



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120846** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)**G01N 33/68** (2006.01)**A61K 35/747** (2015.01)**A61K 35/74** (2015.01)

A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2016 08948	(74)	Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(22)	Дата подання заявки:	23.01.2015	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009155932 A2, 30.12.2009 Peter Holzer: "Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system", Pharmacology and therapeutics, vol. 131, no. 1, 2011, P. 142-170 Holzer et al: "TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia", European journal of pharmacology, Elsevier Science, NL, vol. 500, no. 1-3, 01.10.2004, P. 231-241 X. Ma et al: "Lactobacillus reuteri ingestion prevents hyperexcitability of colonic DRG neurons induced by noxious stimuli", American journal of physiology: Gastrointestinal and Liver physiology, vol. 296, no. 4, 01.04.2009, P. G868-G875 T Kamiya: "Inhibitory effects of Lactobacillus reuteri on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats", Gut, vol. 55, no. 2, 01.02.2006, P. 191-196 Claudio Romano et al: "Lactobacillus reuteri in children with functional abdominal pain (FAP) : Lactobacillus and chronic abdominal pain", Journal of Paediatrics and Child Health, vol. 50, no. 10, 08.07.2010, P. E68-e71 Rok Orel: Effectiveness of Lactobacillus reuteri for prevention and treatment of functional gastrointestinal disorders in infants, children and adolescents (Review), Zdravniški Vestnik, Vol 82, no. 82, 10.2013, P. 1-83-193 Sophie A Van Diest et al: "Relevance of mast cell nerve interactions in intestinal nociception", Biochimica et biophysica acta. molecular basis of disease, Amsterdam, NL, vol. 1822, no. 1, 30.03.2011, P. 74-84
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.02.2020			
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	1450065-6, 1450813-9			
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	23.01.2014, 01.07.2014			
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	SE, SE			
(41)	Публікація відомостей про заявку:	12.12.2016, Бюл.№ 23			
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.02.2020, Бюл.№ 4			
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/SE2015/050064, 23.01.2015			
(72)	Винахідник(и):	Коноллі Імонн (SE), Кунце Вольфганг (CA), Біненшток Джон (CA)			
(73)	Власник(и):	БЮГАЙА АБ, Box 3242, S-103 64 Stockholm, Sweden (SE)			

(54) ВИБІР ШТАМУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ЯКИЙ МОДУЛЮЄ ГАСТРОІНТЕСТИНАЛЬНИЙ БІЛЬ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу вибору бактеріального штаму роду *Lactobacillus* для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини, в якому зазначений

UA 120846 C2

спосіб включає вибір штаму, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію транзиторного рецепторного потенціалу по ванілоїду 1, TRPV1, або кондиціонованого середовища із зазначеного штаму молочнокислої бактерії, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ЯКОЇ СТОСУЄТЬСЯ ВІНАХІД

Даний винахід насамперед стосується модулювання гастроінтестинального болю і зокрема вибору агентів, таких як молочнокислі бактерії, здатні модулювати гастроінтестинальний біль, і застосування даних агентів.

5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Гастроінтестинальний біль є симптомом багатьох патологічних станів, захворювань і розладів, пов'язаних з шлунково-кишковим трактом. Функціональний абдомінальний біль стосується рецидивуючого абдомінального болю. У переважної більшості пацієнтів з рецидивуючим абдомінальним болем має місце "функціональний" або "неорганічний" біль, що означає, що біль не викликаний соматичними порушеннями. Низка розладів моторики також пов'язана з болем і запором або проносом. Термін застосовують для опису низки розладів, при яких кишка не розвивалася правильно або втратила свою здатність координувати м'язову активність внаслідок низки причин.

Дані розлади можуть виявлятися різними шляхами і включають, але без обмеження, таке:

- 15 Здуття живота
- Рецидивуючу непрохідність
- Абдомінальну коліку
- Запор
- Гастроезофагеальну рефлюксну хворобу
- 20 Рецидивуюче блювання, яке не купірується
- Пронос
- Синдром подразненої кишки (IBS)
- Запальне захворювання кишечника
- Нетримання калу
- 25 Коліку немовляти
- Частий рецидивуючий абдомінальний біль (FRAP)
- Відрижку
- Непереносимість харчових продуктів

У широкому значенні, будь-яка значна зміна в пасажі їжі і секреції в травний тракт може мати на увазі порушення моторики кишечника і являє собою тип розладів, часто пов'язаний з гастроінтестинальним болем.

Власні координовані рухи шлунку і кишечника необхідні, щоб перетравлювати і просувати кишковий вміст травним трактом. Моделі скорочення і розслаблення, необхідного для правильної моторики шлунково-кишкового тракту (ШКТ), є складними і задіюють нерви і мускулатуру стінок ШКТ. Щодня в будь-який час на моторику ШКТ може впливати множина чинників, наприклад, фізичні вправи і емоційний дистрес. У новонароджених дітей в ШКТ має розвиватися складна система моторики. Порушення функції шлунково-кишкової моторики часто пов'язане з гастроінтестинальним болем.

40 Старіння, деменція, інсульт, хвороба Паркінсона, пошкодження спинного мозку, розриви стінок прямої кишки в пологах, діабет, хірургічні ускладнення і нейром'язові розлади, наприклад, важка псевдопаралітична міастенія, можуть викликати розлади моторики, пов'язані з болем.

Синдром подразненої кишки (IBS), найчастіше діагностований розлад моторики кишечника і гастроінтестинального болю, має на увазі захворювання товстої кишки протягом десятиліть, але дослідження моторики ШКТ продемонструвало, що порушення моторики, які лежать в основі, можуть також виникати в тонкій кишці. IBS часто може супроводжуватися гастроінтестинальним болем, і було показано, що імунореактивність TRPV1 у пацієнтів IBS значно підвищена (Akbar, Yiangou et al., Gut 2008).

Запор, часто пов'язаний з гастроінтестинальним болем, є найпоширенішою скаргою з боку травного тракту в Сполучених Штатах, але незважаючи на свою частоту, часто залишається нерозпізнаним доти, доки у пацієнта не розвинуться повторні порушення, такі як аноректальні розлади або дивертикулярна хвороба. Як зазначалося вище, гастроінтестинальний біль є частим симптомом запору.

Запор є досить поширеним явищем під час вагітності. М'язові скорочення, які в нормі переміщують їжу по кишечнику, сповільнюються через вищі рівні гормону прогестерону і, можливо, надмірного заліза, що приймається у вигляді вітамінів для вагітних. Це часто також супроводжується абдомінальним болем в нижніх ділянках живота.

Запор також пов'язаний зі старшим віком, і так званий "старіючий кишечник" часто виявляють у людей переважно старше 70 років і в установах постійного догляду.

60 На іншому кінці спектра вікових розладів моторики кишечника постійний або надмірний плач від колік немовляти є однією з найболючіших проблем грудного віку. Це є болісним для

немовляти, для батьків і залучає працівників охорони здоров'я. Коліки часто починаються і закінчуються раптово.

Гіпермоторика кишечника на фоні передбачуваного порушення вегетативної регуляції запропонована як одна з етіології коліки. Багато з механізмів, які регулюють моторику, у дітей грудного віку є незрілими. Незрілість даних механізмів може призводити до підвищеної чутливості до непереносимості їжі. Таким чином, коліка може являти собою основний клінічний прояв у субпопуляції дітей грудного віку, у яких порушена функція дозрівання в одному або більше аспектів регуляції моторики і що часто призводить до гастроінтестинального болю у немовляти.

Розлади моторики кишечника накладаються на патологічні скорочення кишечника, часто пов'язані з гастроінтестинальним болем, існує багато різних видів лікування і рекомендацій для різних розладів, деякі з яких працюють краще, ніж багато інших.

Таким чином, існує загальна потреба у вирішенні конкретних проблем стосовно низки розладів моторики, а саме больових розладів: як найкращим чином підібрати агенти для запобігання або зменшення гастроінтестинального болю?

Транзиторний рецепторний потенціал з ванілоїду 1 (TRPV1) являє собою проникний для Ca^{2+} катіонний канал, який експресується, наприклад, в периферичній нервовій системі (ПНС), центральній нервовій системі (ЦНС), дихальній системі і шлунково-кишковому тракту. TRPV1 активується фізичними і хімічними стимулами, наприклад, температурою, зміною pH і капсаїцином, і відіграє найважливішу роль в розпізнаванні ноцицептивного і термічного запального болю. У шлунково-кишковому тракту імунореактивність до TRPV1 може, наприклад, бути виявлена у вісцеральних чутливих аферентах, і TRPV1-клітини передають, наприклад, відчуття болю в шлунку у розташовані вище центри головного мозку. Як передбачається, TRPV1 задіяний при деяких патологічних станах шлунково-кишкового тракту, які пов'язані з больовими відчуттями, і було показано, що імунореактивність до TRPV1 значно підвищена, наприклад, при IBS (Akbar, Yiangou et al., Gut 2008). Як приклад цього, пацієнти з діагностованим активним запальним захворюванням кишечника демонструють значно підвищену імунореактивність до TRPV1 в нервових волокнах товстої кишки (Wang, Miyares and Ahern, 2005 J. Physiol.).

Незважаючи на припущення, що TRPV1 є потенційною мішенню для розробки лікарських препаратів для лікування болю різних модальностей, повсюдна експресія рецептора може призводити до небажаних явищ, що обмежують застосування системних антагоністів TRPV1 в лікуванні гастроінтестинального болю. Зокрема, внаслідок зниженого вивільнення вазоактивного пептиду надання рецептору властивостей антагоніста потенційно може призводити до серцево-судинних ускладнень.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Загальною задачею є знаходження агентів, придатних для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю.

Конкретна задача полягає в наданні способу для вибору агентів, переважно штамів бактерій і, більш переважно, молочнокислих бактерій, ефективних в зменшенні або запобіганні гастроінтестинального болю.

Дані та інші цілі досягаються варіантами здійснення, як розкрито в даній заявці.

Аспект варіантів здійснення стосується способу для вибору агента, ефективного в зменшенні або запобіганні гастроінтестинального болю у людини. Спосіб включає вибір агента, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію транзиторного рецепторного потенціалу по ванілоїду 1 (TRPV1).

Інший аспект варіантів здійснення стосується агента, вибраного за допомогою визначеного вище способу.

Додатковий аспект варіантів здійснення стосується агента, отриманого за допомогою визначеного вище способу вибору для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Додатковий аспект варіантів здійснення стосується композиції, яка містить агент, отримуваний за допомогою визначеного вище способу вибору, і щонайменше один додатковий компонент, вибраний з групи, яка складається з фармацевтично прийнятного носія, фармацевтично прийнятного розріджувача, фармацевтично прийнятного ексципієнта, харчового продукту, біологічно активної харчової домішки та іншого превентивного або терапевтичного агента.

Споріднений аспект варіантів здійснення визначає агент, за визначенням вище, або композицію, за визначенням вище, для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Інший споріднений аспект варіантів здійснення визначає застосування агента, отриманого за допомогою визначеного вище або за визначенням вище способу вибору, або композиції, за визначенням вище, для виготовлення лікарського засобу, харчового продукту або біологічно активної харчової домішки для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Додатковий аспект варіантів здійснення стосується способу зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини. Спосіб включає введення ефективної кількості агента, отриманого за допомогою визначеного вище способу вибору або за визначенням вище, або композиції, за визначенням вище, людині.

Дані варіанти здійснення надають ефективну методику, яку можна застосовувати для вибору або ідентифікації агентів, зокрема штамів бактерій, таких як молочнокислі бактерії, які можна застосовувати для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у хворих, переважно у хворих людей, які страждають від розладу або захворювання, викликаного або пов'язаного з гастроінтестинальним болем.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Варіанти здійснення, разом з його додатковими цілями і перевагами, можуть бути найкраще зрозумілі за допомогою посилання на наступний опис, взятий разом з супроводжувальними фігурами, на яких:

Фігура 1 показує спонтанну активацію брижових множинних нейронів після додавання 1×10^8 одиниць (КУО)/мл DSM 17938 (A), 1×10^9 КУО/мл DSM 17938 (B), розбавленого (1:5) кондиціонованого середовища DSM 17938 (C), 1×10^9 КУО/мл γ -опроміненого DSM 17938 (D) і тільки розбавленого середовища (1:5) (E) (Критерії Віллоксона).

Фігура 2 показує дію DSM 17938 на частоту спонтанної активації спинномозкових аферентів. А) Частота активації множинних нейронів знизилася, коли у просвіт додали 11×10^9 КУО/мл DSM 17938 (Критерій Віллоксона). В) Ліва панель, активація спинномозкових одиночних нейронів зменшувалася за допомогою DSM 17938 (Критерій Віллоксона). С) Верхні панелі, типові сліди спонтанного розряду множинних нейронів до і після додавання DSM 17938; нижні панелі, накладені форми хвиль одного єдиного нейрону, які виникали у час, позначений "о" у верхніх слідах.

