

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-505254

(P2016-505254A)

(43) 公表日 平成28年2月25日(2016.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 K 35/741 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/741	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 35/742 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/742	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 1/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/12	4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 1/20 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-547122 (P2015-547122)  
 (86) (22) 出願日 平成25年12月12日 (2013.12.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月7日 (2015.8.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2013/053044  
 (87) 国際公開番号 W02014/091160  
 (87) 国際公開日 平成26年6月19日 (2014.6.19)  
 (31) 優先権主張番号 1261916  
 (32) 優先日 平成24年12月12日 (2012.12.12)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 506261567  
 ルサッフル・エ・コンパニー  
 LESAFFRE ET COMPAGN  
 I E  
 フランス、エフ-75001パリ、リュ・  
 エティエンヌ・マルセル41番  
 (71) 出願人 515157220  
 インスティテュート ナショナル デ ラ  
 リシェルシェ アグロノミク アイエヌ  
 アールエー  
 フランス国 エフ-75338 パリ セ  
 デ 07 リュ デ ユニヴェルシテ 1  
 47

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 下痢を治療および/または予防するプロバイオティクス株

(57) 【要約】

本発明は、大腸における水分の吸収に作用することができるプロバイオティクス株を選択または同定する方法、ならびに、下痢の治療および/または予防における医薬品としてのその使用に関する。本発明は、特に、下痢の治療および/または予防に使用するための枯草菌 (Bacillus subtilis) CU1 株に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下痢を治療および/または予防するためのプロバイオティクス株を選択する方法であって、

大腸における水分分泌に關与する少なくとも一つの輸送体または大腸における水分吸収に關与する少なくとも一つの輸送体の発現への、少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記大腸における水分分泌に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の減少および/または前記大腸における水分吸収に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、選択する方法。

10

## 【請求項 2】

前記方法が、

C F T R タンパク質および/または N H E 3 タンパク質の発現への少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記 C F T R タンパク質の発現の減少および/または前記 N H E 3 タンパク質の発現の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、請求項 1 に記載の選択する方法。

## 【請求項 3】

前記試験株が酵母株または細菌株であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の選択する方法。

20

## 【請求項 4】

前記細菌株が桿菌 ( *B a c i l l u s* ) 株、好ましくは枯草菌 ( *B a c i l l u s s u b t i l i s* ) 株であることを特徴とする、請求項 3 に記載の選択する方法。

## 【請求項 5】

前記 C F T R タンパク質および/または前記 N H E 3 タンパク質の発現が、電気泳動、ウエスタンブロット、免疫アッセイ、免疫組織化学、免疫細胞化学、質量分析、R T - P C R、またはノーザンブロットにより測定されることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の選択する方法。

## 【請求項 6】

下痢の治療および/または予防に使用するための、大腸における水分分泌に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の減少および/または大腸における水分吸収に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の増加を誘引するプロバイオティクス株、前記プロバイオティクス株の培養により得られる細胞、あるいは、前記プロバイオティクス株または前記細胞を含む組成物。

30

## 【請求項 7】

前記プロバイオティクス株が枯草菌 ( *B a c i l l u s s u b t i l i s* ) 株であることを特徴とする、請求項 6 に記載の、下痢の治療および/または予防に使用するための、プロバイオティクス株、細胞、または組成物。

## 【請求項 8】

前記プロバイオティクス株が、C N C M において 2 0 0 1 年 1 0 月 2 5 日に番号 I - 2 7 4 5 で寄託された枯草菌 ( *B a c i l l u s s u b t i l i s* ) C U 1 株であることを特徴とする、請求項 7 に記載の、下痢の治療および/または予防に使用するための、プロバイオティクス株、細胞、または組成物。

40

## 【請求項 9】

前記下痢が急性下痢または慢性下痢であることを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の、下痢の治療および/または予防に使用するための、プロバイオティクス株、細胞、または組成物。

## 【請求項 10】

前記下痢が感染起源の下痢または非感染起源の下痢であることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の、下痢の治療および/または予防に使用するための、プロバ

50

イオテイクス株、細胞、または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

基礎となる特許出願

本特許出願は、2012年12月12日出願のフランス特許出願番号FR 12 61 916への優先権を主張する。このフランス特許出願の内容は、参照により完全に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、下痢の治療および/または予防において使用するためのプロバイオティクス株、特に、桿菌プロバイオティクス株に関する。本発明はまた、大腸中の水分吸収に作用する特定の特徴を有するプロバイオティクス株を選択する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

正常に機能する場合、ヒト大腸はその管腔に侵入する水分の約99%（一日当たり約2リットルの水を表す）を吸収する。大腸はさらに4リットルの水まで吸収する能力を有する。しかしながら、一日当たり6リットルの水を超えると、その吸収能力は飽和し、下痢が起こる。

【0004】

下痢は、液性または軟性の粘稠度の、よりかさの大きい、および通常より回数の多い（一日当たり3回より多い便通）大便を特徴とする（世界的に、一年に約20億症例ある）共通問題である。極端な症例では、一日当たり、20リットルより多くの体液が失われる場合がある。

【0005】

下痢は疾患ではなく、症状である。その最も一般的な原因は、汚染された水または食品の摂取である。そのような場合、治療の必要性はないが、下痢は1日か2日続く。しかしながら、下痢自体は、特に乳児において致死的となり得る脱水症状（10%を超える体重喪失は緊急入院となる）を引き起こす場合がある。世界保健機構によれば、下痢は、発展途上諸国における二番目に一般的な乳児死亡原因であり、5歳以下の子供の死亡の18%の原因となっている（非特許文献1）。

【0006】

下痢が原因の脱水症状が起こるのは、体液の喪失が補充されない場合である。正常な場合では、大腸において、水分が大便から除去される。摂取物に含まれる水分の再吸収現象は、大腸細胞のレベルにおいて、水と電解質の能動および受動輸送の組み合わせにより起こる。大腸表皮陥入部の陰窩のレベルで、血液から外部環境への水の分泌がある。これら2つの現象は、健常者において相互に補完し、大便の適切な水分補充（腸通過を促進し、分子の循環状況を改善するもの）を維持することができる。

【0007】

下痢には多数の可能な原因（ウイルス、細菌、または寄生病原体により誘引される感染起源の下痢および非感染性下痢（例、食物不耐性、脂肪性食品、アルコール、心理的要因、医薬品の投与もしくは医療行為の投与により誘引される下痢、疾患もしくは臨床状態に関連する下痢、または、断薬に関連する下痢））がある。

【0008】

症状の持続期間に依存して、急性下痢および慢性下痢（それぞれ、その症状が2週間未満および少なくとも2週間続くもの）が区別される。

【0009】

下痢治療のための典型的な医薬は、例えば、ロペラミドであり、それは水と電解質の吸収を刺激すること及び通過時間をゆっくりとさせることの両者により作用する。しかしながら、通過時間をゆっくりとさせることは、サルモネラ、赤痢菌、またはクロストリジウ

10

20

30

40

50

ム・ディフィシル菌型の重症感染においては問題である。なぜなら、これらの病原性細菌が、長時間腸内に留まるからである。

【0010】

プロバイオティクスは、下痢治療および/または予防の興味深い代替手段となる。この適用症に最もよく使用されるプロバイオティクスは、乳酸菌である。そして、プロバイオティクスは、免疫システムと腸内フローラバランスに有効であるとして総称的に記載される。

【0011】

下痢治療または予防の新規標的を同定しようとする他の研究もある。そこで、文献WO 2004/028480は、CFTRタンパク質(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator(嚢胞性繊維症膜貫通型導電性調節因子))による塩素イオン輸送の有効性を減少させるチアゾリジノン型化合物および分泌性下痢治療におけるその使用を記載する。Bradfordら(非特許文献2)は、(CFTRの発現が変化している)嚢胞性線維症患者における腸閉塞と脱水症状の問題を治療する手段を検討した。

10

【0012】

さらにまた、嚢胞性線維症マウスにおけるNHE3タンパク質(Sodium Hydrogen Exchanger(ナトリウム水素交換体)3)の部分的または完全な喪失が、特に腸内流動性を増加させることにより、腸閉塞の発生を減少させたことも記載されている。結論されたのは、NHE3が、嚢胞性線維症を有してCFTR発現が変更された患者の腸管流動性を制御する有望なターゲットであることである。

20

【0013】

従って、下痢を治療および/または予防するための新規戦略の必要性がまだある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Bryce et al., Lancet, 2005, 365: 1147 - 1152

【非特許文献2】Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2009, 296: G886 - G898

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

一般に、本発明が基づく知見は、独特な様式で、ある種のプロバイオティクス株が、大腸に過剰に存在する水分の吸収を誘引することにより、直接下痢に作用することができるということである。予想外で驚くべきことに、本発明者は、ある種のプロバイオティクス株が、大腸の水分分泌に関与する輸送体の発現を阻害および/または大腸の水分吸収に関与する輸送体の発現を刺激することができて、下痢の治療および/または予防に使用可能であることを示した。

【0016】

従って、独特な様式であることには、これらプロバイオティクス株は、輸送体の阻害剤として作用しない(つまり、輸送体に結合することにより、その機能性を妨げるようには作用しない)が、それらの発現に作用し、したがって、存在する輸送体の数に作用する。

