



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 17 935 A1** 2004.11.04

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 17 935.6**

(22) Anmeldetag: **17.04.2003**

(43) Offenlegungstag: **04.11.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 38/17**

(71) Anmelder:

**S.K. Enterprise GmbH, 20251 Hamburg, DE**

(74) Vertreter:

**HOFFMANN · EITLE, 81925 München**

(72) Erfinder:

**Krauskopf, Jobst, 29576 Barum, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

**US 51 47 853**

**EP 09 42 002 A1**

**JP 63-2 84 133 A**

**JP 11-2 92 788 A**

**TANIGAWA, Tetsuya, et.al.: Marked Enhancement by**

**Fisch Meal of Helicobacter pylori-induced Gastritis in Mongolian Gerbils. In: J.Cancer Res., 91, Aug. 2000, Vol. 91, S. 769-773;;**

**STROMQVIST, M., et.al.: Human milk kappa-casein and**

**inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucosa. In: J. Pediatr Gastroenterol, Nutr., 1995, Oct. 21, 3, S. 288-296;;**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verwendung von Casein zur Bekämpfung von Helicobacter**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Casein in diätetischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen, die darauf ausgerichtet sind, einen Befall der Magenschleimhaut bei Säugetieren zu verhindern oder zu bekämpfen, wobei das Casein der Zusammensetzungen Fe(II) zu Fe(III) oxidiert und somit den Bakterien Fe(II) aus ihrem Lebensmilieu entzieht und verhindert, dass die darauf angewiesenen Bakterien sich an die Magenschleimhaut anheften, dort proliferieren und zu Verletzungen oder Erkrankungen führen, die mit einer H. pylori Infektion in Verbindung gebracht werden können. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und deren Verwendungen stellen somit eine kostengünstige und wirksame, nebenwirkungsarme Behandlungsmöglichkeit dar, die die Resistenzbildung von H. pylori verhindert.

**Beschreibung**

## Technisches Gebiet

**[0001]** Die vorliegende Patentanmeldung betrifft die Verwendung von Casein zur Prävention und Bekämpfung von *Helicobacter pylori*-Infektionen des Gastrointestinaltrakts bei Menschen und Tieren. Ferner betrifft die vorliegende Anmeldung die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prävention und Behandlung von *Helicobacter pylori*-Infektionen des Gastrointestinaltrakts.

## Stand der Technik

**[0002]** *Helicobacter pylori* ist ein spiralartiges, Urease-produzierendes Bakterium, das auf dem gastralen Epithel und in der darüberliegenden Schleimbarriere angesiedelt ist. Zwischen der Besiedlung des Magens und Erkrankungen durch *H. pylori*, beispielsweise Gastritis und Ulkuserkrankungen des Darms, besteht ein starker Zusammenhang. Eine erfolgreiche Therapie der bakteriellen Infektion führt zur Beschleunigung der Ulkusheilung und drastischen Reduktionen von Rezidiven. Weitere Krankheiten des oberen Gastrointestinaltrakts werden mit einer *H. pylori*-Infektion in Zusammenhang gebracht. Hierzu gehören die Dyspepsie, das Magenkarzinom, das MALT-Lymphom und die Riesenfaltengastritis.

**[0003]** Es wird vermutet, dass fast 50% der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert sind. Der Übertragungsweg des Bakteriums ist noch nicht bekannt. In Europa findet man bei ungefähr 10% der unter 30-jährigen eine Besiedlung mit diesem Keim.

**[0004]** Infektionen und einige Erkrankungen durch eine Infektion mit *H. pylori* werden gegenwärtig mit der einwöchigen sogenannten Tripletherapie behandelt, bei denen säurehemmende Protonenpumpenhemmer in Kombination mit zwei Antibiotika z. B. (Clarithromycin/Metronidazol, Clarithromycin/Amoxicillin, Amoxicillin/Metronidazol) eingesetzt werden.

**[0005]** Während diese Therapie in der Mehrzahl der Fälle erfolgreich ist, sind Resistenzprobleme (insbesondere bei Metronidazol) und die Tatsache, dass Breitbandantibiotika ohne jegliche Selektivität für *H. pylori* eingesetzt werden müssen, von Nachteil. Außerdem handelt es sich hierbei nicht um eine antibiotische Monotherapie.

