(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 36 740 T2** 2008.04.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 481 682 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 36 740.9**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 076 034.0**
(96) Europäischer Anmeldetag: **09.12.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.12.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **01.08.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.04.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 35/74*** (2006.01)
A61K 36/064 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A23L 1/308 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
1010770 **09.12.1998** **NL**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
N.V. Nutricia, Zoetermeer, NL

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(72) Erfinder:
De Jong, Patricia, 6026 AM Maarheeze, NL; Van Laere, Katrien, 6666 WS Heteren, NL

(54) Bezeichnung: **Oligosaccharide und Probiotica enthaltendes Präparat**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Präparat, das eine gesundheitsfördernde Wirkung hat, insbesondere zur Verhinderung und/oder Behandlung von Störungen des Verdauungstrakts, insbesondere des Darmes.

[0002] Die Patentanmeldung bezieht sich insbesondere auf ein Präparat dieses Typs, welches Probiotika und nicht-verdaubare Oligosaccharide enthält, wie in Anspruch 1 definiert.

[0003] Es ist bekannt, dass bestimmte Mikroorganismen sowohl eine vorbeugende als auch eine therapeutische Wirkung auf Darmkrankheiten, wie Darminfektionen, haben. Wenn diese Mikroorganismen an Menschen oder Tiere verabreicht werden, konkurrieren sie mit pathogenen Bakterien um Nährstoffe und/oder Haftstellen an der Darmwand, wobei als Ergebnis die Zahl von pathogenen Bakterien abnimmt und Infektionen verhindert oder verringert werden. Solche Mikroorganismen werden gewöhnlich mit dem Ausdruck "Probiotika" bezeichnet.

[0004] Wenn diese Mikroorganismen eine optimale Wirkung haben sollen, müssen sie den Darm lebend erreichen. Eine weitere vorteilhafte Wirkung der Verabreichung von lebenden Mikroorganismen an den Darm ist z.B., dass sie fähig sind, die im Darm vorhandenen Oligosaccharide zu fermentieren, wodurch z.B. Fettsäuren mit kurzen Ketten gebildet werden.

[0005] Darüber hinaus ist es aus wirtschaftlichen Gründen vorteilhaft, wenn so viele Mikroorganismen wie möglich den Darm lebend erreichen. Bei den gewöhnlichen Präparaten, welche Probiotika enthalten, ist der Prozentsatz von Mikroorganismen, der den Darm lebend erreicht, häufig niedrig.

[0006] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Präparat bereitzustellen, das solche Probiotika enthält, bei denen ein hoher Prozentsatz der verabreichten Mikroorganismen den Darm lebend erreicht.

[0007] Es ist auch eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Präparat bereitzustellen, das zur Behandlung von Störungen des Darmes verwendet werden kann und/oder zur vorbeugenden Behandlung des Darmes verwendet werden kann.

[0008] Die vorliegende Erfindung bezieht sich nun auf ein Präparat mit einer gesundheitsfördernden Wirkung, insbesondere zur Verhinderung und/oder Behandlung von Störungen des Verdauungstraktes, insbesondere des Darmes, welches Probiotika und nicht-verdaubare Oligosaccharide enthält, wie in Anspruch 1 definiert.

[0009] Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass die Oligosaccharide ein Substrat für die Probiotika bilden, als Ergebnis dessen die Wahrscheinlichkeit ansteigt, dass die Mikroorganismen den Darm lebend erreichen, und als Ergebnis dessen die Wahrscheinlichkeit ansteigt, dass sie fähig sind, in Kombination mit den im Darm vorhandenen Oligosacchariden ihre vorteilhafte Wirkung auszuüben. Die Oligosaccharide könnten daher auch als "Präbiotika" bezeichnet werden.

[0010] Die Probiotika und die nicht-verdaubaren Oligosaccharide sind in dem Präparat in einem Verhältnis von 1 bis 5 g Oligosaccharide pro 10^8 bis 10^{11} Zellen des Probiotikums vorhanden.

[0011] Die verwendeten Oligosaccharide sind aus den sogenannten "nicht-verdaubaren Oligosacchariden" ausgewählt, d.h. Oligosaccharide, die nicht vom menschlichen oder tierischen Körper absorbiert werden. Als Regel haben diese Oligosaccharide einen Polymerisationsgrad von 2 bis 20. Das bedeutet, dass die Oligosaccharide aus 2 bis 20 Monosaccharideinheiten bestehen. Im Falle eines Polymerisationsgrades von weniger als 2, d.h. im Falle des Monosaccharids, ist das Präparat nicht wirksam, da solche Monosaccharide vom menschlichen oder tierischen Körper absorbiert werden. Bei einem Polymerisationsgrad von größer als 20 verlieren die Oligosaccharide ihre vorteilhafte Wirkung.

[0012] Bevorzugt haben die Oligosaccharide einen Polymerisationsgrad von 2 bis 10, bevorzugter von 2 bis 6 und noch bevorzugter von 3 bis 10 und noch bevorzugter von 3 bis 6.

[0013] Wo in der vorliegenden Patentanmeldung auf Oligosaccharide Bezug genommen wird, wird dieser Ausdruck so gebraucht, dass er sich sowohl auf Oligosaccharide mit einer spezifischen Kettenlänge und auf Mischungen von Oligosacchariden mit verschiedenen Kettenlängen bezieht. Eine Mischung von Oligosacchariden mit verschiedenen Kettenlängen ist jedoch bevorzugt.

[0014] Weiterhin bestehen die Oligosaccharide gewöhnlich nicht vollständig aus Disacchariden. Der Disaccharidgehalt ist gewöhnlich kleiner als 90 % und manchmal kleiner als 60 %.

[0015] Als Regel ist der mittlere Polymerisationsgrad größer als 2,1, gewöhnlich größer als 2,5.

[0016] Als Regel werden die in der Erfindung verwendeten Oligosaccharide weiterhin so ausgewählt, dass sie wenigstens zu 20 % als Substrat für die probiotischen Mikroorganismen, die in dem Präparat vorhanden sind, verwendbar sind, bestimmt durch Hochleistungs-Anionenaustauschchromatografie.

[0017] Beispiele von geeigneten Oligosacchariden sind Transgalactooligosaccharide (TOS), Fructooligosaccharide (FOS) und Kombinationen davon.

[0018] Es ist besonders vorteilhaft, wenn die Oligosaccharide zu dem Präparat in Form eines Hydrolyseproduktes eines oder mehrerer Polysaccharide, z.B. ausgewählt aus β-(Arabino)galactanen, β-(Arabino)xylanen, β-Glucanen, β-Glucomannanen, β-Galactomannanen, α-Arabanen, Inulin und Kombinationen davon, zugesetzt werden. Zusätzlich zu den Oligosacchariden kann ein solches Hydrolyseprodukt auch noch weitere Komponenten enthalten, wie Monosaccharide und Saccharide mit einem Polymerisationsgrad höher als 20. Das Hydrolyseprodukt muss jedoch wenigstens 50 % nicht-verdaubare Oligosaccharide, vorzugsweise wenigstens 70 %, enthalten.

[0019] Die Polysaccharide, die vorzugsweise hydrolysiert werden, sind β-(Arabino)galactane, β-Mannane und Xylane.

[0020] Es ist auch möglich, ein Hydrolyseprodukt von einer oder mehreren Fasern zu verwenden, die hauptsächlich aus den vorstehend genannten Oligosacchariden bestehen, wie Fasern von Hafer, Weizen, Kartoffeln, Zuckerrübe, Sojapolysacchariden und Ähnliches.

[0021] Die Hydrolyse des Polysaccharids bzw. der Polysaccharide und/oder der Faser(n) kann in bekannter Weise durchgeführt werden, z.B. durch die Verwendung von geeigneten Enzymen.

[0022] Die Konzentration von Oligosacchariden in dem Präparat ist derart, dass 0,5 bis 20 g pro Tag verabreicht werden können. Falls erwünscht, kann diese Verabreichung über den Tag verteilt werden, solange die Gesamtmenge der verabreichten Oligosaccharide in dem vorstehend beschriebenen Bereich bleibt. Im Allgemeinen wird das Präparat 2 bis 4 mal pro Tag verabreicht.

[0023] Im Allgemeinen machen die Oligosaccharide 5 Gew.-% bis 50 Gew.-% des Gesamtpräparats aus.

[0024] Die für die vorliegende Erfindung geeigneten Probiotika sind allgemein bekannt. Sie umfassen einen oder mehrere Bakterienstämme, die zur Verwendung in Nahrungspräparaten geeignet sind, nämlich Lactobacillus, Bifidobacterium oder Propionibacterium, und einen oder mehrere Hefestämme, die zur Verwendung in Nahrungspräparaten geeignet sind, nämlich Saccharomyces oder eine Kombination davon. Diese Probiotika haben gewöhnlich GRAS-Status ("Generally Recognised As Safe") ("allgemein als sicher anerkannt").

[0025] Geeignete Bakterienstämme sind z.B. ausgewählt aus solchen, die in EP 0 904 784 im Namen des Anmelders beschrieben sind. Andere mögliche Probiotika sind Pediococcus-, Propionibacterium- oder Leuconostoc-Arten. Die Lactobacillus- und Bifidobacterium-Arten und Kombinationen davon sind zu bevorzugen.

[0026] Der verwendete Bifidobacterium-Stamm kann jeder Stamm sein, der zur Anwendung bei Menschen und Tieren geeignet ist und bevorzugt auch anerkannt ist, wie Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium lactis oder Bifidobacterium longum, oder eine Kombination davon.

[0027] Der Lactobacllius-Stamm wird bevorzugt so ausgewählt, dass er hauptsächlich, bevorzugt ausschließlich, rechtsdrehendes (L+)-Lactat produziert. Hiermit ist gemeint, dass das produzierte Lactat weniger als 5 %, bevorzugt weniger als 2 %, linksdrehendes Lactat ist. Es ist natürlich möglich, dass der Mikroorganismus andere Metaboliten zusätzlich zu Lactat produziert, und dass die vorteilhafte Wirkung des Mikroorganismus (auch) auf der Bildung dieser weiteren Metaboliten basieren kann.

[0028] Beispiele hiervon sind Lactobacllius acidophilus, Lactobacllius brevis, Lactobacllius (para)casei, Lactobacllius fermentum, Lactobacllius plantarum und Lactobacllius rhamnosus und Kombinationen davon.

[0029] Der in der Erfindung verwendete Hefestamm gehört zur Gattung Saccharomyces. Beispiele von geeigneten Saccharomyces-Arten sind Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces boulardii.

[0030] Die Hefe in dem Präparat kann lebend oder tot sein. Sowohl tote als auch lebende Hefe enthält einen hohen Gehalt von Mannoproteinen, die befähigt sind, die Adhäsion von Bakterien an die Darmwand in einem hohen Ausmaß zu verhindern. Die Verabreichung von toter Hefe hat Vorteile in dem Falle von Personen, die an entzündlichen Darmkrankheiten leiden.

[0031] Wenn die Hefe in toter Form verwendet wird, muss wenigstens ein anderer lebender Mikroorganismus verwendet werden. Ein solcher lebender Organismus kann wiederum ausgewählt werden sowohl aus Lactobacilius-, Bifidobacterium- Pediococcus-, Propionibacterien- und Leuconostoc-Stämmen, kann aber auch lebende Saccharomyces sein.

[0032] Die Gesamtkonzentration der Probiotika beträgt 10^6 bis 10^{12}, bevorzugt 10^9 bis 10^{10}, lebende Zellen pro Gramm des Gesamtprodukts. Wenn eine Kombination von Mikroorganismen verwendet wird, muss die minimale Konzentration jedes Mikroorganismus derart sein, dass man noch von lebenden Organismen reden kann, das heißt, wenigstens annähernd 10 pro Gramm des Produkts. Die Gesamtkonzentration der Mikroorganismen muss immer in dem vorstehenden spezifizierten Bereich von 10^6 bis 10^{12} lebenden Zellen pro Gramm des Gesamtprodukts liegen.

[0033] Wenn tote Saccharomyces cerevisae ebenfalls verwendet wird, wird sie in einer Menge von 0,5 bis 5 g pro Tag verabreicht.

[0034] Die Kombination von Lactobacillus rhamnosus mit Transgalactooligosaccharid oder Hydrolyseprodukten von (Kartoffel)-Galactan wird als eine besonders geeignete Kombination von Oligosaccharid und Probiotikum befunden.

[0035] Die Eignung eines speziellen Oligosaccharids für ein spezielles Probiotikum kann bestimmt werden, indem die Fähigkeit des Mikroorganismus betreffend die Fermentation des Oligosaccharids oder der Oligosaccharidfraktion festgestellt wird. Ein spezifisches Verfahren hierfür wird nachstehend in den Beispielen wiedergegeben.

[0036] Die Verabreichungsformen des Präparats gemäß der Erfindung sind als Regel analog zu denjenigen, die in EP-A-0 904 784 im Namen des Anmelders beschrieben sind, wovon der Inhalt hierin durch Bezug eingeschlossen ist. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass gemäß der vorliegenden Erfindung auch nur ein probiotischer Mikroorganismus (einschließlich einer Hefe) vorhanden sein kann, und dass zusätzlich zu dem einen oder mehreren probiotischen Mikroorganismen auch ein oder mehrere Oligosaccharide in den vorstehend spezifizierten Mengen eingearbeitet sein können.