Фігура 3 показує, що DSM 17938 протидіє збудливій відповіді спинномозкових волокон за допомогою додавання капсаїцину до серозного суперфузату. А) Крива залежності "доза-ефект" капсаїцину у 113 спинномозкових окремих одиночних нейронів нанесена на графік (●) і супроводжується трипараметричним логістичним рівнянням, $EC_{50}=200$ нМ. $Max=238 \pm 27$ %; при цьому на графік додатково нанесли додаткову криву залежності "доза-ефект" 116 волокон для капсаїцину в присутності 1×10^9 КУО/мл DSM 17938 (■), і супроводжували таким самим логістичним рівнянням, для якого $EC_{50}=500$ нМ і $Max=129 \pm 17$ % ($P=0,7$ і $P=0,004$ для відмінностей між EC_{50} і Max відповідно, F-критерій за додатковою сумою квадратів). В) Сумарні діаграми розкиду зі середніми і стандартними помилками середніх значень, що показують, як відповіді одиночних нейронів змінювалися зі зростаючими дозами капсаїцину за відсутності або наявності 1×10^9 КУО/мл DSM. (n) означає співвідношення одиночних нейронів для кожної групи.

Фігура 4 показує, що DSM 17938 або антагоніст TRPV1 зменшує індуковану розтягненням збудливу відповідь в спинномозкових одиночних нейронах. А) Графіки розсіювання, які показують, що додавання 1×10^9 DSM 17938 у просвіт зменшує підвищення частоти активації спинномозкових одиночних нейронів, спровоковане зростаючим внутрішньопросвітним тиском до 48 гПа. В) Додавання 10 мкм антагоніста TRPV1 6-йодонордигідрокапсаїцину в просвіт імітує дію додавання DSM 17938 (Критерії Віллоксона).

Фігура 5 показує, що DSM 17938 зменшує індукований капсаїцином підйом Ca^{2+} в соматичних нейронах задніх корінців спинного мозку. А) 1 мкм капсаїцину викликав підвищення надходження Ca^{2+} в нейронах DRG, яке дозозалежно знижувалося під дією внутрішньопросвітної DSM 17938 і не змінювалося під дією 1×10^9 КУО/мл JB-1. В) Зведений графік, що показує, як співвідношення (F/F_0) максимальної Ca^{2+} флуоресценції (F), викликаной капсаїцином, до початкової Ca^{2+} флуоресценції (F_0) змінюється залежно від концентрації DSM 17938 або JB-1. (Значення P, критерій множинного порівняння Бонферроні).

Фігура 6 показує, що на 9 день годування DSM 17938 зменшувалася брадикардія, викликана розтягненням шлунку. А) Підсумкові значення для відсоткового зниження частоти серцевих скорочень в спокої, викликаного розтягненням шлунку 40 і 60 мм рт. ст. (Значення P, критерій Ст'юдента для однієї вибірки). В) Зведені графіки, що показують, як частота серцевих скорочень в спокої змінюється з плином часу у відповідь на розтягнення шлунку 60 мм рт. ст. ($P=0,01$, двофакторний дисперсійний аналіз).

Фігура 7 показує, що кондиціоноване середовище DSM 17938 імітувало DSM 17938, індукуючи зниження збудливої дії капсаїцину на спинномозкові аференти. Зведений графік, що показує збільшення частоти активації одиночних нейронів спинномозкових волокон індукованої 1 мкм капсаїцину в контрольних умовах, з кондиціонованим середовищем DSM 17938 (1:5) або з 1×10^9 КУО/мл DSM 17938 ($P=0,02$, однофакторний дисперсійний аналіз; апостеріорні значення P , критерій множинного порівняння Хольма-Сідака).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

Для полегшення розуміння винаходу нижче визначена низка термінів.

"Гастроінтестинальний біль", який також називається шлунково-кишковим болем, означає біль в шлунково-кишковому тракті хворого. Даний гастроінтестинальний біль часто викликаний або пов'язаний, тобто є симптомом або хворобливим компонентом низки захворювань і розладів, як правило, шлунково-кишкового тракту. Гастроінтестинальний біль включає генералізований біль в шлунково-кишковому тракті, що часто означає генералізований гастроінтестинальний біль в даній ділянці, біль, пов'язаний з розладами моторики кишечника, біль внаслідок запальних захворювань кишечника і синдрому подразненої кишки, біль в шлунку, генералізований абдомінальний біль, вісцеральний біль, функціональний абдомінальний біль, частий рецидивуючий абдомінальний біль і біль при інших функціональних шлунково-кишкових розладах.

"Функціональний абдомінальний біль" стосується рецидивуючого абдомінального болю. Переважну більшість пацієнтів з рецидивуючим абдомінальним болем мають "функціональний" або "неорганічний" біль, який означає, що біль не викликаний фізичними порушеннями.

"Розлади моторики кишечника" застосовують для опису низки розладів, при яких кишка не розвивалася правильно або втратила свою здатність координувати м'язову активність внаслідок низки причин. Дані розлади можуть виявлятися різними шляхами, і включають, але без обмеження, таке:

- Здуття живота
- Рецидивуючу непрохідність
- Абдомінальну коліку
- Запор
- Гастроезофагеальну рефлюксну хворобу
- Рецидивуюче блювання, яке не купірується
- Пронос
- Синдром подразненої кишки (IBS)
- Запальне захворювання кишечника
- Нетримання калу
- Коліку немовляти
- Частий рецидивуючий абдомінальний біль (FRAP)
- Відрижку
- Непереносимість харчових продуктів

У широкому значенні, будь-яка значна зміна в пасажі їжі і секреції в травний тракт може мати на увазі порушення моторики кишечника і являє собою тип розладів, часто пов'язаний з гастроінтестинальним болем.

"Біль в шлунку" являє собою збірний термін, що застосовується для опису болю або дискомфорту у верхніх ділянках живота.

У варіанті здійснення причина болю в шлунку вибрана з групи, яка, наприклад складається з, невиразкової диспепсії, пептичної виразки, гастроезофагеальної рефлюксної хвороби і гастриту.

У конкретному варіанті здійснення причиною болю в шлунку є невиразкова диспепсія і/або гастрит.

Як використовується в даній заявці, термін "частота активації" застосовують для вимірювання послідовностей сенсорних спайків у головний мозок.

Як використовується в даній заявці, термін "внутрішньопросвітний піковий тиск" (PPr) ґрунтується на реєстрації внутрішньопросвітного тиску, де зміни внутрішньопросвітного тиску вимірюють в серединній точці поздовжньої осі сегмента кишки. Сигнал тиску аналізують, і внутрішньопросвітний піковий тиск (PPr) ідентифікують і вимірюють.

Як використовується в даній заявці, термін "частота мігруючого моторного комплексу" (частота MMC) розраховується шляхом підрахунку кількості темних смуг MC на просторово-часових картах.

Як використовується в даній заявці, термін "швидкість мігруючого моторного комплексу" (швидкість ММС) вимірюється з нахилу (нахилів) кожної смуги на просторово-часовій карті, що генерується мігруючими моторними комплексами.

Як використовується в даній заявці, термін "агент" застосовують для позначення будь-якої речовини або матеріалу, включаючи цільні клітини; мікроорганізми; кондиціоноване середовище; білки, пептиди, ферменти і/або молекули, отримані з даного кондиціонованого середовища; білків, пептидів, ферментів і/або молекул, які секретуються або отримуються з цільних клітин або мікроорганізмів; або іншого біологічного або хімічного матеріалу, який можна застосовувати для модулювання гастроінтестинального болю в шлунково-кишковому тракті ссавця. Прикладом переважних агентів є штами бактерій, наприклад, штами пробіотичних бактерій, і зокрема штами молочнокислих бактерій. Іншим прикладом переважного агента є кондиціоноване середовище з штамів бактерій, наприклад, штамів пробіотичних бактерій, і зокрема штамів молочнокислих бактерій.

Кондиціоноване середовище, що іноді також називається як кондиціоноване поживне середовище, являє собою (поживне) середовище, в якому клітини культивують протягом періоду часу. Клітини, що культивуються в середовищі, "кондиціюють" середовище за допомогою вивільнення або вироблення низки компонентів або молекул, такого як білки, пептиди, ферменти, цитокини, хемокіни, хімічні речовини тощо.

Починають визнавати, що кишкові мікроорганізми посилають сигнали у головний мозок як частину так званої осі мікробіота-кишечник-мозок. Проте, відомо дуже мало про роль кишкової мікробіоти в розвитку та функціонуванні нервової системи. На даний момент лише дуже трохи відомо про кількісний характер нервового сигналу, що передається від кишечника до центральної нервової системи.

Одиночні чутливі нейрони, включаючи такі серед волокон блукаючого нерву, ретранслюють безперервні фізичні стимули у вигляді впорядкованої послідовності спайків, які кодують природу та інтенсивність стимулу. На додаток до цього, стимули можуть бути представлені в коді популяції, що визначається кількістю активних волокон в пучку. Вся інформація, що досягає головного мозку через первинні аференти, має кодуватися мовою послідовності нейронних спайків. Внаслідок цього, знання, як на послідовності сенсорних спайків впливає низка агентів, такі як симбіоти, пробіотичні штами і різні речовини, дає можливість авторам винаходу ідентифікувати нові благотворні кишкові мікроорганізми та їхні активні молекули за допомогою їхнього впливу на первинну аферентну активацію, а також нові лікарські препарати та інші сполуки, які можуть у різний спосіб втручатися в дану сигнальну систему, зокрема за допомогою модулювання активації TRPV1.

Спосіб варіантів здійснення в даній заявці використовується для вибору агента для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю за допомогою інгібування передачі сигналів через TRPV1-рецептор. Спосіб варіантів здійснення таким чином можна застосовувати для оцінки агентів, які можуть бути потенційно ефективні в запобіганні гастроінтестинальному болю і/або ефективні в зменшенні, пригніченні або лікуванні гастроінтестинального болю. Таким чином, спосіб можна застосовувати для ідентифікації ефективних агентів, здатних модулювати гастроінтестинальний біль, пов'язаний з периферичною (ентеральною) і/або центральною нервовою системою.

Таким чином, аспект варіантів здійснення стосується способу для вибору агента, ефективного, тобто для застосування, для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини. Спосіб включає вибір агента, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію транзиторного рецепторного потенціалу по ванілоїду 1 (TRPV1).

Варіанти здійснення таким чином ґрунтуються на застосуванні сигнального шляху TRPV1 як інструмента вибору при ідентифікації агентів, які є ефективними при модулюванні, зокрема запобіганні або зменшенні, такому як пригнічення або лікування, гастроінтестинального болю у хворих, які страждають від захворювань або розладів, що включають або що викликають даний гастроінтестинальний біль, і які можна визначити гастроінтестинальні больові захворювання або розлади.

Спосіб варіантів здійснення, як правило, виконується *in vitro* або *ex vivo*, як додатково розкрито в даній заявці. Проте, агент переважно здатний зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1 у хворого при введенні хворому.

Спосіб варіантів здійснення можна, таким чином, застосовувати для пошуку придатних агентів для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю при різних гастроінтестинальних больових розладах і захворюваннях. Агенти вибирають для впливу на активацію TRPV1 хворого у сприятливий спосіб з метою модулювання, тобто переважно запобігання, зменшення або лікування гастроінтестинального болю.

У варіанті здійснення розлад або захворювання, пов'язане з гастроінтестинальним болем, що підлягає запобіганню або лікуванню агентом, вибраним за допомогою способу, являє собою гастроінтестинальний больовий розлад або захворювання.

У варіанті здійснення гастроінтестинальний біль являє собою біль в шлунку.

5 У варіанті здійснення гастроінтестинальний біль являє собою вісцеральний біль.

У варіанті здійснення гастроінтестинальний біль може бути присутнім у людини, яка страждає від коліки.

У варіанті здійснення гастроінтестинальний біль може бути присутнім у людини, яка страждає від синдрому подразненої кишки (IBS).

10 У варіанті здійснення гастроінтестинальний біль може бути присутнім у людини, яка страждає від запору. Гастроінтестинальний біль може бути присутнім у хворих, які страждають розладами моторики кишечника, за визначенням вище.

Таким чином, у варіанті здійснення хворий страждає порушенням моторики кишечника, асоційованої з гастроінтестинальним болем.

15 Спосіб варіантів здійснення ґрунтується на несподіваному відкритті, що гастроінтестинальний біль, який включає біль, пов'язаний з різними патологічними станами і розладами, такими як розлади моторики, і яка проявляється центрально або периферично, пов'язана з активацією TRPV1, яку можна модулювати за допомогою раніше невідомих агентів, таких як молочнокислі бактерії.

20 Одним видом гастроінтестинального болю є вісцеральний біль, який є результатом активації ноцицепторів внутрішніх органів черевної порожнини (органів). Вісцеральні структури є високо чутливими до здуття (розтягнення), ішемії і запалення, але відносно нечутливі до інших стимулів, які в нормі викликають біль. Вісцеральний біль є дифузним, важким для локалізації і часто пов'язаний з віддаленою, звичайно поверхневою, структурою. Він може супроводжуватися симптомами, такими як нудота, блювота, змінами показників життєво важливих функцій, а також емоційними проявами. Біль можна описати як нудотний, глибокий, стискальний і ниючий. Виразні структурні порушення або біохімічні порушення пояснюють даний тип болю лише у частини пацієнтів. Дані захворювання іноді відносять до групи шлунково-кишкових нейром'язових захворювань (GINMD). Люди можуть також відчувати вісцеральний біль, часто

30 вельми інтенсивний за природою, без якої-небудь очевидної структурної, біохімічної або патогістологічної причини для даних симптомів.

Ноцицептор являє собою чутливий рецептор, який реагує на потенційно пошкоджувальні стимули, посилаючи потенціали дії специфічним ноцицептивним нейронам (Аδ або С), які передаються передньобічним трактам спинного мозку (плюс малій вагусній проекції) і потім до таламусу і прозенцефалону, включаючи острівцеву і поясну кору. Особливо важливим для сприйняття болю, що походить від патології кишечника, є активація больових повідомлень з кишечника до центральної нервової системи за зовнішніми первинними аферентними волокнами, які йдуть в мезентеріальних аферентних нервових пучках.

40 Спосіб можна застосовувати для відбору агентів з метою вибору агентів з бажаними властивостями, наприклад, зменшення активації TRPV1, для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю. Параметр, який підлягає вимірюванню в способі, тобто спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1, можна спостерігати в динаміці і визначати в різних моделях і системах. Використовуючи дану інформацію, можна отримати профіль, корисний для визначення докладної і можливо деталізованої дії, яку конкретні агенти вчиняють

45 на передачу больових сигналів при гастроінтестинальному болю.

Інші параметри, які можна виміряти в способі, включають загальну передачу больових сигналів, імпульсну активність нервів, наприклад, аналіз брижового нервового пучка, і, можливо, застосування різних моделей гастроінтестинального болю in vivo.

50 У варіанті здійснення активацію TRPV1 вимірюють в клітинах, які експресують TRPV1, таких як нейрони спинномозкових гангліїв (DRG), CaCo₂ клітини або інша стандартна кишкова епітеліальна клітинна лінія людини. Можна виміряти як спонтанну активацію TRPV1, так і активацію TRPV1 після індукування, наприклад, капсаїцином, зміною рН або температури. Загалом, згідно з варіантами здійснення, для вимірювання активації TRPV1 можна застосовувати будь-яку клітину або тканину, яка експресує TRPV1.

55 Таким чином, у варіанті здійснення спосіб включає контактування клітини, яка експресує TRPV1, з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб також включає вимірювання спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 в клітині слідом за, тобто після, контактуванням клітини з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб додатково включає порівняння виміряної спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 з контрольною активацією TRPV1. У даному варіанті

60 здійснення спосіб додатково включає вибір агента, що підлягає дослідженню, як агента,

ефективного для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю, якщо виміряна спонтанна і/або індукована активація TRPV1 менше контрольної активації TRPV1.

Контрольну активацію TRPV1 можна визначати відповідно до різних варіантів здійснення. Наприклад, активацію TRPV1 можна було б визначити заздалегідь і визначати у експресувальних TRPV1 клітин з рівнем активації, який представляє нормальну або вихідну активацію, відповідну, наприклад, по суті відсутності гастроінтестинального болю.

Проте, переважний варіант здійснення визначення контрольної активації TRPV1 призначений для застосування клітини, яка експресує TRPV1, як внутрішній контрольний зразок. Отже, у варіанті здійснення спосіб включає вимірювання спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 в клітині перед контактуванням клітини з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб також включає визначення контрольної активації TRPV1, ґрунтуючись на спонтанній і/або індукованій активації TRPV1, виміряній в клітині перед контактуванням клітини з агентом, що підлягає дослідженню.

При даному підході вимірювання спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 внаслідок цього переважно виконують двічі: перед контактуванням клітини з агентом, що підлягає дослідженню, і після контактування клітини з агентом, що підлягає дослідженню.

Як альтернатива, вимірювання спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 можуть бути виконані в двох паралельних експериментах: один експеримент, в якому клітина контактувала з агентом, що підлягає дослідженню, і один контрольний експеримент, в якому клітина не контактувала з агентом. Клітини, що використовуються в двох експериментах, в такому випадку є такого самого типу, як і нейрони DRG, клітини CaCo₂ або інша стандартна кишкова епітеліальна клітинна лінія людини. Спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1 вимірюють в обох експериментах і потім порівнюють одну з одною.

Клітина, що підлягає застосуванню в способі, може являти собою будь-яку клітину, яка експресує TRPV1, включаючи, без обмеження, препарати *ex vivo*, клітинні лінії, які експресують TRPV1, такі як кишкові епітеліальні клітинні лінії людини, які експресують TRPV1, і зародкові клітини, які експресують TRPV1.

Виміряну спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1 і контрольну активацію TRPV1 загалом можна виражати у вигляді відповідного значення параметру або критерію, включаючи значення, що представляє рівень спонтанної і/або індукованої активації TRPV1.

У варіанті здійснення для аналізу активації TRPV1 застосовують зародкові клітини, такі як, наприклад, нейрони спинномозкових гангліїв (DRG).

У іншому варіанті здійснення для аналізу активації TRPV1 застосовують клітинні лінії, які експресують TRPV1, такі як CaCo₂ або інша стандартна кишкова епітеліальна клітинна лінія людини.

У інших варіантах здійснення для аналізу активації TRPV1 застосовують клітинні лінії, що є в продажу, які експресують TRPV1, див., наприклад, cat: no CT6105 від Chantest.

Також можливо використати клітини репортерних генів, також позначувані репортерні клітини в даній ділянці, які можна застосовувати для динамічного спостереження і вимірювання експресії TRPV1 і/або спонтанної і/або індукованої активації TRPV1.

Для дослідження активації TRPV1 можна застосовувати декілька різних способів, включаючи, але без обмеження, функціональний аналіз, що використовує, наприклад, надходження кальцію, індуковане, наприклад, капсаїцином і/або його запобігання за допомогою агента в клітинах, які експресують TRPV1, і частоти активації брижових нервових пучків, спонтанної і/або індукованої, наприклад, капсаїцином. У іншому варіанті здійснення для аналізу активації TRPV1 можна застосовувати функціональну оцінку регульованою температурою роботи іонних каналів із застосуванням приладу ПЛР в режимі реального часу, як описано у Reubish, Emerling et al., BioTechniques 2009. У іншому варіанті здійснення для дослідження активації TRPV1 можна застосовувати репортерну мишу для TRPV1-каналу. Низку моделей *in vivo* також можна застосовувати для аналізу дії на біль у винаході. Дані способи включають, наприклад, розтягнення шлунку і дію на частоту серцевих скорочень (див. Приклад 3) і моделі колоректального розтягнення.

Отже, у варіанті здійснення спосіб включає вимірювання надходження Ca²⁺ в клітину, індукованого капсаїцином або іншою речовиною, здатною включати активацію TRPV1, наприклад, аналогом капсаїцину, або іншими речовинами, здатними активувати TRPV1. Також для індукування активації TRPV1 можна застосовувати вплив на клітину вибраних фізичних станів, включаючи зміну pH або температури. Таким чином, вплив на клітину кислого pH, лужний pH і/або нагрівання (підвищених температур, як правило, вище приблизно 42 °C) може індукувати активацію TRPV1. В даному варіанті здійснення надходження в клітину експресувальної TRPV1, таким чином застосовують як параметр, що відображає активацію

TRPV1. Зниження активації TRPV1, і зокрема зниження рН-індукованої, індукованої нагріванням і/або капсаїцин-індукованої активації TRPV1 можна потім виміряти у вигляді зниження надходження Ca^{2+} . В іншому варіанті здійснення спосіб включає вимірювання регульованою температурою роботи іонних каналів в клітині. В даному варіанті здійснення регульовану температурою роботи іонних каналів в клітині, яка експресує TRPV1, застосовують як параметр, що відображає активацію TRPV1. Регульована температурою робота іонних каналів може бути спонтанною або індукованою, така як індукована підвищеною температурою. Зниження активації TRPV1 може бути виміряне у вигляді зниження регульованою температурою роботи іонних каналів в клітині.

У варіанті здійснення активацію TRPV1 вимірюють, застосовуючи експерименти на брижовому аферентному нервовому пучку. Таким чином, іншим параметром, який можна виміряти, є частота спонтанної і/або індукованої, наприклад, капсаїцином, зміною рН або нагріванням, активації брижових аферентних нервових пучків. Дану методику можна застосовувати для визначення змін збудливості брижових нервових волокон, індукованих різними агентами, що підлягають дослідженню. У варіанті здійснення шлунково-кишковий сегмент вирізають з аркадою брижі або без неї, що містить нервовий пучок, іннервувальний сегмент, який складається як зі спинномозкових, так і вагусних волокон для реєстрації даних нервового пучку *ex vivo* (див. Приклад 1).

У деяких варіантах здійснення є важливою регіональна специфічність шлунково-кишкового тракту. Відповідні сегменти для аналізу брижових нервів способу переважно включає відповідний нервовий пучок для забезпечення можливості вимірювання активації аферентного брижового нерву. Це може бути зручно надане за допомогою наявності шлунково-кишкового сегмента з прикріпленою брижовою тканиною (див. Приклад 1). Таким чином, даний варіант здійснення зручно здійснюється на сегментах *ex vivo* від відповідної експериментальної тварини, наприклад, на шлунково-кишкових сегментах миші (наприклад, сегменти ободової або порожньої кишки миші). Здатність проводити порівняння дії агента на тонку в порівнянні з товстою кишкою могло би бути переважним, зокрема, залежно від розладу кишкової моторики, що підлягає лікуванню, і його клінічної стадії і симптомів, при цьому могло б бути сприятливим лікування, яке є специфічним для окремої ділянки, наприклад, специфічним для або тонкої, або товстої кишки.

У варіанті здійснення проаналізований спінальний трафік аферентного брижового нерву для конкретних і вибраних частин кишки. Несподівано було виявлено, що різні агенти, такі як молочнокислі бактерії, здатні впливати або модулювати сигнальні системи гастроінтестинального болю в одній частині, але не в іншій частині ШКТ, і через різні нервові шляхи, такі як вагусний, або для вісцерального болю через спинномозкові ганглії.

Таким чином, у варіанті здійснення спосіб включає контактування шлунково-кишкового сегмента *ex vivo* з прикріпленою брижовою тканиною з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб також включає вимірювання спонтанної і/або індукованої активації брижових аферентів в шлунково-кишковому сегменті *ex vivo* після контактування шлунково-кишкового сегмента *ex vivo* з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб додатково включає порівняння виміряної спонтанної і/або індукованої активації брижових аферентів з контрольною активацією брижових аферентів. У даному варіанті здійснення спосіб додатково включає вибір агента, що підлягає дослідженню як агент, ефективний для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю, якщо виміряна спонтанна і/або індукована активація брижових аферентів нижча контрольної активації брижових аферентів.

Контрольну активацію брижових аферентів можна визначити, як обговорювалося у вищевикладеному застосуванні шлунково-кишкового сегмента *ex vivo* як внутрішній контроль. У цьому випадку спосіб включає вимірювання спонтанної і/або індукованої активації брижових аферентів в шлунково-кишковому сегменті *ex vivo* перед контактуванням шлунково-кишкового сегмента *ex vivo* з агентом, що підлягає дослідженню. Спосіб також включає визначення контрольної активації брижових аферентів на основі спонтанної і/або індукованої активації брижових аферентів, виміряній в шлунково-кишковому сегменті *ex vivo* перед контактуванням шлунково-кишковою сегмента *ex vivo* з агентом, що підлягає дослідженню.

Як альтернатива можуть бути проведені два паралельних експерименти. У одному з них гастроінтестинальний сегмент *ex vivo* контактує з агентом, що підлягає дослідженню, а в іншому, контрольному експерименті, гастроінтестинальний сегмент *ex vivo* не контактує з агентом. У обох експериментах вимірюють і порівнюють одну з одною спонтанну і/або індуковану активацію брижових аферентів.

Аналіз одного або більше з даних параметрів вище призведе до способу вибору агентів, ефективних для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю.

У конкретному варіанті здійснення шлунково-кишковий сегмент *ex vivo* вибирають з сегмента ободової або порожньої кишки *ex vivo*. У цьому випадку спосіб включає контактування сегмента ободової або порожньої кишки *ex vivo* з прикріпленою брижовою тканиною з агентом, що підлягає дослідженню.

5 Приклади відповідних способів і пристрій для аналізу спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 описані в Прикладах і Фігурах.

Таким чином, в переважних способах представлений аналіз надасть дані про спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1. Аналіз одного або декількох з даних параметрів призведе до переважного способу вибору агентів, ефективних для зменшення і/або запобігання гастрointестинальному болю.

Спосіб варіантів здійснення можна, таким чином, застосовувати для пошуку агентів, придатних для лікування, запобігання і/або зменшенню гастрointестинального болю, за допомогою застосування моделі в даній заявці.

15 Представлений спосіб буде надавати дані про спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1 із застосуванням різних моделей. Аналіз даного параметра призведе до способу вибору агентів, ефективних для зменшення або запобігання гастрointестинальному болю.

У варіанті здійснення спосіб аналізує дію агента на активацію TRPV1 (спонтанної і/або індукованої, наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням та її запобігання за допомогою агента) і може таким чином використовуватися як зчитування передачі сигналу гастрointестинального болю, тобто чи має агент з великою ймовірністю дію на гастрointестинальний біль, наприклад, вісцеральний біль, або не має. Підвищення або відсутність вираженої дії на спонтанну або індуковану активність (наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням) TRPV1 вказує на агент, який з великою ймовірністю призведе до посилення гастрointестинального болю або відсутності вираженої дії на гастрointестинальний біль, відповідно, тоді як зменшення спонтанної і/або індукованої активності (наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням) TRPV1 вказує на агент, який зменшить гастрointестинальний біль. Таким чином, переважними агентами є агенти, які призводять до зменшення спонтанної і/або індукованої (наприклад, капсаїцином) активності TRPV1.

У іншому варіанті здійснення спосіб аналізує дію агента на активність TRPV1 за допомогою аналізу спонтанної і/або індукованої (наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням) активації брижового аферентного нерву (передачу больових сигналів) і, таким чином, може застосовуватися як зчитування гастрointестинального болю, тобто чи має агент з великою ймовірністю дію на гастрointестинальний біль, наприклад, вісцеральний біль, або не має. Підвищення або відсутність вираженої дії на активацію аферентного нерву вказує на агент, який з великою ймовірністю призведе до посилення гастрointестинального болю або відсутності вираженої дії на гастрointестинальний біль, відповідно, тоді як зменшення активації аферентного нерву вказує на агент, який зменшить гастрointестинальний біль. Таким чином, переважними агентами є агенти, які призводять до зменшення активації аферентного нерву, наприклад, зменшення спонтанної і/або індукованої частоти активації аферентних нервових пучків.

Агент, що підлягає дослідженню, додають до вибраної системи для аналізу активності TRPV1 у будь-який відповідний спосіб. З метою аналізу дії агента на передачу больового сигналу способи є зручно здійснюваними за наявності і відсутності агента. Наприклад, етап способу здійснюється до і після застосування агента. Таким чином, в даних способах дію агента порівнюють з відповідним контролем, наприклад, результати в присутності досліджуваного агента порівнюють з результатами за відсутності досліджуваного агента, наприклад, результати тільки з буферним розчином порівняно з буферним розчином плюс агент.

Автори винаходу несподівано виявили, що певні штами молочнокислих бактерій, наприклад, DSM 17938, можуть знижувати активацію TRPV1 в різних моделях *ex vivo* і *in vitro* (див. Приклад 1 і 2). Отже, в переважному варіанті здійснення агент являє собою бактеріальний штам, більш переважно молочнокислі бактерії. Таким чином, спосіб варіантів здійснення можна переважно застосовувати для дослідження низки молочнокислих бактерій з метою ідентифікації і вибору одного або більше штамів молочнокислих бактерій, які є ефективними для зменшення або запобігання гастрointестинальному болю у людини, як визначено у спосіб відносно здатності зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1.

Іншим аспектом варіантів здійснення є агент, вибраний за допомогою способу варіантів здійснення, тобто якого отримують за допомогою способу вибору.

Переважний агент являє собою мікроорганізм, більш переважно бактеріальний штам, переважно молочнокислі бактерії, включаючи їхні частини і метаболіти.

60 Інший переважний агент являє собою кондиціоноване середовище з даного мікроорганізму.

Споріднений аспект варіантів здійснення визначає агент, який отримують за допомогою способу вибору варіантів здійснення для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

У конкретному варіанті здійснення агент отримують за допомогою способу вибору варіантів здійснення, здатних зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію RPTV1 для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

У варіанті здійснення для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю буде вибраний агент, який переважно діє, щоб зменшити передачу больового сигналу, що оцінюють за допомогою динамічного спостереження за дією агента на спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1. Даний агент буде переважно діяти, щоб знизити або зменшити активацію TRPV1 в нейронах DRG або інших TRPV1-експресувальних клітинах або тканині. Переважно агент буде діяти, щоб зменшити спонтанну і/або індуковану (наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням) активність TRPV1, використовуючи різні системи або моделі in vitro, включаючи але без обмеження, первинні клітини і клітинні лінії, які експресують TRPV1-рецептор, як обговорювалося раніше.

У варіанті здійснення буде вибраний агент, який переважно діє, щоб знизити або зменшити активацію TRPV1 в брижових аферентних нервових пучках. Агент буде діяти, щоб зменшити частоту спонтанної і/або індукованої (наприклад, капсаїцином, зміною pH і/або нагріванням) активації брижових аферентних нервових пучків.

З вищезазначеного ясно, що спосіб варіантів здійснення можна також застосовувати для відбору або ідентифікації агентів, які не підходять для лікування гастроінтестинального болю, наприклад, агентів, які не мають благотворну дію на зменшення передачі больового сигналу. Зокрема, малоймовірно, що такі агенти, які не демонструють дію на даний параметр, є придатними для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю. На додаток, малоймовірно, що такі агенти, які мають дію на посилення передачі больового сигналу, як оцінено за допомогою підвищення спонтанної і/або індукованої активності TRPV1, є придатними для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю.

Додатковий аспект варіантів здійснення стосується композиції, що містить агент, вибраний за допомогою способу варіантів здійснення, і щонайменше один додатковий компонент. Таким чином, щонайменше один додатковий компонент переважно вибраний з групи, що складається з фармацевтично прийнятного носія, фармацевтично прийнятного розріджувача, фармацевтично прийнятного ексципієнта, харчового продукту, біологічно активної харчової добавки та іншого превентивного або терапевтичного агента.

Таким чином, варіант здійснення стосується композиції, яка містить агент, що отримують за допомогою способу вибору варіантів здійснення, і щонайменше один додатковий компонент, вибраний з групи, що складається з фармацевтично прийнятного носія, фармацевтично прийнятного розріджувача, фармацевтично прийнятного ексципієнта, харчового продукту, біологічно активної харчової добавки та іншого превентивного або терапевтичного агента для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Щонайменше один додатковий компонент можна вводити разом з агентом, вибраним згідно з варіантами здійснення, або можна вводити окремо. На додаток, щонайменше один додатковий компонент можна вводити одночасно з агентом, вибраним згідно з варіантами здійснення, або в різні часові точки. Кваліфікований фахівець в даній галузі може легко визначити придатні режими введення і час введення залежно від додаткового компонента, що розглядається.

У варіанті здійснення щонайменше один додатковий компонент являє собою будь-який відповідний нутритивний компонент, наприклад, харчовий продукт або біологічно активну харчову добавку.

У варіанті здійснення інший превентивний або терапевтичний агент може являти собою будь-який додатковий агент, який є придатним для запобігання або зменшення, такого як лікування, гастроінтестинального болю, що розглядається.

У іншому варіанті здійснення інший превентивний або терапевтичний агент являє собою агент, здатний впливати на шлунково-кишкову моторику і/або перемішування. Інший превентивний або терапевтичний агент тоді переважно здатний модулювати (збільшувати або зменшувати, залежно від патологічного стану, що підлягає лікуванню, як відомо в даній галузі і описано нижче) шлунково-кишкової моторики і/або перемішування.

У додатковому варіанті здійснення агент варіантів здійснення може мати подвійний вплив, тобто мати дію як на гастроінтестинальний біль, так і на шлунково-кишкову моторику і/або перемішування.

Агент, вибраний відповідно до даних варіантів здійснення з метою бути ефективним для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю, може також бути об'єктом іншого або додаткового аналізу або способу вибору з метою визначення, чи є агент додатково ефективним при модулюванні шлунково-кишкової моторики і/або перемішування. Даний агент може бути

5 цікавим для запобігання або лікування, наприклад, розладу моторики, оскільки він спрямований як на гастроінтестинальний біль, так і на зміну моторики в сукупності. Способи аналізу моторики і/або перемішування є відомими в даній галузі. Параметри, що підлягають аналізу, включають, але без обмеження, частоту MMC, швидкість MMC, внутрішньопросвітний тиск, такий як PPr, та інші функціональні моделі.

10 При аналізі моторики зміни шлунково-кишкової моторики, індуковані агентом, можна, наприклад, визначити як зміну патерну моторики або амплітуд скорочення. Деякі агенти взагалі не будуть мати дію. Агент, який може посилити шлунково-кишкову моторику, наприклад, за допомогою підвищення частоти MMC і/або швидкості MMC і/або внутрішньопросвітнього тиску, такого як PPr, з великою ймовірністю буде придатним для лікування розладів, пов'язаних з

15 гастроінтестинальним болем, при яких переважним є посилення пропульсивної моторики по травній трубці, таких як запор і коліка.

Як альтернатива, наприклад, якщо розлад кишкової моторики, що підлягає лікуванню, являє собою розлад, при якому необхідно збільшити час транзиту матеріалу по кишечнику, наприклад, розлади, які задіюють швидкий пасаж, такі як IBS або пронос, коли агент, що досліджується на

20 додаток до своєї дії на модулювання гастроінтестинального болю буде діяти з метою зменшення шлунково-кишкової моторики, наприклад, за допомогою зниження частоти MMC або швидкості MMC або внутрішньопросвітнього тиску, наприклад, PPr. Переважні агенти будуть зменшувати щонайменше швидкість MMC. Переважні агенти будуть зменшувати два або більше даних параметрів, наприклад, будуть зменшувати швидкість MMC і частоту MMC або

25 будуть зменшувати частоту MMC і внутрішньопросвітний тиск (наприклад, PPr) або будуть зменшувати швидкість MMC і внутрішньопросвітний тиск (наприклад, PPr). Найбільш переважні агенти будуть зменшувати всі дані параметри, наприклад, будуть зменшувати частоту MMC, швидкість MMC і внутрішньопросвітний тиск (наприклад, PPr). Аналіз моторики може бути оцінений на відповідному шлунково-кишковому сегменті від тонкої або товстої кишки, наприклад, сегменті порожньої кишки для тонкої кишки або сегмента ободової кишки для товстої кишки. У деяких варіантах здійснення застосування сегментів товстої кишки, наприклад, ободової кишки, є переважним.

Додатковий аспект варіантів здійснення стосується агента, вибраного за допомогою способу варіантів здійснення, або композиції, за визначенням вище, для застосування з метою

35 зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Споріднений аспект варіантів здійснення визначає застосування агента, вибраного за допомогою способу варіантів здійснення, наприклад, отриманого за допомогою способу вибору згідно з варіантами здійснення, або композиції, за визначенням вище, для виготовлення лікарського засобу, харчового продукту або біологічно активної харчової домішки для

40 зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини.

Інший споріднений аспект варіантів здійснення визначає спосіб зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у людини. Спосіб включає введення ефективної кількості агента, вибраної за допомогою способу варіантів здійснення, наприклад, отриманого за допомогою способу вибору згідно з варіантами здійснення, або композиції, за визначенням вище, людині.

45 У варіанті здійснення даних аспектів агент являє собою бактеріальний штам, переважно штам молочнокислих бактерій і більш переважно штам *Lactobacillus reuteri*, такий як бактеріальний штам, здатний зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1, переважно штам молочнокислих бактерій, здатних зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1, і більш переважно штам *Lactobacillus reuteri*, здатний зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1.

50 і/або індуковану активацію TRPV1.

У варіанті здійснення даних аспектів агент являє собою переважно *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. У іншому варіанті здійснення агент являє собою інший штам молочнокислих бактерій, тобто агент являє собою штам молочнокислих бактерій, який не є *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, переважно штам *Lactobacillus reuteri*, який не є *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

55 У варіанті здійснення даних аспектів агент являє собою кондиціоноване середовище з бактеріального штаму, переважно зі штаму молочнокислих бактерій, і більш переважно їхнього штаму *Lactobacillus reuteri*, таке як кондиціоноване середовище з бактеріального штаму, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1, переважно зі штаму молочнокислих бактерій, здатних зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1, і

більш переважно зі штаму *Lactobacillus reuteri*, здатного зменшувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1.

У варіанті здійснення агент являє собою кондиціоноване середовище від штаму молочнокислих бактерій, переважно з *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 або штаму *Lactobacillus reuteri*, який не є *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Середовище, що застосовується для даного кондиціонованого середовища, може являти собою будь-яке середовище, відповідне для культивування штаму молочнокислих бактерій, відому в даній галузі. У варіанті здійснення середовище MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) застосовують як вихідний матеріал для виготовлення кондиціонованого середовища зі штаму молочнокислих бактерій, переважно з *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. У варіанті здійснення винаходу кондиціоноване середовище зі штаму молочнокислих бактерій, переважно з *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, ліофілізують перед введенням або застосуванням у вигляді композиції.

У іншому варіанті здійснення один або декілька компонентів кондиціонованого середовища зі штаму молочнокислих бактерій, переважно з *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, виділяють і вводять хворому у вигляді очищених і/або збагачених компонентів в формі відповідної композиції. Приклади даних компонентів включають білки, пептиди, ферменти та інші молекули, що переважно виділяються штамом молочнокислих бактерій в середовище. Також дані компоненти, виділені безпосередньо зі штаму молочнокислих бактерій, можна застосовувати згідно з варіантами здійснення.

Відповідний спосіб введення і лікарську форму агента або композиції вибирають залежно від локалізації захворювання. Переважним способом введення є пероральний, проте, в рівній мірі для деяких видів лікування будуть придатні внутрішньовенна або внутрішньом'язова ін'єкція.

Відповідні дози агента або композиції можуть бути легко вибрані або визначені кваліфікованим фахівцем в даній галузі залежно від розладу, що підлягає лікуванню, способу введення і передбачуваної лікарської форми.

У одному варіанті здійснення TRPV1-рецептор модулюють локально, наприклад, за допомогою застосування перорально молочнокислих бактерій, що вводяться, які можуть селективно модулювати активацію TRPV1 в ШКТ, у людини, яка страждає від гастроінтестинального болю, і таким чином мінімізуючи будь-які несприятливі ефекти у зазначеного хворого. Можна вважати, що даний переважний шлях введення агента, зокрема штаму молочнокислих бактерій, вибраного за допомогою способу варіантів здійснення, буде головним чином локально впливати на активацію TRPV1, тобто в межах шлунково-кишкового тракту. Таким чином, тоді агент буде мати благотворну дію з метою запобігання або зменшення гастроінтестинального болю, мінімізуючи при цьому будь-яке небажане модулювання TRPV1 за межами шлунково-кишкового тракту.

У способах і застосуваннях даних варіантів здійснення, описаних в даній заявці, терміни "підвищувати", "зменшувати", "знижувати" тощо стосуються вимірюваної зміни рівнів, переважно значної зміни рівнів, більш переважно статистично значущої зміни, переважно зі значенням ймовірності $\leq 0,05$.

Переважними хворими є ссавці, більш переважно люди.

Там, де розлад кишкової моторики, пов'язаний з гастроінтестинальним болем, що підлягає лікуванню, являє собою запор, тоді переважними хворими є пацієнти похилого віку або вагітні жінки. Під пацієнтом похилого віку зазвичай слід розуміти пацієнта у віці 70 років або старше.

Там, де розлад кишкової моторики, пов'язаний з гастроінтестинальним болем, що підлягає лікуванню, являє собою коліку, переважно це буде коліка немовляти.

Застосування агентів, переважно штамів молочнокислих бактерій, вибраних відповідно до способу варіантів здійснення, включає зменшення, запобігання або полегшення розладу, що розглядається, або симптомів розладу (наприклад, може призвести до модулювання симптомів захворювання). Дане зменшення, запобігання або полегшення розладу або його симптомів можна виміряти за допомогою будь-якого відповідного аналізу.

Метою варіанту здійснення є пошук агентів, таких як молочнокислі бактерії, включаючи їхні частини і метаболіти, такі як присутні або виділені з кондиціонованого середовища, придатні для лікування, зменшення, запобігання або модулювання гастроінтестинального болю, наприклад, при специфічних розладах моторики і/або інших гастроінтестинальних больових розладах/захворюваннях, за допомогою застосування моделі в даній заявці, ґрунтуючись на дії агента на спонтанну і/або індуковану активність TRPV1.

У варіанті здійснення метою є підбір бактеріального пробіотичного штаму, такого як штам молочнокислих бактерій, який може бути ефективним для запобігання або зменшення

гастроінтестинального болю, пов'язаного із запором, у людей, особливо хворих похилого віку або вагітних жінок.

У варіанті здійснення метою є підбір агента, наприклад, штам молочнокислих бактерій, який може бути ефективним для запобігання або зменшення гастроінтестинального болю, пов'язаного з кількою немовляти.

У варіанті здійснення метою є підбір агента, наприклад, штаму молочнокислих бактерій, який може бути ефективним для запобігання або зменшення симптомів гастроінтестинального болю, пов'язаного із синдромом подразненої кишки (IBS).

Представлені наступні приклади варіантів здійснення, які не мають на увазі обмеження застосуванням варіантів здійснення в даній заявці, але детально показують практичні приклади, як можна застосовувати винахід. Приклад 1 стосується експерименту на брижовому нервовому пучку, який показує, що DSM 17938 пригнічує частоту активації брижового нерву. Приклад 2 показує, що DSM 17938 блокує індуковане капсаїцином надходження кальцію у первинні культури DRG. Приклад 3 демонструє, що DSM 17938 пригнічує сповільнення частоти серцевих скорочень, викликане розтягненням шлунку.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

Експерименти на брижовому нервовому пучку

Позаклітинна реєстрація даних

Дорослі самці швейцарських мишей Вебстер (20-30 г) були закуплені у Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Мишей умертвили за допомогою цервікальної дислокації. Всі подальші процедури проходили ex vivo.

Сегменти дистальної частини порожньої кишки (~2,5 см) з прикріпленою брижовою тканиною витягували з щойно убитих тварин і вміщували в чашку Петрі, покриту Силгардом, заповнену буфером Кребса (в мМ): 118 NaCl, 4,8 KCl, 25 NaHCO₃, 1,0 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 11,1 глюкози і 2,5 CaCl₂, спіненим карбогеном (95 % O₂ - 5 % CO₂). Проксимальний і дистальний кінці кожного сегмента канюлювали пластмасовими трубками і спорожнювали. Тканину приколювали до Силгарду і виділяли брижовий нервовий пучок. Чашку Петрі вміщували на столик інвертованого мікроскопу, і через просвіт самопливом при 0,5-1 мл/хв. пропускали оксигенований розчин Кребса або розчин Кребса з додатковими компонентами (Perez-Burgos A., Wang B et al., American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). Через серозний компартмент окремо пропускали струмінь попередньо нагрітого (34 °C) розчину Кребса при 3-5 мл/хв. Нервовий пучок обережно втягували в скляну піпетку, прикріплену до держателя електроду патч-клемп (CV-7B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), і проводили позаклітинну реєстрацію даних нерву із застосуванням підсилювача Multi-Clamp 700B і перетворювач сигналу Digidata 1440A (Molecular Devices). Електричні сигнали фільтрували за допомогою смугово-пропускних фільтрів при 0,1-2 кГц, дискретизували при 20 кГц і зберігали в персональному комп'ютері, задіюючи програмне забезпечення pClamp 10 (Molecular Devices). Повторювані розтягнення сегментів здійснювали за допомогою наростаючого внутрішньопросвітнього тиску вище 2 гПа. До розчину Кребса, що протікає по просвіту, застосовували механізм з постійним гравітаційним тиском, який дорівнює 48 гПа, і тиск підвищували за допомогою закриття відповідної трубки протягом 1 хв. до максимум 3 розтягнень, що йдуть одне за одним. Сегменти залишали в спокої протягом 9 хв. між розтягненнями. Конститутивну електричну активність множинних нейронів реєстрували за відсутності позитивного внутрішньопросвітнього тиску.

Ваготомія

Піддіафрагмальну ваготомію проводили, як описано раніше (van der Kleij H, O'Mahony 3 et al. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 2008;295:R1131-7). Тваринам дозволяли відновитися протягом 10-14 днів перед взяттям порожньої кишки і брижової тканини для електрофізіологічних експериментів. Хибні ваготомії виконали 3 тваринам. Після операції щодня вимірювали масу тіла і загальний стан здоров'я мишей. Автори винаходу не виявили очевидних ознак виражених відмінностей в наборі маси через 1 тиждень після операції ані у ваготомованих, ані у хибнооперованих тварин (дані не показані). Всіх ваготомованих мишей досліджували на повноту виконання процедури за допомогою реєстрації після кожного експерименту відповідей на нанесення холецистокініну (ССК) на серозну оболонку. Ваготомію вважали ефективною, тільки якщо ССК не підвищував частоту активації брижового нерву (Perez-Burgos A., Wang B et al., American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20).

Лікарські препарати і бактерії

DSM 17938 були безоплатно надані BioGaia AB (Stockholm, Sweden), тоді як *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 були взяті з запасів Brian-Body Institute McMaster University (Ontario, Canada). Всі процедури були такими, як описано раніше (Kunze WA, Mao YK et al., *Journal of cellular and molecular medicine* 2009;13:2261-70, Ma X, Mao YK et al., *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2009;296:G868-75, Wang B, Mao YK, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010;24:4078-88). Кількість бактерій визначали візуально, а життєздатність перевіряли після посіву в чашки з поживним агаровим середовищем. Бактерії із заморожених запасів піддавали відтаванню, центрифугували при 2000 об/хв. протягом 15 хв. і осад суспендували в розчині Кребса і знову центрифугували і ресуспендували. Перед застосуванням бактерії розбавляли до робочих концентрацій розчином Кребса. Сульфатований холецистокінін (25-33) (ССК) був отриманий від AnaSpec (Fremont, CA); нікардипін, капсаїцин і 6-йодонордигідрокапсаїцин від Sigma-Aldrich і ω -конотоксин GVIA (ω -Cg-GVIA) і ω -конотоксин MVIIIC (ω -Cg-MVIIIC) від Alomone Labs (Jerusalem, Israel). 6-йодонордигідрокапсаїцин і ССК розчиняли в DMSO; капсаїцин розчиняли в етанолі, щоб зробити аліквоти базового розчину. В день експерименту аліквоти розбавляли розчином Кребса до робочих концентрацій з підсумковими концентраціями DMSO і етанолу, що становлять $\leq 0,01\%$ і $\leq 0,1\%$, відповідно.

Аналіз даних в автономному режимі

Частоти спонтанної активації множинних і одиночних нейронів вимірювали, застосовуючи програмне забезпечення Clampfit 10.2 (Molecular Devices) і Origin 8.5 (Northampton, MA).

Реєстрацію спайків множинних і одиночних нейронів в повсякденній практиці застосовували, щоб визначити зміни частот активації волокон брижового нерву, індуковані впливом на кишку різних стимулів або фармакологічних агентів (Perez-Burgos A., Wang B et al., *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2013;304:G211-20). Розрахунок часу спайків при реєстрації множинних нейронів визначали, використовуючи модуль виявлення піка від Clampfit, а середню частоту активації розраховували, виходячи з інтервалів між спайками. З сигналу множинних нейронів виділили одиночні нейрони за допомогою збігу форми спайків, використовуючи інструмент виявлення моделі форми спайків від Clampfit (комп'ютеризований аналіз форми хвилі). Після проходження алгоритму виявлення моделі розпізнавання спайків одиночних нейронів завжди перевіряли за допомогою візуального огляду і відбраковували випадки незбіжних спайків ($< 0,2\%$) (Perez-Burgos A., Wang B et al., *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2013;304:G211-20).

Статистичні дані

Дані виражали у вигляді середніх \pm СО, причому N стосується загальної кількості сегментів порожньої кишки, з яких проводилася реєстрація, а n стосується показника активності одиничних волокон, виділеному з реєстрації даних множинних нейронів. Автори винаходу максимально виділили 6 одиночних нейронів з кожної реєстрації даних множинних нейронів. Для порівняння парних або непарних даних застосовували критерій Вілкоксона або критерій Ст'юдента для однієї вибірки, відповідно; для порівняння безлічі груп застосовували однофакторний і двофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорним критерієм Бонферроні, відповідно. Оскільки між одним препаратом та іншим в нейронній активності множинних нейронів можуть існувати великі відхилення спонтанної активності, порівняння були парними, при цьому проводили реєстрацію даних до і після лікування, коли кожний нервовий пучок слугував як свій власний контроль для достовірності істотних змін кожної обробки або лікарської дози. Відсоткове значення підвищення активації вище вихідної частоти залежно від концентрації капсаїцину (за наявності або відсутності бактерій) наносили на графік, і його доповнювали логістичним рівнянням доза-ефект $[Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\text{LogEC}_{50} - X})]$. Параметри, які описують логістичну підгонку, порівнювали, використовуючи F-критерій за додатковою сумою квадратів. Всі статистичні тести проводили, використовуючи програмне забезпечення Prism 5.0 (програмне забезпечення GraphPad, San Diego, CA).

Дія DSM 17938 на спонтанну частоту активації брижового нерву

Порожнинний DSM 17938 впливав на спонтанний розряд множинних нейронів брижового нерву (Perez-Burgos A., Wang B et al., *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2013;304:G211-20). 1×10^9 КУО/мл внутрішньопросвітного DSM 17938 викликав зменшення спонтанної частоти активації множинних нейронів на 22 % від $36,3 \pm 8,4$ до $28,2 \pm 7,2$ Гц (N=7, P=0,02, Фігура 1A); DSM 17938 при 1×10^8 КУО/мл змінював спонтанний розряд на 19 % від $21,6 \pm 5,1$ до $17,6 \pm 6$ Гц, N=6, P=0,09, Фігура 1B). Кондиціоноване середовище DSM DSM 17938 (1:5) також зменшувало спонтанний розряд на 37 % від $22,6 \pm 4,2$ до $14,17 \pm 2,4$ Гц (N=7, P=0,03, Фігура 1C). Проте вбитий γ -випромінюванням DSM 17938 або один лише бульйон не

знижував аферентну збудливість: з $17,84 \pm 5,3$ до $18,25 \pm 4,1$ Гц ($N=6$, $P=0,84$), і з $20,48 \pm 1,6$ до $21,49 \pm 2,8$ Гц ($N=6$, $P=0,10$) відповідно (Фігури 1D-E).

Ваготомія і м'язовий параліч не пригнічують зменшення за допомогою DSM 17938 спонтанної активації брижового нерву

5 Автори винаходу дослідили, чи була дія DSM 17938 1×10^9 КУО/мл на спонтанний розряд нейтралізована попередньої ваготомією. Для того, щоб контролювати можливу безпосередню дію DSM 17938 на гладком'язові клітини, автори винаходу додали сюди і у всі подальші експерименти зі спонтанної активації блокатор Ca^{2+} каналів L-типу нікардипін (3 мкМ), який пригнічує м'язові скорочення. Таким чином, після ваготомії та додавання нікардипіну DSM 17938
10 зменшував частоту активації множинних нейронів на 18 % з $16,72 \pm 1,9$ до $13,77 \pm 1,9$ Гц ($N=17$, $P=0,001$, Фігура 2A, 2C). Потім дані від ваготомованих тварин і паралізованих м'язів аналізували відносно частоти активації одиночних нейронів. DSM 17938 зменшував частоту активації одиночних нейронів на 19 % з $0,36 \pm 0,05$ до $0,29 \pm 0,03$ Гц ($N=30$, $P=0,02$, Фігура 2B, 2C); в даних волокнах більшість (20/30) продемонструвала зменшення частоти на 36 % з $0,42 \pm 0,06$ до
15 $0,27 \pm 0,04$ Гц ($P<0,0001$), але менша фракція волокон, що залишилися, підвищувала свою частоту активації на 29 % з $0,24 \pm 0,04$ до $0,31 \pm 0,06$ Гц ($N=10/30$, $P=0,006$).

DSM 17938 знижував частоту активації спинномозкових одиночних нейронів і відповідь на капсаїцин за допомогою неконкурентного часткового антагонізму TRPV1-рецепторів

Автори винаходу дослідили, чи може DSM 17938 модифікувати індуковане капсаїцином
20 збільшення частоти активації збудження одиночних нейронів в тканині, взятій у попередньо ваготомованих мишей. Капсаїцин, нанесений на серозний компартмент, підвищував спонтанну частоту активації множинних і одиночних нейронів, з початком латентних періодів, що становлять ~60 с, і дозозалежним чином. Враховуючи, що чутливі до капсаїцину TRPV1-рецептори втрачають чутливість, і що подальше застосування агоніста може викликати
25 зменшену дію, автори винаходу вивчили відповіді на діапазон доз капсаїцину (100 нМ-100 мкМ) в окремих сегментах порожньої кишки. Автори винаходу зробили це з 20-хвилинним попереднім внутрішньопросвітним введенням DSM 17938 1×10^9 КУО/мл і без нього ($N=25$ для кожної кривої, 5 сегментів на кожну концентрацію; для кожного сегмента проаналізовані ~6 спинномозкових одиночних нейронів). Відсоток підвищення частоти активації залежно від концентрації капсаїцину або концентрації капсаїцину плюс DSM 17938 були нанесені на графік і супроводжувалися трипараметричним логістичним рівнянням форми $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\text{LogEC}_{50} - X})$. EC₅₀ для одного капсаїцину становила 200 нМ порівняно з 500 нМ для капсаїцину в присутності DSM 17938 ($P=0,71$). Максимальна відповідь (Top), отримана з капсаїцином, становила $238,4 \pm 27,5$ % vs. 129 ± 17 %, отриманого з капсаїцином плюс DSM 17938
30 ($P=0,004$, Фігура 3A). Узгоджуючись з попередніми повідомленнями, деякі спинномозкові волокна не збуджувалися капсаїцином. Автори винаходу перевірили, чи може капсаїцин безпосередньо збуджувати спинномозкові волокна, або чи залежить збудження від інтрамуральної синаптичної передачі від ентєральних нейронів до внутрішньогангліонарних спинномозкових закінчень. Автори винаходу додали 1 мкМ капсаїцину на серозний компартмент після блокування інтрамуральної синаптичної передачі за допомогою додавання 500 нМ кожного з Ca^{2+} блокаторів $\omega\text{-Cg-GVIA}$ і $\omega\text{-Cg-MV1IC}$. Інтрамуральний синаптичний блок не зменшував індуковане капсаїцином збудження, яке становило $187,5 \pm 42,9$ % ($N=17$) при відсутності конотоксинів і $219,1 \pm 72,6$ ($N=12$) в їхній присутності ($P=0,947$, Фігура 3B). Автори винаходу дійшли висновку, що дія DSM 17938 на спинномозкові аференти не впливає на
40 інтрамуральну синаптичну передачу.)

Дія кондиціонованого середовища DSM 17938, що містить продукти вивільнення бактерій DSM 17938, зменшує дію капсаїцину на спинномозкові волокна

Автори винаходу досліджували на брижових аферентах, чи лежать в основі антагонізму до TRPV1 бактеріальні продукти DSM 17938. Мішенню DSM 17938 в брижових аферентах були переважно спинномозкові волокна, враховуючи, що відсоток індукованого DSM 17938 зменшення спонтанної частоти активації був доволі схожий з попередньої ваготомією і без неї (18 % і 22 %, відповідно); потім автори винаходу ввели 1 мкМ капсаїцину в неваготомовані брижові волокна, які отримали попереднє внутрішньопросвітне введення кондиціонованого середовища DSM 17938 протягом 20 хв. Кондиціоноване середовище DSM 17938 (1:5)
55 сповільнювало підвищення індукованої капсаїцином частоти активації (%) на одиночних брижових волокнах з $187,5 \pm 43$ % (контрольна група, $N=17$) до $74,89 \pm 22$ % ($N=14$) і була схожа з відсотком підвищення індукованої капсаїцином на спинномозкових волокнах з 1×10^9 КУО/мл DSM 17938 лікування ($80,29 \pm 22$ %, $N=17$) ($P=0,02$, однофакторний дисперсійний аналіз; Фігура 7).

Антагонізм DSM 17938 або TRPV1 зменшував індуковану розтягненням активацію

У відсутності нікардипіну для забезпечення м'язового скорочення автори винаходу зареєстрували частоту активації множинних і одиночних нейронів волокон, які ймовірно є ноцицепторами (Grundy D, Gut 2004;53 Suppl 2:ii5-8). Автори винаходу досліджували, чи може DSM 17938 зменшувати їхню збудливу відповідь, спровоковану зростаючим внутрішньопросвітним тиском до ноцицептивної інтенсивності, яка становить 48 гПа (36 мм рт. ст.) (Perez-Burgos A., Wang B et al., American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). Перша відповідь даних волокон на розтягнення кишки є загалом вищою, ніж отримана з подальшим розтягненням, але залишається постійною аж до 3 додаткового розтягнення (Perez-Burgos A., Wang B et al., American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). Автори винаходу таким чином використали 2^о з 3 розтягнень, які йдуть один за одним, для порівняння. Активация множинних нейронів становила 111,5±16,7 Гц під час розтягнення, але після додавання DSM 17938 протягом 20 хв. розтягнення посилило активацію лише до 86,5±10,6 Гц (N=5, P=0,31). Частота активації спинномозкових одиночних нейронів становила 3,01±0,44 Гц під час розтягнення, але в присутності DSM 17938 активація становила 1,71±0,16 під час розтягнення (N=28, P=0,008, Фігура 4A). Частота активації перед розтягненням становила 0,31±0,05 для контролю і 0,25±0,07 Гц для додавання DSM 17938 (N=28, P=0,053, Фігура 4A). Антагоніст TRPV1 6-йодонордигідрокапсаїцин (10 мкМ) імітує дію DSM 17938 на відповідь одиночних нейронів за допомогою зменшення відповіді на розтягнення з 3,26±0,73 до 2,23±0,50 Гц (N=13, P=0,0002, Критерій Вілкоксона, Фігура 4B за відсутності нікардипіну).

ПРИКЛАД 2

DSM 17938 блокує індуковане капсаїцином збільшення Ca²⁺ в первинних культурах нейронів DRG

Первинні культури спинномозкових гангліїв (DRG)

Хребетний стовп відокремили від тіла, перенесли в лабораторну склянку, що містить крижаний розчин Кребса, і подовжньо розітнули. DRG виділили і зібрали від грудиннопоперекових рівнів. Цілі DRG двічі промили середовищем Лейбовіца L-15 (GIBCO, Gaithersburg, MD) та інкубували протягом 40 хв. в колагеназі 1 типу при 1 мг/мл (Sigma-Aldrich; Oakville, ON, Canada) і 0,5 мл трипсину (0,25 %, GIBCO) в 20 мл L-15 при 37 °C. Після додаткового додавання 5 мл L-15, що містить 10 % фетальну бичачу сироватку (FBS, GIBCO), ганглії центрифугували протягом 5 хв. при 1000 об/хв., потім двічі промивали поживним середовищем (L-15, що містить 10 % FBS, 1 % пеніциліну/стрептоміцину/глутаміну, 1 % HEPES і 1 % пірувата Na). DRG вміщували в 2 мл поживного середовища і 10 разів розтирали. Потім ганглії центрифугували протягом 10 с при 500 об/хв., а супернатант переносили до стерильної пробірки. Їх ресуспендували в 2 мл поживного середовища, повторно розтирали доти, доки об'єм перенесеного супернатанту не становив 10 мл, центрифугували протягом 5 хв. при 1000 об/хв., і підсумковий осад ресуспендували в 3 мл поживного середовища. Нейрони наносили на 3 чашки Петрі зі скляним дном, покритим полі-d-лізином (MatTek, Ashland, MA). Через 30 хв. у кожную чашку додатково додавали 1,5 мл поживного середовища і цілком інкубували протягом 24 год. при 37 °C з карбогеном.

Візуалізація Ca²⁺

Нейрони DRG помістили в плексигласову чашку для реєстрації і завантажили індикатор Ca²⁺ Fluo-4-AM (8 мкМ), розбавлений в розчині Кребса з 0,1 % плуороніловою кислотою (в DMSO) при 37 °C протягом 60 хв. Чашку вміщували у відділення для реєстрації і заливали свіжим розчином Кребса (~34 °C) на 15 хв., щоб вимити барвник. Клітини розглядали в інвертованому мікроскопі (Nikon eclipse TE 2000-S, Melville, NY) і отримували зображення, використовуючи камеру Rolera-XR (Surrey, BC, Canada). Інтенсивність флуоресценції в окремих нейронах реєстрували за допомогою програмного забезпечення Simple PCI 6 (Compix Inc, Imaging systems, Sewickley, PA). Лікарські препарати доставляли за допомогою мікропіпетки, прикріпленої до імпульсного розпилювача з електронним регулюванням тиску (Picospritzer II; General Valve, Fairfield, NJ) з кінчиком <100 мкМ з клітини. Зображення, зареєстровані при 0,9 кадрів/с, зберігали на локальному жорсткому диску. Файли зображень аналізували в автономному режимі, використовуючи програмне забезпечення Image J (NIH, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Збільшення Fluo-4 Ca²⁺ при введенні капсаїцину вимірювали у вигляді співвідношення (F/F₀) інтенсивності флуоресценції після капсаїцину (F), поділену на інтенсивність до капсаїцину (F₀). Бактеріями і лікарськими препаратами маніпулювали, як в Прикладі 1.

Результати

Специфічність дії DSM 17938 на спинномозкові нейрони додатково досліджували шляхом дослідження здатності бактерій пригнічувати відповідь TRPV1-рецептора на капсаїцин. У дані

експерименти також включили JB-1. JB-1 (*Lactobacillus rhamnosus*), як раніше було продемонстровано, зменшує біль і активуючий розряд одиночних волокон DRG, індуковані розтягненням шлунку (Duncker et al., The Journal of Nutrition 2011). Оскільки відкриття TRPV1-каналів підвищує концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} , автори винаходу використали візуалізацію Ca^{2+} первинної культури нейронів DRG для даних експериментів. Розпилення 1 мкМ капсаїцину на нейрони DRG викликало підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} протягом ~30 с (Фігура 5A). Оскільки у TRPV1-каналу може зменшуватися чутливість з повторним впливом ліганду, автори винаходу лише одноразово вводили капсаїцин у кожен чашку для культивування. Потім за 30 хв. перед введенням капсаїцину автори винаходу додали або DSM 17938, або JB-1. DSM 17938 при 1×10^9 КУО/мл знижував коефіцієнт зростання флуоресценції з $2,36 \pm 0,31$ контрольна група, $N=14$) до $1,25 \pm 0,04 F/F_0$. Але 1×10^8 КУО/мл DSM 17938 змінило F/F_0 до $2,67 \pm 0,35$, а $1 \times 10^{8.5}$ КУО/мл DSM 17938 до $2,07 \pm 0,27$. Додавання 1×10^9 КУО/мл JB-1 мало невелику дію і змінило співвідношення F/F_0 до $2,48 \pm 0,19$ ($N=9$), яке є схожим зі співвідношенням, отриманим з одним капсаїцином (Фігура 5B). Дані результати демонструють, що DSM 17938 може блокувати підвищення Ca^{2+} , індуковане капсаїцином, в первинних культурах нейронів DRG.

ПРИКЛАД 3

DSM 17938 пригнічує сповільнення частоти серцевих скорочень, викликане розтягненням шлунку

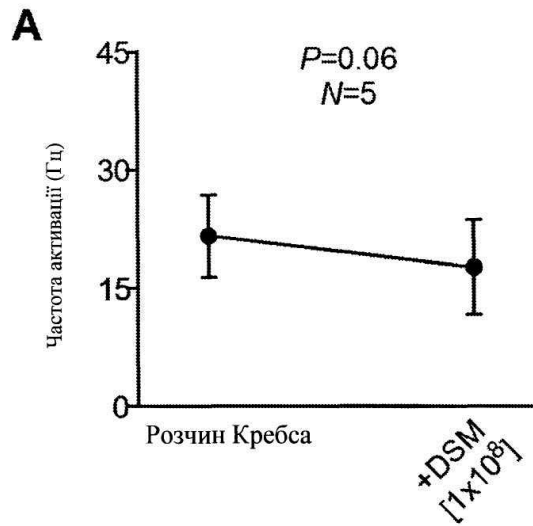
Загалом 17 щурів поділили на 2 групи. Після прибуття щурам давали акліматизуватися протягом 1 тижня з подальшою обробкою протягом 1 тижня (10 хв./доб.) для мінімізації дії стресу під час експериментів. Щурів годували через шлунковий зонд протягом 9 днів або з 0,2 мл (1×10^9 КУО/мл) живого DSM 17938 в розчині Кребса, або тільки розчином Кребса як контроль (носії). Способи розтягнення шлунку опубліковані раніше (Tougas, Wang, American Journal of Physiology 1999;277:R272-8). Коротко, щури голодували протягом ночі, були інтраперитонеально анестезовані сумішшю кетаміну гідрохлориду (75 мг/кг маси тіла) і ксилазину (10 мг/кг маси тіла). За необхідністю давали підтримуючу анестезію. Після середньої лапаротомії пристрій для розтягнення, що складається з кулястого шлункового балону (внутрішній діаметр 2 см), прикріпленого до тефлонового катетера (20 см), вставляли у шлунок через маленький розріз в проксимальній частині дванадцятипалої кишки і з'єднували з системою баростат (Distender, G&J Electronic, Toronto, Canada). Відповідь серця вимірювали, роздуваючи при цьому балон повітрям до тиску, що становить 40 і 60 мм рт. ст. протягом 60 м. Для відновлення після кожного розтягнення давали десять хвилин відпочинку. З метою уникнення можливих компенсаторних механізмів кожному щуру наносили тільки одну серію розтягнень, і після вимірювання щурів умертвляли до повернення до тями. Безперервну реєстрацію частоти серцевих скорочень виконували за допомогою електрокардіограми з поверхні тіла, що складається з 3 голчастих електродів, накладених на ліву і праву передні кінцівки і праву задню кінцівку. Сигнал посилювали і реєстрували на персональному комп'ютері, використовуючи комерційну програму збору даних (Experimenter's Workbench, DataWave Technologies, Loveland, CO). Частоту серцевих скорочень вимірювали протягом 60 с до, під час і після кожного розтягнення лише протягом 180 с. Реєстрація частоти серцевих скорочень (HR) перед кожним розтягненням дозволяла коректувати можливі вихідні зміни внаслідок відмінностей в рівнях анестезії і забезпечувала, що відповідь будь-якої частоти серцевих скорочень може бути пов'язана з розтягненням. Для контролю дії розтягнення шлунку протягом часу дані були представлені у вигляді середньої зміни від HR в спокої (100 %=спокой), використовуючи середню HR, зареєстровану в період 10 с під час розтягнення (10, 20, 30, 40, 50, і 60 с). Групи порівнювали, використовуючи середні зміни HR (відсоток HR в спокої) у всіх щурів тієї самої групи протягом 60 с кожного розтягнення (40 і 60 мм рт. ст.). Бактеріями і лікарськими препаратами маніпулювали, як в Прикладі 1.

Результати

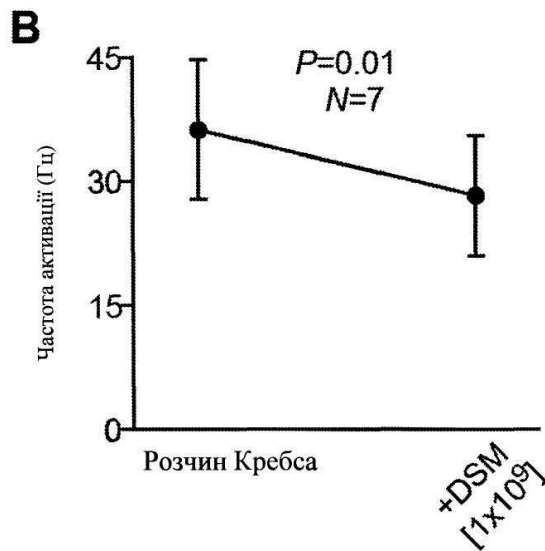
Зменшення частоти серцевих скорочень, викликане 40 мм рт. ст., введення DSM 17938 через шлунковий зонд не змінювало ($P=0,121$, Фігура 6A) ($N=8$ і 9 з носієм і DSM 17938, відповідно). Роздування до 60 мм рт. ст. знижувало частоту серцевих скорочень протягом 10 с, яке зберігалось протягом 30 с під час розтягнення (Фігура 6B). Введення DSM 17938 через шлунковий зонд протягом 9 дн. до дослідження пом'якшувало відповідь на 60 мм рт. ст. ($P=0,028$, критерій Ст'юдента для однієї вибірки, Фігура 6A, 6B). Податливість шлунку (об'єм/тиск) не відрізнялася у тварин, оброблених носієм і DSM 17938, для тиску розтягнення шлунку, що становить 40 або 60 мм рт. ст. (дані не показані). Дані результати демонструють антиноцицептивну дію бактерій.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

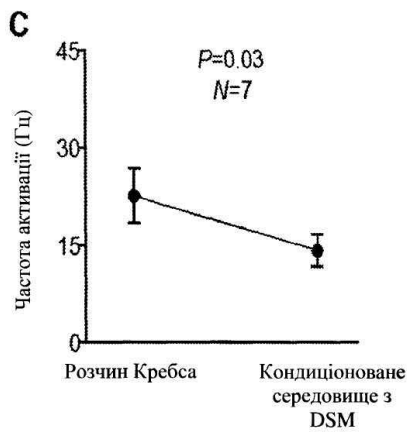
1. Спосіб вибору бактеріального штаму роду *Lactobacillus* для застосування з метою зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю у суб'єкта, де зазначений спосіб включає:
 - 5 контактування клітини, яка експресує TRPV1, зі штамом бактерій *Lactobacillus* або кондиціонованим середовищем із зазначеного штаму бактерій, який підлягає дослідженню; вимірювання спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 у зазначеній клітині після контактування зазначеної клітини із зазначеним штамом бактерій або зазначеним кондиціонованим середовищем із зазначеного штаму бактерій, який підлягає дослідженню; і
 - 10 порівняння зазначеної вимірної спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 з контрольною активацією TRPV1, при цьому вибір зазначеного штаму бактерій або зазначеного кондиціонованого середовища із зазначеного штаму бактерій включає вибір зазначеного штаму бактерій або зазначеного кондиціонованого середовища із зазначеного штаму бактерій, який підлягає дослідженню, як штаму молочнокислих бактерій або кондиціоноване середовище із
 - 15 зазначеного штаму молочнокислих бактерій, ефективного для зменшення або запобігання гастроінтестинальному болю, якщо зазначена виміряна спонтанна і/або індукована активація TRPV1 нижча зазначеної контрольної активації TRPV1.
2. Спосіб за п. 1, в якому вимірювання зазначеної спонтанної і/або індукованої активації TRPV1 включає вимірювання надходження Ca^{2+} у зазначеній клітині, індукованого капсаїцином, зміною
 - 20 рН і/або нагріванням.
3. Спосіб за п. 1, який додатково включає:
 - контактування *ex vivo* шлунково-кишкового сегмента з прикріпленою брижовою тканиною зі штамом молочнокислих бактерій або кондиціонованим середовищем із зазначеного штаму молочнокислих бактерій, який підлягає дослідженню;
 - 25 вимірювання спонтанної і/або індукованої активації брижових аферентів у зазначеному *ex vivo* шлунково-кишковому сегменті після контактування зазначеного *ex vivo* шлунково-кишкового сегмента із зазначеним штамом бактерій або зазначеним кондиціонованим середовищем із зазначеного штаму бактерій, який підлягає дослідженню; і
 - 30 порівняння зазначеної спонтанної і/або індукованої вимірної активації брижових аферентів з контрольною активацією брижових аферентів, при якому вибір зазначеного штаму бактерій або зазначеного кондиціонованого середовища із зазначеного штаму бактерій включає вибір зазначеного штаму бактерій або зазначеного кондиціонованого середовища із зазначеного штаму бактерій, який підлягає дослідженню, як зазначений штам бактерій або зазначене кондиціоноване середовище із зазначеного штаму бактерій, ефективного для зменшення або
 - 35 запобігання гастроінтестинальному болю, якщо зазначена виміряна спонтанна і/або індукована активація брижових аферентів нижча зазначеної контрольної активації брижових аферентів.
4. Спосіб за п. 1, в якому зазначений штам бактерій *Lactobacillus* являє собою штам *Lactobacillus reuteri*, здатний знижувати спонтанну і/або індуковану активацію TRPV1.
5. Спосіб за п. 4, в якому зазначений штам *Lactobacillus reuteri* являє собою штам *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
- 40 6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому зазначений суб'єкт страждає на порушення моторики кишечника, яке викликало зазначений гастроінтестинальний біль у зазначеного суб'єкта.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому зазначений суб'єкт страждає на захворювання, вибране з групи, яка складається з колік, синдрому подразненої кишки і запору, який викликає
- 45 зазначений гастроінтестинальний біль у зазначеного суб'єкта.



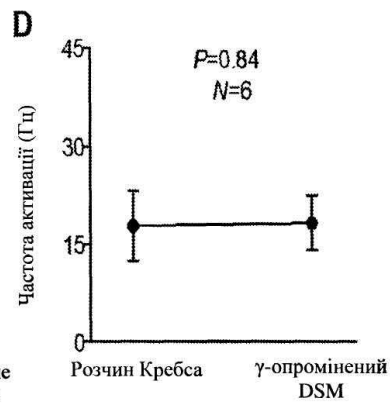
Фіг. 1А



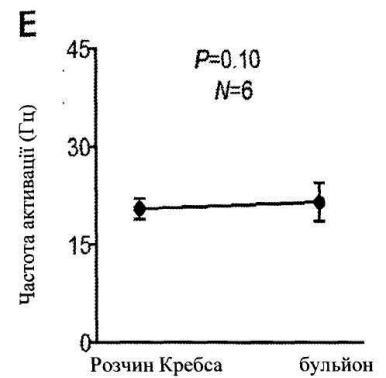
Фіг. 1В



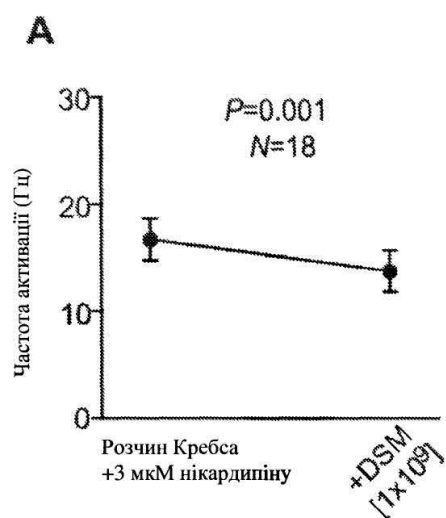
Фіг. 1С



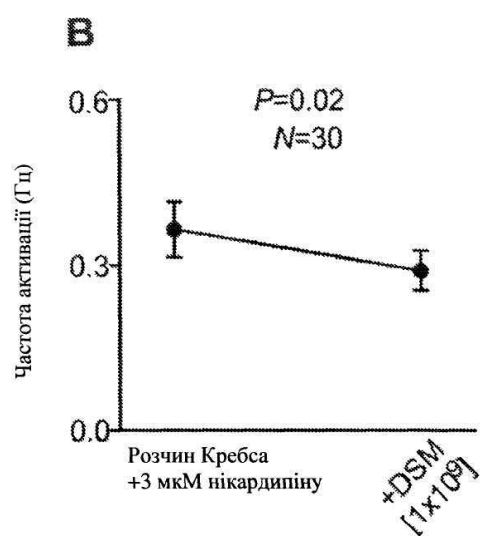
Фіг. 1D



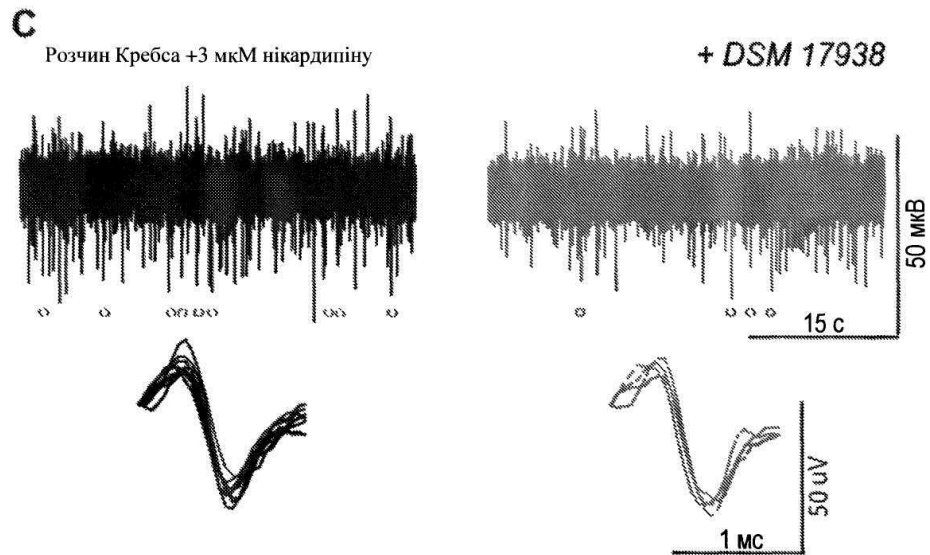
Фіг. 1Е



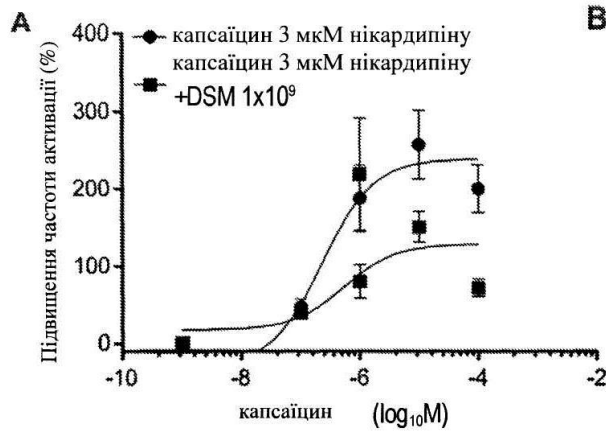
Фіг. 2А



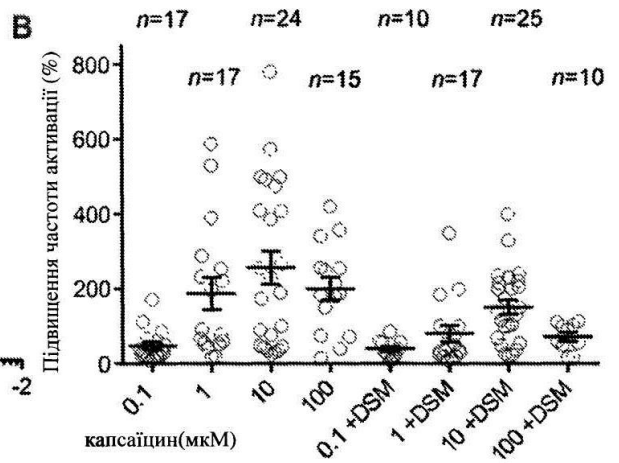
Фіг. 2В



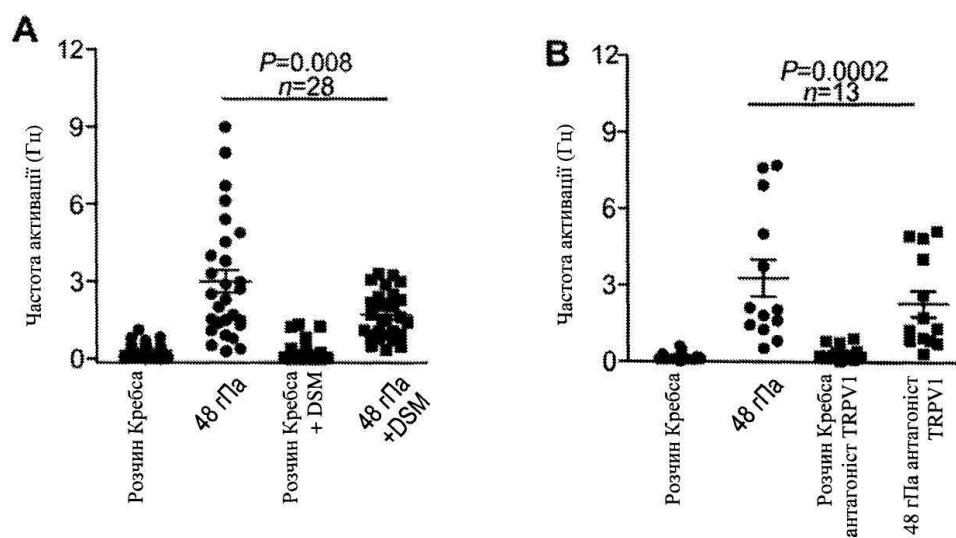
Фіг. 2С



Фіг. 3А

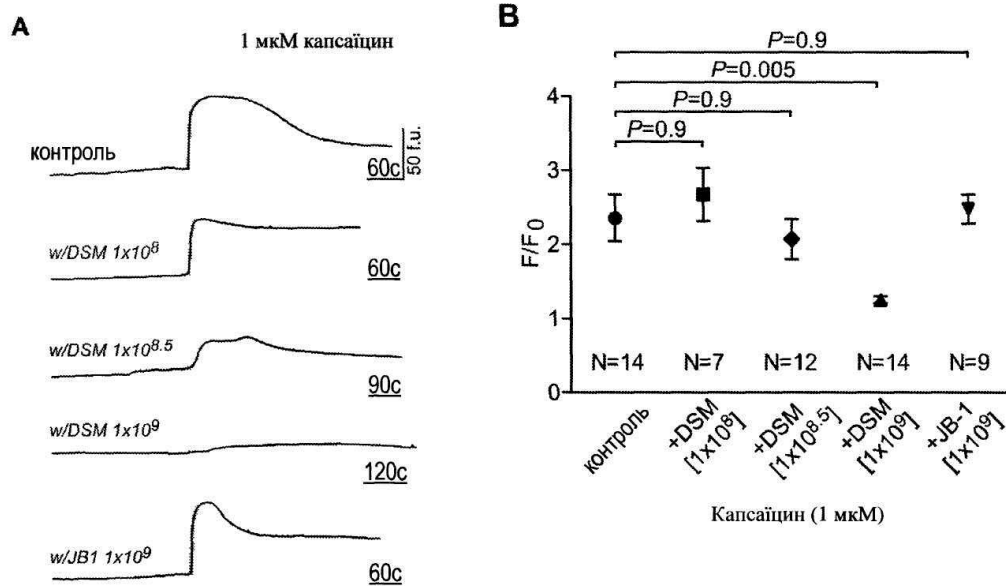


Фіг. 3В



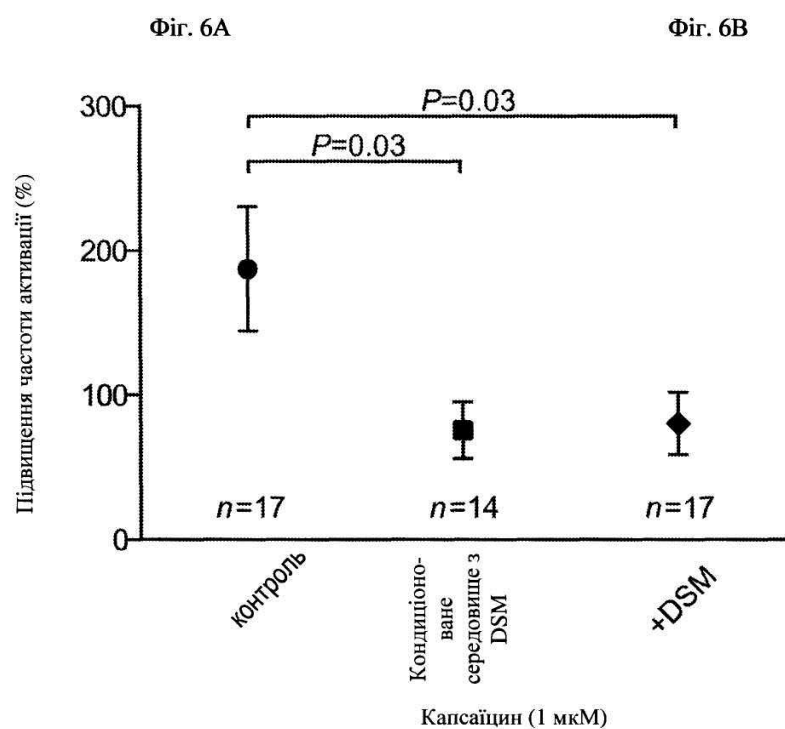
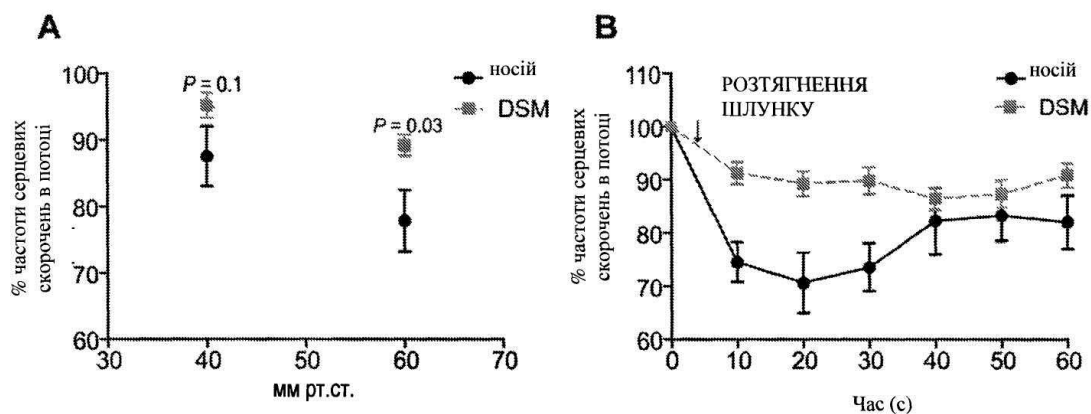
Фіг. 4А

Фіг. 4В



Фіг. 5А

Фіг. 5В



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601