40

【0017】

さらにまた、これらプロバイオティクス株は大腸に過剰に存在する水分の吸収に直接作用するので、それら株は、任意の型の下痢、特に、下痢が感染性または非感染性起源であるかどうか及び腸内毒素症の存在または非存在に関わらずに、その下痢を予防および/または治療するために使用可能であるという利点を有する。

【課題を解決するための手段】

【0018】

50

本発明は、従って、下痢を治療および/または予防するためのプロバイオティクス株を選択する方法であって、前記方法は、

大腸における水分吸収または分泌に関与する少なくとも一つの輸送体の発現への少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記大腸における水分分泌に関与する少なくとも一つの輸送体の発現の減少および/または前記大腸における水分吸収に関与する少なくとも一つの輸送体の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、方法に関する。

【0019】

より具体的には、第一の観点では、本発明は、下痢を治療および/または予防するためのプロバイオティクス株を選択する方法であって、前記方法は、

C F T R タンパク質（囊胞性繊維症膜貫通型導電性調節因子）の発現へのおよび/または N H E 3 タンパク質（ナトリウム水素交換体 3）の発現への少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記 C F T R タンパク質の発現の減少および/または前記 N H E 3 タンパク質の発現の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、方法に関する。

【0020】

ある実施形態では、前記試験株は、酵母株または細菌株である。特に、被試験細菌株は、桿菌（*Bacillus*）株、好ましくは枯草菌（*Bacillus subtilis*）株である場合がある。

【0021】

ある実施形態では、C F T R タンパク質および/または N H E 3 タンパク質の発現は、電気泳動、ウエスタンブロット、免疫アッセイ、免疫組織化学、免疫細胞化学、質量分析、R T - P C R、またはノーザンブロットにより測定される。

【0022】

別の観点では、本発明は、下痢の治療および/または予防に使用するための、本発明の方法を使用して選択されるプロバイオティクス株に関する。

【0023】

ある実施形態では、前記プロバイオティクス株は、枯草菌株、好ましくは、C N C M（国立微生物培養物コレクション（*Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*）；25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15）において、2001年10月25日に、番号 I - 2745 で寄託された枯草菌 C U 1 株である。

【0024】

補足的観点では、本発明は、下痢の治療および/または予防に使用される、本発明の方法を使用して選択されるプロバイオティクス株の培養により得られる細胞に関する。

【0025】

特に、本発明は、下痢の治療および/または予防に使用するための、C N C M において、2001年10月25日に、番号 I - 2745 で寄託された枯草菌 C U 1 株の培養により得られる枯草菌細胞に関する。

【0026】

本発明は、また、患者の下痢を治療および/または予防する方法であって、本発明の方法を使用して選択されるプロバイオティクス株の培養により得られる有効量の細胞を、前記患者に投与する工程を含む、方法に関する。

【0027】

ある実施形態では、下痢を治療および/または予防する方法は、枯草菌のプロバイオティクス株、好ましくは、C N C M において、2001年10月25日に、番号 I - 2745 で寄託された枯草菌 C U 1 株の培養により得られる枯草菌細胞を投与する工程を含む。

【0028】

別の観点では、本発明は、下痢の治療および/または予防に使用するための組成物であって、本発明の少なくとも一つのプロバイオティクス株または前記株を培養して得られる

10

20

30

40

50

細胞を含む組成物に関する。特に、前記組成物は、CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる枯草菌細胞を含む。

【0029】

本発明により予防的および/または治療的に処置され得る下痢の形態は、急性下痢および慢性下痢を含む。

【0030】

ある実施形態では、本発明により治療される下痢は、ウイルス、細菌または寄生病原体により誘引される感染起源の下痢である。

【0031】

他の実施形態では、本発明により治療される下痢は、非感染起源の下痢である。

【0032】

非感染起源の下痢は、例えば、食物不耐性により誘引される下痢、脂肪性食品により誘引される下痢、アルコールにより誘引される下痢、心理的要因により誘引される下痢、医薬品の投与により誘引される下痢、治療行為の投与により誘引される下痢、疾患または臨床状態に関連する下痢、または、断薬に関連する下痢である。

【0033】

本発明の好ましい実施形態のより詳細な説明を以下に示す。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】CFTRタンパク質の大腸発現への枯草菌CU1株処置の効果。蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ を、コントロール(白)とCU1処置後(黒)で示す。 $* p < 0.005$ 。

【図2】NHE3タンパク質の大腸発現への枯草菌CU1株処置の効果。蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ を、コントロール(白)とCU1処置後(黒)で示す。 $* p < 0.005$ 。

【図3】CFTRタンパク質の大腸発現へのラクトバチルス・プランタラム株処置の効果の欠如。蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ を、コントロール(白)とLR処置後(黒)で示す。 $* p < 0.005$ 。

【図4】NHE3タンパク質の大腸発現へのラクトバチルス・プランタラム株処置の効果の欠如。蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ を、コントロール(白)とLR処置後(黒)で示す。 $* p < 0.005$ 。

【図5】マウスにLPS(15mg/kg)または生理食塩水を静脈投与後60分間(黒)および60~120分の間(白)における、大便中に排泄された水分(mg)(平均値 $\pm$ SEM、 $n = 10 \sim 20$ )。T-:生理食塩水を注射されたCU1非処置マウス; T+:LPSを注射されたCU1非処置マウス; T-/CU1:生理食塩水を注射されたCU1処置マウス; T+/CU1:LPSを注射されたCU1処置マウス。 $* P < 0.05$ 対T-;  $\dagger P < 0.05$ 対T+。

【図6】マウスにヒマシ油(200 $\mu\text{L}$ )または生理食塩水を胃内投与後60分間(黒)、60~120分の間(灰色)、および120~180分の間(白)における、大便中に排泄された水分(mg)(平均値 $\pm$ SEM、 $n = 10 \sim 19$ )。T-:生理食塩水を注射されたCU1非処置マウス; T+:ヒマシ油を注射されたCU1非処置マウス; T-/CU1:生理食塩水を注射されたCU1処置マウス; T+/CU1:ヒマシ油を注射されたCU1処置マウス。 $* P < 0.05$ 対T-;  $\dagger P < 0.05$ 対T+。

【発明を実施するための形態】

【0035】

上述したように、本発明は、腸液の制御に関与する輸送体のレベルでの直接作用により、大腸内の水分吸収に作用することができるプロバイオティクス株の同定に関し、ならびに、下痢の治療および/または予防における医薬品としてのそれら株の使用に関する。

【0036】

I プロバイオティクス株の選択方法

本発明の選択方法は、下痢の治療および/または予防に有用なプロバイオティクス株を

10

20

30

40

50

同定することを目標とする。

【0037】

本発明は、従って、下痢を治療および/または予防するためのプロバイオティクス株を選択する方法であって、前記方法は、

大腸における水分吸収または分泌に關与する少なくとも一つの輸送体の発現への少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記大腸における水分分泌に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の減少および/または前記大腸における水分吸収に關与する少なくとも一つの輸送体の発現の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、方法に關する。

【0038】

大腸での水分分泌に關与する輸送体の例は、CFTRタンパク質（囊胞性纖維症膜貫通型導電性調節因子）である。

【0039】

大腸での水分吸収に關与する輸送体の例は、NHE3タンパク質（ナトリウム水素交換体3）である。

【0040】

本発明の好ましい方法は、

CFTRタンパク質の発現へのおよび/またはNHE3タンパク質の発現への少なくとも一つの試験株の効果を測定する工程、ならびに、

前記CFTRタンパク質の発現の減少および/または前記NHE3タンパク質の発現の増加を誘引する少なくとも一つの株を選択する工程を含む、方法であることを特徴とする。

【0041】

本発明の方法の結果選択される株は、従って、下痢の治療および/または予防に有用なプロバイオティクス株である。

【0042】

本明細書中で、「プロバイオティクス株」が意図して示すのは、宿主の健康に有益な効果を奏する生きた微生物株である。

【0043】

宿主は一般的にヒトである。しかし、宿主は別の哺乳類（例、イヌ、ネコ、反芻動物、特に、ヒツジ、ヤギ、子牛、ウシ、シカ類（*cervids*）、ラクダ類、ウマ類、旧世界豚（特に、ブタおよび小豚）、ウサギ類、ネズミ類、ならびにテンジクネズミ科のげっ歯類）であると想定してもよい。

【0044】

試験株

本発明の方法を使用して試験される株は、任意の微生物株であってもよい。

【0045】

ある実施形態では、前記試験株は、酵母株である。試験可能な酵母の中で、言及可能なものは、例えば、サッカロミセス属（特に、サッカロマイセス・ブラウディ（*Saccharomyces boulardii*）種、サッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）種）の酵母、クロイペロミセス属（特に、クロイペロミセス・マルキシアヌス（*Kluyveromyces marxianus*）種）の酵母である。

【0046】

他の実施形態では、被試験株は細菌株である。

【0047】

試験株は、ヒトおよび/または動物に無害であると認識されている細菌から好ましくは選択される。

【0048】

試験可能な細菌の中で、言及可能なものは、例えば、ビフィドバクテリウム属の細菌（

10

20

30

40

50

特に、*Bifidobacterium animalis*種、*Bifidobacterium bifidum*種、*Bifidobacterium infantis*種、*Bifidobacterium lactis*種、*Bifidobacterium longum*種、および*Bifidobacterium breve*種)；ラクトバチルス属の細菌(特に、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)種、ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)種、ラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)種、ラクトバチルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)種、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)種、ラクトバチルス・ヘルベチカス(*Lactobacillus helveticus*)種、ラクトバチルス・ジョンソニー(*Lactobacillus johnsonii*)種、ラクトバチルス・プラントラム(*Lactobacillus plantarum*)種、ラクトバチルス・パラカセイ(*Lactobacillus paracasei*)種、ラクトバチルス・ラムノーサス(*Lactobacillus rhamnosus*)種、およびラクトバチルス・サリパリス(*Lactobacillus salivarius*)種)；ワイセラ属の細菌(特に、ワイセラ・チバリア(*Weissella cibaria*)種、ワイセラ・キムチイ(*Weissella kimchii*)種、ワイセラ・タイランドンシス(*Weissella thailandensis*)種)；桿菌属の細菌(特に、枯草菌(*Bacillus subtilis*)種、バチルス・アグランス(*Bacillus coagulans*)種、バチルス・アミロリクエファシエンス(*Bacillus amyloliquefaciens*)種、バチルス・リチェニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)種、バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)種、およびバチルス・クラウジー(*Bacillus clausii*)種)；ラクトコッカス属の細菌(特に、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)種)；エンテロコッカス属の細菌(特に、エンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)種、エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus fecalis*)種)；ストレプトコッカス属の細菌(特に、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)種)；大腸菌属の細菌(特に、大腸菌(*Escherichia coli*)種)である。

#### 【0049】

CFT Rおよび/またはNHE 3の発現

本発明の方法は、大腸における水分の吸収または分泌に関与する少なくとも一つの輸送体の発現、特に、CFT Rタンパク質および/またはNHE 3タンパク質の発現への試験株の効果を測定する工程を含む。

#### 【0050】

本明細書中で使用される「CFT Rタンパク質」は、染色体7番の長腕領域q31.2の遺伝子座7q31.2に位置するCFT R(「Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator(嚢胞性繊維症膜貫通型導電性調節因子)」)遺伝子によりヒトでコードされているタンパク質を意味する。CFT R遺伝子は、種を超えてよく保存されている。ヒトでは、CFT Rタンパク質は、例えば、GenBankアクセション番号NP\_00483の1480アミノ酸長のポリペプチド配列を有する。

#### 【0051】

CFT Rタンパク質は、表皮細胞の塩素イオンおよびチオシアネートイオンを透過可能なチャネルを形成する。

#### 【0052】

10

20

30

40

50

C F T R タンパク質は、膵管および胆管、腸陰窩、気管気管支、尿細管、生殖系ならびに汗腺の表皮細胞の頂極で発現する。

【 0 0 5 3 】

C F T R の阻害剤（例、チアゾリジノン）が、下痢の治療および／または予防へ応用されることが実証されてきた（Verkmanら，Curr. Pharm. Des.，2006，12：2235 - 2247）。

【 0 0 5 4 】

本発明の選択方法では、C F T R タンパク質発現の減少を誘引する試験株は、従って、下痢の治療および／または予防に有用である場合がある。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用される「N H E 3 タンパク質」は、染色体13番に位置するN H E 3 遺伝子（「Sodium - Hydrogen Exchanger（ナトリウム水素交換体）3」；また、名称S L C 9 A 3（「Solute Carrier Family 9 Member 3」としても知られる））によりヒトでコードされるタンパク質を意味する。ヒトでは、N H E 3 タンパク質は、例えば、GenBankアクセション番号N P \_ 0 0 4 1 6 5 の834アミノ酸長のポリペプチド配列を有する。

【 0 0 5 6 】

N H E 3 タンパク質は、腎臓の腎単位および腸の内皮細胞の頂端膜で発現し、そこでは、ナトリウムバランスを維持することを主に担当している。

【 0 0 5 7 】

N H E 3 遺伝子を遺伝学的に改変して不活性化したマウスが下痢に罹患したことが示されてきた（Schultheisら，1998，Nat. Genet 19：282 - 285）。

【 0 0 5 8 】

本発明の選択方法では、N H E 3 タンパク質発現の増加を誘引する試験株は、従って、下痢の治療および／または予防に有用である場合がある。

【 0 0 5 9 】

本発明の文脈では、大腸における水分の吸収または分泌に關与する輸送体の発現、特に、C F T R タンパク質および／またはN H E 3 タンパク質の発現への試験株の効果の測定を、当業者に公知の任意の方法（例えば、HarlowおよびLane、「Antibodies（抗体）：A Laboratory Manual（ラボマニュアル）」、1988年、Cold Spring Harbor Laboratory：Cold Spring Harbor，NYを参照されたい）を使用して実施可能（なぜなら使用する方法の性質が、重要または限定的な要素ではないから）である。

【 0 0 6 0 】

一般的に、タンパク質の発現レベルは、直接法（例、電気泳動法、ウエスタンブロット法、免疫アッセイ法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法、または質量分析法）により決定可能である。

【 0 0 6 1 】

タンパク質の発現レベルを間接法によって決定することも可能である。

【 0 0 6 2 】

間接法は、例えば、R T - P C R（逆転写に続いてポリメラーゼ連鎖反応を行うもの）、好ましくは定量R T - P C Rまたはノーザンブロット法により、対応する遺伝子の転写レベルを測定することからなる場合がある。

【 0 0 6 3 】

間接法の他の例は、タンパク質活性、つまり、存在する機能的タンパク質の量と相關するタンパク質活性を測定することからなる方法である。

【 0 0 6 4 】

ある好ましい実施形態では、輸送体、特に、C F T R タンパク質および／またはN H E 3 タンパク質の発現レベルを電気泳動で決定する。

10

20

30

40

50

## 【0065】

電気泳動は、タンパク質が、その分子量に従って分離されるのを可能にする。ラウリル硫酸ナトリウム含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）と呼ぶもの）を一般的に使用する。電気泳動は、二次元電気泳動（例、等電点電気泳動（それを用いて、タンパク質をその分子量とその等電点に従って分離可能とする））であってもよい。

## 【0066】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E 3タンパク質の発現レベルをウエスタンブロットで決定する。

## 【0067】

ウエスタンブロット（ウエスタン技術とも呼ぶもの）は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離する工程と、その後、ポリアクリルアミドゲルから支持膜（その支持膜上で、目的タンパク質を、そのタンパク質に特異的な標識抗体を使って検出する）へタンパク質をトランスファーする工程とからなる。

## 【0068】

ある好ましい実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E 3タンパク質の発現レベルを免疫アッセイで決定する。本明細書中で使用される「免疫アッセイ」は、抗原、抗体、または類似物質を検出および定量するための抗原-抗体反応を使用する任意の技術を意味する。抗体-抗原複合体を、いくつかのやり方で可視化してもよい。ほとんどの場合、抗体を、発色反応（例、免疫ペルオキシダーゼ染色）を触媒可能な酵素（例、ペルオキシダーゼ）と結合する。また、抗体を、フルオロフォア（例、FITC、ローダミン、テキサスレッド、またはAlexa Fluor）で標識してもよい。抗体-抗原複合体を、その後、免疫蛍光により検出する。

## 【0069】

ヒトCFTRタンパク質およびヒトNH E 3タンパク質に特異的モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知であり、市販されている。

## 【0070】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E 3タンパク質の発現レベルを免疫組織化学で決定する。用語「免疫組織化学」は、組織中でタンパク質を位置同定するための抗体の使用に基づく方法のことを指す。一般的には、組織を固定、洗浄、その後、透過処理する。その組織を、その後、目的タンパク質（ここでは、例えば、CFTRタンパク質またはNH E 3タンパク質）を特異的に認識する一次抗体とインキュベートする。検出系に結合させた二次抗体を加える。検出系は、例えば、蛍光色素または基質の存在下に置いた場合、発色反応を引き起こす酵素である。この二次抗体は、一次抗体の定常領域Fcを認識し、一次抗体の種と異なる種由来でなければならない。蛍光色素の場合、サンプルの蛍光を保護する媒体中、または、酵素の場合、基質の存在下に置いた後に、組織を、蛍光または共焦点顕微鏡を使用して解析する。目的タンパク質の発現レベルを、その後、デンシトメトリー、蛍光強度測定、または分光測光により決定してもよい。

## 【0071】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E 3タンパク質の発現レベルを免疫細胞化学で決定する。

## 【0072】

免疫細胞化学は、出発試料が組織の代わりに細胞学的調製物であることを除いて、免疫組織化学と類似する技術である。

## 【0073】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E 3タンパク質の発現レベルを質量分析で決定する。

## 【0074】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNH E

10

20

30

40

50

3 タンパク質の発現レベルを R T - P C R で決定する。

【 0 0 7 5 】

R T - P C R は、R N A を c D N A にする逆転写と、その後の、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) からなる。R T - P C R は、好ましくは、目的タンパク質に対応する初期 R N A の定量を可能にする定量 R T - P C R である。

【 0 0 7 6 】

本発明のある実施形態では、輸送体、特に、C F T R タンパク質および / または N H E 3 タンパク質の発現レベルをノーザンプロットで決定する。

【 0 0 7 7 】

ノーザンプロット ( また、ノーザントランスファーとも呼ぶもの ) は、ゲル電気泳動により大きさに従って R N A を分離する工程、その後、定量するタンパク質の R N A に特異的な標識ハイブリダイゼーションプローブで検出可能な膜上にゲルから R N A をトランスファーする工程とからなる。

【 0 0 7 8 】

生体試料

本発明の一つの方法は、大腸における水分の吸収または分泌に関与する少なくとも一つの輸送体の発現、特に、C F T R タンパク質および / または N H E 3 タンパク質の発現への試験株の効果を、生体試料中で測定する工程を含む。

【 0 0 7 9 】

本明細書中で使用される用語「生体試料」は、最も広い意味で使用される。生体試料は、目的タンパク質 ( 特に、C F T R タンパク質または N H E 3 タンパク質 ) が発現され、従って、検出および定量可能な任意の生体組織であってもよい。

【 0 0 8 0 】

本発明の選択方法を適用する際に使用可能な生体試料は、例えば、腸、膵管、胆管、尿管、気管気管支、生殖系、汗腺、および腎臓の腎単位由来のサンプルである場合がある。

【 0 0 8 1 】

ある好ましい実施形態では、生体試料は、腸サンプル、好ましくは大腸サンプルである。

【 0 0 8 2 】

組織試料は、好ましくは、例えば、バイオプシーによりモデル動物から採取する。モデル動物は、好ましくは、哺乳類 ( 例、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ニワトリ、サル ) である。モデル動物は、トランスジェニック動物である場合がある。

【 0 0 8 3 】

本発明の好ましい生体試料は、大腸細胞 ( つまり、大腸粘膜由来の細胞 ) を含む組織試料である。

【 0 0 8 4 】

生体試料は、組織由来であり、目的タンパク質を発現する生体材料であってもよい。

【 0 0 8 5 】

組織由来生体材料は、例えば、組織試料から単離された細胞または組織試料から単離された細胞より抽出されたタンパク質から選択される。

【 0 0 8 6 】

用語「生体試料」は、また、目的タンパク質、特に、C F T R タンパク質および / または N H E 3 タンパク質を発現する既知の細胞株の細胞を含む。

【 0 0 8 7 】

C F T R タンパク質発現細胞株の例は、大腸から単離された C a c o - 2 細胞、大腸から単離された H T - 2 9 細胞、または大腸から単離された T 8 4 細胞を含む。

【 0 0 8 8 】

N H E 3 タンパク質発現細胞株の例は、大腸から単離された C a c o - 2 細胞、大腸から単離された H T - 2 9 細胞、または大腸から単離された T 8 4 細胞を含む。

10

20

30

40

50

## 【0089】

これらの細胞株は、例えば、ATCC (American Type Culture Collection (アメリカ培養細胞系統保存機関)) から市販されている。

## 【0090】

ある実施形態では、生体試料は、目的タンパク質、特にCFTRおよび/またはNHE3タンパク質を発現する細胞または組織から単離されたタンパク質抽出物である。タンパク質抽出方法は、当業者に周知である(例えば、「Protein Methods (タンパク質方法)」、D. M. Bollagら、第二版、1996年、Wiley-Liss; 「Protein Purification Methods (タンパク質精製方法): A Practical Approach (実践的方法)」、E. L. HarrisおよびS. Angal (編)、1989年; 「Protein Purification Techniques (タンパク質精製技術): A Practical Approach (実践的方法)」、S. Roe、第二版、2001年、Oxford University Press; 「Principles and Reaction of Protein Extraction, Purification, and Characterization (タンパク質抽出、精製、および特徴解析の原理と反応)」、H. Ahmed、2005年、CRC Press: Boca Raton, FLを参照されたい)。組織または生体液からタンパク質を抽出するための市販キットもある。そのようなキットは、例えば、BioRad Laboratories (Hercules, CA)、BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA)、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、Pierce Biotechnology (Rockford, IL)、およびInvitrogen Corp. (Carlsbad, CA) より販売されている。当業者は、如何に状況に最も適するキットを選択するかを知っている。

10

20

## 【0091】

## 試験株の効果

本発明の方法では、大腸における水分の吸収または分泌に關与する輸送体、特に、CFTRタンパク質および/またはNHE3タンパク質の発現への試験株の効果を、前記試験株で処置したモデル動物から得られる生体試料中で測定される目的タンパク質発現レベルと前記試験株で処置しなかった(同種類の)モデル動物から得られる(同種類の)生体試料中で測定される目的タンパク質発現レベルとを比較することによって決定する。最後に言及した動物を、コントロール動物と呼ぶ。

30

## 【0092】

従って、例えば、生体試料がモデル動物に由来する本発明の方法を適用する場合、試験株の培養により得られる細胞の所定量を前記モデル動物へと投与する。

## 【0093】

その細胞量は、一度に投与してもよい。

## 【0094】

また、その細胞量を、同日に、数日かけて、または数週間かけて、数回投与してもよい。

40

## 【0095】

試験株の培養により得られる細胞は、使用するモデル動物に適する任意の投与方法により投与可能である。例えば、試験株の培養により得られる細胞の所定量と適するピヒクルを含む溶液または懸濁液の注入(特に、胃内注入)により、投与を実施してもよい。ピヒクルのみを含む等量の溶液を、コントロール動物へ投与する。

## 【0096】

さらにまた、生体試料が細胞株である本発明の方法を適用する場合、試験株の効果を、前記試験株で処置した細胞株の細胞で測定される目的タンパク質発現レベルと前記試験株で処置しなかった(同細胞株の)細胞で測定される目的タンパク質発現レベルとを比較す

50

ることによって決定する。最後に言及した細胞をコントロール細胞と呼ぶ。

【0097】

従って、例えば、生体試料が細胞株である本発明の方法を適用する場合、細胞株の細胞を、試験株の培養により得られる所定量の細胞と適するビヒクルを含む所定量の溶液または懸濁液とインキュベートする。前記細胞株のコントロール細胞を、ビヒクルのみを含む等量の溶液の存在する同等の条件中でインキュベートする。

【0098】

酵母株または細菌株であろうとその株の培養法は、当該技術分野で公知であり、当業者は、如何にその性質に関して各株の培養条件を最適化するかを知っている。

【0099】

さらにまた、当業者は、モデル動物へ投与するため又は細胞株の細胞とともにインキュベートするために、如何に試験株の培養により得られる菌細胞の最適量を決定するかを知っている。

【0100】

例えば、枯草菌細胞を、培養培地、特に、書籍：「Biotechnology (バイオ技術)」、第5版、R. Scriban、編集 Tec. & Doc.、1999年、ISBN：2-7430-0309-Xに記載される培地中で枯草菌株培養することにより得る。

【0101】

典型的には、枯草菌株の培養による枯草菌細胞の生産方法は、  
枯草菌株の植菌源を培養培地に植菌する工程と、  
好気性条件で培養し、細胞を複製させる工程と、  
その培養培地からバイオマスを分離して、枯草菌細胞を得る工程とを、含む。

【0102】

そのようにして得られる枯草菌細胞は、主として栄養型である。

【0103】

表現「主として栄養型」とは、少なくとも70%の細胞が栄養型であり、好ましくは、少なくとも80%であり、より好ましくは、少なくとも90%であることを意味する。

【0104】

細菌の「栄養型」とは、有利な条件中に置かれる細菌の型を示す。

【0105】

有利な条件の例は、細菌複製に有利な温度とpHの非制限培養培地である。

【0106】

非制限培養培地は、細胞複製に必要な全ての栄養素を含む。

【0107】

枯草菌細胞の生産方法は、また、好気性条件中で培養する工程とバイオマスを分離する工程との間に、不利な条件中に細胞を置く中間工程を含んでもよい。生産方法の最後に得られる枯草菌細胞は、従って、主として孢子形成型である。

【0108】

表現「主として孢子形成型」とは、少なくとも70%の細胞が孢子形成型であり、好ましくは、少なくとも80%であり、より好ましくは、少なくとも90%であることを意味する。

【0109】

細菌の「孢子形成型」とは、不利な条件中に置かれる細菌の型を示す。孢子形成型は、従って、困難な環境（例えば、栄養素の欠乏（つまり、限定的栄養培地）、水ストレス、pHもしくは温度のばらつきが大きいこと、または消化管の通過）に耐性を与えることを可能にする耐性型である。

【0110】

不利な条件に細菌細胞を置くことは、例えば、細菌の培養培地を新しいものとしなかったり、培養培地への栄養供給を止めたり、限定的培養培地を使用したり、温度を変えたり

10

20

30

40

50

、pHを変えたり、またはその組み合わせにより、得られる。

【0111】

枯草菌細胞の生産方法は、また、細胞を乾燥させて、乾燥型の枯草菌細胞を得るさらなる工程を含む場合がある。

【0112】

表現「乾燥型の枯草菌細胞」は、枯草菌細胞の生産方法の最後に得られたバイオマスが、90%より多い乾燥分、好ましくは95%より多い乾燥分を含むことを意味する。

【0113】

乾燥とは、例えば、凍結乾燥、流動床乾燥、またはスプレードライによる乾燥である。

【0114】

下痢を治療および/または予防するプロバイオティクス株の同定

試験株で処置したサンプル中で測定される目的タンパク質発現レベルと、コントロールサンプル中で測定される目的タンパク質発現レベルを比較することによって、試験株が目的タンパク質の発現の減少もしくは増加を誘引するかどうか、または、試験株が前記発現に影響がなかったかどうかを決定することが可能となる。

【0115】

上記したように、大腸における水分分泌に関与する少なくとも一つの輸送体の発現の減少および/または大腸における水分吸収に関与する少なくとも一つの輸送体の発現の増加を誘導する場合、本発明の選択方法により決定された株が、下痢の治療および/または予防に有用である可能性のあるプロバイオティクス株である。

【0116】

本発明者らは、そのようなプロバイオティクス株が、大腸において過剰に存在する水分の吸収を誘引することができることを示し、従って、下痢の治療および/または予防への応用を見出した。

【0117】

「大腸における水分分泌に関与する輸送体の発現の減少」が意図して示すのは、試験株の非存在下における前記輸送体の発現と比べてその発現が有意に減少することである。

【0118】

この減少の「有意」な性質を、統計解析により決定する。

【0119】

輸送体の発現への影響を免疫組織化学により測定する場合、「輸送体の発現の減少」は、試験株非存在下における発現に対する前記輸送体の発現と対応する蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ の有意な減少に対応する。

【0120】

「大腸における水分吸収に関与する輸送体の発現の増加」が意図して示すのは、試験株の非存在下における前記輸送体の発現と比べてその発現が有意に増加することである。

【0121】

この増加の「有意」な性質を、統計解析により決定する。

【0122】

輸送体の発現への影響を免疫組織化学により測定する場合、「輸送体の発現の増加」は、試験株非存在下における発現に対する前記輸送体の発現と対応する蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ の有意な増加に対応する。

【0123】

当業者が理解するであろうように、下痢の治療および/または予防に有用なプロバイオティクス株の同定は、本発明の選択方法のたった一つを使用することにより実施可能である。本発明の方法は、単一タイプの生体試料、例えば、所定のモデル動物を使用するか、または、数種類のタイプの生体試料、例えば、細胞株、その後、少なくとも一つのモデル動物を使用することで実施可能である。

【0124】

また、大腸における水分吸収に作用することができるプロバイオティクス株の同定は、

10

20

30

40

50

本発明の選択方法を使用し、その後、当業者に周知の一連のテスト及び臨床試験でこの選択方法を補完することにより実施可能である。

【0125】

II 下痢治療および/または予防におけるプロバイオティクス株の使用

本発明は、下痢の治療および/または予防に使用するための、大腸において過剰に存在する水分の吸収を誘引することができる、本発明の方法により同定される任意のプロバイオティクス株に関する。本発明は、また、下痢の治療および/または予防するための医薬品の製造に用いるために使用されるそのようなプロバイオティクス株に関する。

【0126】

上記したように、前記プロバイオティクス株は、任意の微生物株、特に、酵母株または細菌株（上述したようなもの）であってもよい。

10

【0127】

特に、本発明者は、CNCMにおいて、2001年10月25日に番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株が、大腸における過剰水分の吸収に作用して、従って、下痢の治療および/または予防に有用な場合があるプロバイオティクス株であることを実証した。

【0128】

この株は、文献FR 2 837 835（胃腸粘膜レベルでの免疫化用の前記株を含むライブアジュバントを開示するもの）中に記載された。

【0129】

本発明は、また、下痢の治療および/または予防に使用されるための、本発明の方法により同定されるプロバイオティクス株の培養により得られる全ての酵母細胞または細菌細胞に関する。

20

【0130】

上で指摘した様に、株の培養条件は、一般的に当該技術分野で公知であり、当業者により容易に決定可能である。

【0131】

特に、本発明は、下痢の治療および/または予防に使用するための、CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる細胞に関する。

30

【0132】

「CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる細胞」を、これ以後「CU1細胞」と呼ぶ。

【0133】

CU1細胞の生産を、上記した様に実施してもよい。

【0134】

下痢の治療および/または予防に使用されるCU1細胞は、孢子形成型および/または栄養型の細胞である。

【0135】

好ましい実施形態では、CU1細胞は、主として孢子形成型である。

40

【0136】

好ましい実施形態では、下痢の治療および/または予防に使用されるCU1細胞は乾燥型である。

【0137】

本発明の特に有利な実施形態では、下痢の治療および/または予防に使用されるCU1細胞は、主として孢子形成型および乾燥型である。

【0138】

本発明は、また、CFTRタンパク質の発現の減少および/またはNHE3タンパク質の発現の増加を誘引する能力を有し、従って大腸における過剰水分の吸収を誘引できる抽出物または濾液であって、任意のプロバイオティクス酵母細胞抽出物またはプロバイオテ

50

イクス細菌細胞抽出物およびプロバイオティクス株の培養由来の任意の濾液に関する。

【0139】

本発明の下痢を治療および/または予防する方法は、本明細書中に記載される方法により同定されるプロバイオティクス株の培養により得られる有効量の酵母細胞または細菌細胞を、患者に投与する工程を含む。一又は複数の投与量で投与可能な、酵母細胞または細菌細胞の有効量は、医師により決定される場合がある。投与の正確な量は、患者の年齢、体重、全身状態、下痢の性質と重症度等に依存して、患者により異なる場合がある。投与の正確な量は、また、所望の治療効果（つまり、下痢を予防するのか、または、下痢を治療するのか）に依存して異なる場合もある。

【0140】

投与経路（経口または非経口）は、下痢の性質に依存して、および/または、患者の年齢と全身状態に依存して選択可能である。

【0141】

下痢予防の症例では、本発明の方法により同定されるプロバイオティクス株の培養により得られる酵母細胞または細菌細胞を、症状が現れる前に投与する。

【0142】

下痢治療の症例では、本発明の方法により同定されるプロバイオティクス株の培養により得られる酵母細胞または細菌細胞を、症状が現れた後に投与する。

【0143】

一般的に、任意の型の下痢（急性型下痢および慢性型下痢を含むもの）は、本発明のプロバイオティクス株または前記プロバイオティクス株の培養により得られる細胞を使用して治療可能である。

【0144】

「急性下痢」は、症状が2週間未満継続する下痢を意味し、「慢性下痢」は、症状が少なくとも2週間、好ましくは少なくとも1か月継続する下痢を意味する。

【0145】

急性下痢には、例えば、ウイルス性胃腸炎、細菌性胃腸炎、および食中毒（例、サルモネラ症、細菌性赤痢、黄色ブドウ球菌感染、セレウス菌感染、大腸菌感染）を含む。

【0146】

慢性下痢には、例えば、吸収不良症候群、胃腸症（セリアック病、ウィップル病、クローン病等）、ぜん動運動性下痢（つまり、腸通過の加速による下痢）、分泌性下痢（つまり、小腸および/または大腸における水-電解質分泌の加速による下痢）、浸透圧性下痢（吸収不良であり且つ浸透圧効果を生み出す溶質の胃腸管における存在に起因する下痢）を含む。

【0147】

本発明のプロバイオティクス株または本発明のプロバイオティクス株の培養により得られる細胞を使用して治療可能な他の下痢には、不安または激しい感情による下痢、食物不耐性（例えば、牛乳の乳糖、ソルビトール、グルテン等）による下痢、ある種の治療（例、マグネシア療法、放射療法、または化学療法）またはある型の外科治療（例、胃切除または回腸切除）による下痢、胃、腸、大腸等の過負荷または炎症による下痢、（ヘロイン等の）断薬による下痢、ある種の医薬（例、抗生物質）による下痢を含む。

【0148】

本発明のプロバイオティクス株または本発明のプロバイオティクス株の培養により得られる細胞を使用して治療可能な他の下痢の例には、胆汁性発作または消化不良を伴う下痢、ある種の緩下性食品の過剰消費が原因の下痢、およびランナー下痢を含む。

【0149】

ある有利な実施形態では、本発明のプロバイオティクス株または本発明のプロバイオティクス株の培養により得られる細胞を使用して治療される下痢は、抗生物質投与により、または、より一般的に医薬品投与により誘引される下痢ではない。

【0150】

10

20

30

40

50

他の有利な実施形態では、本発明のプロバイオティクス株または本発明のプロバイオティクス株の培養により得られる細胞を使用して治療する下痢は、感染起源の下痢ではない。

【0151】

III 組成物

本発明は、また、下痢の治療および/または予防に使用するための組成物であって、本発明の少なくとも一つのプロバイオティクス株または、より具体的には、そのような株の培養により得られる細胞を含む組成物に関する。特に、前記組成物は、CNMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる有効量の細胞を含む。

10

【0152】

本発明の組成物は、食品組成物、食品サプリメント、または医薬組成物である場合がある。

【0153】

食品組成物は、任意のタイプの食品、飲料、または菓子類を示す。

【0154】

食品組成物は、例えば、飲料、シリアルバー、チューインガム、チョコレート、乳製品（例、発酵乳製品）、野菜起源の発酵製品であってもよい。

【0155】

「食品サプリメント」は、通常食を補助することを目的とする食品を意味する。食品サプリメントは、栄養素の濃縮源または滋養もしくはは生理学的効果を有する他の物質の濃縮源を、単独または組み合わせて構成する。

20

【0156】

食品サプリメントは、投与形態、つまり、これら剤形（例、カプセル、トローチ、錠剤、丸薬および他の同様な形態、粉末の匂い袋、液体アンプル、滴瓶および他の同様な形態の液体用の瓶、または少量測定単位で摂取されることを意図する粉末製剤）で市販される。

【0157】

本発明の組成物は、例えば、プロバイオティクス株の培養によって得られる細胞を、ヒト用途目的にする場合、 $1 \cdot 10^8$  CFU ~  $1 \cdot 10^{11}$  CFUの量で、好ましくは  $1 \cdot 10^9$  CFU ~  $1 \cdot 10^{10}$  CFUの量で毎日使用するのに適している。

30

【0158】

本発明の組成物は、例えば、プロバイオティクス株の培養によって得られる細胞を、獣医用途目的にする場合、 $1 \cdot 10^5$  CFU ~  $1 \cdot 10^{11}$  CFUの量で、好ましくは  $1 \cdot 10^6$  CFU ~  $1 \cdot 10^{10}$  CFUの量で毎日使用するのに適している。

【0159】

用語CFUは、コロニー形成単位 ( Colony Forming Unit ) を示す。

【0160】

IV 医薬組成物

腸液の制御に参与する輸送体に直接作用するので、本発明の方法により同定されるプロバイオティクス株、より具体的には、そのような株の培養により得られる酵母細胞または細菌細胞を治療剤として使用してもよい。

40

【0161】

これらの酵母または細菌細胞を、そのように投与することもできるし、あるいは、少なくとも一つの生理学的に許容可能なビヒクルまたは賦形剤の存在下で製剤または医薬組成物の形態で投与することもできる。本発明の文脈では、「生理学的に許容可能なビヒクルまたは賦形剤」は、有効成分（ここでは、前記酵母または細菌細胞）の生物学的活性の効力と干渉せず、且つ、投与される濃度で、患者または被験者に過剰に毒性がない任意の媒体または添加剤を意味する。生理学的に許容可能なビヒクルまたは賦形剤は、ヒトおよび

50

／または動物（特に、哺乳類）への投与に適するビヒクルまたは賦形剤であってもよい。

【0162】

本発明の医薬組成物は、所望の治療効果を得るために、任意の有効な組み合わせの投与量と投与経路を使用して投与可能である。投与の正確な量は、患者の年齢、体重、全身状態、下痢の性質と重症度等に依存して、患者により異なる場合がある。投与経路（経口または非経口）は、下痢の性質に依存して、ならびに／あるいは、患者の年齢および／または健康に依存して選択可能である。

【0163】

例として、本発明は、上で定義した医薬組成物であって、前記プロバイオティクス株の培養によって得られる細胞を、ヒト用途目的にする場合、 $1 \cdot 10^8$  CFU ~  $1 \cdot 10^{11}$  CFUの量で、好ましくは $1 \cdot 10^9$  CFU ~  $10^{10}$  CFUの量で毎日使用するための医薬組成物に関する。

10

【0164】

本発明は、また、上で定義した医薬組成物であって、前記プロバイオティクス株の培養によって得られる細胞を、獣医用途目的にする場合、 $1 \cdot 10^5$  CFU ~  $1 \cdot 10^{11}$  CFUの量で、好ましくは $1 \cdot 10^6$  CFU ~  $1 \cdot 10^{10}$  CFUの量で毎日使用するための医薬組成物に関する。

【0165】

本発明の医薬組成物の処方は、投与経路および組成物を使用しようとする投与量に依存して異なる場合がある。少なくとも一つの生理学的に許容可能なビヒクルまたは賦形剤を処方後、本発明の医薬組成物は、哺乳類、特にヒトへの投与に適する任意の形態（例、菱形錠剤、錠剤、糖衣剤、カプセル、シロップ、軟膏、注射可能溶液、坐薬等の形態）であってもよい。当業者は、所定タイプの製剤を調製する際に、如何に最も適したビヒクルおよび賦形剤を選択するかを知っている。従って、例えば、賦形剤（例、水、2,3-ブタンジオール、リンゲル液、塩化ナトリウム等張液、合成モノまたはジグリセリド、およびオレイン酸）は、しばしば、注射可能製剤の処方に使用される。液体組成物（乳剤、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシル剤等を含むもの）は、溶剤類、溶解剤類、乳化剤類、油類、脂肪類、及び他の添加剤（例、懸濁剤、防腐剤、甘味料、香味料、粘度調整剤、着色料等）の存在下で処方可能である。経口経路による投与用の固形組成物は、不活性賦形剤（例、クエン酸ナトリウム）および、任意ではあるが、添加剤（例、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、吸収促進剤、潤滑剤等）の存在下で処方可能である。

20

30

【0166】

ある実施形態では、本発明の医薬組成物を、一又は複数の有効成分、特に前記プロバイオティクス株の培養により得られる酵母細胞または細菌を即時に放出するように処方する。また、医薬組成物は、例えば、胃酸度および酵素に対する一又は複数の有効成分の長期または標的化放出のため、あるいは、前記一又は複数の有効成分の保護のために処方可能である。

【0167】

従って、pHおよび／もしくは胃酵素の作用に抵抗性のコーティング、pHおよび／もしくは酵素作用に感受性のコーティング、または胃もしくは腸の壁に接着する生体接着性コーティングを使用すること、あるいはカプセル化システムを用いることが可能である。

40

【0168】

本発明の医薬組成物は、さらにまた、少なくとも一つの別の活性医薬成分（すなわち、前記プロバイオティクス株の培養により得られる酵母または細菌細胞に付け加えるもの）を含む。

【0169】

「活性医薬成分」は、それが投与される患者または被験者の健康または全身状態に治療効果または薬効を有するように投与される任意の化合物または物質を意味する。

【0170】

従って、活性医薬成分は、前記医薬組成物の投与により予防または治療される下痢に対

50

して活性がある場合があり；下痢に関連する状態または症状（例、熱、嘔吐、または腹部けいれん）に対して活性がある場合があり；前記医薬組成物の一又は複数の有効成分の利用可能性および／または活性を増加させる場合がある。

【0171】

本発明の組成物に存在してもよい活性医薬成分の例は、限定はされないが、抗炎症剤、抗生物質、解熱剤、制吐薬、抗ヒスタミン剤、ビタミン類、鎮痙薬等を含む。

【0172】

有利な実施形態では、他の活性医薬成分は、枯草菌株またはそのような株の培養により得られる細胞ではない。好ましくは、細菌株またはそのような株の培養により得られる細胞でもない。より好ましくは、プロバイオティクス株またはそのような株の培養により得られる細胞でもない。

10

【0173】

本発明の医薬組成物の例は、前記プロバイオティクス株の培養により得られる酵母または細菌細胞をただ一つの活性医薬成分として含む組成物である。

【0174】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる細胞を含むが、任意の他の細菌株を含まない。

【0175】

別の好ましい実施形態では、本発明の組成物は、CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる細胞を含むが、任意の他の細菌または酵母株を含まない。

20

【0176】

さらに別の好ましい実施形態では、本発明の組成物は、CNCMにおいて、2001年10月25日に、番号I-2745で寄託された枯草菌CU1株の培養により得られる細胞を、ただ一つの医薬活性成分として含む。

【0177】

定義がなされていない場合、本説明中で使用する全ての技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されると同じ意味を有する。さらにまた、本明細書中に述べた全ての刊行物、特許出願、全ての特許および全ての他の参考資料は、参照により組み込まれる。

30

【実施例】

【0178】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を説明する。しかしながら、実施例は説明目的のためのみ提示され、本発明の範囲を如何なるやり方でも限定しないことが理解される。

【0179】

実施例1： 下痢予防および／または治療を目的とするプロバイオティクス株の選択材料および方法

試験プロバイオティクス株

試験株は以下のもの：ラクトバチルス・プランタラム株および枯草菌CU1株である。

40

【0180】

枯草菌CU1（以下、CU1）の細胞は、孢子形成型で乾燥したものを使用する。

【0181】

ラクトバチルス・プランタラム（以下、LR）の細胞は、凍結乾燥栄養型で使用する。

【0182】

CFTRおよびNHE3の発現へのプロバイオティクス株の効果の測定

4匹のマウスを、それぞれCU1を $10^9$ CFU/日で、2週間処置した。

【0183】

4匹のマウスを、それぞれLRを $10^9$ CFU/日で、2週間処置した。

50

## 【0184】

CU1で処置しなかった4匹のマウスをコントロールとして使用した。

## 【0185】

CFTRおよびNHE3の発現を、以下に記載するように、CU1で処置したマウスからとコントロールマウスから得られた大腸細胞の免疫組織化学により測定した。

## 【0186】

マウスを屠殺直後に、近位大腸サンプル(1cm長)を、0.9%NaCl溶液で洗浄し、4%ホルムアルデヒドの緩衝液で(6時間)固定し、4の30%ショ糖溶液中に24時間浸漬した。

## 【0187】

そのサンプルを、Tissue Tek媒体(Euromedex、Souffelweyersheim、フランス)中で固定し、-45のイソペンタン中で凍結した。クライオスタット切片を、アセトンで(10分、-20)後固定し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)-ミルク溶液中で水和させた。ブロッキング溶液(0.25%のTriton X-100を有するPBSであって0.1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むもの)でインキュベーション後、切片を、ウサギ抗マウスCFTR(1/100)、抗マウスNHE3(1/200)または抗マウスTLR4(1/100)ポリクローナル抗体(Abcam、Cambridge、UK)で、4一晚インキュベートした。切片をその後、FITC標識ロバ抗ウサギ抗体(1/2000、Uptima、Montlucan、フランス)で、室温、1時間インキュベートした。切片をその後、「Vectashield Hard Setマウント媒体」(Abcys、Les Ulis、フランス)にマウントし、ニコン90i蛍光顕微鏡(ニコン、Champigny-sur-Marne、フランス)下で検証した。免疫標識の蛍光強度/ $\mu\text{m}^2$ を、NIS-Elements Arソフトウェア(ニコン)で測定した。解析を、4匹のマウスからなる群由来の5枚の切片で実行した。

## 【0188】

## 結果

試験したプロバイオティクス株のうち、枯草菌CU1株のみが、大腸粘膜を介する水分の移動に關与する2つの輸送体CFTRおよびNHE3の発現に影響があることが分かった。事実、図1に示すように、枯草菌CU1株で2週間マウスを処置すると、健常マウスの大腸の大腸細胞の頂極でのCFTR発現の有意な減少が導かれた。図2に示すように、枯草菌CU1株で2週間マウスを処置すると、健常マウスの大腸の大腸細胞の頂極でのNHE3発現の有意な増加が導かれた。

## 【0189】

対照的に、図3および4に示すように、L.プラントラム株での処置は、CFTRまたはNHE3の発現を有意に変更しなかった。

## 【0190】

実施例2：下痢予防および/または治療におけるプロバイオティクス株CU1の使用材料および方法

## LPS誘引下痢モデル

$10^9$  CFU/日/動物の被評価プロバイオティクス株を、胃内経路で雄DBA/2マウスに14日間投与した。

## 【0191】

コントロールグループのマウス(12匹のマウス)を、その後、200 $\mu\text{L}$ の水を静脈内投与することで処置した。そして、試験群のマウス(12匹のマウス)は、下痢を誘引するために、15mg/kgの用量で、サルモネラ・エンテリティディス(Salmonella enteritidis)のリポポリサッカリド(LPS)の静脈内投与を受けた。マウスを、LPS注射後30分ごとに120分間大便回収を可能とするため、アルミニウムシートで覆った床の個々のケージに入れた。回収された大便物質の重さを測り、そして、24時間100で加熱して再び重さを測った。(加熱前の)大便物質の湿重量

10

20

30

40

50

と乾燥質量との差が、水分排泄に対応する。下痢を、LPS投与後の総排泄水分に比して評価した。

【0192】

ヒマシ油誘引下痢モデル

10<sup>9</sup> CFU/日/動物の被評価プロバイオティクス株を、胃内経路で雄NMRIマウスに14日間投与した。

【0193】

コントロールグループのマウス(12匹のマウス)を、200μLの水を胃内経路投与することで処置した。200μLのヒマシ油(シグマ社)を、下痢を誘引するために、胃内経路で「試験」群の雄NMRIマウス(12匹のマウス)に投与した。マウスを、ヒマシ油投与後30分ごとに180分間大便回収を可能とするため、アルミニウムシートで覆った床の個々のケージに入れた。回収された大便物質の重さを測り、そして、24時間100℃で加熱して再び重さを測った。(加熱前の)大便物質の湿重量と乾燥質量との差が、水分排泄に対応する。下痢を、ヒマシ油投与後の総排泄水分に比して評価した。

10

【0194】

抗生物質誘引下痢モデル

抗生物質誘引下痢動物モデルを、抗生物質の数を減らして使用することにより準備した(Chenら、2008年、Gastroenterology, 135(6):1984-92の仕事に基づく)。抗生物質投与は、免疫応答とともにフローラの腸内毒素症(アンバランス)およびマウス腸の粘液生産細胞の数の変化を誘引する。抗生物質処置は、クロストリジウム・ディフィシルの出現を顕著に誘引することができる。

20

【0195】

CU1株を用いた予防的処置を、5匹のマウスの群で、14日間および18日間、10<sup>9</sup> CFU/日/動物の率で、このモデルで試験した。CU1株の投与7日間後、5種類の抗生物質混合物を、3日間飲料水中に投与した。その後、次の日に、抗生物質処置マウスは、クリンダマイシンの腹腔内注射を受けた。処置の効果を、実験開始後14日目および18日目に観察した。CU1株処置マウスは、試験期間を通じてこの株を受けた。

【0196】

結果

枯草菌CU1株を、各種マウス下痢モデルで試験した。

30

【0197】

枯草菌CU1株の抗下痢特性

図4および5に示すように、CU1株は、LPS(図5)およびヒマシ油(図6)により誘引される下痢を有意に予防することが有意に分かった。

【0198】

事実、CU1細胞投与は、LPS投与後の最初の1時間に大便中に排泄される水分を有意に減少させた(4回の試験で、その減少は、35%、38%、36%および40%であった)。

【0199】

CU1細胞投与は、ヒマシ油により誘引された下痢モデルの第2時間目の間の大便中に排泄される水分を有意に減少させた(3回の試験で、その減少は、63%、46%および44%であった)。

40

【0200】

CU1株は、また、抗生物質投与により誘引される下痢への予防的効果も有する。この効果は、CU1細胞の予防的処置後に観察された。マウスは、その後、腸微生物相の正常化ならびに腸内粘膜の粘液生産細胞レベルおよびマクロファージ上の、抗生物質により引き起こされる変化の改善を呈した。

【0201】

ロペラミド効果との比較

15日間のCU1株を用いた予防的処置は、下痢が開始する1時間前に経口経路で単一

50

用量 ( 1 m g / k g ) で投与されたロペラミド ( 対照抗下痢分子 ) と同じ効力で、L P S またはヒマシ油により誘引された下痢を減少させることが分かった。ロペラミドは、L P S 後の大便排泄における 5 0 % の水分減少 ( C U 1 については 4 0 % ) 、およびヒマシ油後には 6 0 % ( C U 1 については 6 0 % ) を示す。

【 0 2 0 2 】

結論

生体内で、枯草菌 C U 1 株は、体液過剰状態において大腸の吸収能力を改善することができる。

【 0 2 0 3 】

別の研究が示したのは、枯草菌 C U 1 株が：

ヒマシ油モデルおよび L P S モデルにおいて小腸の分泌 / 吸収能力に影響がないこと；  
ヒマシ油により誘引されるものではなく、大腸壁のレベルで L P S により誘引される傍細胞透過性の増加を打ち消すこと；

大腸壁レベルでヒマシ油により誘引される短絡電流を減少させることである ( それは、ヒマシ油により誘引される便通を促進する下痢状態 ( およびベースライン状態ではなく ) において、大腸が水分を吸収する能力を補強することを示唆する ) 。

【 0 2 0 4 】

枯草菌 C U 1 株およびこの株の培養により得られる細胞は、従って、任意の型の下痢を治療および / または予防するのに有用である。

10

【 図 1 】

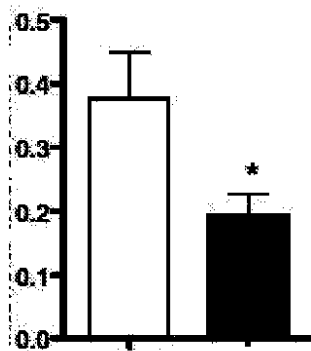


Figure 1

【 図 2 】

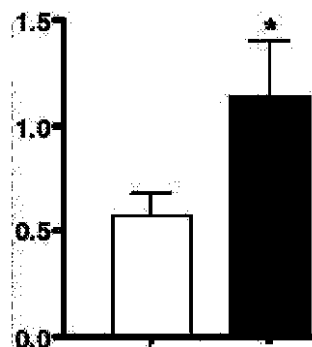


Figure 2

【 図 3 】

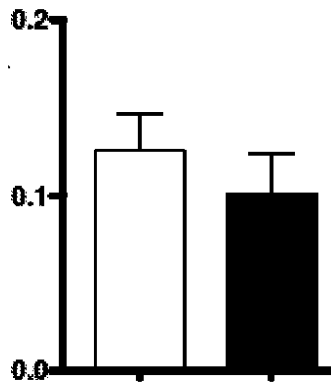


Figure 3

【 図 4 】

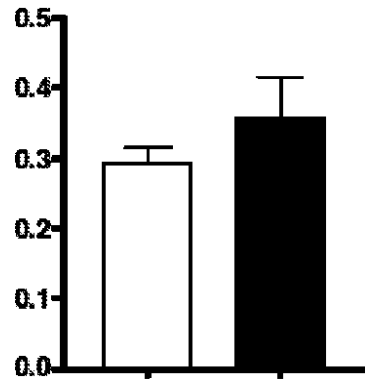


Figure 4

【 図 5 】

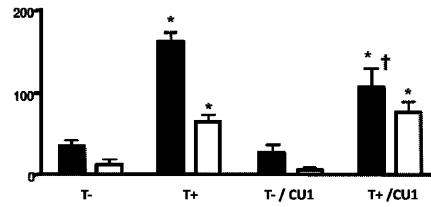


Figure 5

【 図 6 】

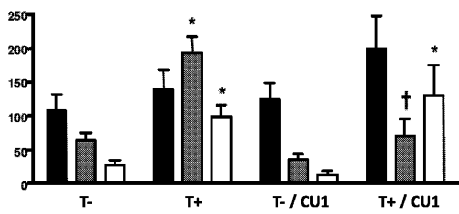


Figure 6

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2013/053044
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/064741 A2 (KEMIN IND INC [US]; VARGHESE JERRY [IN]; SAS BENEDIKT [BE]; VAN HEMEL) 7 June 2007 (2007-06-07) the whole document	6,7,9,10
X	----- G. RAHEJA ET AL: "Lactobacillus acidophilus stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 298, no. 3, 1 March 2010 (2010-03-01) , pages G395-G401, XP055066166, ISSN: 0193-1857, DOI: 10.1152/ajpgi.00465.2009 the whole document ----- -/--	1-7,9,10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February 2014		Date of mailing of the international search report 05/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, Céline

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/053044

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALAN BR THOMSON: "Recent advances in small bowel diseases: Part&emsp14;I", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 18, no. 26, 1 January 2012 (2012-01-01), page 3336, XP055066038, ISSN: 1007-9327, DOI: 10.3748/wjg.v18.i26.3336 the whole document	1-10
A	E. HEUVELIN ET AL: "A Bifidobacterium Probiotic Strain and Its Soluble Factors Alleviate Chloride Secretion by Human Intestinal Epithelial Cells", THE JOURNAL OF NUTRITION, vol. 140, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 7-11, XP055066032, ISSN: 0022-3166, DOI: 10.3945/jn.109.114553 the whole document	1-10
A	RESTA-LENERT ET AL: "Probiotics and Commensals Reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-Induced Dysfunction in Human Intestinal Epithelial Cells", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 130, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 731-746, XP005442375, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2005.12.015 the whole document	1-10
A	MACFARLANE G T ET AL: "PROBIOTICS, INFECTION AND IMMUNITY", CURRENT OPINION ON INFECTIOUS DISEASES, CURRENT SCIENCES, GB, vol. 15, no. 5, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 501-506, XP009081317, ISSN: 0951-7375 the whole document	1-10
A	KIELA PAWEL R ET AL: "Molecular mechanism of rat NHE3 gene promoter regulation by sodium butyrate", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY, vol. 293, no. 1, July 2007 (2007-07), pages C64-C74, XP002698832, ISSN: 0363-6143 the whole document	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2013/053044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007064741 A2	07-06-2007	AU 2006320613 A1	07-06-2007
		BR P10619364 A2	27-09-2011
		CA 2631289 A1	07-06-2007
		CN 101448398 A	03-06-2009
		EP 1956914 A2	20-08-2008
		IL 191795 A	31-07-2013
		JP 5280854 B2	04-09-2013
		JP 2009519238 A	14-05-2009
		JP 2013173750 A	05-09-2013
		KR 20080073771 A	11-08-2008
		NZ 569244 A	27-07-2012
		US 2008057047 A1	06-03-2008
		WO 2007064741 A2	07-06-2007
-----			

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/053044

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. G01N33/50 G01N33/569 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2007/064741 A2 (KEMIN IND INC [US]; VARGHESE JERRY [IN]; SAS BENEDIKT [BE]; VAN HEMEL) 7 juin 2007 (2007-06-07) le document en entier -----	6,7,9,10
X	G. RAHEJA ET AL: "Lactobacillus acidophilus stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 298, no. 3, 1 mars 2010 (2010-03-01), pages G395-G401, XP055066166, ISSN: 0193-1857, DOI: 10.1152/ajpgi.00465.2009 le document en entier ----- -/--	1-7,9,10
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
10 février 2014		05/03/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Hoff, Céline

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/053044

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALAN BR THOMSON: "Recent advances in small bowel diseases: Part&emsp14;I", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 18, no. 26, 1 janvier 2012 (2012-01-01), page 3336, XP055066038, ISSN: 1007-9327, DOI: 10.3748/wjg.v18.i26.3336 le document en entier -----	1-10
A	E. HEUVELIN ET AL: "A Bifidobacterium Probiotic Strain and Its Soluble Factors Alleviate Chloride Secretion by Human Intestinal Epithelial Cells", THE JOURNAL OF NUTRITION, vol. 140, no. 1, 1 janvier 2010 (2010-01-01), pages 7-11, XP055066032, ISSN: 0022-3166, DOI: 10.3945/jn.109.114553 le document en entier -----	1-10
A	RESTA-LENERT ET AL: "Probiotics and Commensals Reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-Induced Dysfunction in Human Intestinal Epithelial Cells", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 130, no. 3, 1 mars 2006 (2006-03-01), pages 731-746, XP005442375, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2005.12.015 le document en entier -----	1-10
A	MACFARLANE G T ET AL: "PROBIOTICS, INFECTION AND IMMUNITY", CURRENT OPINION ON INFECTIOUS DISEASES, CURRENT SCIENCES, GB, vol. 15, no. 5, 1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 501-506, XP009081317, ISSN: 0951-7375 le document en entier -----	1-10
A	KIELA PAWEL R ET AL: "Molecular mechanism of rat NHE3 gene promoter regulation by sodium butyrate", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY, vol. 293, no. 1, juillet 2007 (2007-07), pages C64-C74, XP002698832, ISSN: 0363-6143 le document en entier -----	1-10

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2013/053044

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007064741 A2	07-06-2007	AU 2006320613 A1	07-06-2007
		BR P10619364 A2	27-09-2011
		CA 2631289 A1	07-06-2007
		CN 101448398 A	03-06-2009
		EP 1956914 A2	20-08-2008
		IL 191795 A	31-07-2013
		JP 5280854 B2	04-09-2013
		JP 2009519238 A	14-05-2009
		JP 2013173750 A	05-09-2013
		KR 20080073771 A	11-08-2008
		NZ 569244 A	27-07-2012
		US 2008057047 A1	06-03-2008
		WO 2007064741 A2	07-06-2007
		-----	

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
<b>A 2 3 L 33/10 (2016.01)</b>	A 2 3 L	1/30	Z
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
	C 1 2 Q	1/68	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71) 出願人 515156360  
 エコール ナショナル シュペリール デ サイエンス アグロノミク デ ボルドー アキテ  
 ーヌ (ボルドー サイエンス アグロ)  
 フランス国 エフ - 3 3 1 7 0 グラディニャン クール ドゥ ジェネラル ド ゴール 1

(74) 代理人 100106002  
 弁理士 正林 真之

(74) 代理人 100120891  
 弁理士 林 一好

(74) 代理人 100165157  
 弁理士 芝 哲央

(74) 代理人 100126000  
 弁理士 岩池 満

(72) 発明者 クオン フー マリー  
 フランス国 エフ - 6 4 1 0 0 パイヨンヌ リュ ブランシュ アンヌビュット 8

(72) 発明者 フィオラモンティ ジャン  
 フランス国 エフ - 3 1 1 2 0 ロケット リュ デ ラ ガロンヌ 2 1

(72) 発明者 ウルダチ マリア  
 フランス国 エフ - 3 3 1 7 5 グラディニャン セデ クール ドゥ ジェネラル ド ゴール  
 1 ボルドー サイエンス アグロ

F ターム (参考) 4B018 MD81 MD88 ME02 ME11  
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ06 QQ07 QQ52 QQ79 QR62 QR75 QR76  
 QS25  
 4B065 AA19X AC20 CA44  
 4C087 AA01 AA02 BC64 BC65 CA09 NA14 ZA73

专利名称(译)	用于治疗和/或预防腹泻的益生菌菌株		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016505254A</a>	公开(公告)日	2016-02-25
申请号	JP2015547122	申请日	2013-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	乐斯福公司 研究所国家德拉歇尔份额格斯跳蚤点击眼NTT伯爵呢 巴黎高等国立格哈德国羊毛去学农跳蚤点击去波尔多，阿基坦大区农业科学		
申请(专利权)人(译)	ルサッフル・エ・コンパニー 研究所国家德拉Risherushe Aguronomiku眼NTT伯爵呢 巴黎高等国立高等DES科学Aguronomiku波尔多阿基坦 (波尔多农业科学)		
[标]发明人	クオンフォーマリー フィオラモンティジャン ウルダチマリア		
发明人	クオンフォーマリー フィオラモンティジャン ウルダチマリア		
IPC分类号	C12Q1/04 A61K35/741 A61K35/742 A61P1/12 C12N1/20 A23L33/10 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/5044 G01N33/56911 A61P1/12 A23L33/135 A61K35/742 C12N1/20 C12R1/125 A61K2035/115 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/04 A61K35/741 A61K35/742 A61P1/12 C12N1/20.A A23L1/30.Z G01N33/53.D G01N33/53.Y C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B018/MD81 4B018/MD88 4B018/ME02 4B018/ME11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ07 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QS25 4B065/AA19X 4B065/AC20 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC64 4C087/BC65 4C087/CA09 4C087/NA14 4C087/ZA73		
代理人(译)	Seihayashi正幸 和义林		
优先权	2012061916 2012-12-12 FR		
其他公开文献	JP6401180B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及选择或鉴定能够影响大肠中水分吸收的益生菌菌株的方法及其作为药物用于治疗 and/或预防腹泻的用途。本发明特别涉及用于治疗 and/或预防腹泻的枯草芽孢杆菌CU1菌株。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2015-547122 (P2015-547122)	(71) 出願人	506261567
(86) (22) 出願日	平成25年12月12日 (2013.12.12)		ルサッフル・エ・コンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月7日 (2015.8.7)		LESAFFRE ET COMPAGN
(86) 国際出願番号	PCT/FR2013/053044		IE
(87) 国際公開番号	WO2014/091160		フランス、エフ-75001パリ、リュ・
(87) 国際公開日	平成26年6月19日 (2014.6.19)		エティエンヌ・マルセル41番
(31) 優先権主張番号	1261916	(71) 出願人	515157220
(32) 優先日	平成24年12月12日 (2012.12.12)		インスティテュート ナショナル デ ラ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		リシエルシェ アグロノミク アイエヌ
			アルエー
			フランス国 エフ-75338 パリ セ
			デ 07 リュ デ ユニヴェルシテ 1
			47
			最終頁に続く