[0037] Die Präparate gemäß der vorliegenden Erfindung können unter anderen in Form einer Nahrungsergänzung, einer Gesamtnahrung und einer klinischen Nahrung verabreicht werden. Es wird in gleicher Weise Bezug genommen auf EP 0 904 784 für die spezifischen Additive, welche solchen Nahrungsmitteln zugesetzt werden, und auf die Herstellung und Anwendungen von solchen Nahrungsmitteln.

[0038] Die Probiotika werden bevorzugt zu dem Präparat in (gefrier-)getrockneter Form zugesetzt. Es ist auch möglich, flüssige Präparate herzustellen, diese müssen aber kühl gelagert werden. Weiterhin können ein oder mehrere der Mikroorganismen in eingekapselter Form verwendet werden, z.B. um die Lagerfähigkeit zu verbessern.

[0039] Wenn das Präparat gemäß der Erfindung als Nahrungsergänzung verwendet wird, kann es als solches verabreicht werden, es kann mit einer geeigneten trinkbaren Flüssigkeit, wie Wasser, Joghurt, Milch oder Fruchtsaft, vermischt werden, oder es kann mit fester oder flüssiger Nahrung vermischt werden. In diesem Zusammenhang kann die Nahrungsergänzung in Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern, Kissen, Pastillen, Süßigkeiten, Riegeln und entsprechenden Verabreichungsformen, gewöhnlich in Form einer Einheitsdosis, vorliegen.

[0040] Eine Ergänzung gemäß der Erfindung kann z.B. die folgende Zusammensetzung haben:

– Probiotika:	10 bis 40 Gew.-%
– Oligosaccharide:	40 bis 80 Gew.-%
– weitere Additive:	0 bis 40 Gew.-%

bis auf insgesamt 100 Gew.-%.

[0041] Das Präparat kann auch in Form eines Nahrungspräparats vorliegen, das zum direkten Verbrauch geeignet ist, wie Gesamtnahrung oder klinische Nahrung. Dies kann entweder orale Nahrung oder Nahrung zur Verabreichung über einen Tubus oder einen Katheter sein.

[0042] Solche Nahrungsmittel können in fester Form oder in flüssiger/trinkbarer Form vorliegen und können sämtliche übliche Additive für Gesamtnahrung und/oder klinische Nahrung enthalten, einschließlich Proteine, Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente und Ähnliches.

[0043] Eine Gesamtnahrung gemäß der Erfindung kann z.B. die folgende Zusammensetzung haben:

– Probiotika:	0,1 bis 10 Gew.-%
– Oligosaccharide:	1 bis 20 Gew.-%
– weitere Additive:	75 bis 95 Gew.-%

bis auf insgesamt 100 Gew.-%.

[0044] Gemäß einer besonderen Ausführungsform liegt das Präparat gemäß der Erfindung in Form einer (Ergänzung für eine) Babynahrung oder Nahrungsergänzung für Babys vor.

[0045] Die vorstehend beschriebenen Präparate können für die gleichen Anwendungen verwendet werden, wie diejenigen, die in EP 0 904 784 im Namen des Anmelders beschrieben sind, insbesondere bei der Behandlung von Darmstörungen, wie Diarrhoe, wie sie bei Reisen oder nach Behandlung mit Antibiotika auftreten kann, oder die von einer Nahrungsmittelvergiftung herrührt. Eine andere Anwendung ist bei der Behandlung von entzündlichen Darmkrankheiten (IBD), wie Colitis ulcerosa und Crohn-Krankheit. Die Präparate gemäß der Erfindung sind auch für Patienten geeignet, die eine Nahrungsmittelallergie haben, wie eine Allergie gegen Kuhmilch oder gegen Gluten.

[0046] Die Probiotika und nicht-verdaubaren Oligosccharide können auch in Babynahrung verwendet werden, um Darmprobleme zu verhindern oder zu behandeln.

[0047] Die Erfindung wird nun mit Hilfe der folgenden, nicht-beschränkenden Beispiele erläutert.

