



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2019.05); C12Q 1/02 (2019.05); C12R 1/225 (2019.05); A61K 35/74 (2019.05); A61K 35/747 (2019.05); A23L 33/135 (2019.05); G06T 7/0012 (2019.05); G06T 7/13 (2019.05); A61K 2035/11 (2019.05); A23V 2002/00 (2019.05); G06T 2207/30092 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2015112102, 03.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.09.2013

Дата регистрации:
26.09.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.09.2012 US 61/696,277

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2016 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 26.09.2019 Бюл. № 27

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.04.2015

(86) Заявка РСТ:
EP 2013/068202 (03.09.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/033330 (06.03.2014)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

КОННОЛЛИ Имонн (SE),
КУНЦЕ Вольфганг (CA),
БИНЕНШТОК Джон (CA)

(73) Патентообладатель(и):
БИОГАЙА АБ (SE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WANG B. ET AL. Luminal
administration ex vivo of a live Lactobacillus
species moderates mouse jejunal motility within
minutes. The FASEB Journal, 2010, vol. 24, no.
10, pp. 4078-4088. WANG B. ET AL. Lactobacillus
reuteri ingestion and IKCa channel blockade have
similar effects on rat colon motility and myenteric
neurons. Neurogastroenterol Motil (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОТБОРА СРЕДСТВ, КОТОРЫЕ ВЛИЯЮТ НА НАРУШЕНИЯ МОТОРИКИ КИШЕЧНИКА И БОЛЬ

(57) Реферат:

Предложен способ отбора молочнокислого бактериального штамма, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника. Указанный способ включает: а) стадию пространственно-временного (ST) картирования, которую осуществляют на желудочно-кишечном сегменте для того, чтобы анализировать эффект указанного молочнокислого бактериального штамма, оказываемый на моторику желудка и кишечника; б) стадию регистрации нервного

пучка ex vivo, которую осуществляют на желудочно-кишечном сегменте для того, чтобы анализировать эффект указанного молочнокислого бактериального штамма, оказываемый на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам; и с) стадию выбора бактериального штамма, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника, в соответствии с критериями отбора на основе эффектов указанного средства на моторику

желудка и кишечника и на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам, проанализированных на стадии (а) и стадии (б), где критерии отбора варьируют в зависимости от нарушения моторики, которое желательно подлежит лечению. Также предложены бактериальные штаммы *Lactobacillus gasseri* LG345A (DSM 27123) и *Lactobacillus gasseri* LG621A

(DSM 27126), отобранные с помощью способа по изобретению, и применение указанных штаммов в лечении нарушений моторики кишечника. Изобретение обеспечивает отбор молочнокислого бактериального штамма, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника. 7 н. и 16 з.п. ф-лы, 9 ил., 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

(2010) 22, 98-е33. US 8021656 B2, 20.09.2011. ШЕНДЕРОВ Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. III: Пробиотики и функциональное питание. - М.: Издательство "Грантъ", 2001, с.75-84.

RU 2701348 C2

RU 2701348 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*C12Q 1/02* (2006.01)*A61P 1/00* (2006.01)*C12R 1/225* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2019.05); *C12Q 1/02* (2019.05); *C12R 1/225* (2019.05); *A61K 35/74* (2019.05); *A61K 35/747* (2019.05); *A23L 33/135* (2019.05); *G06T 7/0012* (2019.05); *G06T 7/13* (2019.05); *A61K 2035/11* (2019.05); *A23V 2002/00* (2019.05); *G06T 2207/30092* (2019.05)

(21)(22) Application: **2015112102, 03.09.2013**(24) Effective date for property rights:
03.09.2013Registration date:
26.09.2019

Priority:

(30) Convention priority:
03.09.2012 US 61/696,277(43) Application published: **20.10.2016 Bull. № 29**(45) Date of publication: **26.09.2019 Bull. № 27**(85) Commencement of national phase: **03.04.2015**(86) PCT application:
EP 2013/068202 (03.09.2013)(87) PCT publication:
WO 2014/033330 (06.03.2014)Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**KONNOLLI Imonn (SE),
KUNTSE Wolfgang (CA),
BINENSHTOK Dzhon (CA)**

(73) Proprietor(s):

BIOGAJA AB (SE)(54) **METHOD FOR SELECTING AGENTS WHICH AFFECT INTESTINAL MOTILITY DISORDERS AND PAIN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method for sampling a lactic acid bacterial strain effective for treating intestinal motility disorder is disclosed. Said method comprises: a) a stage of space-time (ST) mapping, which is carried out on the gastrointestinal segment in order to analyze the effect of said lactic acid bacterial strain on gastric and intestinal motility; b) a stage of detecting the nerve bundle ex vivo, which is carried out on the gastrointestinal segment in order to analyze the effect of the said lactic acid bacterial strain on the passage of pulses on the mesenteric afferent nerves; and c) a step

for selecting a bacterial strain effective for treating intestinal motility disorder in accordance with the selection criteria based on the effects of said agent on gastric and intestinal motility and on the mesenteric afferent nerve impulses analyzed at step (a) and step (b), where the selection criteria vary depending on the motility disorder, which is desirably to be treated. Also disclosed are bacterial strains of *Lactobacillus gasseri* LG345A (DSM 27123) and *Lactobacillus gasseri* LG621A (DSM 27126) selected using the method of the invention, and use of said strains in treating intestinal motility disorders.

EFFECT: invention provides selection of lactic acid
bacterial strain effective for treating intestinal motility

disorder.
23 cl, 9 dwg, 1 tbl, 3 ex

R U 2 7 0 1 3 4 8 C 2

R U 2 7 0 1 3 4 8 C 2

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область изобретения

Термин «нарушения моторики кишечника» применим к аномальным сокращениям кишечника, часто связанным с болью, констипацией или диареей. Эту фразу используют для того, чтобы описывать различные нарушения, при которых кишка не развита должным образом или утрачивает свою способность координировать мышечную активность в силу различных причин. Такие нарушения могут проявляться различными способами, и включают, но не ограничиваясь этим, следующее:

- Вздутие живота
- Рецидивирующую непроходимость
- Колики в животе
- Констипацию
- Нарушение гастроэзофагеального рефлюкса
- Некупируемую, рецидивирующую рвоту
- Диарею
- Синдром раздраженной кишки (IBS)
- Воспалительное заболевание кишечника
- Недержание фекалий
- Детские колики
- Частую рецидивирующую боль в животе (FRAP)
- Регургитацию
- Пищевую непереносимость

В широком смысле, какое-либо значительное изменение в прохождении пищи и секрети в пищеварительный тракт можно рассматривать как нарушение моторики кишечника.

Надлежащие координированные движения желудка и кишечника необходимы для того, чтобы переваривать и проталкивать кишечное содержимое вдоль пищеварительного тракта. Паттерны сокращения и расслабления, необходимы для надлежащей моторики желудочно-кишечного (ЖКТ) тракта, являются сложными, и в них участвуют нервы и мышцы в стенках ЖКТ. Каждый день в любое время многие факторы могут оказывать влияние на моторику ЖКТ (например, физические упражнения, эмоциональный дистресс). Новорожденные дети должны развивать сложную систему моторики в ЖКТ тракте. Патогенез нарушений моторики кишечника в большинстве случаев является многофакторным.

Несмотря на то, что общая структурная организация нервов и мускулатуры схожа на всем протяжении тонкого и толстого кишечника, каждая часть имеет отличительную двигательную активность. Постоянные или недалеко распространяющиеся сокращения с нерегулярными более длинными перистальтическими и антиперистальтическими комплексами возникают во время и после кормления, и это позволяет разрушать пищевой комок и смешивать его с пищеварительными соками для надлежащей абсорбции. После переваривания двигательная программа меняется на программу с более длительно распространяющимися сокращениями, которые перемещают переваренные продукты в направлении ануса. Возникает другая двигательная активность, более регулярная, которая создает перистальтические волны (т.е. сокращения круглых мышц тонкого кишечника), которые делают возможным продвижение не переваренной пищи через кишечник.

Старение, деменция, инсульт, болезнь Паркинсона, повреждения спинного мозга, разрывы прямой кишки во время родов, диабет, хирургические осложнения и нервно-

мышечные нарушения (например, миастения гравис) могут вызывать нарушения моторики.

В течение десятилетий IBS, обычно диагностируемое нарушение моторики кишечника, рассматривали как заболевание ободочной кишки, но исследования моторики ЖКТ продемонстрировали, что нарушения моторики, лежащие в его основе, могут возникать также в тонкой кишке. IBS может сопровождаться болью в животе.

Причины синдрома раздраженной кишки (IBS) остаются неизвестными. Согласно некоторым сообщениям, тонкая кишка и ободочная кишка пациентов с IBS более чувствительны и реактивны к слабым стимулам, чем обычно.

Иногда недержание фекалий может возникать после приема определенной пищи. Сахара, нерастворимые волокна и крахмалы (за исключением риса) обычно разрушаются в кишечнике, образуя различные количества газа, который должен быть удален. Большинство людей, которые имеют лактазную недостаточность, не могут переваривать лактозу, сахар, который часто встречается в некоторых продуктах питания (например, молоке, выпечке). Люди, которые имеют лактазную недостаточность, могут переносить неконтролируемую жидкую диарею после употребления лактозы.

В Соединенных Штатах констипация является наиболее распространенной жалобой на пищеварение, но, несмотря на ее частоту, часто остается нераспознанной до тех пор, пока у пациента не развиваются вторичные нарушения, такие как аноректальные нарушения или дивертикулярная болезнь.

Не существует широко принятого клинически эффективного определения констипации. Поставщики медицинских услуг обычно используют частоту дефекации (т.е. меньше чем 3 дефекации в неделю) для того, чтобы определять констипацию. Однако, Римские критерии, изначально введенные в 1988 году и впоследствии дважды модифицированные, что дало Римские критерии III, стали стандартным исследовательским определением констипации.

Согласно Римским критериям III, для констипации пациент должен испытывать по меньшей мере 2 из следующих симптомов в течение предшествующих 3 месяцев:

- Меньше чем 3 дефекации в неделю
- Натуживание
- Комковатый или твердый стул
- Ощущение аноректальной непроходимости
- Ощущение неполной дефекации
- Помощь руками, необходимая для дефекации

Констипация часто является хронической, может значительно влиять на качество жизни индивидуума и может быть связана со значительными расходами на медицинскую помощь. Ее считают хронической, если она случалась в течение по меньшей мере 12 недель (всего, не обязательно последовательно) во время предыдущего года.

Констипация обыкновенно имеет несколько причин, первичных или вторичных.

Наиболее частыми из них являются следующие:

- Диета с очень низким содержанием волокон
- Беременность
- Психологическая констипация и клиническая депрессия, связанные с изменениями в образе жизни (например, путешествие, новая работа или развод), при которых пациент не замечает позывы к дефекации
- Гипотирозидизм
- Нарушение баланса электролитов, в частности, с участием Ca^{++} или K^{+}
- Опухоли, создающие механическое давление на кишечный тракт, или изнутри или

снаружи

- Повреждения нервной системы
- Старение
- Болезнь Паркинсона

5 - Интоксикация свинцом, ртутью, фосфором или мышьяком

Констипация является достаточно обычной во время беременности. Мышечные сокращения, которые обычно перемещают пищу через кишечник, замедляются из-за более высоких уровней гормона прогестерона и возможно излишнего железа, принимаемого в виде витаминов для беременных. Это иногда также сопровождается
10 болью в нижней части живота.

Констипация также связана с увеличением возраста и так называемым «старением кишечника», обыкновенно встречающимися, в частности, у людей старше 70 лет и в учреждениях постоянного ухода. Этому состоянию сопутствуют:

- Сниженное число нейронов в ослабленном ответе мизэнтерического сплетения на
15 прямую стимуляцию, что ведет к нарушению мизэнтерической функции
- Увеличенное отложение коллагена в нисходящей ободочной кишке, которое ведет к аномалиям в растяжимости ободочной кишки и прямой кишки, и нарушению моторики
- Снижение амплитуды ингибиторных нервных импульсов, поступающих в кольцевой мышечный слой ободочной кишки, что ведет к недостатку сегментирующей
20 двигательной координации
- Увеличенное связывание эндорфинов плазмы с кишечными рецепторами у людей в возрасте 60 лет и старше

На другом конце спектра возрастных нарушений моторики кишечника находится постоянный или чрезмерный плач от колик новорожденных, который является одной
25 из наиболее тревожных проблем младенчества. Он тревожит младенцев, родителей и вовлеченных работников здравоохранения. Родители раздражительного младенца могут рассматривать плач как вердикт об их способности заботиться или в качестве доказательства болезни их ребенка. Детские колики представляют собой состояние, которое разрешается со временем.

30 Наиболее широко принятым определением для колик являются критерии Весселя или «правило трех»: плач, который длится в течение больше чем трех часов в сутки, происходит больше чем в течение трех суток в неделю, и сохраняется в течение больше чем трех недель. Это определение также требует, чтобы младенец был «в остальном здоров и его хорошо кормили».

35 Кишечная гипермоторика, вторичная по отношению к предполагаемому автономному дисбалансу, также предложена в качестве одной этиологии для колик. Многие механизмы, которые регулируют двигательную активность, незрелы у младенцев. Незрелость этих механизмов может вести к увеличенной восприимчивости к пищевой непереносимости. Таким образом, колики могут представлять собой обыкновенную
40 клиническую манифестацию в субпопуляции младенцев, которые имеют нарушение функции созревания в одном или нескольких аспектах регуляции моторики.

Согласно некоторым эпидемиологическим отчетам, целых 30 миллионов американцев имеют нарушения моторики кишечника. Доступные данные из медицинской литературы показывают, что по всему миру 30-45% всех состояний ЖКТ могут быть отнесены к
45 нарушениям моторики кишечника.

Существующее лечение и рекомендации варьируют в зависимости от типа нарушения моторики, для констипации некоторые примеры представляют собой:

- Волокна или наполнители (нельзя использовать при гипокинетической констипации)

- Размягчители стула
- Стимулирующие слабительные средства
- Осмотические слабительные средства (например, полиэтиленгликоль)
- Активатор хлоридных каналов (например, лубипростон)
- Серотонинергические средства (агонисты рецепторов 5-HT₄)

Исследовали дополнительное использование молочнокислых бактерий (LAB) в рандомизированном клиническом исследовании: Efficacy of *Lactobacillus paracasei*-enriched Artichokes in the Treatment of Patients With Functional Constipation (Riezzo et al; Aliment Pharmacol Ther. 2012 Feb; 35(4):441-50).

Также 90 младенцев с коликами, которых кормили грудью, случайным образом включали в исследование лечения с использованием *L. reuteri* или симетикона. На базовом уровне медианное суточное время плача составляло 197 минут в обеих группах. Среди 83 младенцев, которые выполнили исследование, медианное суточное время плача было ниже в группе *L. Reuteri*, чем в группе симетикона на сутки 7 (159 против 177 минут) и сутки 28 (51 против 145 минут). (Savino F et al, Pediatrics. 2007; 119(1):e124).

Нарушения моторики кишечника распространяются на аномальные сокращения кишечника, часто связанные с болью, и существует много различных типов лечения и рекомендаций для различных нарушений, некоторые из которых работают лучше, чем многие другие.

Поэтому существует общая необходимость и конкретные проблемы, требующие решения для различных нарушений моторики, а именно: как лучше всего отбирать средства для нормализации или лечения нарушений моторики кишечника и боли в кишечнике?

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения, описанного в настоящем документе, разработали новый способ оценки средств для лечения различных нарушений моторики кишечника с использованием отличительных методологических частей, относящихся к мускулатуре и нервам желудочно-кишечного тракта и их связи с головным мозгом.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу отбора средства, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника, где указанный способ включает:

а) стадию пространственно-временного (ST) картирования, которую осуществляют на желудочно-кишечном сегменте для того, чтобы анализировать эффект средства, оказываемый на моторику желудка и кишечника; и

б) стадия *ex vivo* регистрации нервного пучка, которую осуществляют на желудочно-кишечном сегменте для того, чтобы анализировать эффект средства, оказываемый на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам.

В предпочтительных вариантах осуществления ST картирование на стадии а) осуществляют посредством видеовизуализации или регистрации. В способах по изобретению стадия а) предпочтительно включает использование ST карты, созданной на стадии а), для того, чтобы измерять частоту мигрирующего моторного комплекса (ММС) и/или скорость мигрирующего моторного комплекса (ММС) в указанном желудочно-кишечном сегменте.

В способах по изобретению стадия а) предпочтительно дополнительно включает измерение внутрипросветного давления, например, внутрипросветного пикового давления (PPr).

В способах по изобретению предпочтительно стадия б) включает измерение частот прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным

пучкам.

В предпочтительных аспектах в настоящем изобретении раскрыт двухстадийный способ отбора средств, эффективных при нарушениях моторики. На первой стадии авторы изобретения объединили регистрацию внутрипросветного давления с пространственно-временными картами для того, чтобы анализировать эффекты различных средств, оказываемые на моторику. На этой стадии предпочтительно измеряют внутрипросветное пиковое давление (PPr) и выполняют видеорегистрацию сегментов тощей кишки и ободочной кишки мыши *ex vivo* до и после внутрипросветного применения средств. Частоту и скорость мигрирующего моторного комплекса также вычисляют на первой стадии способа. На второй стадии анализируют передачу сигналов по нервам кишечника и измеряют частоты прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Таким образом, в настоящем изобретении раскрыт способ отбора средств, эффективных при нарушениях моторики, который включает первую стадию с использованием одновременной регистрации изменений внутрипросветного давления в дополнение к видеорегистрации и пространственно-временным картам и вторую стадию, которая представляет собой анализ передачу сигналов по нервам, например, посредством выполнения регистрации брыжеечных нервов, например, внеклеточной регистрации брыжеечных нервов.

Таким образом, в еще одном дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ отбора средства, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника, который включает стадии:

(а) регистрацию внутрипросветного давления, создание пространственно-временной (ST) карты для того, чтобы сделать возможным анализ эффектов различных средств, оказываемых на моторику желудка и кишечника, где указанную пространственно-временную карту используют для того, чтобы измерять частоту и скорость мигрирующего моторного комплекса, в образце кишечника в присутствии и в отсутствие тестового средства; и

(б) анализ передачи сигналов по нервам кишечника посредством измерения частот прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам в образце кишечника в присутствии и в отсутствие тестового средства.

В предпочтительных вариантах осуществления этого способа на стадии (а) измеряют внутрипросветное пиковое давление (PPr).

Настоящее изобретение относится к описанному двухстадийному способу, а также к новым бактериальным штаммам.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1. Регистрация моторики органа

Фиг. 2. Изображение и данные, полученные при регистрации моторики

Фиг. 3. Изображение и данные, полученные при регистрации моторики

Фиг. 4. Регистрация брыжеечных нервов; иннервация кишечника

Фиг. 5. Внеклеточная регистрация

Фиг. 6. Подробности о подключаемом программном обеспечении StMAP

Фиг. 7. Графики, показывающие результаты стадии а). Тестировали средства: (A) *L. gasseri* 345A (DSM 27123), (B) *L. gasseri* 621A (DSM 27126), (C) *L. gasseri* T1, (D) *L. gasseri* T2, (E) *L. reuteri* ATCC PTA 6475, (F) *L. reuteri* DSM 17938 и (G) *L. rhamnosus* (JB-1).

Фиг. 8. Графики, показывающие результаты стадии б). Тестировали средства: *L. rhamnosus* (JB-1), *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, *L. gasseri* 345A (DSM 27123), *L. gasseri* 621A (DSM 27126), *L. gasseri* T1 и *L. gasseri* T2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ И ЕГО ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ

ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Для того чтобы содействовать пониманию изобретения, далее определены некоторые термины.

Как используют в настоящем документе, термин «внутрипросветное пиковое давление» (PPr) основан на регистрации внутрипросветного давления, где изменения внутрипросветного давления измеряют в середине продольной оси сегмента кишки. Анализируют сигнал давления, а также идентифицируют и измеряют внутрипросветное пиковое давление (PPr).

Как используют в настоящем документе, термин «частота мигрирующего моторного комплекса» (частота ММС) вычисляют посредством подсчета числа темных МС полос на пространственно-временных картах.

Как используют в настоящем документе, термин «скорость мигрирующего моторного комплекса» (скорость ММС) измеряют по наклону(ам) каждой полосы на пространственно-временной карте, которую генерируют с помощью мигрирующих моторных комплексов.

Как используют в настоящем документе, термин «частота прохождения импульсов» используют для того, чтобы измерять последовательности сенсорных спайков, посылаемых в головной мозг.

Как используют в настоящем документе, термин «средство» используют для обозначения какого-либо вещества или материала, содержащего целые клетки, микроорганизмы, белки, пептиды, ферменты, молекулы или другие биологические или химические материалы, которые можно использовать для того, чтобы оказывать влияние на моторику и/или боль в желудочно-кишечной системе млекопитающего. Предпочтительные средства представляют собой бактериальные штаммы, например, пробиотические бактериальные штаммы.

Способ по изобретению в настоящем документе представляет собой двухстадийный способ, основанный на способе пространственно-временного (ST) картирования (стадия 1) в комбинации с усовершенствованной технологией регистрации нервного пучка *ex vivo* (стадия 2), в которой желудочно-кишечный сегмент иссекают с брыжеечной аркадой, содержащей нервный пучок, идущий к сегменту, который состоит как из спинномозговых, так и из вагальных волокон, или без нее.

На первой стадии представленного предпочтительного способа регистрацию внутрипросветного давления комбинируют с пространственно-временными (ST) картами для того, чтобы анализировать эффекты различных средств, оказываемые на моторику.

ST карты предоставляют инструмент для визуализации поля, развивающегося во времени и меняющегося в пространстве, который можно использовать при анализе моторики желудка и кишечника, в том числе характеристики в здоровом состоянии и при нарушениях моторики. Используя пространственно-временную видеовизуализацию, авторы изобретения в настоящем документе разработали части нового способа с использованием компьютерного анализа пространственно-временных карт изменений диаметра кишки. Это выявило двигательные паттерны, которые очень сложно обнаруживать с использованием какого-либо другого способа. Параметры этих паттернов непосредственно коррелируют с результатами, полученными с использованием кишечных сегментов мыши *ex vivo* и кишечных фармакологических средств для человека. Проводили цифровую регистрацию перистальтического распространения моторных комплексов (МС) или перемешивающих движений (стационарные МС) в реальном времени и сохраняли изображения. Аналитическое программное обеспечение, как описано дополнительно далее, обнаруживает края кишки

и способно автоматически вычислять диаметр вдоль длины сегмента с течением времени. Эти данные программа использует для того, чтобы строить пространственно-временные карты, которые позволяют извлекать высоко специфичную информацию о двигательных паттернах; например, частоту мигрирующего моторного комплекса сокращений (ММС) (частота ММС, которая зависит от нервной системы), скорость ММС сокращений и частота миогенных (связанных с медленными волнами) сокращений.

Кроме того, сначала следует принять, что кишечные микроорганизмы подают сигналы в головной мозг в качестве части так называемой оси «микробиом кишечника-головной». Однако очень мало известно о роли микробиома кишечника в развитии или функционировании нервной системы. В настоящее время ничего не известно о количественной природе нервных сигналов, передаваемых из кишечника в центральную нервную систему.

Отдельные сенсорные нейроны, включая те, которые находятся в волокнах блуждающего нерва, представляют непрерывные физические стимулы в виде паттернов последовательностей спайков, которые кодируют свойства и интенсивность стимула. В дополнение к этому, стимулы могут быть представлены в популяционном коде, определяемом с помощью числа активных волокон в пучке. Вся информация, достигающая головного мозга по первичным афферентным волокнам, должна быть закодирована на языке нейронных последовательностей спайков. Следовательно, знание о том, как на последовательности сенсорных спайков влияют комменсалы, пробиотические штаммы и различные вещества, позволяет идентифицировать новые полезные микроорганизмы кишечника и их активные молекулы посредством эффектов, оказываемых на прохождение первичных афферентных импульсов, а также новые лекарственные средства и другие соединения, которые могут различными путями вмешиваться в эту систему сигналов.

Новый способ по изобретению в настоящем документе для оценки средств для лечения различных нарушений моторики кишечника делает возможной дифференциацию конкретных эффектов средств, например, пробиотического бактериального штамма или другого биологического или химического средства, оказываемых как на мышцы, так и на нервы. Экспериментальные данные подтверждают, что это не обязательно то же средство, которое способно модулировать, например, перемешивающий паттерн или поступательный паттерн в определенной части желудочно-кишечного тракта, которое также является наиболее эффективным при модуляции боли, связанной с кишечником и/или центральной нервной системой.

Кроме того, для исследования эффектов определенных молекул при различных заболеваниях, способ авторов изобретения делает возможными различные исследования просветной перфузии и диффузии к эпителиальному барьеру и через него.

Пищеварительная трубка проводит два фундаментальных паттерна моторики:

Поступательное движение: пищу нужно проталкивать по всей длине пищеварительной трубки для того, чтобы она подвергалась последовательной обработке, вовлеченной в разрушение и абсорбцию. Принципиальным типом поступательной моторики, которую наблюдают, в частности, в пищеводе и тонкой кишке, является перистальтика – кольцо мышечного сокращения двигается от ротовой стороны пищевого комка и в направлении ануса, проталкивая содержимое просвета в этом направлении; по мере движения кольца мышцы на другой стороне растянутой области расслабляются, что облегчает плавное прохождение комка.

Перемешивание: если проглоченное вещество просто проталкивать через пищеварительную трубку, следует ожидать очень плохого переваривания и абсорбции,

поскольку пищеварительные ферменты не будут в достаточной мере смешаны с пищей и большая часть пищи не будет входить в контакт с эпителиальными клетками, которые абсорбируют питательные вещества, в том числе воду. Сегментирующие сокращения представляют собой обыкновенный тип перемешивающей моторики, наблюдаемой, в частности, в тонкой кишки – сегментирующие кольца сокращения разделяют и перемешивают пищу. Чередующиеся сокращения и расслабления продольных мышц в стенке кишки также обеспечивают эффективное перемешивание ее содержимого.

Используя новый способ в настоящем документе, можно обнаруживать и регистрировать измененную моторику кишечника, наблюдаемую в виде или перемешивающего паттерна (после приема пищи) или поступательного паттерна, которую ясно видно при использовании способа ST картирования, в комбинации с изменениями в боли, обусловленной различными нарушениями моторики и проявляющейся центрально или периферически.