**[0006]** Unabhängig von der Entwicklung neuer Therapieformen bzw. neuer Antibiotika wird die Durchführbarkeit anderer wissenschaftlicher Denkansätze geprüft. Beispiele hierfür sind die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *H. pylori*, die spezifische Blockierung der Adhäsion und der Motilität des Bakteriums sowie die Hemmung der bakteriellen Urease. Es ist ferner wünschenswert, Wege zu finden, die verhindern, dass *Helicobacter pylori* den Gastrointestinaltrakt infiziert, bzw. ist es ein Ziel, eine Neuinfektion nach einer erfolgreichen Behandlung zu verhindern oder zu begrenzen. Im Hinblick auf die mögliche Entwicklung von Resistenzen gegen Antibiotika, die zur Bekämpfung von *H. pylori* eingesetzt werden, wäre es von großem Interesse, eine günstige Alternative zur Bekämpfung der Infektionen zur Verfügung zu stellen.

**[0007]** Die Schädigung des Gastrointestinaltrakts durch *H. pylori* wird unter anderem auf die Bildung sogenannter reaktiver Sauerstoffmetabolite zurückgeführt, wobei Eisenionen eine besondere Bedeutung bei der Lipidperoxidation und beim Induzieren der Lyse der Zellen zukommt (Joriaki Yajima et al., *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 40, No. 4 (April 1995), Seiten 879–886). Ferner wurde herausgefunden, dass die Verwendung von bovinem Laktoferrin bei *H. pylori*-Infektionen zu einer signifikant hemmenden Wirkung auf die Anheftung von *H. pylori* an das Magenepithel führte, und dass der Serumantikörpertiter gegen *H. pylori* auf ein nichtnachweisbares Niveau absank (Wada. T., et al. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 34(3), 238–243(1999)). Auch E.J. Dial et al (*Digestive Diseases and Sciences*, 42(12) 2750 (1998)) beschreiben die Wirkung von Laktoferrin auf die *H. pylori*-Infektion bei Mäusen. Diese Autoren beobachteten, dass Laktoferrin die Vermehrung des Erregers hemmte, und zur teilweisen Abheilung der Schleimhauterkrankungen bei Mäusen führte, die mit *Helicobacter felis* infiziert wurden. Die Autoren weisen ferner darauf hin, dass die durch Laktoferrin-induzierte Hemmung der Vermehrung sich durch den Zusatz von Eisen zum Behandlungsmittel umkehren lies, was daraufhin deutet, dass Eisen für den Stoffwechsel von *Helicobacter*-Bakterien von Bedeutung ist.

**[0008]** Es wurde auf der Grundlage des Stands der Technik nach neuen kostengünstigen Behandlungs- und Präventivmaßnahmen gesucht, um *Helicobacter pylori*-Infektionen zu verhindern, oder zu bekämpfen.

## Beschreibung der Erfindung

**[0009]** Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschend herausgefunden, dass Casein in der Lage ist, Eisen zu oxidieren, und damit präventiv oder kurativ gegen Infektionen durch *Helicobacter pylori* wirkt.

**[0010]** Die Caseine bilden eine uneinheitliche Gruppe von Proteinen, die den Hauptanteil (zwischen 76–86%) der in der Milch enthaltenen Eiweiße ausmachen. Die Caseinfraktion setzt sich aus  $\alpha_{s1}$ -Casein (38%; Gew.%),  $\alpha_{s2}$ -Casein (10%),  $\beta$ -Casein (36%) und  $\kappa$ -Casein (13%) zusammen. Dazu kommen noch  $\gamma$ -Caseine, die durch das Milchenzym Plasmin als Fragmente aus  $\beta$ -Casein freigesetzt werden und Proteose-Peptide, sie stellen durch Plasmin hydrolysierte N-terminale Fragmente des  $\beta$ -Caseins dar.

**[0011]** In frischer Milch liegen die Caseine kolloid-dispers verteilt als mehr oder weniger runde Micellen vor. Hierbei sind zwei Formen, die Submicellen und die Micellen, zu unterscheiden. Eine Caseinmicelle ist aus mehreren Submicellen aufgebaut. Für ihre Entstehung ist Calciumphosphat notwendig, das die einzelnen Submicellen verbindet. Der Calciumgehalt dieser Komplexe beträgt durchschnittlich 2,9%, der Phosphorgehalt liegt bei 0,8%. Die einzelnen Caseinmicellen der Milch haben einen Durchmesser zwischen 0,02 und 0,4  $\mu\text{m}$  und bestehen aus 20.000–150.000 Caseinmolekülen.

**[0012]** Casein wirkt positiv auf die Versorgung des Organismus mit Mineralstoffen und Spurenelementen. Ursache hierfür ist die hohe Bindungsrate des in der Milch enthaltenen Calciums und Phosphors an Casein. 20% beider Mineralien, 5% des Magnesiums, 28% des Zinks, 17% des Kupfers und 27% des Eisens sind an Caseine gebunden. An Eiweiß gebundenes Calcium wird als beste Calcium-Quelle für den Organismus angesehen, da es sich hier um eine vom Körper verwertbare Form des Calcium-Angebotes handelt. Im Vergleich zur Ionenform ist die Verfügbarkeit von Calcium im labgefällten Casein mit 144 zu 100 deutlich erhöht. Casein aus der Sauermilchkäseherstellung ist allerdings arm an Calcium, da während der Säuregerinnung das Calcium des Caseins durch Hydronium-Ionen ausgetauscht wird. Durch Hitze denaturiertes Casein verringert die Bioverfügbarkeit von Calcium im Vergleich zu nativem Casein deutlich.

**[0013]** Es wurde überraschend herausgefunden, dass durch die Verwendung des Caseins eine pharmazeutische Zusammensetzung erhalten wird, die bei oraler Verabreichung zur Prävention, bzw. Bekämpfung einer *Helicobacter*-Infektion in der Lage ist, insbesondere bei einer Infektion durch *Helicobacter pylori*.

**[0014]** Ferner wurde überraschenderweise herausgefunden, dass Casein erfindungsgemäß sogar zur Behandlung von Ulkuserkrankungen, die durch Infektionen mit *H. pylori* mit verursacht werden, einsetzbar ist.

**[0015]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine pharmazeutische Zusammensetzung Casein, das aus der Milch von Rindern, Ziegen, Schafen, Büffeln, Kamelen, u.a. milchgebenden Tieren gewonnen wird.

**[0016]** Die erfindungsgemäße caseinhaltige Zusammensetzung kann außerdem zur Herstellung einer Zusammensetzung verwendet werden, die weitere, zur Herstellung von diätetischen und/oder angereicherten Nahrungsmittel geeignete Zusatzstoffe und/oder pharmazeutisch annehmbare Zusatzstoffe und/oder Trägermaterialien umfasst.

**[0017]** Erfindungsgemäß kann Casein zur Herstellung von Nahrungsmitteln, zum Beispiel diätetischer Nahrungsmittel und/oder Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden, wodurch diese die Eigenschaft erhalten, die Infektion von *H. pylori* zu verhindern oder zu bekämpfen, sowie Erkrankungen zu lindern oder zu heilen, die mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert sind. Beispiele für derartige Nahrungsmittel sind feste oder flüssige Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel, wie Milchprodukte oder Fruchtsäfte, die mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung angereichert sind, aber auch andere Nahrungsmittel sind denkbar.

**[0018]** Ferner ist die erfindungsgemäße Zusammensetzung zur Behandlung und Prävention von Infektionen mit *H. pylori* bei Säugern, wie Pferde, und insbesondere beim Menschen, verwendbar.

**[0019]** Die Dosierung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung kann je nach Krankheitsindikation, Alter, Gewicht und Geschlecht der zu behandelten Person variieren. Ferner kann die Konzentration der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Säugerart angepasst werden.

**[0020]** Die Konzentration der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in diätetischen und/oder angereicherten Nahrungsmitteln kann in Abhängigkeit vom ausgewählten geeigneten Zusatzstoff und/oder Trägerstoff variieren, wobei insbesondere Rücksicht auf die organoleptischen Eigenschaften des Endproduktes genommen

wird.

**[0021]** Besonders bevorzugt werden außerdem die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Bekämpfung/Prävention einer Infektion mit *H. pylori* mittels der Oxidierung von Eisen im Lebensmilieu des Bakterium verwendet. Insbesondere werden daher die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sowie deren Gebrauch zur Eisenoxidierung beansprucht, wobei die Eisenoxidierung im Lebensraum von *H. pylori* der präventiven Hemmung der Bakterienproliferation, der Bekämpfung beim Befall und der Prävention gegen einen Wiederbefall von *H. pylori* dient.