Beispiele

[0048] Um geeignete Kombinationen von Oligosacchariden und Probiotika zu bestimmen, wurden die nachstehend aufgeführten Mikroorganismen geprüft, um ihre Fähigkeit zu bestimmen, strukturell verschiedene Oligosaccharidfraktionen zu fermentieren. Vorkultivierte Stämme in flüssigem Medium auf der Grundlage von Thioglycolat (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) wurden Subkulturen in Thioglycolat unterworfen, zu welchen 0,5 % (m/V) Oligosaccharide zugesetzt waren. Das zuckerfreie Thioglycolatmedium und die Oligosaccharidlösungen wurden getrennt für 15 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0049] Nach anaerober Inkubation für 48 Stunden bei 37°C wurde der pH mit Hilfe eines Mikro-pH-Meters (Sentron, Roden, The Netherlands) gemessen. Die Änderungen in dem restlichen Oligosaccharidgehalt und die Bildung von Reaktionsprodukten wurden unter Verwendung von HPAEC (Hochleistungs-Anionenaustauschchromatografie) bestimmt. Für die HPAEC-Analyse wurden die Kulturen zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wurde 10-fach mit H_2O verdünnt und 5 Minuten gekocht, um die enzymatische Aktivität abzustoppen. Die Reinheit der Stämme wurde vor und nach der Fermentation geprüft.

[0050] Das HPAEC-System bestand aus einem Dionex Bio-LC GPM-II quaternären Gradientenmodul (Dionex Corporation, Sunnyval, CA, USA), ausgerüstet mit einer Dionex Carbopac PA-100 Säule (4 × 250 mm) in Kombination mit einer Carbopac PA-100-Wächtersäule (3 × 25 mm). Die Proben (20 µl) wurden unter Verwendung eines Spectra Physics SP8880 Autosamplers injiziert. Die Oligomere wurden unter Verwendung eines Gradienten von Natriumacetat in 100 mmol/l NaOH analysiert.

[0051] Die Ergebnisse dieser Versuche sind nachstehend in der Tabelle für eine Anzahl von Kombinationen von Probiotika und Substraten angegeben, worin:

++ eine komplette Fermentation anzeigt,
+ eine Teilfermentation anzeigt und
– keine oder nur eine sehr beschränkte Fermentation anzeigt

Bakterien	Substrat			
	Hydrolyseprodukt von:			
	Arabinogalactanen	Arabanen	Arabinoxylanen	Fructanen
Bi. Breve	++	+	–	++
Bi. Longum	++	++	+	++
Bi. adolescentis	++	+	++	++
L. acidophilus	++	–	–	+
L. fermentum	++	–	–	+
K. pneumoniae	++	–	–	+
C. perfingens	–	–	–	++

[0052] Einige Beispiele von Präparaten gemäß der Erfindung sind nachstehend wiedergegeben.

Beispiel I: Synbiotischer Riegel

[0053] Ein 23 g Riegel wurde aus 4,0 g Haferflocken, 4,0 g Weizenflocken, 3,0 g Puffreis, 1,0 g zerkleinerten Haselnüssen, 0,25 g Honig, 3,0 g Rosinen, 1,5 g Maltodextrin, 1,0 g gefriergetrocknetes Lb rhamnosus, 0,5 g Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae; Gist Brocades) und 5,0 g Transgalactooligosacchariden hergestellt.

Patentansprüche

1. Präparat mit einer gesundheitsfördernden Wirkung, insbesondere zur Verhinderung und/oder Behandlung von Störungen des Verdauungstraktes, welches Probiotika enthält, umfassend wenigstens einen Bakterienstamm einer Lactobacillus- oder einer Bifidobacterium- oder einer Propionibacterium-Art und wenigstens einen Hefestamm einer Saccharomyces-Art und ein oder mehrere nicht-verdaubare Oligosaccharide, worin die Oligosaccharide Fructooligosaccharide sind und/oder durch Hydrolyse von Inulin erhalten worden sind.

2. Präparat gemäß Anspruch 1, worin die Oligosaccharide einen Polymerisationsgrad von 2 bis 20, bevorzugt von 2 bis 10 und bevorzugter von 3 bis 6 haben.

3. Präparat gemäß Anspruch 1 oder 2, welches auch tote Hefezellen enthält.

4. Präparat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Verhältnis zwischen dem einen Probiotikum oder mehreren Probiotika und dem einen nicht-verdaubaren Oligosaccharid oder mehreren nicht-verdaubaren Oligosacchariden in dem Bereich von 1 bis 5 g Oligosacchariden pro 10^8 bis 10^{11} Zellen des Probiotikums liegt.

5. Präparat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, welches die Probiotika in einer Konzentration von 10^7 bis 10^{11} lebenden Zellen pro Gramm des Gesamtproduktes enthält.

6. Präparat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, welches eine totale Ernährung ist mit der folgenden Zusammensetzung:
• 0,1-10 Gew.-% Probiotika;
• 1-20 Gew.-% Oligosaccharide;
• 75-95 Gew.-% weitere Additive; bis einer Gesamtzahl von 100 Gew.-%.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen