, PPr)을 감소시킬 것이다. 방법의 단계 a)는 소장 또는 대장으로부터의 적절한 위장 분절, 예를 들어 소장의 경우 공장 분절 또는 대장의 경우 결장 분절에 대해 평가될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대장, 가령 결장 분절의 용도가 바람직하다.

[0122] 이러한 질환의 치료를 위해, 통증 신호전달을 초래하지 않거나 통증 신호전달을 증가시키지 않고, 또는 바람직하게는 통증 신호전달을 감소시키는 것으로 작용하는 작용제가 선별될 것이다. 방법의 단계 b)에서 이러한 작용제는 장간막 구심성 신경 발화를 감소시키거나 줄이도록 바람직하게 작용할 것이고 또는 이에 미치는 효과가 없을 것이다. 바람직하게 상기 작용제는 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도를 감소시키도록 바람직하게 작용할 것이고 또는 이에 미치는 효과가 없을 것이다. 방법의 단계 b)는 소장 또는 대장으로부터의 적절한 위장 분절, 예를 들어 소장의 경우 공장 분절 또는 대장의 경우 결장 분절에 대해 평가될 것이다. 몇몇 구체예에서, 소장, 가령 공장 분절의 용도가 바람직하다.

[0123] 본 발명의 방법을 이용하여, 발명자는 새로운 박테리아 균주, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A (LG621A)를 선별하였으며, 이는 MMC 속도를 감소시키는 것으로 나타나는 방식에 의해 위장 운동을 감소시키는 것으로 나타났고 MMC 빈도 또는 내강내 피크 압력에 미치는 효과는 없다. 이 균주는 또한, 장간막 구심성 신경 발화를 감소시킴으로써 (장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시킴으로써) 통증 신호전달을 감소시키는 것으로 나타났다. 이 균주는 장간막 구심성 신경 발화를 감소시킴으로써 (장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시킴으로써) 통증 신호전달을 감소시키는 것으로 또한 나타났다. 이 단리된 박테리아 균주 (및 특징, 가령 이 기탁된 균주의 위장 운동 및 통증 신호전달에 미치는 상기 언급된 효과를 유도하는 능력을 가진, 다른 균주, 가령 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 균주)는 본 발명의 바람직한 측면을 형성하고 장 운동 질환, 특히 장을 통한 물질의 통과 시간을 증가시키는 것이 바람직한 것 (가령, 빠른 관 통과와 관련한 질환)들을 치료하는 데에 이용될 수 있다. 따라서, 이 균주로 치료되어야 할 바람직한 병은 IBS 또는 설사이다. 가령, MMC 빈도, MMC 속도 및 내강내 피크 압력 중 하나 이상 (바람직하게는 MMC 속도)을 감소시키는 능력을 가짐으로써, 위장 운동을 감소시킬 수 있는, 그리고 가령, 장간막 구심성 신경 발화를 감소시키는 능력을 가짐으로써 (가령, 장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시킴으로써) 통증 신호전달을 감소시킬 수 있는, 균주, 가령 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 균주는 본 발명의 바람직한 측면을 형성한다.

[0124] 본 발명의 방법이, 장 운동 질환의 치료에 적합하지 않은 작용제, 예를 들어 MMC 속도 또는 MMC 빈도 또는 내강내 압력 중 하나 이상, 또는 둘 이상, 또는 셋 모두에 미치는 어떠한 효과도 보이지 않고 장 운동 질환의 치료에서 이용하는 데에 적합하지 않을 수도 있는 작용제를, 특히 이러한 작용제가 통증 신호전달 감소에 미치는 이로운 효과를 가지지 않을 경우, 선별하거나 식별하는 데에도 또한 이용될 수 있다는 점이 상기로부터 명확하다. 특히 이들 파라미터 중 어느 하나에도 미치는 효과가 없음을 보이는 이들 작용제는 장 운동 질환의 치료에 아마 적합하지 않을 것이다. 추가로, 방법의 단계 b)에서 장간막 구심성 신경 발화에서의 증가에 의해 측정된 바와 같이 통증 신호전달이 증가하는 효과를 가지는 이들 작용제는 장 운동 질환의 치료에 아마 적합하지 않을 것이다.

[0125] 따라서, 본 발명의 추가적인 측면은 치료법에서 이용하기 위한, 더욱 바람직하게는 본 명세서에서 설명된 것들과 같은 장 운동 질환의 치료에서의 이용을 위한 본 발명의 방법에 의해 선별된, 작용제, 바람직하게는 박테리아 균주를 제공한다. 치료되어야 할 적절한 장 운동 질환은 본 명세서의 다른 곳에서 설명된다. 본 발명의 작용제 또는 박테리아 균주에 의해 치료되어야 할 바람직한 장 운동 질환은 장을 통한 물질의 통과 시간을 감소시키는 것이 바람직한 것들, 예를 들어 산통, 구토 또는 변비이다. 바람직한 다른 장 운동 질환은 장을 통한 물질의

통과 시간을 증가시키는 것이 바람직한 것들, 예를 들어 IBS 또는 설사이다.

[0126] 장 운동 질환을 가진 대상의 치료 방법이 본 발명에 의해 또한 제공되고, 상기 방법은 본 발명의 방법에 의해 선별된, 작용제, 바람직하게는 박테리아 균주를 상기 장 운동 질환을 치료하기 위한 유효량으로 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0127] 장 운동 질환을 가진 대상의 치료 방법이 본 발명에 의해 또한 제공되고, 상기 방법은 본 발명의 박테리아 균주를 상기 장 운동 질환을 치료하기 위한 유효량으로 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 균주는 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같은 장 운동 질환의 치료를 위한 LG345A 또는 LG621A이다.

[0128] 바람직한 장 운동 질환 및 다른 바람직한 특징은 본 발명의 다른 측면에 대해 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같다.

[0129] 본 발명에 의해 또한 제공되는 것은 장 운동 질환의 치료에서의 이용을 위한 조성물 또는 약제의 제조에서, 본 발명의 방법에 의해 선별된, 작용제, 바람직하게는 박테리아 균주의 용도이다.

[0130] 본 발명에 의해 또한 제공되는 것은 장 운동 질환의 치료에서의 이용을 위한 조성물 또는 약제의 제조에서, 본 발명의 박테리아 균주의 용도이다. 바람직한 균주는 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같은 장 운동 질환의 치료를 위한 LG345A 또는 LG621이다.

[0131] 바람직한 장 운동 질환 및 다른 바람직한 특징은 본 발명의 다른 측면에 대한 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 바와 같다.

[0132] 본 명세서에서 설명된 본 발명의 방법과 용도에서, 용어 "증가하다", "감소하다", "줄이다" 등은 수준의 측정 가능한 변화, 바람직하게는 수준의 유의적인 변화, 더욱 바람직하게는 ≤ 0.05 의 확률치로 바람직하게, 통계적으로 유의적인 변화를 나타낸다.

[0133] 본 발명의 방법을 이용하여 치료를 위한 바람직한 대상은 포유류, 가장 바람직하게는 인간이다. 치료되어야 할 장 운동 질환이 변비인 경우, 바람직한 대상은 고령 환자 또는 임신한 여성이다. 고령 환자는 70세 이상의 환자인 것으로 일반적으로 이해될 것이다. 치료되어야 할 장 운동 질환이 산통인 경우, 바람직하게 이것은 영아 산통이다.

[0134] 본 발명의 추가적인 측면은 본 명세서의 다른 곳에서 정의된 바와 같은 치료학적 용도를 위한 본 발명의 작용제 또는 균주 (가령, 본 발명의 방법에 의해 선별된 작용제 또는 균주)를 포함하는 산물을 제공하며, 여기서 상기 용도는 적어도 하나의 추가적인 치료제 또는 영양제의 투여를 포함한다. 이러한 구체예에서, 추가적인 치료제는 논의가 되고 있는 장 운동 질환의 치료에서 유용한 임의의 추가적인 작용제일 수 있다. 추가적인 영양제는 임의의 적절한 영양 성분, 가령 식품 또는 식품 보충제일 수 있다.

[0135] 상기 추가적인 작용제는 본 발명의 작용제 또는 균주와 함께 (가령 조성물로서) 투여될 수 있고 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 추가로, 상기 추가적인 작용제는 본 발명의 작용제 또는 균주와 동시에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있다. 적합한 투여법 및 투여 시간은 논의가 되고 있는 추가적인 작용제에 따라 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0136] 본 발명은 다음을 포함한 조성물을 또한 제공한다:

[0137] (i) 본 발명의 선별 방법에 의해 얻을 수 있는 작용제, 바람직하게는 박테리아 균주, 또는 그렇지 않으면 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 박테리아 균주; 및

[0138] (ii) 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제, 식품 또는 식품 보충제, 또는 추가적인 치료제 또는 영양제로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 추가적인 성분. 따라서, 상기 조성물은 제약학적 조성물로서 또는 영양적 조성물로서, 가령 식료품으로서 조제될 수 있다.

[0139] 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 작용제, 균주 및 조성물의 치료학적 용도는 관련 질환 또는 질환의 증상의 감소, 예방 또는 완화를 포함한다 (가령, 질병 증상의 조절을 야기할 수 있음). 질환 또는 이의 증상의 이러한 감소, 예방 또는 완화는 임의의 적절한 어세이로 측정될 수 있다. 바람직하게 질환 또는 증상의 감소 또는 완화는 바람직하게는 <0.05 의 확률치로, 통계적으로 유의적이다. 질환 또는 증상의 감소 또는 완화는 일반적으로, 적절한 대조 개체 또는 모집단, 예를 들어, 건강한 대상 또는 비처리 또는 위약 처리 대상과 비교하여 결정된다.

- [0140] 작용제, 균주, 조성물 등의 조제와 투여의 적절한 방식은 질병 부위에 따라 선택된다. 투여의 바람직한 방식은 경구이지만, 몇몇 치료법과 동일하게, 정맥내 또는 근육내 주사가 적절할 것이다.
- [0141] 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 작용제, 균주 및 조성물의 적절한 용량은 치료되어야 할 질환, 관심의 투여 방식 및 관련된 조제에 따라 통상의 기술자에 의해 쉽게 선택되거나 결정될 수 있다.
- [0142] 상기 설명된 바와 같이, 본 명세서에서 본 발명을 이용하여 발명자는 2개의 새로운 균주, 락토바실러스 가세리 (*Lactobacillus gasseri*) 345A 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A를 얻었다. 이를 균주는 2013년 4월 18일에 DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany)에 기탁되었고 각각, 제DSM 27123호 및 제DSM 27126호로 지정되었다.
- [0143] 운동성 장애에 영향을 주는 작용제의 효과가 대부분의 경우, 다인성이고 GI-관의 여러 가지 부분에 있어 상이하며 그리고 결과적으로 특이적 질환에 대한 최적의 작용제를 찾기 위한 방식으로 연구되어야 한다는, 본 명세서에서의 발명자에 의한 발견은 본 발명의 방법으로 이어졌다.
- [0144] 따라서 본 발명의 목적은 본 명세서에서의 모델을 이용함으로써, 특이적인 운동성 질환을 치료, 예방 또는 조절하는 데에 적합한 작용제를 찾는 것이다.
- [0145] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 목적은 인간에서, 특히 고령자에서 변비를 예방하거나 치료하는 데에 효과적인, 제약 또는 영양적 화합물로서 잠재적인 용도를 가진, 화합물 또는 다른 작용제를 선별하기 위함이다.
- [0146] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 목적은 인간, 특히 고령 대상 또는 임신한 여성에서 변비를 예방하거나 치료하는 데에 효과적일 수 있는 프로바이오틱 박테리아 균주를 선별하기 위함이다.
- [0147] 또 다른 구체예에서, 영아 산통을 예방하거나 치료하는 데에 효과적일 수 있는, 본 발명의 목적은 작용제, 예를 들어 프로바이오틱 균주를 선별하기 위함이다.
- [0148] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 목적은 설사 또는 다른 운동성 질환을 예방하거나 치료하는 데에 효과적일 수 있는, 작용제, 예를 들어 프로바이오틱 균주를 선별하기 위함이며, 여기서 속도를 줄이고 그럼으로써 통과 시간을 증가시키는 것이 유익하다.
- [0149] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 목적은 과민성 대장 증후군 (IBS)을 치료하거나 조절하는 데에 유용할 수 있는, 작용제, 예를 들어 프로바이오틱 균주를 선별하기 위함이다. 이러한 작용제는 바람직하게 어떠한 통증도 일으키는 것 없이, 통과 시간을 증가시키고 바람직하게 통증을 감소시키는 것으로 선별된다.
- [0150] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 목적은 변설금을 예방하는 데에 효과적일 수 있는, 작용제, 예를 들어 프로바이오틱 균주를 선별하기 위함이다.
- [0151] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 목적은 어떠한 통증도 일으키는 것 없이 소장과 대장에서의 혼합을 증가시키고 바람직하게는 통증을 감소시키고, 대상에서, 특히 고령자에서, 더 나은 영양 흡수를 촉진하거나 야기하는 데에 효과적일 수 있는, 작용제, 예를 들어 프로바이오틱 균주를 선별하기 위함이다.
- [0152] 다음은 본 발명의 몇 가지 실시예이며, 이는 본 명세서에서 본 발명의 용도를 제한하는 것으로 의도되지 않고 하지만 본 발명이 어떻게 이용될 수 있는지에 대해 상세하게 실례를 보여주기 위한 것이다. 실시예 1은 시공간 맵핑 (StMap) 소프트웨어 플러그인의 설명과 관련되고 실시예 2는 효과적인 작용제의 선별 단계와 관련되며 그리고 실시예 3은 특이적인 운동성 질환에 대한 작용제의 선별과 관련된다.
- [0153] 실시예 1
- [0154] NIH ImageJ 소프트웨어에 대한 StMap 플러그-in의 설명;
- [0155] ImageJ는 Macintosh의 NIH Image에 의해 영감을 받은 공용 도메인 Java 이미지 프로세싱 프로그램(Java image processing program)이다. 이는 온라인 애플릿(online applet)으로서 또는 다운로드를 할 수 있는 응용 프로그램으로서, Java 1.4 또는 최근의 가상 기계가 있는 임의의 컴퓨터 상에서 작동한다. 다운로드를 할 수 있는 배포판은 Windows, Mac OS, Mac OS X 및 Linux에서 이용 가능하다.
- [0156] ImageJ는 Java 플러그인을 통해 확장성을 제공하는 개방형 구조로 설계되었다. 커스텀 획득(custom acquisition), 분석 및 프로세싱 플러그인(processing plugin)은 ImageJ의 내장된 편집기 및 Java 컴파일러 (compiler)를 이용하여 개발되었다. 사용자-기록 플러그인은 임의의 이미지 프로세싱 또는 분석 문제 대부분을

해결하는 것을 가능하게 해준다.

[0157] 도 6에서의 세부 사항에 따라 (<http://rsbweb.nih.gov>) (National Institutes of Health (NIH), 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA)에서 이용가능한 소프트웨어의 설명에 따라 플러그-인을 개발하였다. ROI는 "관심 영역(Region of Interest)"를 나타낸다.

[0158] 실시예 2

[0159] 운동성 질환에 효과적인 작용제의 선별.

[0160] 이 선별은 두-단계 방법을 포함한다. 내강내 압력의 자발적인 기록을 이용하는 첫 번째 단계는 비디오 기록 뿐만 아니라 시공간 맵을 변화시킨다. 두 번째 단계는 신경 신호전달의 분석이다.

[0161] 모든 작용제는 대조와 비교하고 작용제끼리는 서로 비교하지 않으며, 이것은 검사되는 작용제당 하나의 그래프를 야기시킬 것이다.

첫 번째 단계. 시공간 분석

[0163] Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)에서 구입한 수컷 스위스 웨스터(Swiss Webster) 생쥐 (20-30 g)를 이용하였다. 동물 사용 및 관리에 대한 McMaster 지침에 따라, 경부 탈구로 생쥐를 죽였다. 뒤이은 모든 절차는 생체외였다.

기관 조(*organ bath*) 운동성 기록

[0165] 4-cm-길이의 공장 분절 또는 원위 결장 분절을 잘라내고 2 hPa 중력 압력 수두 하에 크레브스(Krebs) 식염수로 분절을 씻어냄으로써 내용물이 비워지도록 하였다. 각각의 분절을 20-ml 기관 조 챔버(chamber)에 마운팅하고 산소화된 크레브스에 가라 앉혔다 (도 1A). 구강 및 항문 끝에 캐뉼러를 삽입하였고, 그리고 여러 가지 마리오토(Mariotte) 병을 이용하여 (95% O₂ 및 5% CO₂)--기체 공급된 크레브스로 내강을 중력 관류시켰다. 실온 완충액 (19 내지 22°C)으로 내강내 구획을 0.5 ml/분으로 관류시켰다. 미리-따듯하게 해둔 (34°C), 카보겐-기체 공급된, 크레브스 용액으로 기관 챔버 (장막 구획)을 5 ml/분의 속도로 관류시켰다. 산소화된 크레브스 완충액은 다음 조성물 (mM)로 이루어졌다: 118 NaCl, 4.8 KCl, 25 NaHCO₃, 1.0 NaH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11.1 글루코오스, 및 카보겐 기체 (95% O₂ 및 5% CO₂)로 버블링된(bubbled) 2.5 CaCl₂. 실험의 시작에서, 내강내 압력을 3 hPa로 조정하였고 기록은 이 충전 압력에서 이루어졌다. 도 1A에서 예증된 바와 같이, 적절한 스톱콕(stopcock)을 닫고 열음으로써 크레브스를 함유한 마리오토 병에서 크레브스 플러스 박테리아를 함유한 것으로 구강 내강 유입을 바꿔 박테리아를 적용시켰다. 내장 분절의 세로축의 중심점에서 내강내 압력 변화를 측정하였다. 압력 신호를 PC 컴퓨터 상에서 증폭시키고, 디지털화하고, 저장하였고 그리고 PC clamp 9 소프트웨어 (Molecular Devices, Sunny Vale, CA, USA)를 이용하여 오프-라인으로 분석하였다.

[0166] 내장 분절 10cm 위에 위치된 비디오 캠코더 (JVC Everio Hard Disk Camcorder Model GZ-MG155U)를 이용하여 이미지를 기록하였다 (도 1A). 기록은 실험 기간 동안 8 내지 12 cm의 관측 시야를 이용하여 압력 기록과 함께 공시적 연구로 시작하였다. 카메라 출력은 초당 30프레임 (fps)으로 미가공 비디오 형식 (MOD)이었다. 비디오 편집 소프트웨어 (Avidemux 버전 2.5.0, www.avidemux.org에서 이용가능한 오픈 소스 소프트웨어)를 이용하여 MOD 파일로부터 10-분 길이의 비디오 클립(video clip)을 잘라내었다. 이후 클립을 비디오 컨버터 (Zune 컨버터 버전 1.1, <http://ffmpeg.mplayerhq.hu>에서 이용가능한 오픈 소스 소프트웨어)를 이용하여 MOV 형식으로 전환시켰다. 최종 비디오 클립을 384 × 256 픽셀의 해상도와 25 fps로 리샘플링(resampling)하였다. NIH ImageJ (버전 1.43c, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>에서 이용가능한 오픈 소스 소프트웨어)로서 개발된 인-하우스(in-house) 이미지 프로세싱 소프트웨어 (StMap, 실시예 1을 참고)를 이용하여 비디오 기록을 분석하였다. 소프트웨어는 비디오의 각각의 프레임내 이미지 (1B)를 흑백 실루엣 (1C)으로 전환시키고 모서리 검출 루틴 (edge detection routine)을 이용하여 시공간 맵을 만든다. 먼저 루틴은 내장을 따라 각각의 위치에서 지름을 측정하고 그 다음에는 색조 명도 (0-255의 범위, 검은 색에서부터 흰색)로서 각각의 위치에서 물리적인 지름을 나타낸다. 내장 지름은 수축 동안에 감소하기 때문에, 색조 값은 0쪽으로 감소되고 더 어두운 값쪽으로 나타날 것이다. 소프트웨어는 각각의 10분 클립을 통해 판독하면서, 이는 시공간 맵 - 3 세트의 정보: 내장에 따른 위치 (세로 좌표), 시간 (가로 좌표) 및 내장 지름 (높이 좌표 또는 z-축)을 함유한 명 및 암 색조의 교대하는 밴드의 패턴을 만든다 (도 1D). 이를 변수를 이용하여, 시공간 맵은 운동 "지문"이 되고, 이의 민감성은 특이적인 프로바이오틱 균주와 다른 작용제가 그들 사이를 구별할 수 있는 능력과 운동성을 갖는다는 상세하고 미묘한 효과를 정의하는데에 결정적으로 중요하다.

- [0167] StMap은 각각의 위치에서 지름 변화를 측정하기 때문에, StMap은 수많은 2D 지름 대 시간 그래프의 스택킹(stacking)로서 해석될 수 있다. 실제로, 맵에 대하여, 압력 변환기의 위치가 식별되고 (도 2A에서 점선) 그리고 무채색 스케일(grey scale) 대 시간 그래프로서 나타난다면 (도 2B), 이 그래프는 그 위치에서의 동시 기록된 압력 대 시간으로 레지스터(register)에 있을 수 있다.
- [0168] StMap 플러그인을 이용하여 시공간 맵으로부터 운동성 파라미터를 직접 측정하였다. 이 시스템에서, 수축이 장의 신경계에 의존하거나 근원성 (주기적인 근육 수축으로 유도되지만 뉴런 비의존적임)인지에 대해 검사 (테트로도톡신 뉴런 침묵을 이용함)할 수 있다. 신경으로 발생된, 항문으로 전파하는, 이동성 복합 운동 MC는 원쪽에서 오른쪽으로 대각선으로 기울어진 두껍고 어두운 밴드를 만들었다; 각각의 밴드의 기울기(들)로부터 전파 속도 (mm s^{-1})를 측정한다 (도 3). 각각의 처리에서, 전파 속도를 계산하기 위해 3-5개 연속적인 MC의 기울기의 평균을 내었다. 10분 분절 동안 어두운 MC 밴드의 수를 샘으로써 MC 빈도 (mHz)를 추산하였다. 각각의 처리에 대해 평균을 낸 3개의 값으로 기준 지름 (도 2B) 또는 압력 (도 2C)으로부터 다음 피크까지 MC 증폭을 직접 측정하였다. 지름이 기선에서부터 최대로 수축하는 테에 걸리는 시간으로부터 지름 변화의 속도 (cm/s)를 계산하였다 ((도 2B)에서 MC의 하향행정(downstroke)).
- [0169] 검사되어야 할 작용제
- [0170] 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) (JB-1), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) (DSM 17938), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 6475, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 345A (DSM 27123), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A (DSM 27126), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T1 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T2를 본 발명의 방법의 첫 번째 단계에서 모두 검사하였다.
- [0171] 시각적으로 세포 수를 결정하고 성장 배지 한천 평판 상에 도말한 후 성장 능력으로 생존력을 항상 확인하였다. 냉동 스톡(stock)으로부터의 세포를 해동시키고 15분 동안 2000 rpm에서 원심분리하였고, 그리고 펠렛(pellet)을 동일한 부피의 크레브스 완충액에서 혼탁시켰다. 이후 혼탁액을 다시 원심분리하였고, 그리고 세포를 제거하고 원래 농도로 크레브스에서 재현탁시켰다. 이용하기 직전에, 신선한 크레브스 완충액으로 박테리아를 작용 농도까지 희석시켰다.
- [0172] 박테리아를 함유한 크레브스를 내강내 구획에 공급하고 동시에 장막 구획을 관류시키는 크레브스 완충액에 이온 채널 조절 약물을 첨가하였다. 약물 용액이 텁에서부터 기록 챔버까지 흐르기 위해 요구되는 시간은 30초였다. IK_{Ca} 이온 채널 차단제 1-[2-(2-클로로페닐)디페닐메틸]-1H-피라졸 (TRAM-34) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA)을 순수한 디메틸 셀록사이드 (DMSO)와 함께 용해시켜 10-mM 스톡 용액을 만들었고, 사용하기 30분 전에 이들을 산소화된 크레브스에서 희석시켜 작용 농도를 만들었다. IK_{Ca} 채널 오프너(opener), 5,6-디클로로-1-에틸-2- 벤즈이미다졸리논 (DCEB10) (Tocris)을 DMSO에서 용해시켜 10-mM 스톡 용액을 만들었다; 크레브스 완충액내 최종 작용 농도는 0.1 또는 1 μM 였다.
- [0173] 상기 제시된 단계 1에 따라 작용제를 분석하였고 결과는 도 7에서 나타난다.
- [0174] 통계
- [0175] GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 이용하여 통계를 계산하였다. 기술 통계학은 평균 \pm SD로서 주어지지만, 농도-반응 플롯에서, 샘플링 오차는 SEM을 이용하여 나타난다; 샘플 크기는 n 으로 표시한다. 유의성의 검사를 위해 통계적으로 구별 가능한 차이는 $P = 0.05$ 에서의 세트였고; 모든 검사는 양방향(2-tailed)이었다.
- [0176] 두 번째 단계, 신경 신호전달의 분석
- [0177] 모든 절차는 동물 관리 지침에 대해 캐나다 위원회에 고수되었고 그리고 McMaster University의 Animal Research Ethics Board에 의해 승인되었다 (허가 #08-08- 35).
- [0178] 세포외 기록
- [0179] Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)로부터 성체 수컷 스위스 웨스터 생쥐 (20-30 g)를 얻었다. 경부 탈구로 생쥐를 희생시켰다. 뒤이은 모든 절차는 생체외였다. 부착된 장간막 조직이 있는 잘라낸 원위 공장 (~2.5 cm)의 분절을 마취된 동물로부터 제거하였고 (도 4) 다음 조성물의 크레브스 완충액으로 채운 Sylgard-코팅된 기록 페트리 접시에 즉시 두었다: 118 NaCl, 4.8 KC1, 25 NaHCO₃, 1.0 NaH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11.1 글루코

オス 및 카보겐 기체 (95% O₂/5% CO₂)로 베블링된 2.5 CaCl₂. 내장 분절의 구강 및 항문 끝에 플라스틱 관의 캐뉼러를 삽입하였고, 산소화된 크레브스 완충액으로 채워진 부착 주사기를 이용하여 서서히 비웠다; 그 다음, 분절 및 장간막 조직을 고정시키고 그리고 Barbara et al (Gastroenterology, Volume 132, Issue 1, Pages 26-37, January 2007)에 의해 설명된 바와 같이 입체 현미경 하에 신중한 해부로 장간막 신경 다발을 단리시켰다. 제조물을 도립 현미경에 옮기고 여러 가지 마리오트 병을 이용하여 실온 (~22 °C)의 산소화된 크레브스 및/또는 첨가제로 내강을 0.5-1ml/분으로 중력 관류시켰다. 미리-따듯하게 해둔 (34°C), 크레브스 용액으로 장막 구획을 3-5 ml/분으로 개별적으로 관류시켰다. 흡입기(suction)로 신경 다발을 폐치 클램프 전극 홀더(patch clamp electrode holder) (CV-7B; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)에 부착된 유리 피펫 내로 부드럽게 끌어당겼고 그리고 Multi-Clamp 700B 증폭기 및 Digidata 1440A 신호 컨버터 (Molecular Devices)를 이용하여 세포의 신경 기록을 수행하였다. 전기 신호를 0.1 내지 2 kHz에서 통과대역(bandpass)-여파시키고, 20 kHz에서 샘플링하고 그리고 사후 분석을 위해 pClamp 10 소프트웨어 (Molecular Devices)를 작동시켜 개인 컴퓨터에 저장하였다.

[0180] 미주신경 절제술(vagotomy)

몇 가지 실험을 위하여, 이전에 설명된 바와 같이 횡경막하 미주신경 절제술을 수행하였다 (van der Kleij H., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295:1131-1137, 2008). 전기생리학적 실험을 위해 공장 및 장간막 조직을 수화하기 전에 10-14일 동안 동물이 회복되도록 하였다. 3마리 동물에게 모의 미주신경 절제술을 수행하였다. 수술 후에, 매일 생쥐의 체중과 일반적인 건강을 측정하였다. 미주신경 절제된 또는 모의-치료된 동물에서 수술 후 1주에는 무게에서 유의적인 차이의 증거를 찾지 못했다. 각각의 실험 후 콜레시스토키닌 (CCK)의 장막 적용에 대한 반응을 기록함으로써 절차의 완성도에 대하여 미주신경 절제된 모든 생쥐를 검사하였다.

[0182] CCK가 장간막 신경 발화 속도를 증가시키지 않았다는 점을 밝혀내었을 때 미주신경 절제술이 효과적이었다는 것으로 간주되었다.

[0183] 공장 분절의 통합

[0184] 실험 동안에 상피를 가로지르는 박테리아의 자리이동에 관하여 공장 분절의 통합을 검사하기 위하여, 5-(6)-카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르 (CFSE)로 JB-1을 표지하고 10⁹/ml 의 크레브스 농도로 이들을 내강 내에 두고 75분 동안 인큐베이션 후, 파라포름알데하이드에 조직을 고정시키고, 그리고 공초점 현미경 (이중-레이저 현미경, LSM 510, Carl Zeiss, Germany)으로 상피 아래의 그들 존재에 대해 박편을 검사하였다. JB-1을 PBS로 2회 세척하고 5% 소 태아 혈청으로 보충된 PBS에서 5 μM의 CFSE 최종 농도에서 재현탁시키고 그리고 37°C에서 25분 동안 인큐베이션하였다. 조직 (n=3)을 하룻밤 동안 4°C에서 4% 파라포름알데하이드에서 고정시키고, 그 다음 각각을 10분 동안 PBS로 3회 세척하고, 10 및 30 μm의 박편을 만들었고 그리고 가로의 박편을 현미경 슬라이드에 옮기고 마운팅하였다. 이후 Z-스테킹 방법론에 의한 광학 슬라이스(optical slice)에서 이들을 관찰하였다.

[0185] 검사되어야 할 작용제

[0186] 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) (JB-1), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) (DSM 17938), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 6475, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 345A (DSM 27123), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A (DSM 27126), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T1 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T2를 본 발명의 방법의 두 번째 단계에서 모두 검사하였다.

[0187] 시각적으로 세포 수를 결정하고, 성장 배지 한천 평판 상에 도말한 후 성장 능력으로 생존력을 확인하였다. 냉동된 (-80°C) 1 ml 분취량에서 생 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)를 성장시켰고, 이는 Man-Rogosa Sharpe 부용 (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA)에서 5x10⁹개 세포로 구성된다. 냉동 스톡으로부터의 세포를 해동시키고 15분 동안 2000 rpm에서 원심분리하였고, 그리고 펠렛을 동일한 부피의 크레브스 완충액에서 현탁시켰다. 현탁액을 다시 원심분리하였고, 그리고 세포를 제거하고 원래 농도로 크레브스에서 재현탁시켰다. 이 용하기 직전에, 신선한 크레브스 완충액으로 세포를 작용 농도까지 희석시켰다. 몇 가지 실험을 위하여, 박테리아를 해동 후 (부용에서) 작용 농도까지 바로 희석시켰다; 박테리아를 공장 분절의 내강 내로 항상 적용시켰다. 항산화된 콜레시스토키닌 (25-33) (CCK; AnaSpec, Fremont, CA)을 DMSO에서 희석시켜 1 mM 스톡 용액을 만들었다. 분취량을 실험 날에 크레브스 완충액에서 작용 농도까지 희석시켰고, 여기서 최종 DMSO 농도는 ≤0.0001%이

다.

[0188] 오프-라인 데이터 분석

[0189] Clampfit 10.2 (Molecular Devices)를 이용하여 장간막 구심성 신경 다발의 다중- 및 단일-단위 자발적 발화 빈도를 측정하였다. 두 가지 측정 방법 (다중-단위 스파이크 방전 및 과형 분석) 모두, 상이한 처리에 의해 유도되는 장간막 신경 섬유의 흥분성에서의 변화를 측정하는 데에 일과적으로 이용된다. Clampfit의 피크 검출 모듈을 이용하여 다중-단위 스파이크의 시기를 측정하였고, 그리고 스파이크 간격으로부터 평균 빈도를 계산하였다. Clampfit (컴퓨터화된 과형 분석)의 스파이크 모양 자동 주형 검출 도구를 이용하여 다중-단위 활성으로부터 단일-단위 활성을 단리시켰다. 주형 검출 후, 육안 검사로 차이를 항상 확인하고 시각적으로 비-스파이크 모양의 결과는 처분하였다 (<0.2%). 결과는 도 8에서 나타난다.

[0190] 통계

[0191] 데이터는 기록된 공장 분절의 총 수를 나타내는 n과 함께 평균 ± SD로서 표현된다; 동일한 동물로부터 기록된 분절의 최대 수는 2개였다. 쌍 데이터 비교를 위해 윌콕슨(Wilcoxon) 검사를 이용하였고 그리고 분산의 반복 측정 분석을 위해 Prism 소프트웨어 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 던(Dunn)의 사후 검사와 함께 프리드먼(Friedman) 검사를 수행하였다. 자발적인 활성에서 큰 변자는 다중-단위 신경 활성으로 하나의 제조물과 또 다른 것 사이에서 발생할 수 있기 때문에, 모든 비교는 각각의 신경 다발이 그 자체의 대조로서 역할을 하는 경우 만들어진 처리 기록 전과 후와 쌍을 이루었다. P ≤ 0.05라면 차이는 유의적인 것으로 간주된다.

[0192] 실시예 3

[0193] A. 본 발명의 정의된 단계를 이용하여 운동성 질환 (가령, 고령자에서 변비)을 치료하는 것을 돋기 위한 최적의 프로바이오틱 박테리아 작용제의 선별:

[0194] 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) (JB-1), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) (DSM 17938), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 6475, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 345A (DSM 27123), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 621A (DSM 27126), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T1 및 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) T2를 실시예 2에 따라 분석한다. 표 1에서 결과를 요약한다.

표 1

| 작용제 | 운동성 | | | 통증 신호전달 |
|------------------|--------|----|----|------------|
| | | 공장 | 결장 | |
| JB-1 | MMC 빈도 | ↓ | ↓ | ↑ |
| | MMC 속도 | ↑ | ↓ | |
| | PPr | ↓ | ↓ | |
| DSM 17938 | MMC 빈도 | ↓ | ↑ | ↓ |
| | MMC 속도 | ↓ | ↑ | |
| | PPr | ○ | ○ | |
| ATCC PTA 6475 | MMC 빈도 | - | ○ | ○ |
| | MMC 속도 | - | ○ | |
| | PPr | - | ○ | |
| LG345A | MMC 빈도 | - | ↑ | ↓ |
| | MMC 속도 | - | ↑ | |
| | PPr | - | ↑ | |
| LG621A | MMC 빈도 | - | ○ | ↓ |
| | MMC 속도 | - | ↓ | |
| | PPr | - | ○ | |
| T1 | MMC 빈도 | - | ○ | ○ |
| | MMC 속도 | - | ○ | |
| | PPr | - | ↓ | |
| T2 | MMC 빈도 | - | ↓ | ○ |
| | MMC 속도 | - | ○ | |
| | PPr | - | ○ | |

[0195]

락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938 및 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 345A는 결장에서 MMC 속도를 증가시키고 또한 결장에서 파라미터 PPr 또는 MMC 빈도 중 적어도 하나를 증가시킨다 (락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938은 MMC 빈도를 증가시키고 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 345A는 PPr을 증가시킨다). 이들 두 가지 균주 모두 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도를 감소시킨다. 따라서 이를 균주는 산통, 가령, 영아 산통의 치료를 위해 선별되는데, 그 이유는 이들 균주가 MC 전파 흐름의 속도를 증가시키고 동시에 장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도는 감소시키기 때문이다.

[0197]

락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938 및 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 345A에 의해 야기된 MMC 속도에서의 증가 및 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도의 감소는 그들을 특히, 감소가 요구되는 임신한 여성에서, 또는 고령자에서 변비의 치료를 적합하게 만든다.

[0198]

락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) JB-1 및 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 621A는 MMC 속도를 감소시킨다. 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) 621A는 또한 장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도를 감소시키고 따라서 빠른 관통과 관련한 질환, 예를 들어 IBS를 치료하기 위해 이용될 수 있다. 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) JB-1은 장간막 구심성 신경 다발의 발화 빈도에 미치는 효과가 없으며 따라서 운동성 질환의 치료에는 적용가능하지 않다.

[0199]

락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC PTA 6475, 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T1 및 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) T2는 MMC 속도 또는 장간막 구심성 신경 다발의 자발적인 발화 빈도에 미치는 어떠한 효과도 보

이지 않으며 따라서 운동성 질환에서 이용하는 것이 권장되지 않는다.

수탁번호

[0200]

기탁기관명 : DSMZ

수탁번호 : DSM27123

수탁일자 : 20130418

기탁기관명 : DSMZ

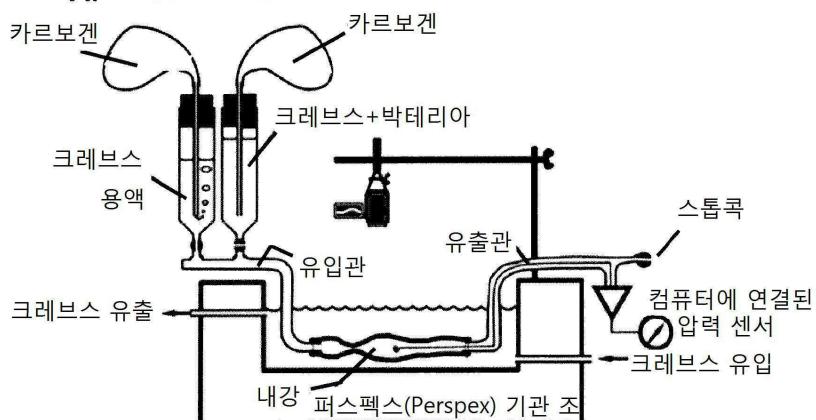
수탁번호 : DSM27126

수탁일자 : 20130418

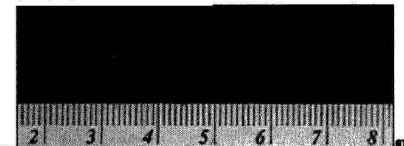
도면

도면1

A. -> 기관 조 설치



B. -> 이미지 획득



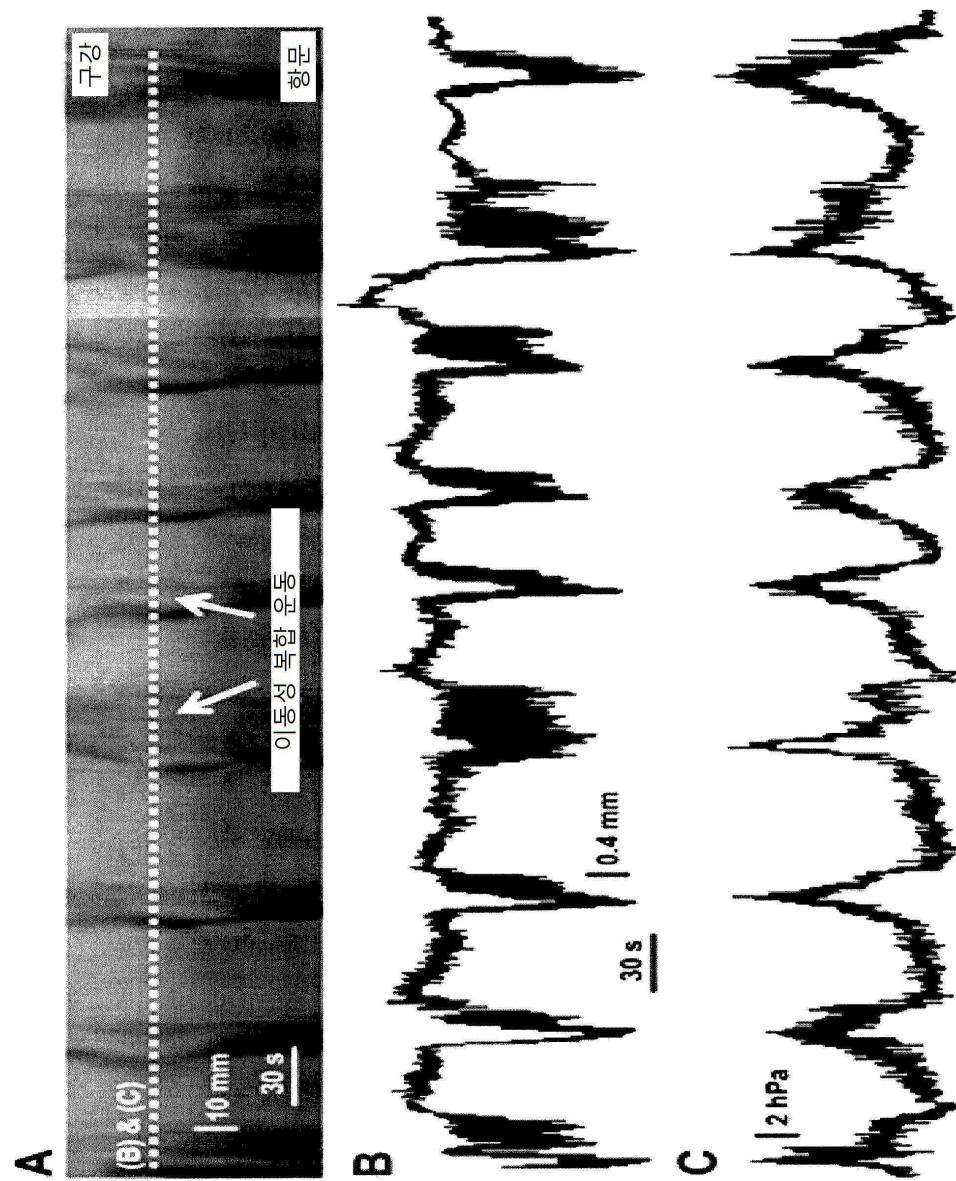
C. -> 윤곽선 검출을 위해 B&W로 전환



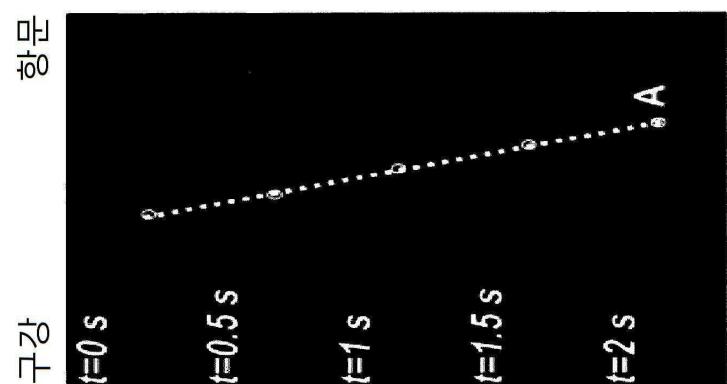
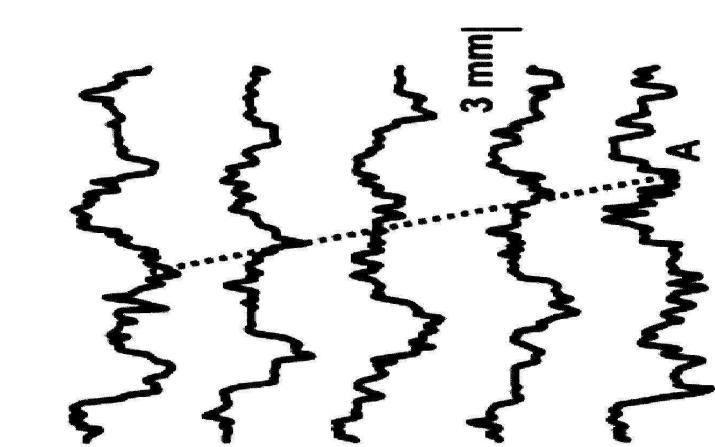
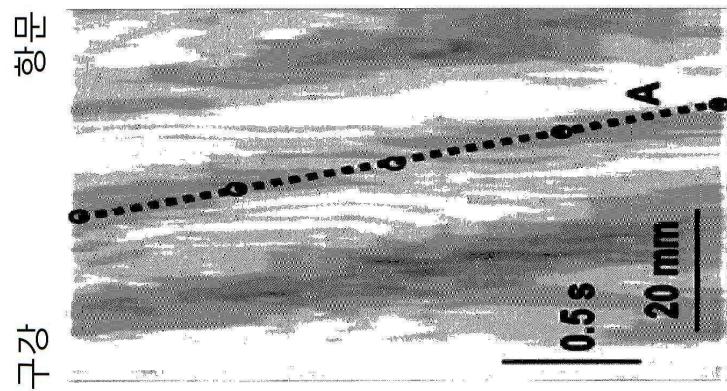
D. -> 시공간적 맵의 생성



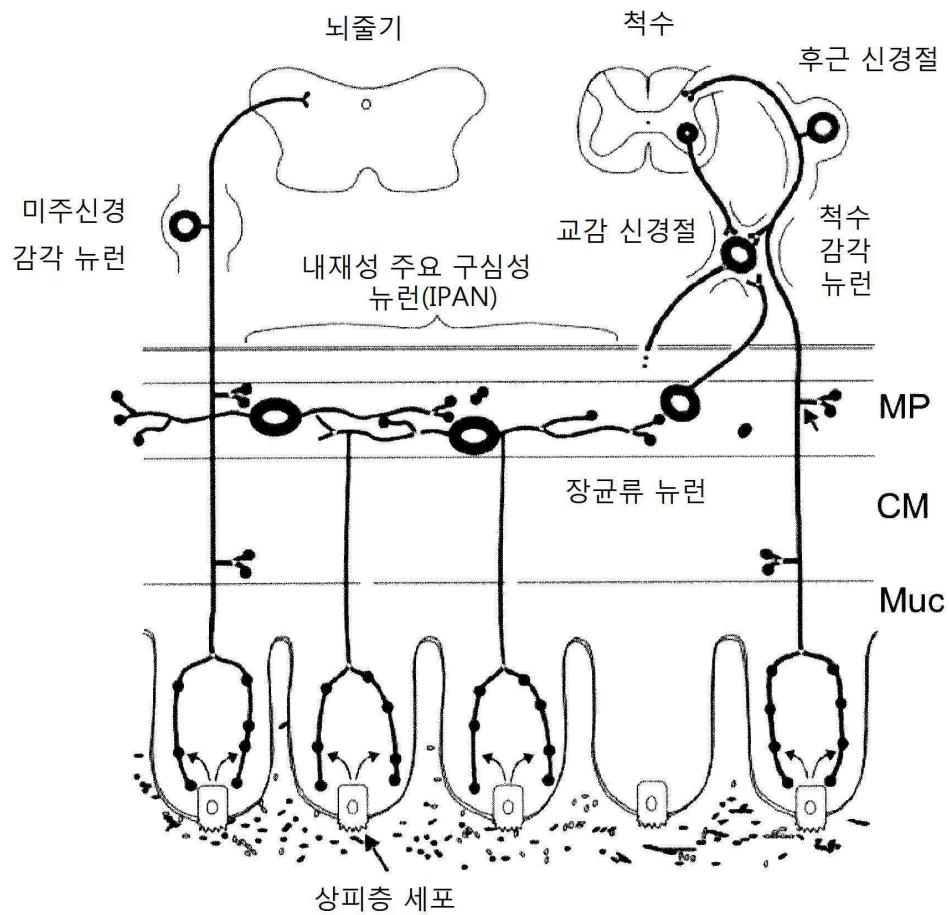
도면2



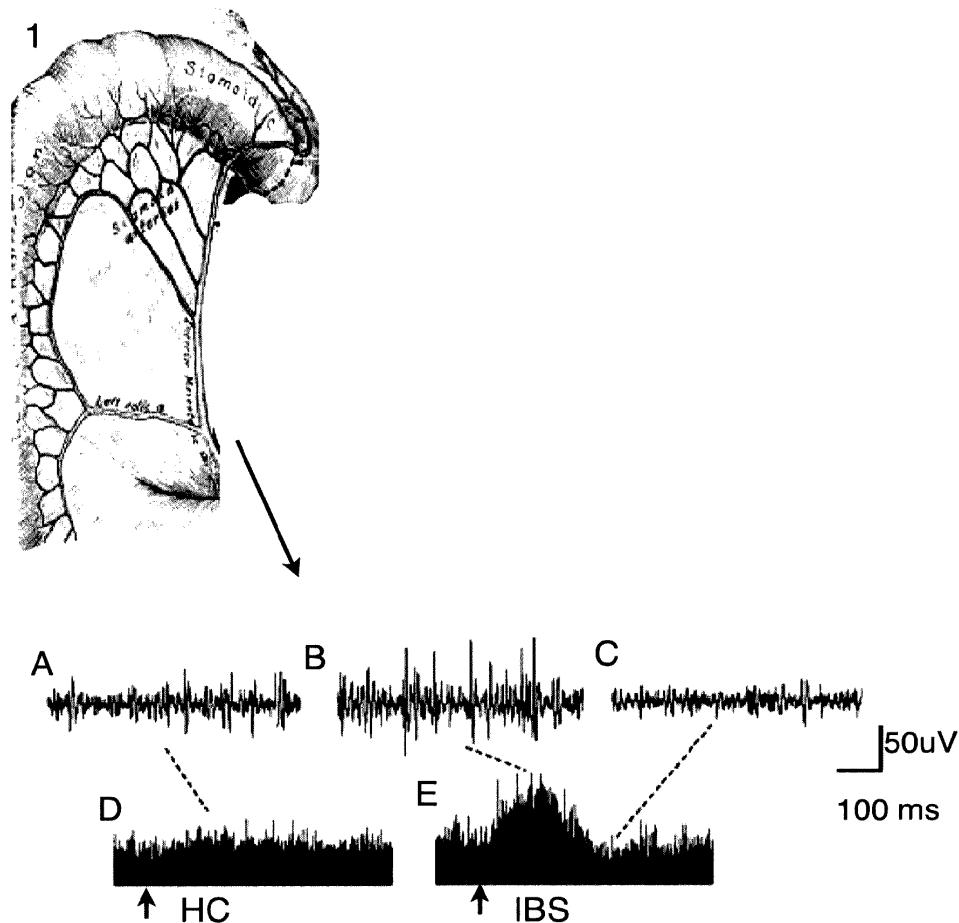
도면3



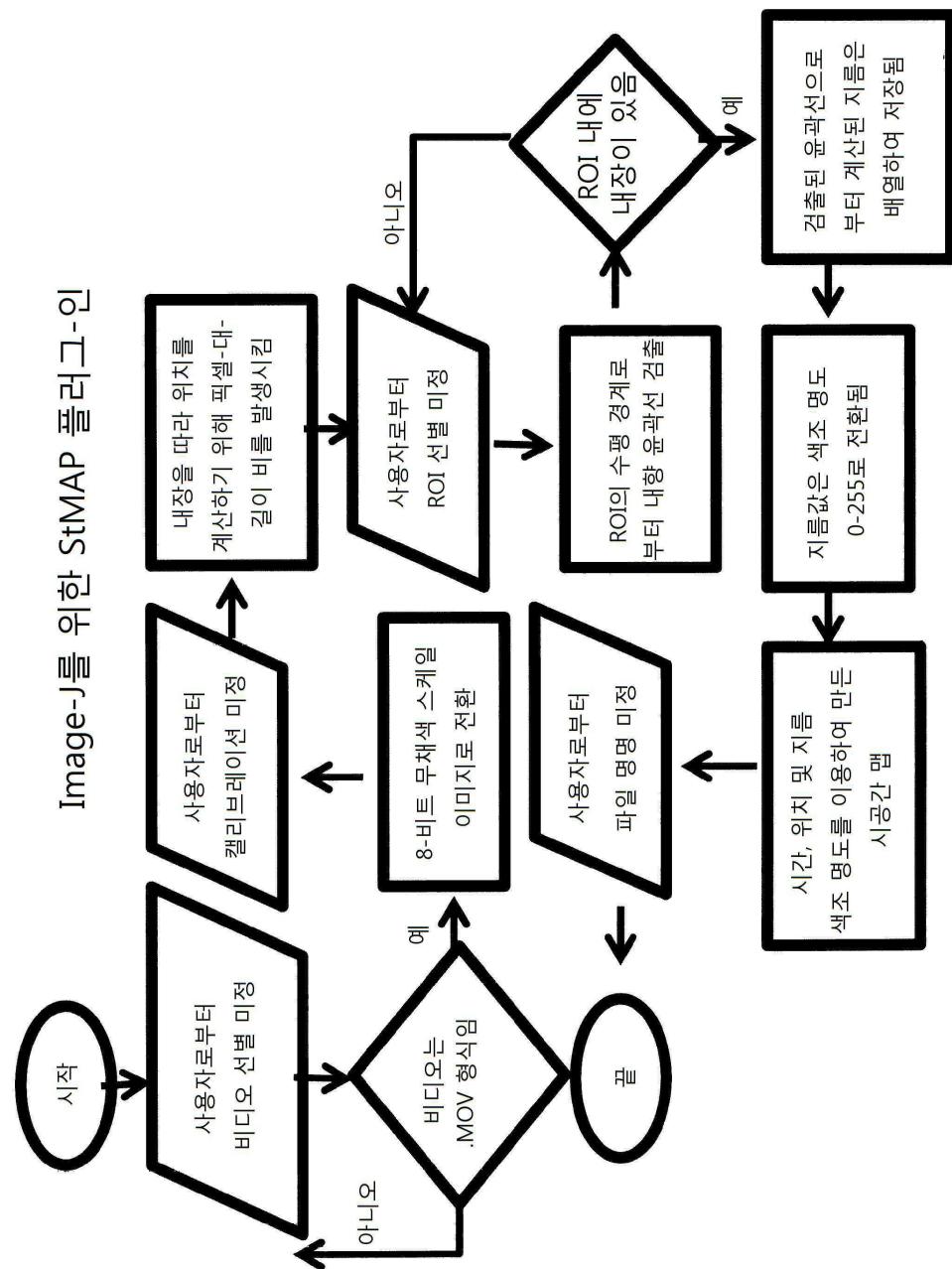
도면4



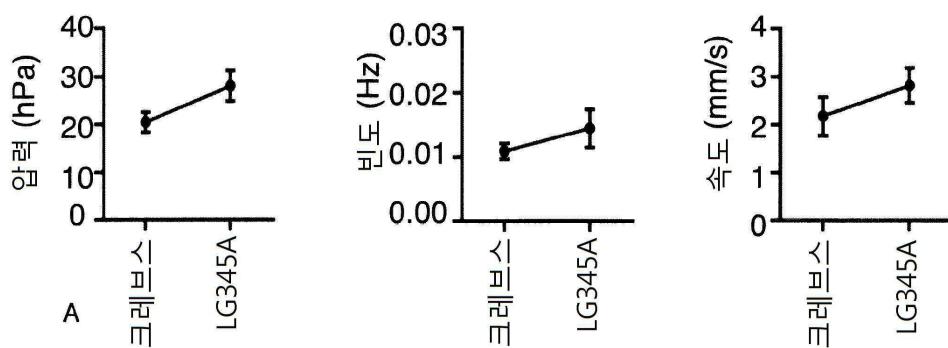
도면5



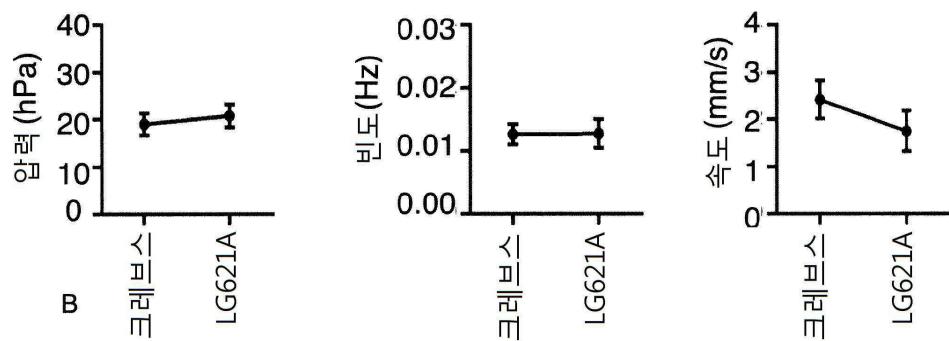
도면6



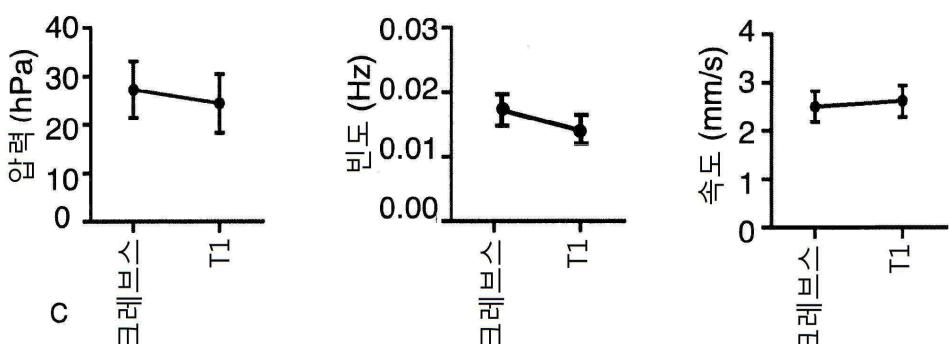
도면7a



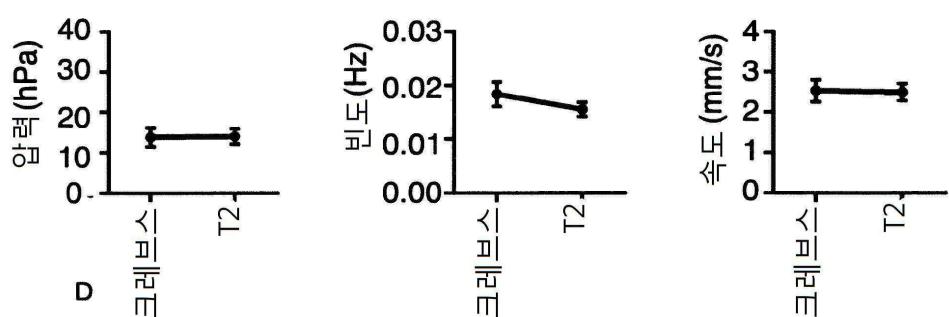
도면7b



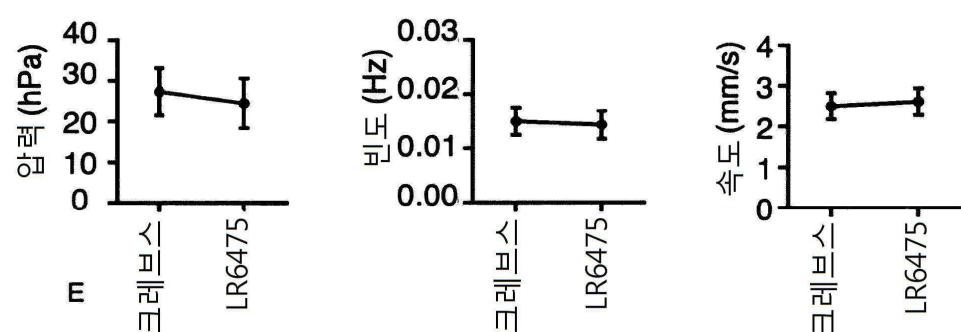
도면7c



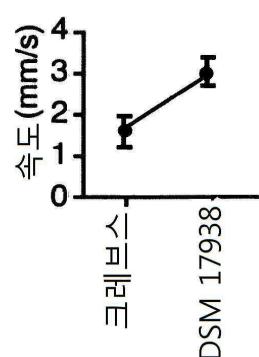
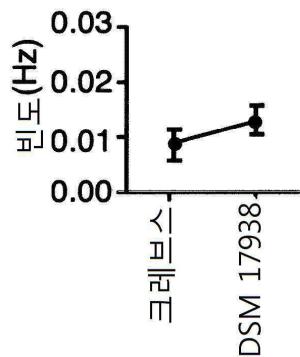
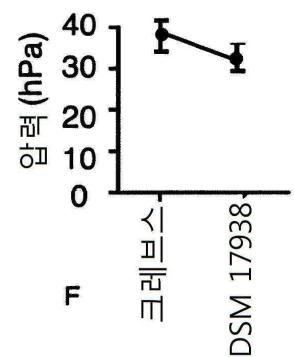
도면7d



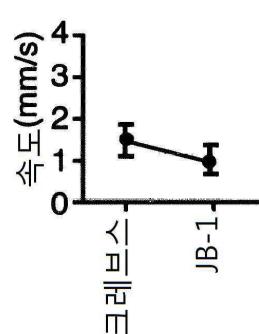
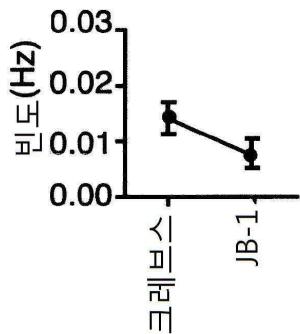
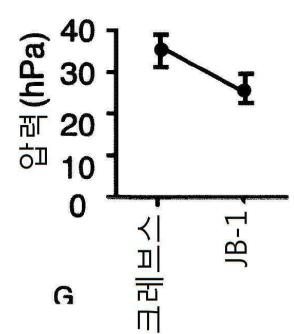
도면7e



도면7f



도면7g



도면8