Один тип боли представляет собой висцеральную боль, которая является результатом активации ноцирецепторов внутренних органов брюшной полости. Висцеральные структуры очень чувствительны к расширению (растяжению), ишемии и воспалению, но относительно не чувствительны к другим стимулам, которые обычно вызывают боль. Висцеральная боль диффузна, трудно определить ее местоположение и часто ее связывают с удаленными, обычно поверхностными, структурами. Она может сопровождаться такими симптомами, как тошнота, рвота, изменения в показателях жизнедеятельности, а также эмоциональные манифестации. Боль можно описать как отвратительную, глубокую, сжимающую и тупую. Отличительные структурные повреждения или биохимические аномалии объясняют боль этого типа только у части пациентов. Эти заболевания иногда объединяют в желудочно-кишечные нервно-мышечные заболевания (GINMD). Люди также могут испытывать висцеральные боли, часто очень интенсивные по характеру, без какой-либо видимой структурной, биохимической или гистопатологической причины для таких симптомов.

Ноцирецептор представляет собой сенсорный рецептор, который реагирует на потенциально повреждающие стимулы, посылая потенциалы действия на конкретные ноцицептивные нейроны (Aδ или C), которые осуществляют передачу в антеролатеральные тракты спинного мозга (плюс небольшая вагусная проекция) и затем в таламус и передний мозг, содержащий островковую кору и поясную кору. Ключевой для восприятия боли, происходящей от патологии кишечника, является активация болевых сообщений, идущих от кишечника к центральной нервной системе через внешние первичные афферентные волокна, которые проходят в брыжеечных афферентных нервных пучках.

В системе по изобретению, описанному в настоящем документе, измерения в моторике и боли считывают в виде изменений в паттернах моторики (например, RPr, скорость ММС и/или частота ММС) или амплитуд сокращений или увеличенного спинно-мозгового трафика афферентных брыжеечных нервов для конкретных и выбранных частей кишки. К удивлению, обнаружено, что различные средства могут способствовать перемешиванию в одной части желудочно-кишечного тракта и поступательным движениям в другой части, или могут вовсе не оказывать эффект, и влиять на систему болевых сигналов в одной части, но не в другой части желудочно-кишечного тракта, и через различные нервные пути, такой как вагусный, или для висцеральной боли через ганглий заднего корешка. Такая точная регионарная специфичность подчеркивает мощь и специфичность подхода авторов изобретения к оценке эффектов тестовых молекул.

Следовательно, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы найти средства, подходящие для лечения, предотвращения или модулирования конкретных нарушений моторики, посредством использования модели, описанной в настоящем документе.

Две стадии в представленном способе предоставляют данные о моторике желудка и кишечника и прохождении импульсов по брыжеечным афферентным нервам. Анализ этих параметров ведет к способу отбора средств, эффективных при лечении нарушения моторики кишечника. Таким образом, анализ эффекта средства на стадии а) и стадии б) предоставленных способов используют для того, чтобы определять, является ли средство эффективным для лечения нарушения моторики кишечника.

Предпочтительные параметры, подлежащие измерению на стадии а), представляют собой частоту ММС и/или скорость ММС, и это удобно выполнять с помощью ST карты, которую предпочтительно генерируют посредством видеовизуализации, например, с использованием видеорегистрации, и которая предпочтительно содержит паттерн из чередующихся полос светлых и темных оттенков, который содержит информацию трех типов: положение вдоль кишки (ордината), время (абсцисса) и диаметр кишки (аппликата или ось z). При использовании этих переменных пространственно-временная карта может становиться «отпечатком» моторики, чувствительность которого важна при определении детализированных и уточненных эффектов, которые конкретные пробиотические штаммы и другие средства оказывают на моторику и способность проводить различия между ними.

Другие предпочтительные параметры, подлежащие измерению на стадии а), представляют собой внутрипросветное давление, в частности, внутрипросветное пиковое давление (PPr). Другие параметры, например, как описано в примерах, можно необязательно измерять по ST карте и на стадии а) способа.

Предпочтительный параметр, подлежащий измерению на стадии б), представляет собой частоту прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Этот способ можно использовать для того, чтобы определять изменения в возбудимости волокон брыжеечных нервов, вызываемые различным лечением.

Анализ одного или нескольких из этих параметров ведет к способу отбора средств, эффективных при нарушениях моторики. Подходящие способы и аппарат для создания ST карты и измерения этих параметров приведены в экспериментальных примерах и на фигурах.

Таким образом, в предпочтительных способах, две стадии в представленном способе дают данные о внутрипросветном пиковом давлении (PPr), частоте ММС, скорости ММС и частоте прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Анализ всех этих параметров ведет к предпочтительному способу отбора средств, эффективных при нарушениях моторики.

Способы по изобретению можно использовать для того, чтобы находить подходящие средства для различных нарушений моторики. Средства выбирают для того, чтобы влиять на скорость ММС и/или частоту ММС и/или PPr и частоту прохождения нервных импульсов у пациента полезным образом для того, чтобы оказывать влияние, предотвращать или лечить нарушения моторики.

На стадии а) способа используют ST картирование (ST анализ) желудочно-кишечного сегмента для того, чтобы анализировать эффект средства, оказываемый на моторику желудка и кишечника. Чтобы выполнить это, предпочтительно, с использованием ST карты измеряют частоту ММС и/или скорость ММС. На ST карте удобно представлены изображения МС полос, по которым можно измерять частоту и скорость, например,

как описано в экспериментальных примерах. Кроме того, внутри желудочно-кишечного сегмента измеряют предпочтительно внутрипросветное давление и, более предпочтительно, внутрипросветное пиковое давление (PPr).

Желудочно-кишечный сегмент для использования в способах по настоящему изобретению может быть из любой подходящей части желудочно-кишечного тракта, например, может представлять собой сегмент из тонкой кишки (например, тощей кишки) или из толстой кишки (например, ободочной кишки). Для подходящих сегментов для стадии b) способа необходимо присутствие подходящего нервного пучка, чтобы сделать возможным измерение прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам. Это можно удобно обеспечивать, имея желудочно-кишечный сегмент с прикрепленной брыжеечной тканью, например, как описано в экспериментальных примерах. Таким образом, способы по изобретению удобно осуществлять на сегментах *ex vivo* из подходящего экспериментального животного, например, на желудочно-кишечных сегментах мыши (например, сегменты ободочной кишки или тощей кишки мыши). К удивлению, способы по настоящему изобретению могут обнаруживать различия в действии одного и того же средства на оба типа отрезка кишечника. Способность осуществлять сравнение эффекта средства, оказываемого на тонкую кишку в сравнении с толстой кишкой, может быть благоприятным, в частности, в качестве лечения, которое обладает регионарной специфичностью, в зависимости от нарушения моторики кишечника, подлежащего лечению, и его клинической стадии и симптомов, например, специфичность к тонкой или толстой кишке может быть полезной.

Изменения моторики желудка и кишечника, вызванные средством, можно обнаруживать в виде показаний на стадии a) способа, например, в виде изменения паттерна моторики или амплитуды сокращений. Некоторые средства вовсе не будут оказывать эффект. Средство, которое может повышать моторику желудка и кишечника, например, посредством увеличения частоты ММС и/или скорости ММС и/или внутрипросветного давления, такого как PPr, вероятно будет эффективно при лечении нарушений, при которых будет благоприятно повышать поступательную моторику вдоль пищеварительной трубки, например, при констипации и коликах. Если показано, что средство снижает или не значительно изменяет моторику желудка и кишечника, например, посредством снижения или незначительного изменения частоты ММС и/или скорости ММС и/или внутрипросветного давления, такого как PPr, то такое средство маловероятно будет эффективным при лечении таких нарушений и не будет отобрано, в частности, если имеет место снижение или незначительное изменение всех измеряемых параметров. Однако, средство, которое может вести к снижению моторики желудка и кишечника, например, посредством снижения одного или нескольких из частоты ММС и/или скорости ММС и/или внутрипросветного давления, такого как PPr, вероятно будет эффективным при лечении нарушений, при которых благоприятно снижать поступательную моторику вдоль пищеварительной трубки, например, при IBS или диарее.

Увеличение моторики желудка и кишечника, например, увеличение частоты ММС и/или скорости ММС и/или внутрипросветного давления, такого как PPr, в сегменте толстой кишки, с помощью средства в способах по изобретению, является особенно предпочтительным для того, чтобы выбирать средство для применения в лечении констипации или колик.

На стадии b) способов по изобретению анализируют эффект, который оказывает средство на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам (передача болевых сигналов и который, таким образом, можно использовать в качестве показания

для боли, т.е. вероятно оказывает средство эффект на боль или нет, например, на висцеральную боль. Увеличение достоверного эффекта, оказываемого на прохождение импульсов по афферентным нервам, или его отсутствие указывает на средство, которое вероятно ведет к увеличению боли или не оказывает достоверного эффекта на боль, соответственно, тогда как снижение прохождения импульсов по афферентным нервам указывает на средство, которое будет снижать боль. Предпочтительные средства, таким образом, представляют собой те, которые ведут к снижению прохождения импульсов по афферентным нервам, например, к снижению частоты прохождения самопроизвольных импульсов по афферентным нервным пучкам. Альтернативно, средство, которое ведет к незначительному изменению прохождения импульсов по нервам, можно отбирать, если штамм проявляет благоприятные свойства, как измеряют посредством стадии а) способа.

Средство, подлежащее тестированию, добавляют в выбранный желудочно-кишечный сегмент любым подходящим образом. Удобно добавлять средства во внутрипросветное пространство сегмента, т.е. применять внутри просвета. Для того чтобы анализировать эффект средства, оказываемый на моторику (на стадии а) или передачу болевых сигналов (на стадии b), стадии удобно осуществлять в присутствии и в отсутствие средства. Например, стадии а) и b) осуществляют до и после применения средства. Таким образом, в таких способах эффект средства сравнивают с подходящим контролем, например, результаты в присутствии тестового средства сравнивают с результатами в отсутствие тестового средства, например, результаты с использованием только буфера противопоставляют буферу плюс средство (например, буфер плюс бактериальный штамм).

Таким образом, еще один дополнительный аспект по изобретению относится к средству, выбранному с помощью способов по изобретению. Предпочтительным средством является микроорганизм, более предпочтительно бактериальный штамм, предпочтительно пробиотический бактериальный штамм. Средства, выбранные с помощью способов по изобретению, могут принимать форму фармацевтического соединения или композиции или алиментарного соединения или композиции.

Как описано выше, в зависимости от нарушения моторики, которое желательно подлежит лечению, критерии отбора будут варьировать. Например, если нарушением моторики кишечника является то, при котором желательно снижать время прохождения материала через кишечник (или увеличивать поступательную моторику вдоль пищеварительной трубки), например, констипация, регургитация или колики, то на стадии а) способа средство, представляющее интерес, должно действовать для того, чтобы увеличивать моторику желудка и кишечника, например, посредством увеличения частоты ММС или скорости ММС или внутрипросветного давления (например, PPr). Предпочтительные средства должны увеличивать два или более из этих параметров, например, должны увеличивать частоту ММС и скорость ММС или должны увеличивать частоту ММС и внутрипросветное давление (например, PPr), или должны увеличивать скорость ММС и внутрипросветное давление (например, PPr). Большинство предпочтительных средств должны увеличивать все эти параметры, например, должны увеличивать частоту ММС, скорость ММС и внутрипросветное давление (например, PPr). Стадию а) способа можно оценивать на подходящем желудочно-кишечном сегменте из тонкой или толстой кишки, например, сегмент тощей кишки для тонкой кишки или сегмент ободочной кишки для толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления использование толстой кишки, например, сегментов ободочной кишки, является предпочтительным.

Для лечения таких нарушений следует выбирать средство, которое не оказывает

эффекта или не увеличивает передачу болевых сигналов или предпочтительно действует для того, чтобы снижать передачу болевых сигналов. На стадии b) способа такие средства не должны оказывать эффекта или предпочтительно должны действовать для того, чтобы снижать или уменьшать прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам. Предпочтительно указанное средство не должно оказывать эффект или предпочтительно должно действовать для того, чтобы снижать частоту прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Стадию b) способа можно оценивать на любом подходящем желудочно-кишечном сегменте из тонкой или толстой кишки, например, на сегменте тощей кишки для тонкой кишки или на сегменте ободочной кишки для толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления использование тонкой кишки, например, сегментов тощей кишки, является предпочтительным.

Используя способ по настоящему изобретению, авторы изобретения отобрали новый бактериальный штамм, *Lactobacillus gasseri* 345A (LG345A), который, как показано, увеличивает моторику желудка и кишечника посредством, как показано, увеличения частоты ММС, скорости ММС и внутрипросветного пикового давления. Также показано, что этот штамм снижает передачу болевых сигналов посредством снижения прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам (посредством снижения частоты прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам). Этот выделенный бактериальный штамм (и другие штаммы, например, штаммы *L. gasseri*, с характеристиками этого депонированного штамма, например, способностью вызывать указанные выше эффекты, оказываемые на моторику желудка и кишечника и передачу болевых сигналов) образует предпочтительный аспект по изобретению, и его можно использовать для того, чтобы лечить нарушения моторики кишечника, в частности, те, при которых желательно снижать время прохождения материала через кишечник. Таким образом, предпочтительные состояния, подлежащие лечению с применением этого штамма, представляют собой констипацию или колики. Штаммы, например, штаммы *L. gasseri*, которые могут повышать моторику желудка и кишечника, обладая способностью увеличивать каждое из частоты ММС, скорости ММС и внутрипросветного пикового давления, и которые могут снижать передачу болевых сигналов, например, обладая способностью снижать прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам (например, посредством снижения частоты прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам) образуют предпочтительные аспекты по настоящему изобретению.

Альтернативно, если, например, нарушение моторики кишечника, подлежащее лечению, представляет собой то, при котором желательно увеличивать время прохождения материала через кишечник (например, нарушения с быстрым сквозным прохождением), например, IBS или диарея, то на стадии a) способа средство, представляющее интерес, должно действовать для того, чтобы снижать моторику желудка и кишечника, например, посредством снижения частоты ММС или скорости ММС или внутрипросветного давления, например, PPr. Предпочтительные средства должны снижать по меньшей мере скорость ММС. Предпочтительные средства должны снижать два или более из этих параметров, например, должны снижать скорость ММС и частоту ММС или должны снижать частоту ММС и внутрипросветное давление (например, PPr) или должны снижать скорость ММС и внутрипросветное давление (например, PPr). Большинство предпочтительных средств должны снижать все эти параметры, например, должны снижать частоту ММС, скорость ММС и внутрипросветное давление (например, PPr). Стадию a) способа можно оценивать на

подходящем желудочно-кишечном сегменте из тонкой или толстой кишки, например, на сегменте тощей кишки для тонкой кишки или сегменте ободочной кишки для толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления использование сегментов толстой кишки, например, ободочной кишки, является предпочтительным.

5 Для лечения таких нарушений следует выбирать средство, которое не оказывает эффекта или не увеличивает передачу болевых сигналов, или предпочтительно действует для того, чтобы снижать передачу болевых сигналов. На стадии b) способа такие средства не должны оказывать эффекта или предпочтительно должны действовать для того, чтобы снижать или уменьшать прохождение импульсов по брыжеечным
10 афферентным нервам. Предпочтительно указанное средство не должно оказывать эффект или предпочтительно должно действовать для того, чтобы снижать частоту прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Стадию b) способа можно оценивать на подходящем желудочно-кишечном сегменте из тонкой или толстой кишки, например, на сегменте тощей кишки для тонкой
15 кишки или на сегменте ободочной кишки для толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления использование сегментов тонкой кишки, например, тощей кишки, является предпочтительным.

Используя способ по настоящему изобретению, авторы изобретения отобрали новый штамм, *Lactobacillus gasseri* 621A (LG621A), который, как показано, снижает моторику
20 желудка и кишечника посредством, как показано, снижения скорости ММС и не оказывает эффекта на частоту ММС или внутрипросветное пиковое давление. Также показано, что этот штамм снижает передачу болевых сигналов посредством снижения прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам (посредством снижения частоты прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам).
25 Этот выделенный бактериальный штамм (и другие штаммы, например, штаммы *L. gasseri*, с характеристиками этого депонированного штамма, например, со способностью вызывать указанные выше эффекты, оказываемые на моторику желудка и кишечника и передачу болевых сигналов) образует предпочтительный аспект по изобретению, и его можно использовать для того, чтобы лечить нарушения моторики кишечника, в
30 частности, те, при которых желательно увеличивать время прохождения материала через кишечник (например, нарушения с быстрым сквозным прохождением). Таким образом, предпочтительные состояния, подлежащие лечению с применением этого штамма, представляют собой IBS или диарею. Штаммы, например, штаммы *L. gasseri*, которые могут снижать моторику желудка и кишечника, например, обладая
35 способностью снижать одно или несколько из частоты ММС, скорости ММС и внутрипросветного пикового давления (предпочтительно скорость ММС), и которые могут снижать передачу болевых сигналов, например, обладая способностью снижать прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам (например, посредством снижения частоты прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным
40 пучкам), образуют предпочтительные аспекты по настоящему изобретению.

Из приведенного выше ясно, что способы по изобретению также можно использовать для того, чтобы выбирать или идентифицировать средства, которые не подходят для
лечения нарушений моторики кишечника, например, средства, которые не
демонстрируют какого-либо эффекта, оказываемого на одно или несколько или два
45 или более или все три из скорости ММС или частоты ММС или внутрипросветного давления, могут не быть пригодны для применения в лечении нарушений моторики кишечника, в частности, если такие средства не оказывают положительного эффекта на снижение передачи болевых сигналов. В частности, те средства, которые не

демонстрируют эффекта, оказываемого на какие-либо из этих параметров, маловероятно подходят для лечения нарушения моторики кишечника. Кроме того, те средства, которые оказывают эффект повышения передачи болевых сигналов, как измеряют с помощью увеличения прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам на стадии

5 б) способа, маловероятно подходят для лечения нарушения моторики кишечника.

Таким образом, еще один дополнительный предпочтительный аспект по изобретению относится к средству, предпочтительно бактериальному штамму, отобранному с помощью способа по изобретению для применения в терапии, более конкретно для применения в лечении нарушения моторики кишечника, такому как те, которые описаны

10 в настоящем документе. Подходящие нарушения моторики кишечника, подлежащие лечению, описаны в настоящем документе в другом месте. Предпочтительные нарушения моторики кишечника, подлежащие лечению с помощью средств или бактериальных штаммов по изобретению, представляют собой те, при которых желательно снижать время прохождения материала через кишечник, например, колики, регургитацию или

15 констипацию. Другие предпочтительные нарушения моторики кишечника представляют собой те, при которых желательно увеличивать время прохождения материала через кишечник, например, IBS или диарею.

Настоящим изобретением также предусмотрены способы лечения субъекта с нарушением моторики кишечника, указанные способы включают введение средства,

20 предпочтительно бактериального штамма, отобранного с помощью способа по изобретению, указанному субъекту в количестве, эффективном для того, чтобы лечить указанное нарушение моторики кишечника.

Настоящим изобретением также предусмотрены способы лечения субъекта с нарушением моторики кишечника, указанные способы включают введение

25 бактериального штамма по изобретению указанному субъекту в количестве, эффективном для того, чтобы лечить указанное нарушение моторики кишечника. Предпочтительные штаммы представляют собой LG345A или LG621A для лечения нарушений моторики кишечника, как описано в настоящем документе в другом месте.

Предпочтительные нарушения моторики кишечника и другие предпочтительные признаки представляют собой то, что описано в настоящем документе в другом месте

30 для других аспектов по изобретению.

Настоящим изобретением также предусмотрено использование средства, предпочтительно бактериального штамма, отобранного с помощью способа по изобретению, при изготовлении композиции или лекарственного средства для

35 применения в лечении нарушения моторики кишечника.

Настоящим изобретением также предусмотрено использование бактериального штамма по изобретению при изготовлении композиции или лекарственного средства для применения в лечении нарушения моторики кишечника. Предпочтительные штаммы представляют собой LG345A или LG621A для лечения нарушений моторики кишечника,

40 как описано в настоящем документе в другом месте.

Предпочтительные нарушения моторики кишечника и другие предпочтительные признаки представляют собой то, что описано в настоящем документе в другом месте для других аспектов по изобретению.

В способах и в использовании настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, термины «увеличивать», «снижать», «уменьшать» и т.д. относятся к изменению уровней, поддающемуся измерению, предпочтительно, к значительному изменению уровней, более предпочтительно, к статистически значимому изменению, предпочтительно, со значением вероятности $<0,05$.

Предпочтительные субъекты для лечения с использованием способов по изобретению представляют собой млекопитающих, более предпочтительно человека. Когда нарушение моторики кишечника, подлежащее лечению, представляет собой констипацию, предпочтительные субъекты представляют собой престарелых пациентов или беременных женщин. Под престарелым пациентом в целом понимают пациента в возрасте 70 лет или более. Когда нарушение моторики кишечника, подлежащее лечению, представляет собой колики, предпочтительно они представляют собой детские колики.

Еще один дополнительный аспект по изобретению относится к продукту, который содержит средства или штаммы по изобретению (например, средства или штаммы, отобранные с помощью способов по изобретению) для терапевтического применения, как определено в настоящем документе в другом месте, где указанное использование дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического или алиментарного средства. В таких вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство может представлять собой какое-либо дополнительное средство, которое можно применять в лечении рассматриваемого нарушения моторики кишечника. Дополнительное алиментарное средство может представлять собой любой подходящий алиментарный компонент, например, продукт питания или пищевую добавку.

Указанные дополнительные средства можно вводить вместе со средством или штаммом по изобретению (например, в виде композиции) или можно вводить отдельно. Кроме того, указанные дополнительные средства можно вводить одновременно в виде средства или штамма по изобретению или в различные моменты времени. Подходящие режимы и время введения может легко определить специалист в зависимости от рассматриваемого дополнительного средства.

Настоящее изобретение также относится к композиции, которая содержит:

(i) средство, предпочтительно бактериальный штамм, получаемый с помощью способа отбора по изобретению, или бактериальный штамм по изобретению, как определено в настоящем документе иным образом; и

(ii) по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или эксципиента, продукта питания или пищевой добавки или дополнительного терапевтического или алиментарного средства. Таким образом, указанные композиции можно формулировать как фармацевтические композиции или как алиментарные композиции, например, в виде пищевого продукта.

Терапевтическое применение средств, штаммов и композиций по изобретению, как определено в настоящем документе, включают снижение, предотвращение или облегчение релевантного нарушения или симптомов нарушения (например, может вести к модуляции симптомов заболевания). Такое снижение, предотвращение или облегчение нарушения или его симптомов можно измерять с помощью любого подходящего анализа. Предпочтительно снижение или облегчение нарушения или симптомов является статистически значимым, предпочтительно, со значением вероятности $<0,05$. Такое снижение или облегчение нарушения или симптомов в целом определяют по сравнению с подходящим контрольным индивидуумом или популяцией, например, здоровым субъектом или субъектом, который получал лечение плацебо или не получал лечение.

Подходящий способ введения и состав средств, штаммов, композиций и т.д. выбирают в зависимости от места заболевания. Предпочтительным способом введения является пероральный, однако в равной мере для некоторых видов лечения будут подходить

внутривенные или внутримышечные инъекции.

Подходящие дозы средств, штаммов и композиций по изобретению, как определено в настоящем документе, может легко выбрать или определить специалист в зависимости от рассматриваемого нарушения, подлежащего лечению, способа введения и состава.

5 Как описано выше, используя изобретение, описанное в настоящем документе, авторы изобретения получили два новых штамма, *Lactobacillus gasseri* 345A и *Lactobacillus gasseri* 621A. Эти штаммы депонированы в DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) 18 апреля 2013 года и обозначены номерами DSM 27123 и DSM 27126,
10 соответственно.

Открытие, сделанное авторами изобретения, описанного в настоящем документе, что эффекты средства, влияющего на нарушения моторики, являются в большинстве случаев многофакторными и различаются в различных частях желудочно-кишечного тракта и, следовательно, их следует изучать таким образом, чтобы найти наилучшее
15 средство для конкретного нарушения, привело к способу по изобретению.

Следовательно, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы найти средства, подходящие для лечения, предотвращения или модуляции конкретных нарушений моторики, посредством использования модели, описанной в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления изобретения цель состоит в том, чтобы отобрать
20 соединение или другое средство, которое возможно использовать в качестве алиментарного соединения или фармацевтического средства, которое эффективно для предотвращения или лечения констипации у человека, в частности, престарелого человека.

В одном из вариантов осуществления изобретения цель состоит в том, чтобы отобрать
25 пробиотический бактериальный штамм, который может быть эффективен для предотвращения или лечения констипации у человека, в частности, у престарелых субъектов или беременных женщин.

В другом варианте осуществления цель изобретения состоит в том, чтобы отобрать средство, например, пробиотический штамм, который может быть эффективен при
30 предотвращении или лечении детской колики.

В другом варианте осуществления цель изобретения состоит в том, чтобы отобрать средство, например, пробиотический штамм, который может быть эффективен при предотвращении или лечении диареи или других нарушений моторики, где полезно снижать скорость и, тем самым, увеличивать время прохождения.

35 В одном из вариантов осуществления изобретения цель состоит в том, чтобы отобрать средство, например, пробиотический штамм, который может быть эффективен при лечении или модулировании симптомов синдрома раздраженной кишки (IBS). Такое средство выбирают для того, чтобы увеличивать время прохождения, предпочтительно, не вызывая какой-либо боли и предпочтительно для того, чтобы снижать боль.

40 В еще одном другом варианте осуществления цель изобретения состоит в том, чтобы отобрать средство, например, пробиотический штамм, который может быть эффективен при предотвращении недержания фекалий.

В еще одном другом варианте осуществления цель изобретения состоит в том, чтобы отобрать средство, например, пробиотический штамм, который может быть эффективен
45 для того, чтобы повышать перемешивание в тонкой и толстой кишке, не вызывая какой-либо боли и предпочтительно снижая боль, чтобы содействовать или вести к лучшему захвату питательных веществ субъектом, в частности, престарелым.

Далее представлены некоторые примеры изобретения, которые предназначены не

для того, чтобы ограничивать использование изобретения, описанного в настоящем документе, но для того, чтобы подробно представить практические примеры того, как можно использовать изобретение. Пример 1 относится к описанию подключаемого программного обеспечения для пространственно-временного картирования (StMap), а пример 2 относится к стадиям отбора эффективных средств и пример 3 к отбору средств для конкретного нарушения моторики.

ПРИМЕР 1

Описание подключаемого расширения StMap для программного обеспечения NIH ImageJ;

ImageJ представляет собой публичный домен на основе программы для обработки изображений на Java, похожей на NIH Image для Macintosh. Его запускают или в виде онлайн-апплета или в виде загружаемого приложения, на каком-либо компьютере с виртуальной машиной Java 1.4 или старше.

Доступно распространение посредством загрузки для Windows, Mac OS, Mac OS X и Linux.

ImageJ разработан с использованием открытой архитектуры, которая обеспечивает расширяемость через подключаемые расширения на Java. Специализированные подключаемые расширения для регистрации, анализа и обработки можно разрабатывать с использованием встроенного редактора в ImageJ и компилятора Java. Написанные пользователями подключаемые расширения позволяют решать почти любую проблему обработки или анализа изображений.

Авторы изобретения разработали подключаемое расширение, соответствующее описанию программного обеспечения, доступному на (<http://rsbweb.nih.gov>) (National Institutes of Health (NIH), 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA), в соответствии с подробностями фиг. 6.

ROI обозначает «область, представляющая интерес».

ПРИМЕР 2

Отбор средств, эффективных при нарушениях моторики.

Этот отбор включает двухстадийный способ. На первой стадии используют одновременную регистрацию изменений внутрипросветного давления в дополнение к видеорегистрации и пространственно-временным картам. Вторая стадия представляет собой анализ передачи сигналов по нервам.

Все средства сравнивают с контролем и средства не сравнивают друг с другом, это дает по одному графику на протестированное средство.

Первая стадия, пространственно-временной анализ

Авторы изобретения использовали взрослых самцов мышей Swiss Webster (20-30 г), приобретенных в Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Мышей умерщвляли посредством смещения шейных позвонков, наряду с руководством McMaster по использованию и уходу за животными. Все последующие процедуры проводили ex vivo.

Регистрация моторики в ванне для органов

Сегмент тонкой кишки или дистальный сегмент ободочной кишки длиной 4 см иссекали и опорожняли содержимое посредством промывания сегмента физиологическим раствором Кребса при гравитационном гидростатическом напоре 2 гПа. Каждый сегмент закрепили в 20 мл камере ванны для органов и погружали в оксигенированный Кребс (фиг. 1A). Ротовой и анальный концы канюлировали и просвет под действием силы тяжести перфузировали (95% O₂ и 5% CO₂)-газированным Кребсом с использованием нескольких сосудов Мариотта. Внутрипросветный компартмент перфузировали 0,5 мл/мин с использованием буфера при комнатной температуре (от

19 до 22°C). Камеру с органом (серозный компартмент) перфузировали предварительно нагретым (34°C) газированным карбогеном раствором Кребса со скоростью 5 мл/мин). Оксигенированный буфер Кребса имел следующую композицию (мМ): 118 NaCl, 4,8 KCl, 25 NaHCO₃, 1,0 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 11,1 глюкозы и 2,5 CaCl₂, барботированную газовой смесью карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). В начале эксперимента внутрипросветное давление корректировали до 3 гПа и регистрацию проводили при этом давлении наполнения. Бактерии вносили посредством переключения входящего потока в ротовой просвет с сосудов Мариотта, содержащих Кребс, на те, которые содержали Кребс плюс бактерии, посредством закрывания и открывания подходящих кранов, как проиллюстрировано на фиг. 1А. Изменения внутрипросветного давления измеряли в середине продольной оси сегмента кишки. Сигнал давления усиливали, оцифровывали, сохраняли на персональном компьютере и анализировали оффлайн с использованием программного обеспечения PClamp 9 (Molecular Devices, Sunny Vale, CA, USA).

Изображения регистрировали с использованием видеокамеры (JVC Everio Hard Disk Camcorder модели GZ-MG155U), которую помещали в 10 см над сегментом кишки (фиг. 1А). Регистрацию начинали синхронно с регистрацией давления с использованием 8-12 см поле обзора в течение эксперимента. Камера выводила данные в формате необработанного видео (MOD) с частотой 30 кадров в секунду (fps). Видеоклипы длиной 10 мин вырезали из MOD файла с использованием программного обеспечения для видеомонтажа (Avidemux версии 2.5.0, программное обеспечение с открытым исходным кодом, доступное на www.avidemux.org). Затем клипы конвертировали в формат MOV с использованием видеоконвертера (конвертер Zune версии 1.1, программное обеспечение с открытым исходным кодом, доступное на <http://ffmpeg.mplayerhq.hu>). Повторно меняли разрешение конечных видеоклипов до 384 × 256 пикселей и 25 fps. Видеорегистрацию анализировали с использованием собственного программного обеспечения для обработки изображений (StMap, см. пример 1), разработанного в виде подключаемого расширения для NIH ImageJ (версия 1.43с, программное обеспечение с открытым исходным кодом, доступное на <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Программное обеспечение конвертирует изображение (IB) в каждом кадре видео в черно-белый силуэт (1С) и генерирует пространственно-временную карту с использованием подпрограммы для обнаружения краев. Подпрограмма сначала измеряет диаметр в каждом положении вдоль кишки и затем представляет физический диаметр в каждом положении в виде значения оттенка (диапазон 0-255, от черного до белого). По мере уменьшения диаметра кишки во время сокращений, значение оттенка уменьшается в направлении 0 и должно быть показано направленным к более темным значениям. Когда программное обеспечение читает каждый 10-минутный клип, оно генерирует пространственно-временную карту - паттерн чередующихся полос светлых и темных оттенков, который содержит информацию трех типов: положение вдоль кишки (ордината), время (абсцисса) и диаметр кишки (аппликата или ось z) (фиг. 1D). Используя эти переменные, пространственно-временная карта становится «отпечатком» моторики, чувствительность которого критически важна при определении детализированных и уточненных эффектов, которые конкретные пробиотические штаммы и другие средства оказывают на моторику и способность проводить различия между ними.

Поскольку StMap измеряет изменения диаметра в каждом положении, StMap можно интерпретировать как графики из стопок из множества двухмерных диаметров в зависимости от времени. В действительности, для карты, если идентифицировали местоположение преобразователя давления (пунктирная линия на фиг. 2А), и оно показано в виде графика в оттенках серого в зависимости от времени (фиг. 2В), этот

график будет совпадать с одновременно зарегистрированной записью давления в зависимости от времени в этом месте (фиг. 2С).

Параметры моторики измеряли непосредственно по пространственно-временной карте с использованием подключаемого расширения StMap. В этой системе авторы изобретения могли тестировать (с использованием тетродотоксинового глушения нейронов), зависят ли сокращения от нервной системы кишечника или они являются миогенными (приводимые в движение ритмическими мышечными сокращениями, но независимо от нейронов). Генерируемые нервной системой распространяющиеся к анусу мигрирующие моторные комплексы МС генерировали толстые темные полосы, который наклонены по диагонали слева направо; скорость распространения ($\text{мм} \times \text{с}^{-1}$) измеряют по наклону(ам) каждой полосы (фиг. 3). Для каждого лечения наклоны от 3-5 последовательных МС усредняли для того, чтобы вычислять скорость распространения. Частоту МС (мГц) измеряли посредством подсчета числа темных МС полос во время 10-минутного сегмента. МС амплитуду измеряли непосредственно от базового диаметра (фиг. 2В) или давления (фиг. 2С) до следующего пика, причем для каждого лечения усредняли 3 значения. Скорость изменения диаметра (см/с) вычисляли по времени, которое требовалось для максимального сжатия диаметра от базового уровня (ход МС вниз на (фиг. 2В)).

Средства, подлежащие тестированию

Lactobacillus rhamnosus (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 и *Lactobacillus gasseri* T2 тестировали на первой стадии способов по изобретению.

Оптически определяли число клеток, а жизнеспособность всегда проверяли по способности расти после посева на агаровые чашки со средой для выращивания. Клетки из замороженных исходных образцов размораживали и центрифугировали на 2000 об./мин в течение 15 мин, и осадок суспендировали в равном объеме буфера Кребса. Затем суспензию снова центрифугировали, и клетки удаляли и ресуспендировали в Кребсе в исходной концентрации. Прямо перед использованием бактерии разводили до рабочих концентраций свежим буфером Кребса.

Кребс, содержащий бактерии, подавали во внутрипросветный компартмент, при этом модулирующие ионные каналы лекарственные средства добавляли в буфер Кребса, которым перфузировали серозный компартмент. Время, необходимое для протекания раствора лекарственного средства от крана до регистрационной камеры, составляло 30 с. Блокатор ионных каналов IC_{Ca} 1-[(2-хлорфенил)дифенилметил]-1Н-пиразол (TRAM-34) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) растворяли в чистом диметилсульфоксиде (DMSO) для получения 10 мМ исходных растворов, а их разводили в оксигенированном Кребсе для получения рабочих концентраций за 30 мин до использования. Открывающее канал IC_{Ca} средство 5,6-дихлор-1-этил-2-бензимидазолинон (DCEBIO) (Tocris) растворяли в DMSO для получения 10 мМ исходного раствора; конечная рабочая концентрация в буфере Кребса составляла 0,1 или 1 мкМ.

Средства анализируют в соответствии с представленной выше стадией 1, а результаты представлены на фиг. 7

Статистика

Статистические вычисления выполняли с использованием GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Статистическое описание дано в виде среднего + стандартное отклонение, но на графиках зависимости ответа от концентрации,

погрешности выборки отображают с использованием стандартной погрешности средней величины; размер выборки обозначен как n . Статистически различимую разницу для критериев значимости задавали равной $P=0,05$; все критерии были двухсторонними.

Вторая стадия, анализ передачи сигналов по нервам

5 Для всех процедур придерживались руководства Canadian Council on Animal Care и получено одобрение Animal Research Ethics Board of McMaster University (разрешение № 08-08-35).

Внеклеточная регистрация

10 Взрослых самцов вышей Swiss Webster (20-30 г) получали из Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Мышей умерщвляли посредством смещения шейных позвонков. Все последующие процедуры проводили *ex vivo*. У эвтаназированных животных удаляли сегменты иссеченной дистальной тощей кишки (~2,5 см) с прикрепленной брыжеечной тканью (фиг. 4), и незамедлительно помещали их покрытую Sylgard регистрационную чашку Петри, заполненную буфером Кребса следующей композиции (мМ): 118 NaCl, 15 4,8 KCl, 25 NaHCO₃, 1,0 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 11,1 глюкоза и 2,5 CaCl₂, который барботировали карбогеном (95% O₂/5% CO₂). Ротовой и анальный концы сегмента кишки канюлировали пластмассовой трубкой и осторожно опорожняли с использованием прикрепленного шприца, заполненного оксигенированным буфером Кребса; затем сегмент и брыжеечную ткань прикалывали и брыжеечный нервный пучок 20 выделяли посредством аккуратного рассечения под стереомикроскопом (фиг. 5), как описано в Barbara et al (Gastroenterology, том 132, выпуск 1, страницы 26-37, январь 2007). Препарат переносили в инвертационный микроскоп и просвет перфузировали под действием силы тяжести 0,5-1 мл/мин оксигенированным Кребсом при комнатной температуре (~22°C) и/или добавками с использованием нескольких сосудов Мариотта. 25 Серозный компартмент отдельно перфузировали предварительно нагретым (34°C) раствором Кребса по 3-5 мл/мин. Нервный пучок осторожно втягивали всасыванием в стеклянную пипетку, прикрепленную к держателю электрода для фиксации потенциала (CV-7B; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), и выполняли внеклеточную регистрацию нервов с использованием усилителя Multi-Clamp 700B и преобразователя 30 сигнала Digidata 1440A (Molecular Devices). Электрические сигналы пропускали через полосный фильтр от 0,1 до 2 кГц, дискретизировали на 20 кГц и сохраняли на персональном компьютере с запущенным программным обеспечением pClamp 10 (Molecular Devices) для апостериорного анализа.

Ваготомия

35 Для некоторых экспериментов, осуществляли поддиафрагмальную ваготомию, как описано ранее (van der Kleij H., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295:1131-1137, 2008)). Животных оставляли восстанавливаться в течение 10-14 суток перед взятием тощей кишки и брыжеечной ткани для электрофизиологических экспериментов. У 3 животных осуществляли ложную ваготомию. После операции массу тела и общее 40 состояние здоровья мышей определяли ежедневно. Авторы изобретения не обнаружили свидетельств значимой разницы в увеличении массы через 1 неделю после хирургического вмешательства у животных с ваготомией или с ложной ваготомией. Всех мышей с ваготомией тестировали на законченность процедуры посредством 45 регистрации после каждого эксперимента ответов на серозное нанесение холецистокинина (ССК).

Ваготомию считали эффективной, когда авторы изобретения обнаружили, что ССК не увеличивает уровень прохождения импульсов по брыжеечным нервам.

Целостность сегментов тощей кишки

Для того чтобы тестировать целостность сегментов тощей кишки с учетом транслокации бактерий через эпителий во время эксперимента, авторы изобретения метили JB-1 с использованием 5-(6)-карбоксифлуоресцеинсукцинимидилового эфира (CFSE), помещали их в концентрации 10^9 /мл Кребса в просвет и после инкубации в течение 75 мин фиксировали ткань в параформальдегиде и исследовали срезы на их присутствие под эпителием в конфокальной микроскопии (микроскопия с двумя лазерами, LSM 510, Carl Zeiss, Germany). JB-1 промывали два раза в PBS и суспендировали в конечной концентрации CFSE 5 мкМ в PBS с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и инкубировали в течение 25 мин при 37°C. Ткани (n=3) фиксировали в 4% параформальдегиде при 4°C в течение ночи, затем промывали 3 раза в PBS по 10 мин каждый, делали срезы 10 и 30 мкм и переносили поперечные срезы на предметные стекла и закрепляли. Затем их просматривали на оптических срезах способом укладки в стопку по оси Z.

Средства, подлежащие тестированию

Lactobacillus rhamnosus (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 и *Lactobacillus gasseri* T2 тестировали на второй стадии способов по настоящему изобретению.

Число клеток определяли оптически, а жизнеспособность проверяли по способности расти после посева на агаровые чашки со средой для выращивания. Живые *L. rhamnosus* выращивали из замороженных (-80°C) 1 мл аликвот, которые состояли из 5×10^9 клеток в бульоне Мана-Рогоза-Шарпа (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). Клетки из замороженных исходных образцов размораживали и центрифугировали на 2000 об./мин в течение 15 мин и суспендировали осадок в равном объеме буфера Кребса. Суспензию снова центрифугировали, и клетки удаляли и ресуспендировали в Кребсе в исходной концентрации. Прямо перед использованием клетки разводили до рабочих концентраций буфером Кребса. Для некоторых экспериментов бактерий разводили непосредственно до рабочих концентраций после размораживания (в бульоне); бактерий всегда вносили в просвет сегмента тощей кишки. Сульфатированный холецистокинин (25-33) (ССК; AnaSpec, Fremont, CA) растворяли в DMSO для получения 1 мМ исходного раствора. Аликвоты разводили в день эксперимента до рабочей концентрации в буфере Кребса с конечной концентрацией DMSO <0,0001%.

Анализ данных оффлайн

Частоты прохождения самопроизвольных множественных и единичных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам измеряли с использованием Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Оба способа (множественный спайковый разряд и анализ формы волны) измерения обычно используют для того, чтобы определять изменения в возбудимости волокон брыжеечных нервов, вызываемые различным лечением. Временные моменты множественных спайков определяли с использованием модуля для обнаружения пиков из Clampfit, а среднюю частоту вычисляли по интервалам между спайками. Единичную активность отделяли от множественной активности с использованием инструмента автоматического обнаружения шаблонов формы спайков из Clampfit (компьютерный анализ формы волны). После обнаружения шаблона, различительную способность всегда проверяли с помощью визуальной проверки и отбрасывали случаи, визуально не похожие на форму спайка, (<0,2%). Результаты представлены на фиг. 8.

Статистика

Данные выражали в виде среднего + стандартная погрешность средней величины,

где n обозначает общее число зарегистрированных сегментов тощей кишки; максимальное число зарегистрированных сегментов от одного и того же животного равнялось двум. Критерий Уилкоксона использовали для парного сравнения данных, а критерий Фридмана с апостериорным критерием Данна для дисперсионного анализа повторных измерений осуществляли с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Поскольку значительные вариации в самопроизвольной активности могут возникать между одним и другим препаратами при множественной нервной активности, все сравнения спаривали с регистрацией до и после лечения, которую выполняли, когда каждый нервный пучок служил в качестве своего собственного контроля. Различия считали значимыми, если $P < 0,05$.

ПРИМЕР 3

А. Отбор оптимальных пробиотических бактериальных средств для того, чтобы помогать при лечении нарушений моторики (например, констипации у престарелых), с использованием определенных стадий по настоящему изобретению;

L. rhamnosus (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 и *Lactobacillus gasseri* T2 анализировали согласно примеру 2. Результаты сведены в таблице 1.

Таблица 1				
Средство	Моторика			Передача болевых сигналов
		Тощая кишка	Ободочная кишка	
JB-1	Частота MMC	↓	↓	↑
	Скорость MMC	↑	↓	
	PPr	↓	↓	
DSM 17938	Частота MMC	↓	↑	↓
	Скорость MMC	↓	↑	
	PPr	○	○	
ATCC PTA 6475	Частота MMC	-	○	○
	Скорость MMC	-	○	
	PPr	-	○	
LG345A	Частота MMC	-	↑	↓
	Скорость MMC	-	↑	
	PPr	-	↑	
LG621A	Частота MMC	-	○	↓
	Скорость MMC	-	↓	
	PPr	-	○	
T1	Частота MMC	-	○	○
	Скорость MMC	-	○	
	PPr	-	↓	
T2	Частота MMC	-	↓	○
	Скорость MMC	-	○	
	PPr	-	○	

L. reuteri DSM 17938 и *L. gasseri* 345A увеличивают скорость MMC в ободочной кишке и также увеличивают по меньшей мере один из параметров PPr или частота MMC в ободочной кишке (*L. reuteri* DSM 17938 увеличивает частоту MMC и *L. gasseri* 345A увеличивает PPr). Оба эти штамма увеличивают частоту прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам. Следовательно, эти штаммы отобрали для лечения колик, например, детских колик, поскольку эти штаммы увеличивают скорость волны распространения MC и одновременно снижают частоту прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам.

Увеличение скорости MMC и снижение частоты прохождения самопроизвольных

импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам, обусловленные *L. reuteri* DSM 17938 и *L. gasseri* 345A, делают их подходящими для лечения констипации, в частности, у беременных женщин, где снижение желательно, или у престарелых.

L. rhamnosus JB-1 и *L. gasseri* 621A снижают скорость ММС. *L. gasseri* 621, также снижают частоту прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам и, следовательно, могут быть применены для лечения нарушений с быстрым сквозным прохождением, например, IBS. *L. rhamnosus* JB-1 не оказывает эффекта на частоту прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам и, следовательно, не применима для лечения нарушений моторики.

L. reuteri ATCC PTA 6475, *L. gasseri* T1 и *L. gasseri* T2 не демонстрируют какого-либо эффекта, оказываемого на скорость ММС или частоту прохождения самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервным пучкам и, следовательно, не рекомендованы для использования при нарушениях моторики.

(57) Формула изобретения

1. Способ отбора молочнокислого бактериального штамма, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника, где указанный способ включает:

а) стадию пространственно-временного (ST) картирования, которое осуществляют на желудочно-кишечном сегменте в присутствии молочнокислого бактериального штамма по сравнению с тем же этапом, проведенным в отсутствие указанного молочнокислого бактериального штамма, для того, чтобы анализировать эффект указанного молочнокислого бактериального штамма, оказываемый на моторику желудка и кишечника;

б) стадию регистрации нервного пучка *ex vivo*, которую осуществляют на желудочно-кишечном сегменте в присутствии молочнокислого бактериального штамма по сравнению с тем же этапом, проведенным в отсутствие указанного молочнокислого бактериального штамма, для того, чтобы анализировать эффект указанного молочнокислого бактериального штамма, оказываемый на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам; и

с) стадию выбора бактериального штамма, эффективного для лечения нарушения моторики кишечника, в соответствии с критериями отбора на основе эффектов указанного средства на моторику желудка и кишечника и на прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам, проанализированных на стадии (а) и стадии (б), где критерии отбора варьируют в зависимости от нарушения моторики, которое желательно подлежит лечению, которые включают

i) выбор бактериального молочнокислого штамма, который повышает моторику желудка и кишечника и ведет к уменьшению или снижению прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам, для лечения нарушения моторики кишечника, в котором желательно уменьшить время прохождения материала через кишечник или увеличить поступательную моторику вдоль пищеварительной трубки, где молочнокислый бактериальный штамм можно рассматривать как увеличивающий моторику желудка и кишечника тракта в указанном желудочно-кишечном сегменте, предпочтительно, когда он увеличивает одно или более из частоты мигрирующего моторного комплекса сокращений (ММС) и скорости мигрирующего моторного комплекса сокращений (ММС) в указанном желудочно-кишечном сегменте, как это может быть измерено на стадии (а) картированием ST;

ii) выбор молочнокислого бактериального штамма, который уменьшает моторику желудка и кишечника и ведет к уменьшению или снижению прохождения импульсов

по брыжеечным афферентным нервам, для лечения нарушения моторики кишечника, в котором желательно увеличить время прохождения материала через кишечник, где молочнокислый бактериальный штамм можно рассматривать как уменьшающий моторику желудка и кишечника тракта в указанном желудочно-кишечном сегменте, предпочтительно, когда он уменьшает одно или более из частоты мигрирующего моторного комплекса сокращений (ММС) и скорости мигрирующего моторного комплекса сокращений (ММС) в указанном желудочно-кишечном сегменте, как это может быть измерено на стадии (а) картированием ST.

2. Способ по п.1, в котором картирование ST на стадии а) выполняют посредством видеовизуализации.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что стадия а) дополнительно включает измерение внутрипросветного давления, причем предпочтительно указанное измерение внутрипросветного давления представляет собой измерение внутрипросветного пикового давления (PPr), где стадия (с) включает:

- выбор бактериального молочнокислого штамма, который повышает моторику желудка и кишечника и ведет к уменьшению или снижению прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам, для лечения нарушения моторики кишечника, в котором желательно уменьшить время прохождения материала через кишечник или увеличить поступательную моторику вдоль пищеварительной трубки, где молочнокислый бактериальный штамм можно рассматривать как увеличивающий моторику желудка и кишечника тракта в указанном желудочно-кишечном сегменте, предпочтительно, когда он увеличивает одно или более из частоты ММС, скорости ММС и внутрипросветного давления, предпочтительно PPr, в указанном желудочно-кишечном сегменте, как это может быть измерено на стадии (а) картированием ST;

- выбор молочнокислого бактериального штамма, который уменьшает моторику желудка и кишечника и ведет к уменьшению или снижению прохождения импульсов по брыжеечным афферентным нервам, для лечения нарушения моторики кишечника, в котором желательно увеличить время прохождения материала через кишечник, где молочнокислый бактериальный штамм можно рассматривать как уменьшающий моторику желудка и кишечника тракта в указанном желудочно-кишечном сегменте, предпочтительно, когда он уменьшает одно или более из частоты ММС, скорости ММС и внутрипросветного давления, предпочтительно PPr, в указанном желудочно-кишечном сегменте, как это может быть измерено на стадии (а) картированием ST.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что на стадии б) измеряют прохождение самопроизвольных импульсов по брыжеечным афферентным нервам.

5. Применение молочнокислого бактериального штамма, отбираемого способом по пп.1-4, для лечения нарушения моторики кишечника, при котором нарушение моторики кишечника является таким, при котором желательно уменьшить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт, где указанный бактериальный штамм демонстрирует способность увеличивать моторику желудочно-кишечного тракта и указанный бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам.

6. Применение по п.5, где молочнокислый бактериальный штамм демонстрирует способность увеличивать частоту ММС, или увеличивать скорость ММС, или увеличивать внутрипросветное давление и указанный молочнокислый бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать передачу болевых сигналов.

7. Применение по п.5 или 6, в котором бактериальный штамм представляет собой *Lactobacillus reuteri*, который был депонирован как DSMZ Accession No. DSM 17938.

8. Применение по п.5 или 6, где бактериальный штамм представляет собой *Lactobacillus gasseri* 345A (LG345A), который был депонирован как DSMZ Accession No. DSM 27123.

9. Применение по любому из пп.5-8, в котором расстройство подвижности кишечника представляет собой констипацию, регургитацию или колики.

5 10. Применение по п.9, в котором указанный запор наблюдается у пожилого пациента или беременной женщины, или где указанные колики представляют собой детские колики.

11. Применение молочнокислого бактериального штамма, отбираемого способом по пп.1-4, для лечения нарушения моторики кишечника, при котором нарушение
10 моторики кишечника является таким, при котором желательно увеличить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт, где указанный бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать моторику желудочно-кишечного тракта, и указанный бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать прохождение импульсов по брыжеечным афферентным нервам.

12. Применение по п.11, в котором молочнокислый бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать частоту ММС, или уменьшать скорость ММС, или уменьшать внутрипросветное давление и указанный молочнокислый бактериальный штамм демонстрирует способность уменьшать передачу болевых сигналов.

13. Применение по п.11 или 12, где молочнокислый бактериальный штамм
20 представляет собой *Lactobacillus gasseri* 621A (LG621A), который был депонирован как DSMZ Accession No. DSM-27126.

14. Применение по любому из пп.11-13, в котором нарушение моторики кишечника является синдромом раздраженной толстой кишки или диареей.

15. Бактериальный штамм *Lactobacillus gasseri* LG345A (DSM 27123), предназначенный
25 для использования в качестве пробиотика.

16. Бактериальный штамм по п.15 для использования в качестве пробиотика при лечении нарушения моторики кишечника, при котором желательно уменьшить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт.

17. Бактериальный штамм по п.15 или 16 для использования в терапии.

18. Бактериальный штамм *Lactobacillus gasseri* LG621A (DSM 27126), предназначенный
30 для использования в качестве пробиотика.

19. Бактериальный штамм по п.18 для использования в качестве пробиотика при лечении нарушения моторики кишечника, при котором желательно увеличить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт.

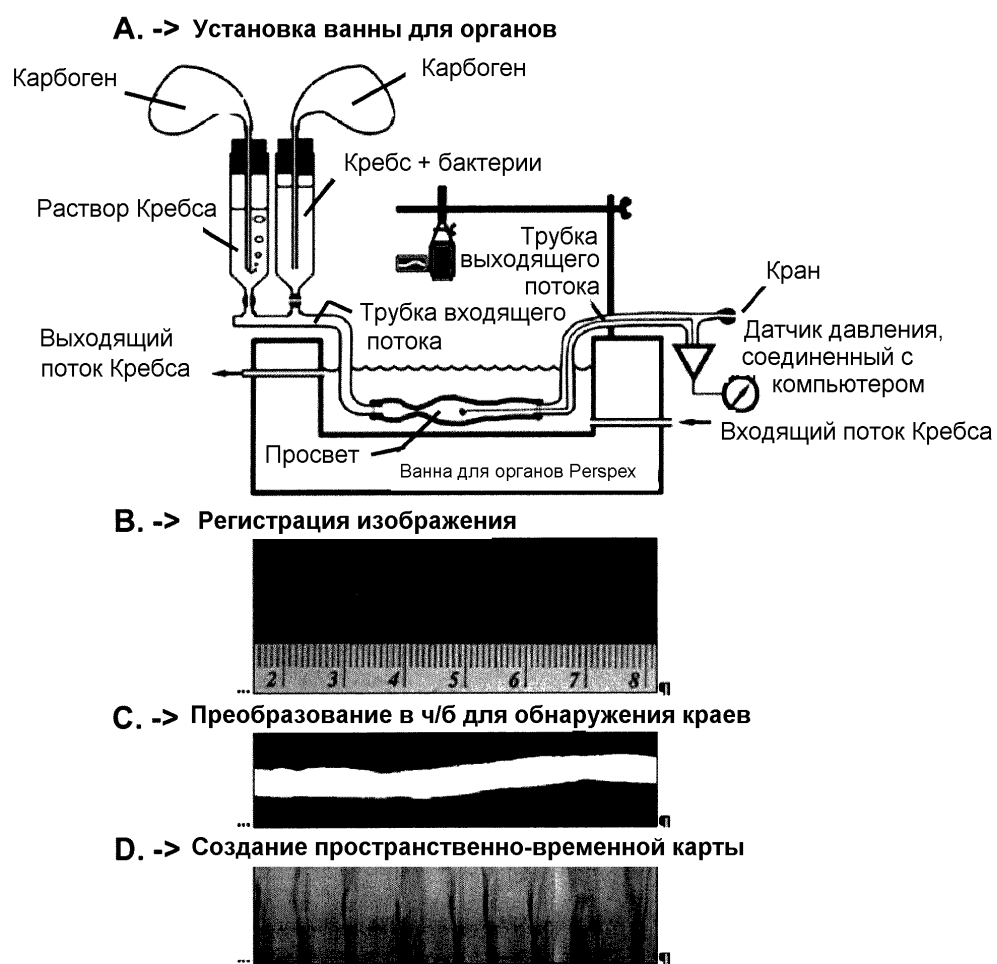
20. Бактериальный штамм по п.18 или 19 для использования в терапии.

21. Композиция для лечения расстройства подвижности кишечника, в которой расстройство моторики кишечника является таким, в котором желательно уменьшить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт, содержащая бактериальный штамм по п.15.

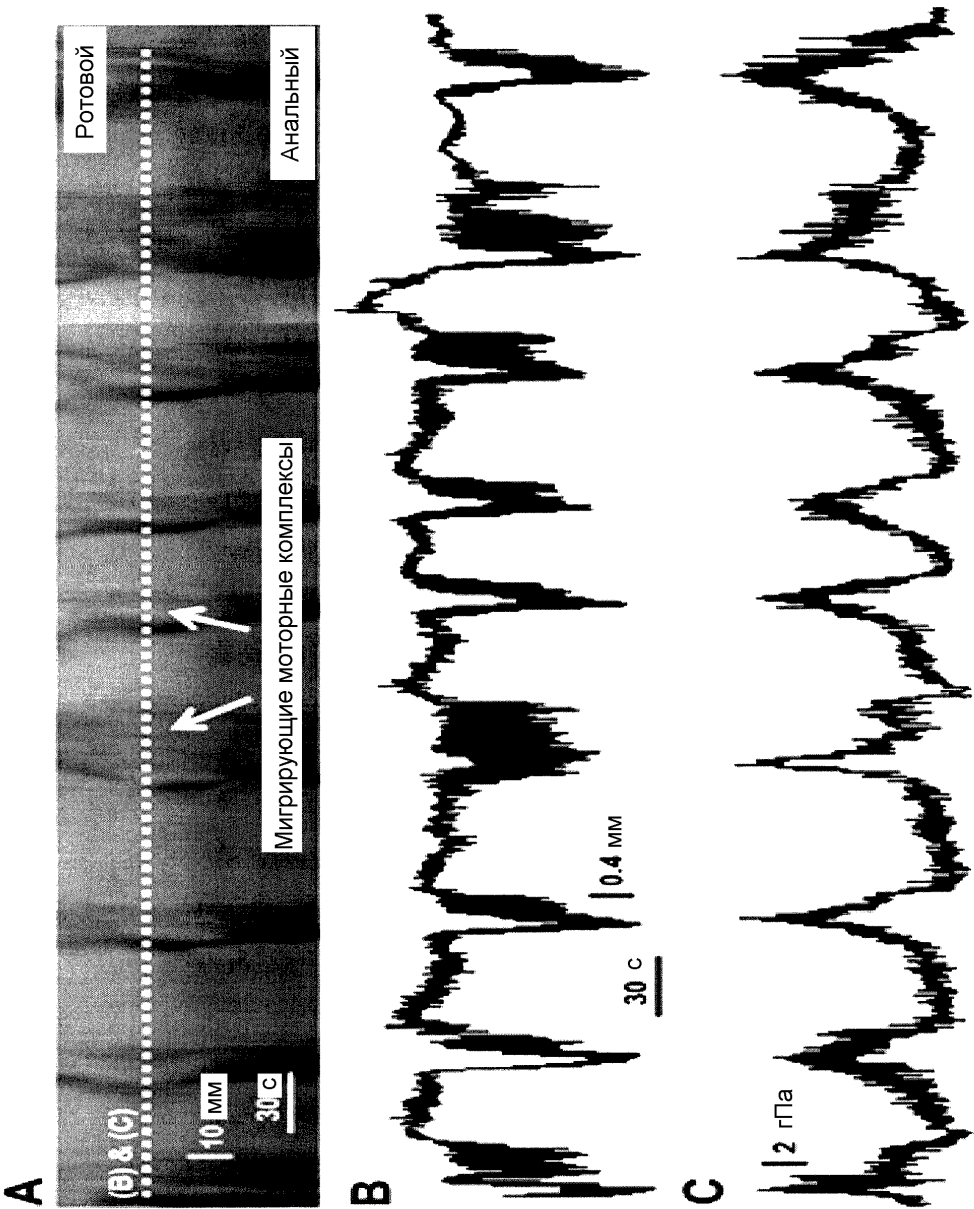
22. Композиция для лечения расстройства подвижности кишечника, в которой расстройство моторики кишечника является таким, в котором желательно увеличить время прохождения материала через желудочно-кишечный тракт, включающая бактериальный штамм по п.18.

23. Композиция по п.21 или 22, где композиция содержит по меньшей мере один
45 дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или эксципиента, пищевого продукта или пищевой добавки или другого терапевтического или пищевого агента.

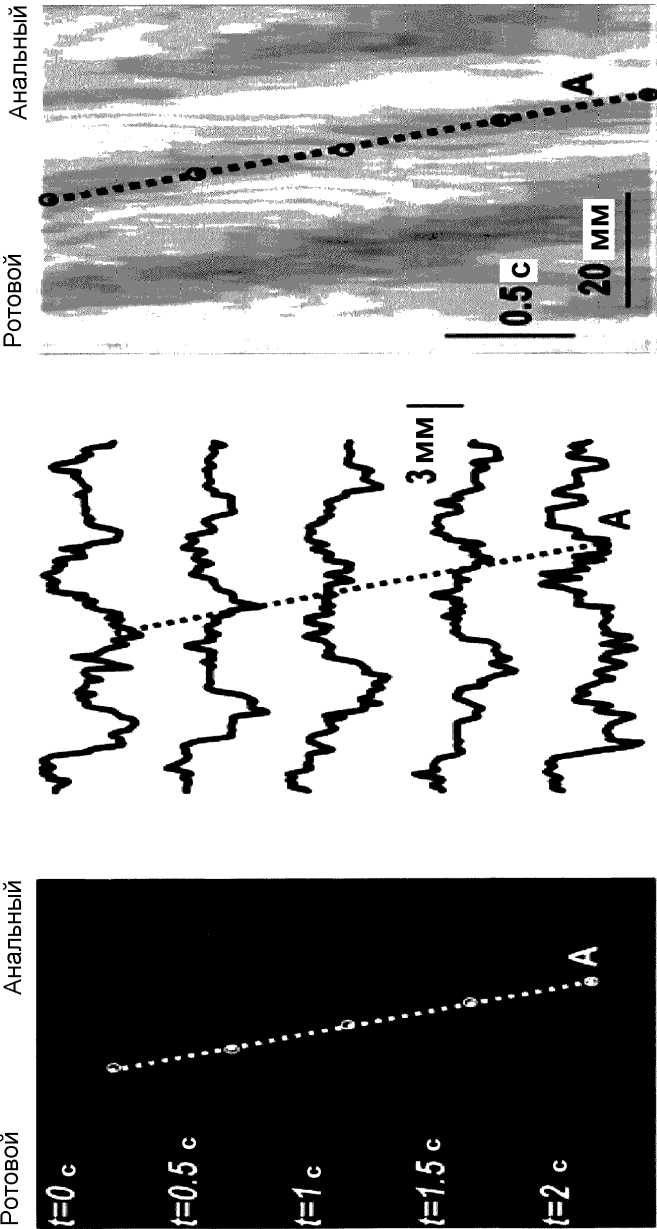
ФИГ. 1



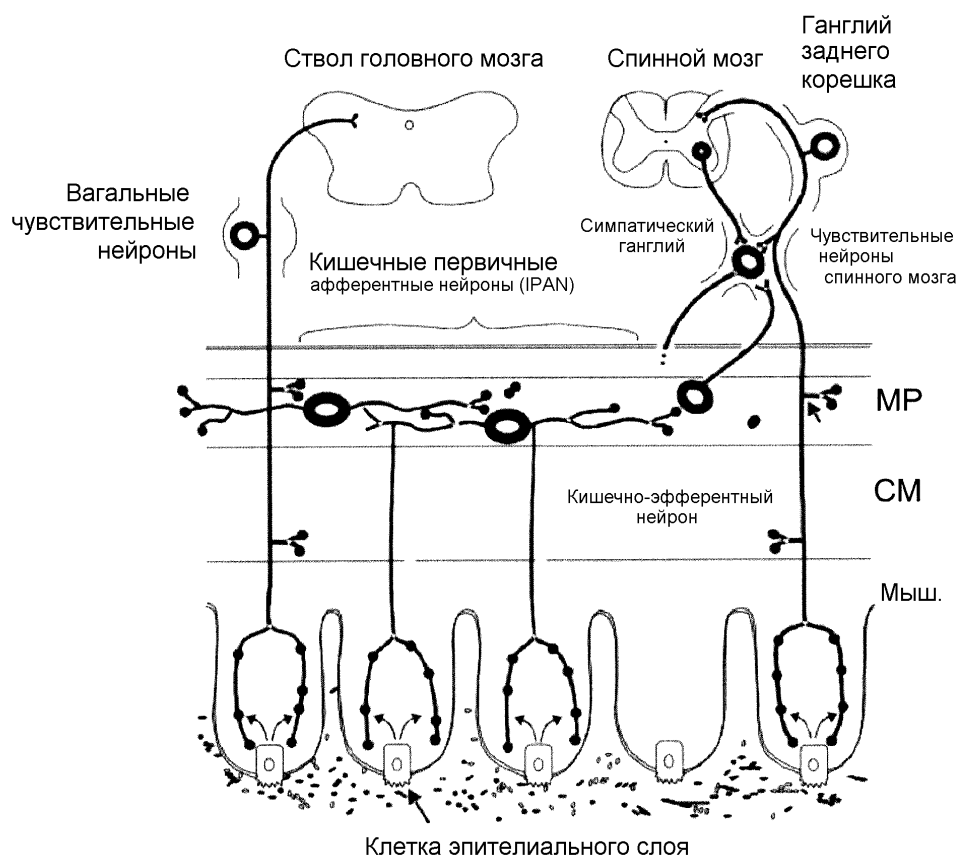
ФИГ. 2



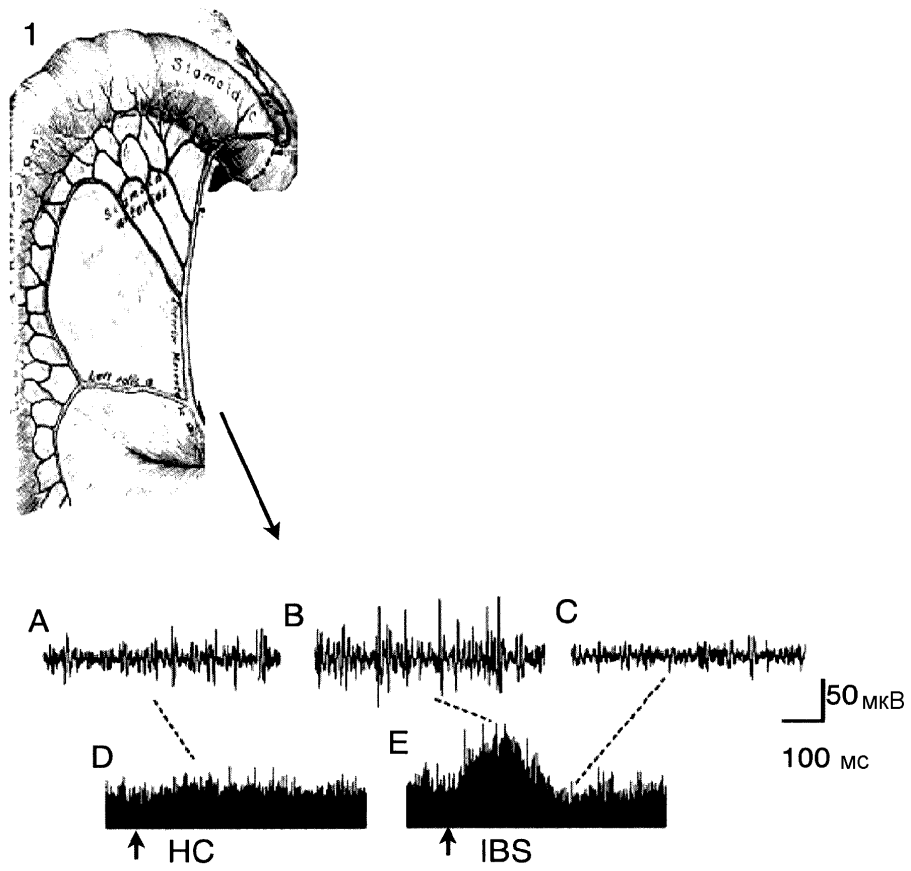
ФИГ. 3



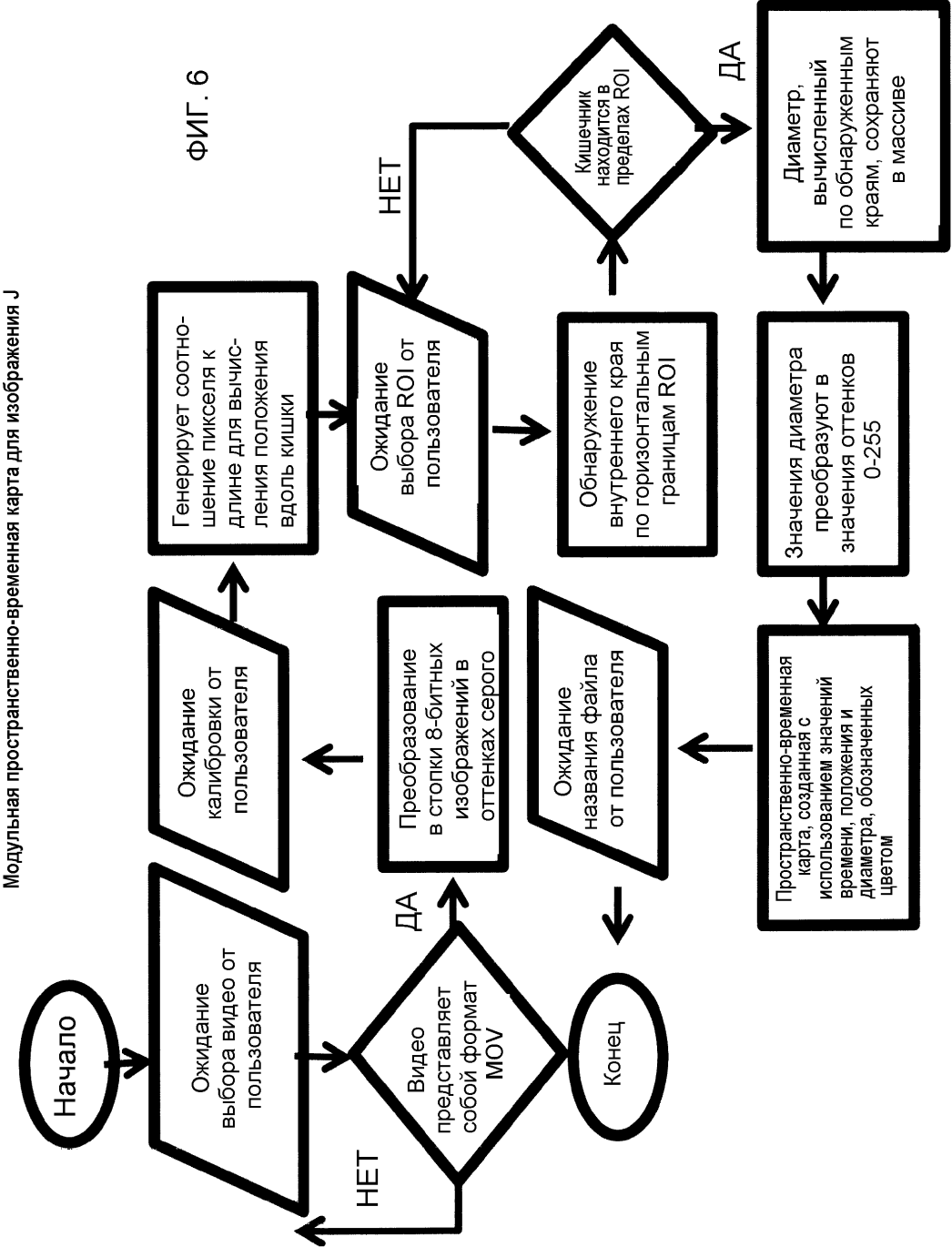
ФИГ. 4



5/9

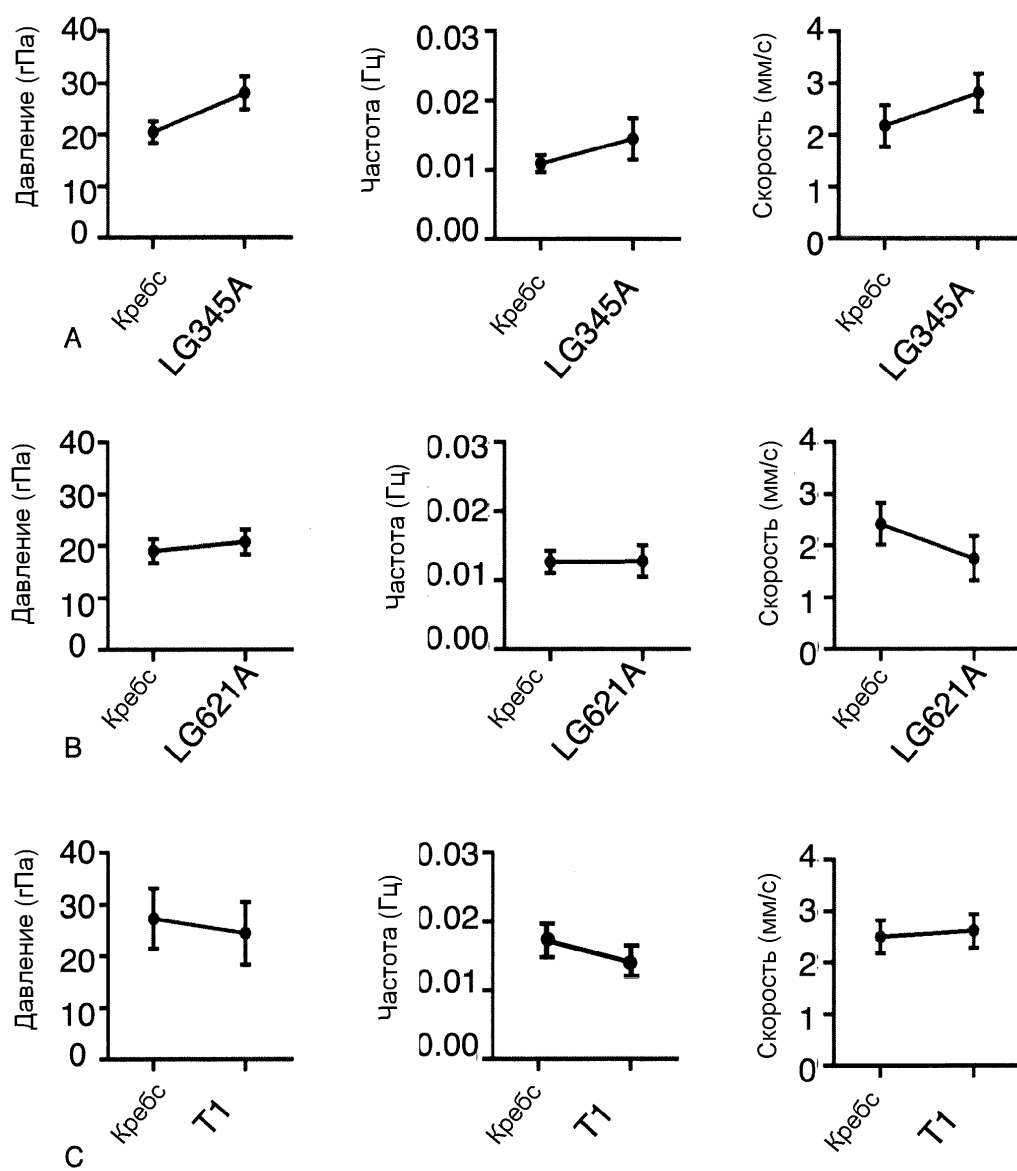


ФИГ. 5



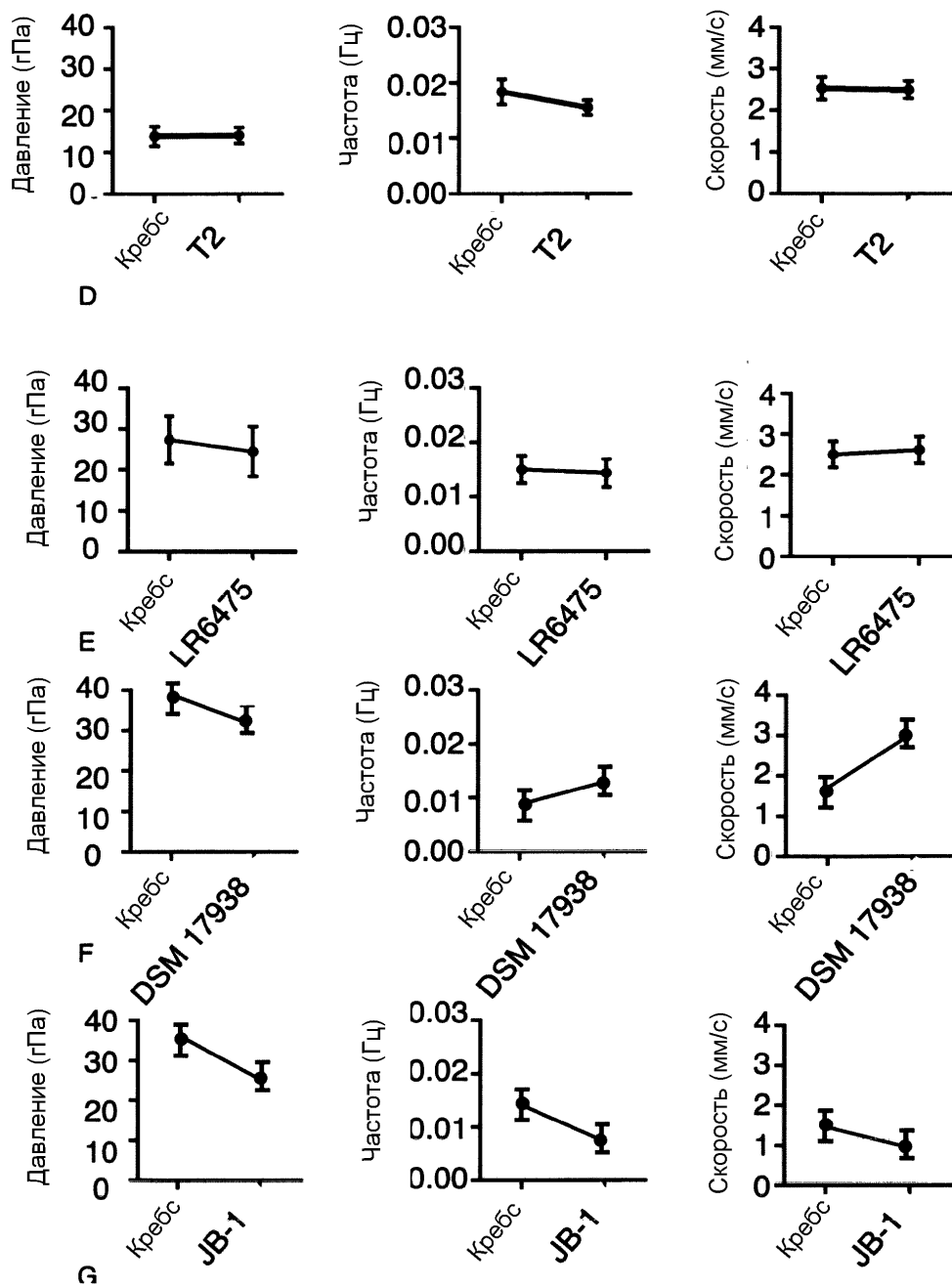
7/9

ФИГ. 7



8/9

ФИГ. 8



ФИГ. 9