**[0022]** Insbesondere wird daher mit Hilfe der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eine Hemmung der Proliferation von *H. pylori* erzielt, wobei die Hemmung auf einen Entzug von nichtoxidiertem Eisen zurückzuführen ist.

**[0023]** Besonders bevorzugt werden auch erfindungsgemäße Zusammensetzungen, die eine Adhäsion von *H. pylori* an das Magenepithel verhindern.

**[0024]** Des weiteren wird die Verwendung von erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten beansprucht, die zur Behandlung und Verbesserung, d. h. einer Verheilung von Schleimhauterkrankungen nützlich sind.

**[0025]** Noch bevorzugter verhindern die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen die Entstehung von Erkrankungen der Magenschleimhaut und anderer Erkrankungen, die von einer *H. pylori*-Infektion begünstigt oder verursacht werden, wobei Ulkuserkrankungen, Gastritis, Riesen-zottengastritis, Magenkarzinom, MALT-Lymphom oder Dyspepsie besonders bevorzugt sind.

**[0026]** Die Konzentration des Caseins in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen beträgt bevorzugt 0,01–99,9 Gew.-%, wobei 0,1–90 Gew.-% mehr bevorzugt sind, noch mehr bevorzugt sind 1–90 Gew.-% und am meisten bevorzugt liegt die prozentuale Konzentration der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zwischen 2–80 Gew.-%.

**[0027]** In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform hat sich eine Mikroverkapselung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung als besonders vorteilhaft gezeigt. Die Mikroverkapselung kann z.B. wie in den Patent-Offenlegungsschriften DE 198 54 749 A1 und DE 100 08 880 A1 und dem Gebrauchsmuster DE 296 23 285 U1 beschrieben, erfolgen. Dabei wird die Verbindung zum Beispiel in einer Hülle aus einem Polysaccharid, wie z.B. Alginat, fest eingeschlossen. Damit der möglicherweise unverdauliche Hüllstoff eine Freisetzung der Verbindung nicht verhindert und dadurch eine ernährungsphysiologische Nutzung durch den Organismus unmöglich macht, kann eine verdauliche Komponente, wie z.B. Stärke der Umhüllung beigefügt werden. Durch geschickte Wahl und/oder Kombination der löslichen und unlöslichen Umhüllungskomponenten kann so die Abgabe der mikroverkapselten pharmazeutischen Zusammensetzung in verschiedenen Bereichen des Verdauungstrakts gezielt gesteuert werden. Eine abgestufte Freisetzung im Darm, z.B. eine Freisetzung von 50 bis 80 Gew.-%, bevorzugt von 60 bis 70 Gew.-%, insbesondere von 62,5 Gew.-% im Dünndarm, und eine Freisetzung von 20 bis 50 Gew.-%, bevorzugt von 30 bis 40 Gew.-%, insbesondere von 37,5 Gew.-% im Dickdarm ist ein mögliche Art der gezielten Freisetzung. Ein weiterer vorteilhafter Effekt kann durch eine verlängerte Haltbarkeit durch Schutz der verkapselten Verbindung z.B. vor Umwelteinflüssen erzielt werden.

**[0028]** Die pharmazeutischen Präparate der Erfindung können in jeder möglichen Darreichungsform, wie einer festen oder flüssigen Darreichungsform, vorliegen, z. B. als Dragees, Tabletten, Kapseln, wobei diese Darreichungsformen auf eine dem Fachmann bekannte Weise hergestellt werden und weitere bei der Herstellung von Medikamenten übliche Zusätze enthalten können, z. B. Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Geschmacksstoffe etc. Die Medikament können nach üblichen Verabreichungszeitplänen einmal oder mehrmals täglich verabreicht werden.

#### Ausführungsbeispiel

##### Experiment 1

##### Zielstellung und Prinzip des Experiments

**[0029]** Das Ziel des Experiments bestand darin, die Wirkung von Casein auf die Heilung von Ulzera bzw. auf

die Eradikation von *Helicobacter pylori* im Ulkusmodell der Ratte zu testen. Bei dem verwendeten Modell handelt es sich um ein spezielles Ulkusmodell für das Ratten verwendet werden, die überwiegend mit *Helicobacter* besiedelt sind. Es gilt als gesichert, dass der Befall mit diesen Erregern unter Einwirkung zusätzlicher Risikofaktoren eine erhöhte Ulkusanfälligkeit verursacht. Als solcher Risikofaktor wird im vorliegenden Modell Cysteaminhydrochlorid (Ulcerogen) verwendet. Nach oraler Gabe des Ulcerogens ist 48 Stunden post applicationem ein Ulkus duodenum makroskopisch und histologisch nahezu 100%ig nachweisbar. Das Modell dient sowohl der Untersuchung der Ulcerogenese und Ulkus-Heilung als auch der Testung potentieller UlkusProphylaktika und -Therapeutika. Zu definierten Zeiten (am 2., 5., 8. and 15. Tag) nach der Ulkusinduktion erfolgt die Überprüfung der Ulkus-Heilung in entsprechenden Tierkollektiven mittels makroskopischer Bewertung bei gleichzeitigem Nachweis von *Helicobacter pylori*.

## 2. Zubereitung der Prüfsubstanz

**[0030]** Eine Einwaage von 1,0 g Casein wurde in einem Mörser mit 1,0 ml Cremophor (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Ch.B.:07H1330) sorgfältig verrieben, nach und nach wurde tropfenweise Wasser dazugegeben und auf 10,0 ml aufgefüllt, täglich frisch angesetzt und jeweils umgehend appliziert.

## 3.3 Referenz-Cocktail:

- (1) Metronidazol (Sigma, U.S.A., Ch.-B.:92 HO 285)
- (2) Tetracyclin (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Ch.-B.: H8)
- (3) Basisches Wismutnitrat (in Ulkowitz®-Tabletten, Temmler Pharma GmbH, Marburg, Ch.-B.: 3398511)

## 3.4 Zubereitung des Referenz-Cocktails:

|              |                            |         |             |
|--------------|----------------------------|---------|-------------|
| Tages-Dosis: | (1) 15 mg/kg KG            | Ansatz: | (1) 38 mg   |
|              | + (2) 6 mg/kg KG           |         | + (2) 15 mg |
|              | + (3) 30 mg/kg KG          |         | + (3) 75 mg |
|              | (entspr. ¼ Tabl. Ulkowitz) |         |             |

in 20 ml Wasser bei täglich 2 x Verabreichung

**[0031]** Der Referenz-Cocktail wurde täglich frisch angesetzt.

## 3.5 Ulcerogen

Cysteamin-HCl

(2-Aminoethanthiol-hydrochlorid)  $C_2H_8CINS$  MG = 113,6  $N^+H_3-CH_2-CH_2-SH$  MERCK-Schuchardt, Ch.-Nr. 33211123

Applikation:

einmalig oral; Dosis: 400 mg/kg KG, Applikationsvolumen: 4 ml/kg KG

## 3.6-Versuchsgruppeneinteilung and Dosierung

| Gruppe | Dosis                       | Dosis                    | Anzahl der Tiere | Nummern der Tiere/Geschlecht |
|--------|-----------------------------|--------------------------|------------------|------------------------------|
| 1      | Nachweisgruppe <sup>+</sup> | /                        | 8                | 1-4/m - 5-8/w                |
| 2      | Dosisgruppe                 | 0,1 mg/ml <sup>++</sup>  | 4                | 9-10/m - 11-12/w             |
| 3      | Referenzgruppe              | siehe 3.4 <sup>+++</sup> | 4                | 13-14/m -15-16/w             |
| 4      | Kontrollgruppe              | /                        | 4                | 17-18/m -19-20/w             |

+ Nachweis *Helicobacter pylori* an 8 Tieren 2 Tage nach Applikation des Ulcerogens

++ Applikationsvolumen: 1,0 ml auf 220 g Körpergewicht (KG)

+++ Applikationsvolumen: 4,0 ml/kg KG

## 3.7 Prüfungssystem

Spezies: konventionelle Wistar-Ratten

Herkunft: Tierpark Berlin-Friedrichsfelde GmbH

Begründung für die Spezieswahl:

Ratte als anerkanntes Ulkus-Modell

Gesamttierzahl und Geschlecht:

10 männliche Tiere und 10 weibliche Tiere

Körpergewicht bei Einstellung:

49,6 g–89,4 g (Mittelwert = 59,85 g;

Standardabweichung = 9,83 g)

Körpergewicht bei Prüfbeginn:

171 g–302 g (Mittelwert = 225,2;

Standardabweichung = 32,5 g)

Identifikation: Farbcodierung und Käfigschilder

## 4. Methodik

## 4.1 Versuchsdurchführung

- einmalige orale Applikation des Ulcerogens am Tag 0
- orale Applikation der Prüfsubstanz einmal jeden 2. Tag (Tag 1 bis 14)
- täglich zweimalige orale Applikation der methodenbedingten Referenzsubstanz bzw. einmalig am Wochenende
- Tötung der Versuchstiere and Bewertung (Beeinflussung des Ulkus and Besiedlung der Rattenmagen-Mucosa durch *Helicobacter pylori* und der Grad der Eradikation dieses Keimes) wie folgt:

|                | Tag 2   | Tag 5  | Tag 8  | Tag 15 nach<br>Ulkusinduktion |
|----------------|---------|--------|--------|-------------------------------|
| Nachweisgruppe | 8 Tiere | /      | /      | /                             |
| Dosisgruppe    | /       | 1 Tier | 1 Tier | 2 Tiere                       |
| Referenzgruppe | /       | 1 Tier | 1 Tier | 2 Tiere                       |
| Kontrollgruppe | /       | 1 Tier | 1 Tier | 2 Tiere                       |

[0032] Die Tötung erfolgte durch Entbluten aus der Arteria carotis nach Ethernarkose.

## 4.2 Körpergewichtsbestimmungen

[0033] Die Bestimmung der Körpergewichte erfolgte bei Tiereingang, an jedem Applikationstag während der

Prüfphase and vor der Tötung.

#### 4.3 Versuchsauswertung

##### Schweregrad

**[0034]** Der Schweregrad der in Pylorusnähe entstandenen Duodenal-Geschwüre wurde nach folgender Bewertungsskala eingestuft:

- 0: kein Ulkus, keine sichtbare Läsionen der Mukosa
- 1: Erosion, rinnenförmige Läsion ausschließlich in der Mukosa
- 2: Schädigung lokal deutlich umgrenzt, auch tiefere Schichten erfassend (Lamina muscularis and Submukosa), länglich elliptische Form
- 3 = Ulkus sehr schwer, äußere Muskelschicht zerstört, perforierend

**[0035]** Für ein gleichbehandeltes Tierkollektiv wurde die mittlere Bewertungszahl (mBZ) errechnet:

$$mBZ = \frac{\sum \text{aller Schweregrade}}{\text{Anzahl der Versuchstiere}}$$

Prozentuale Häufigkeit

**[0036]** Es wurde der prozentuale Anteil (%U) der Tiere mit Duodenal-Ulzera der Schweregrade 1–3 ermittelt.

##### Ulkus-Index

**[0037]** Der Ulkus-Index (UI) stellt das Produkt aus der mittleren Bewertungszahl und dem prozentualen Anteil der Tiere mit Duodenalulzera aller Schweregrade dar:

$$UI = mBZ \times \%U$$

##### Flächenmessung

**[0038]** Des Cysteamin-induzierte Duodenal-Ulkus der Ratte hat in der Aufsicht die Form einer Ellipse. Für die Ermittlung der Fläche wurden folglich der große Durchmesser (D) sowie der kleine Durchmesser (d) bestimmt. Die Fläche A wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$A = \frac{\pi}{4} \cdot D \cdot d$$

##### Nachweis von Helicobacter pylori

##### Arbeitsablauf:

1. Entnahme von Biopsatproben aus dem Bereich des Antrums der Schleimhaut des Rattenmagens
2. Überführung in ein spezifisches Transportmedium
3. Keimnachweis mit 3 parallel durchgeführten Bestimmungs-Methoden
  - 3.1 Schnelldiagnose bakterieller Urease-Aktivität, CUT-Campylobacter-Urease-Test  
Ergebnisse verfügbar nach 30 min
  - 3.2 Mikroskopischer Direktnachweis von histologischen Präparaten nach spezieller Gramfärbung
  - 3.3 Kultivierung in selektivem Medium in spezieller mikroaerophiler Atmosphäre bei anschließender Identifikation (Ergebnisse nach einer Kultivierungszeit von 3–5 Tagen)

**[0039]** Eine Entscheidung "Helicobacter-pylori-positiv (HP+)" wurde gefällt, wenn mindestens 2 Bestimmungsmethoden zu einem positiven Ergebnis geführt haben.

## 5. Ergebnisse

## 5.1 Körpergewichtsentwicklung

**[0040]** Die Werte der Körpergewichtsentwicklung über den Prüfzeitraum in den Versuchsgruppen 2, 3 und 4 sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Körpergewichte in g

Tage p. a. Ulcerogen

---

**Dosisgruppe**

| Tier Nr. | Geschl. | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
|----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 9        | m       | 272,9 | 284,6 | /     | 308,0 | /     | 318,1 | #     | #     |
| 10       | m       | 258,8 | 277,6 | /     | 305,9 | /     | 323,9 | /     | 331,9 |
| 11       | w       | 202,3 | 199,3 | /     | 216,2 | /     | 226,1 | /     | 226,7 |
| 12       | w       | 180,6 | 191,2 | /     | 202,2 | /     | 210,5 | /     | 212,5 |

**Referenzgruppe**

|    |   |       |       |       |       |   |       |       |       |
|----|---|-------|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|
| 13 | m | 302,4 | 312,4 | 324,6 | 331,1 | / | 347,1 | #     | #     |
| 14 | m | 272,1 | 182,8 | 297,2 | 304,0 | / | 318,0 | 324,7 | 326,2 |
| 15 | w | 170,6 | 171,0 | 168,9 | 169,1 | / | 184,1 | 191,3 | 191,0 |
| 16 | w | 175,2 | 184,2 | 180,0 | 196,0 | / | 205,3 | 206,3 | 206,1 |

**Kontrollgruppe**

|    |   |       |   |   |   |   |       |   |       |
|----|---|-------|---|---|---|---|-------|---|-------|
| 17 | m | 282,7 | / | / | / | / | 288,3 | # | #     |
| 18 | m | 208,4 | / | / | / | / | 244,8 | / | 249,3 |
| 19 | w | 190,1 | / | / | / | / | 206,8 | / | 208,6 |
| 20 | w | 203,4 | / | / | / | / | 223,2 | / | 2310  |

**[0041]** Die Körpergewichtsentwicklung war in der Dosisgruppe (Gruppe 2) beeinträchtigt. In der Kontrollgruppe zeigt sich auf Grund des hohen Schweregrades der Ulzera bei den Tieren 18 und 20 eine deutliche Gewichtsreduzierung in den letzten Prüftagen.

**Dosisgruppe**

| Tier Nr. | Geschl. | Tag 8  | Tag 9  | Tag 10 | Tag 11 | Tag 12 | Tag 13. | Tag 14 | Tag 15 |
|----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| 10       | m       | 331,7  | 338,0  | 348,8  | 348,5  | 353,8  | 357,4   | 356,7  | 372,4  |
| 11       | w       | 234,6  | #      | #      | #      | #      | #:      | #      | #      |
| 12       | w       | 2 14,7 | 2 18,9 | 219,2  | 2 18,3 | 227,5  | 227,3   | 231,4  | 233,2  |

**Referenzgruppe**

|    |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 14 | m | 336,0 | 341,3 | 350,1 | 350,8 | 366,1 | 364,5 | 383,5 | 386,0 |
| 15 | w | 193,6 | #     | #     | #     | #     | #     | #     | #     |
| 16 | w | 211,5 | 215,7 | 219,9 | 219,6 | 231,4 | 230,8 | 238,0 | 241,7 |

**Kontrollgruppe**

|    |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 18 | m | 260,9 | 266,2 | 281,3 | 281,3 | 275,1 | 254,8 | 252,4 | 250,1 |
| 19 | w | #     | #     | #     | #     | #     | #     | #     | #     |
| 20 | w | 233,1 | 234,2 | 244,5 | 237,6 | 221,6 | 209,3 | 210,4 | 204,6 |

# Tiere bereits getötet  
/ keine Wägung

**5.2 Versuchsauswertung**

**[0042]** Die Ergebnisse der Prüfbehandlung sind in der Tabelle 2 dargestellt.

**[0043]** Die Tiere der Nachweisgruppe (Gruppe 1) wurden 2 Tage nach Applikation des Ulcerogens getötet und ausgewertet. Für den Ulkus-Index wurde ein Wert von 124,5 bei einem 75%igen Anteil der Tiere mit Ulzera and bei einem 50%igen *Helicobacter pylorus*-Befall ermittelt.

**[0044]** 15 Tage nach Applikation des Ulcerogens ergab die Auswertung der Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe 2) einen Ulkus-Index von 250 bei 100%igen Ulkus- und *Helicobacter*-Befall. In der Kontrollgruppe, die ohne Behandlung blieb, verstarb ein Tier aufgrund des hohen Schweregrades des Ulkus bereits am Tag 7 p.a. Ulcerogen.

**[0045]** Gegenüber der Kontrollgruppe verringert sich der Ulkus-Index in der Dosisgruppe (Gruppe 3) auf UI = 50 and in der Referenzgruppe (Gruppe 4) auf UI = 170 und zeigt damit unter den gegebenen Prüfbedingungen einen Behandlungserfolg. Der Behandlungserfolg zeigt sich auch darin, dass in der Dosis-Gruppe and in der Referenzgruppe die Eradikation von *Helicobacter pylori* bei 100% lag und somit bei den ausgewerteten Tieren *Helicobacter pylori* nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2: Wirkung von Casein auf Ulkus duodeni/Ulkus ventriculi bzw. auf Helicobacter pylori (Hp) am Ratten-Ulkus-Modell

| Tags p. a Ulcerogen                                  |     | 2     | 5   | 8   | 15  |
|------------------------------------------------------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Gruppe<br>(Anzahl ausgewerteter Tiere)<br>Behandlung |     |       |     |     |     |
| <u>1 Nachweis- Gruppe</u>                            | I   | 124,5 | #   | #   | #   |
| (n=8)                                                | II  | 75    | #   | #   | #   |
| ohne Behandlung                                      | III | 50    | #   | #   | #   |
| <u>2 Dosis- Gruppe</u>                               | I   | /     | 200 | 0   | 50  |
| (n = 4)                                              | II  | /     | 100 | 0   | 50  |
| Casein (a)                                           | III | /     | 100 | 0   | 0   |
| <u>3 Referenz - Gruppe</u>                           | I   | /     | 0   | 300 | 170 |
| (n = 4)                                              | II  | /     | 0   | 100 | 100 |
| Cocktail (b)                                         | III | /     | 0   | 100 | 0   |
| <u>4 Kontroll-Gruppe</u>                             | I   | /     | 150 | 300 | 250 |
| (n = 4)                                              | II  | /     | 100 | 100 | 100 |
| ohne Behandlung                                      | III | /     | 0   | (c) | 100 |

(a) Applikation per oral einmal jeden 2. Tag, Dosis: 0,1 mg/ml,

Appl.-Vol. = 1,0 ml/220 g KG

(b) Cocktail: – Basisches Wismutnitrat 30 mg/kg KG

– Metronidazol 15 mg/kg KG

– Tetracyclin: 6 mg/kg KG

Applikation peroral 2 × täglich bzw. am Wochenende mit einmaliger Tagesdosis (Appl.-Vol. = 4,0 ml/kg KG)

(c) Tier bereits am 7. Tag verendet, deshalb kein Helicobacter pylori-Nachweis möglich

I UI (Ulkusindex)

II %U (prozentualer Anteil Anteil Ulzera)

III %Hp (Helicobacter pylori-Nachweis)

### Patentansprüche

1. Verwendung von Casein zur Herstellung einer Zusammensetzung zur Prävention oder Bekämpfung einer Helicobacter Infektion oder zur Behandlung von Erkrankungen die auf eine Infektion mit Helicobacter zurückzuführen sind.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Casein aus der Milch von Rindern, Schafen, Ziegen, Büffeln, Kamelen oder anderen Säugetieren gewonnen wird.

3. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Oxidierung von Eisen.

4. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 3 zur Oxidierung von Eisen im Gastrointestinaltrakt.

5. Verwendung der Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 bis 4 zur Oxidierung von Eisen im Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren.

6. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Zusammensetzung oral verabreicht wird.

7. Verwendung der Zusammensetzung gemäß einem der vorherigen Ansprüche in einem Nahrungsmittel

oder in einem Nahrungsergänzungsmittel.

8. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Heilung oder Linderung von Ulkuserkrankungen, Dyspepsie, MALT-Lymphon, Gastritis, Riesen-zottengastritis oder Magenkarzinom.

9. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Adhäsion von *Helicobacter pylori* an die Magenschleimhaut verhindert wird.

10. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Zusammensetzung 0,01–99,9 Gew.% an Casein enthält.

11. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Infektion eine Infektion mit *Helicobacter pylori* ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen