



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 22 437 T2** 2004.04.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 942 660 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 22 437.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE97/01918**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 913 633.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/021978**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.04.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A23K 1/16**

A23K 1/165, A23L 1/10, A23L 1/185

(30) Unionspriorität:

9604251 20.11.1996 SE

(73) Patentinhaber:

Rural Patent Svenska AB, Stockholm, SE

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LANGE, Stefan, S-411 28 Göteborg, SE;
GÖRANSSON, Leif, S-260 23 Kageröd, SE;
LÖNNROTH, Ivar, S-431 69 Mölndal, SE**

(54) Bezeichnung: **DURCH LEBENSMITTEL INDUZIERTER ANTISEKRETORISCHE PROTEINE**

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 betrifft die Verwendung von Produkten mit enzymatischer Aktivität zur Herstellung eines Nahrungsmittels, das die Bildung von antisekretorischen Proteinen (ASP) induziert.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eine starke Sekretion von Körperflüssigkeiten führt zu einer Reihe unterschiedlicher Situationen. Eine große Nahrungsmittelaufnahme vor einer körperlichen Anstrengung bringt leicht eine Sekretion von Körperflüssigkeit in den Darm mit sich. Die körperliche Anstrengung als solche resultiert in einem Flüssigkeitsstrom in Muskeln und Gelenke. Dieses Phänomen führt zu Steifheit und verringerter Leistungsfähigkeit. Eine Reizung der Darmwand mit verschiedenen Agentien verleiht dem Stuhl eine unangenehm weiche Konsistenz.

[0003] In Schweden gibt es mehr als 10.000 Patienten mit Stomaanlage. Jedes Jahr kommen etwa 1000 dazu. Eine nicht allzu bedeutender Teil dieser Personen ist Dünndarm-Stoma operiert (Ileostomie). In Fällen, in denen die Sekretion einen Liter pro Tag übersteigt, entstehen Probleme aufgrund des starken Flusses in den Stomaanlagenbeutel, was häufiges Wechseln und Leeren des Beutels erfordert. Dies führt zu erheblichen Unannehmlichkeiten mit Einschränkungen der sozialen Aktivitäten, des Arbeitsvermögens, Flüssigkeitsmangel und Kalorien- und Mineralstoffmangel für jede Person. Personen mit diesen Problemen hatten bisher Schwierigkeiten, eine effektive Hilfe zu erhalten.

[0004] In den letzten Jahren wurden wichtige Erkenntnisse gewonnen, um die Fähigkeit des Körpers, den Nettofluss von Flüssigkeit und die Elektrolyten im Darm zu regulieren. Es wurde festgestellt, dass verschiedene Peptide die Fähigkeit haben, die Resorption von Flüssigkeit und Elektrolyten durch die Darmwand zu verstärken. Die wichtigsten dieser hormonartigen Peptide sind Somastostatin und Neuropeptid y (Krieger DT und Martin JB, N. Engl. J. Med. 304 : 876–885, 1981; Miller J., Regulatory peptides 4 (Erg.): 203–208, 1985) sowie die so genannten antisekretorischen Proteine (Lange S. und Lönnroth I., FEMS Microbiol. Letters 24 : 165–168, 1984; Lange S. und Lönnroth I., Biochim. Biophys. Acta 883 : 138–144, 1986). ASP kehrt die Sekretion um und erhöht die Resorption von Flüssigkeit und Elektrolyten im Darm.

Stand der Technik

[0005] Aus SE 9000028-2 (Publikation Nr. 466 331) ist bekannt, dass die Bildung eines antisekretorischen Faktors (ASF) oder eines antisekretorischen Proteins bei Tieren stimuliert werden kann, indem die Tiere mit einem Futter gefüttert werden, dem Aminosäuren und/oder Zucker und/oder Amide in bestimmten Mengen zugesetzt wurde. Infolge der Bildung dieses antisekretorischen Faktors kann man Diarrhö verschiedener Ursachen bei Tieren verringern. Indem der Gehalt an ASP durch ein in diesem Patent beschriebenes Verfahren bestimmt wird, können die Mengen an Aminosäuren und Zuckern so eingestellt werden, dass eine wirksame Menge an ASP bei Kosten gebildet wird, die wirtschaftlich interessant sind.

[0006] Von Khin-Maung-U und William Grennough III (J. Pediatrics 118, 72–85 (1991)) ist bekannt, dass Reismahlzeiten und Weizenmehl wie auch Abkochungen davon zur Rehydratisierung bei Diarrhö verwendet werden können. Es werden oft Salze zugesetzt, um den Verlust dieser Substanzen zu kompensieren. Der Zweck dieser Präparationen besteht nur darin, den bereits aufgetretenen Flüssigkeitsverlust zu ersetzen.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0007] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Nahrungsmittels, das die Störungen und Phänomene, die mit der unerwünschten Sekretion von Körperflüssigkeiten, die oben beschrieben wurden, einhergehen, lindert oder heilt. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird gelöst, indem Produkte mit enzymatischer Aktivität zur Bereitstellung eines Nahrungsmittels verwendet werden, das, wenn es konsumiert wird, die Bildung antisekretorischer Proteine induziert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0008] Während der andauernden Arbeiten zur Untersuchung der Bildung von ASP wurde überraschenderweise gefunden, dass die Bildung von ASP nicht nur durch den Zusatz von Aminosäuren und Zuckern, sondern auch durch Nahrungsmittel, denen Enzyme zugesetzt wurden, die den Gehalt des Nahrungsmittels an Kohlenhydraten und Proteinen mit einer solchen Rate hydrolysieren können, dass die Mengen an Zuckern und Aminosäuren, die per se bekannt sind, im Intestinaltrakt auftreten, stimuliert wird. Dann wurde überraschenderweise gefunden, dass die Bildung von ASP kontrolliert oder gesteuert werden kann, indem die Menge und der Anteil des Produktes mit enzymatischer Aktivität variiert werden. Dadurch können Nahrungsmittel hergestellt werden, die eine solche Zusammensetzung haben, dass der Gehalt an ASP, der bei wiederholtem Verzehr gebildet

- wird, mit einem vernünftigen Sicherheitsgrad vorhergesagt werden kann. Dies ist besonders signifikant, da die Dosisantwort zwischen verschiedenen Personenkategorien variiert.
- [0009] Die Feststellung, dass gemälzte Cerealien die Fähigkeit haben, wirksame Mengen an Zuckern und Aminosäuren bereit zu stellen, ist besonders überraschend. Dies bietet die Möglichkeit, Nahrungsmittel herzustellen, die nahrhaft sind, wohlschmeckend sind und die Fähigkeit haben, die Bildung von ASP zu stimulieren.
- [0010] Der Ausdruck „Nahrungsmittel“, wie er hier verwendet wird, soll Nahrungsmittel für den menschlichen Verzehr als auch Futter für den Verbrauch durch Tiere umfassen. Das Nahrungsmittel ist vorzugsweise ein Produkt in Form von Brot, Keksen, Pasta, Körnern und Flocken, Porridge und Haferschleim, kann aber auch ein Nahrungsmittelpräparat sein, das Fleisch und Fleischprodukte, Fett und Fettprodukte oder Milch und Milchprodukte enthält.
- [0011] Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden gemälzte Getreide (bzw. Cerealien) bei der Herstellung des ASP-induzierenden Nahrungsmittels eingesetzt.
- [0012] Der Ausdruck „Getreide (bzw. Cerealien)“, wie er hier verwendet wird, soll die üblichen Sorten von Getreide oder Korn umfassen, zum Beispiel Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Reis, Mais, Hirse, Durra und Sorghum.
- [0013] „Gemälzte Getreide (bzw. Cerealien)“ sind gesundes und frisches Korn, das einem Mälzen unterzogen worden ist. Mälzen bedeutet, dass die Getreidekörner eingeweicht werden und danach bei einem sorgfältig kontrollierten Wassergehalt und bei sorgfältig kontrollierter Temperatur keimen gelassen werden, bis sich Keimsprosslinge entwickelt haben. Die Keimungszeit wird auf die entsprechende Menge und Varietät eingestellt. Die gekeimten Körner werden getrocknet und entkeimt. Die Trocknung kann so gesteuert werden, dass die Enzymaktivität in stärkerem oder geringerem Ausmaß verändert wird. Das dann erhaltene Produkt ist Malz. Die Nährstoffe der Körner waren zu einem begrenzten Grad hydrolysiert und die Enzyme des Keimlings aktiviert. Diese partielle Hydrolyse erleichtert der Angriff der endogenen Enzyme des Verdauungssystems auf die Nährstoffe. Es ist offensichtlich, dass ein gewisses Vorkochen oder eine Wärmebehandlung die Hydrolyserate auch erhöhen kann.
- [0014] Bei Herstellung von Nahrungsmittelprodukten können die gemälzten Getreide im Gemisch mit nicht gemälzten Getreiden in solchen Verhältnissen zugesetzt werden, dass ASP induziert wird, wenn das so hergestellte Nahrungsmittel konsumiert wird.
- [0015] In Tests wurde gezeigt, dass Getreideprodukte, die auch normalerweise einen beträchtlichen Teil der täglichen Nahrungsmittelaufnahme ausmachen, mit Enzymen oder vorzugsweise Malzprodukten ergänzt werden können, um ein Nahrungsmittel zu erhalten, das, wenn es konsumiert wird, die gewünschte ASP-Induktion bereit stellt.
- [0016] Die Mengen und Verhältnismengen der gemälzten und nicht gemälzten, wenn vorhanden, Getreide (bzw. Cerealien), die zur Bereitstellung des beabsichtigten Effekts erforderlich sind, können vom Fachmann in einfacher Weise durch Routinetests entwickelt werden, wobei die Reaktion auf die Induktion durch das Nahrungsmittel nach dem Verfahren gemessen wird, das in SE 9000028-2 ausgeführt ist. Kurz, das Verfahren beinhaltet eine Messung einer standardisierten Sekretions(bzw. Ausscheidungs)-Reaktion im Dünndarm der Ratte.
- [0017] Es wurde gezeigt, dass der ASP-Spiegel, der erforderlich ist, um den angestrebten Effekt zu erreichen, mindestens 0,5 Einheiten pro ml Blut ist.
- [0018] Es ist offensichtlich, dass erfindungsgemäß hergestellte Nahrungsmittel in verschiedener Weise verändert werden können und dass verschiedene Ausführungsformen angegeben werden können. Dadurch kann eine Ernährungsmonotonie vermieden werden. Der Notwendigkeit zur Stimulation verschiedener Individuen, eine wirksame ASP-Konzentration zu erreichen, kann entsprochen werden, indem die Reaktion auf die Nahrungsmittelaufnahme wie angegeben gemessen wird. Durch die Erfindung kann man auch Schwankungen bei der Enzymaktivität von Präparationen wie auch Unterschiede in der enzymatischen Aktivität zwischen gemälzten Getreiden kompensieren.
- [0019] Außerdem ist es offensichtlich, dass das Nahrungsmittel auf verschiedene Weise formuliert werden kann, um auch die Anforderungen an Wohlgeschmack und Variation zu erfüllen. Nahrungsmittel, die auf der Basis von gemälzten Getreiden hergestellt werden, können in Form von Frühstücksflocken, Brot, Brötchen und Nudelprodukten unter Anwendung bekannter Technik hergestellt werden. Bei der Herstellung von Produkten, die ein Anfeuchten mit Wasser erfordern, zum Beispiel bei der Herstellung von Brot, müssen die Rezepte auf der Basis der Erfahrungen des Bäckers verändert werden. Es ist auch offensichtlich, dass die Produkte als Pulver formuliert werden können, das dazu bestimmt ist, in Wasser oder Limonade oder einer anderen Flüssigkeit eingerührt zu werden und als Getränk konsumiert zu werden.
- [0020] Als Beispiele für Fleischprodukte, in denen die gemälzten Getreide enthalten sein können, können Fleischpudding, der Hafergrütze enthält, oder Wurstpudding genannt werden, denen die Hafergrütze als gemälztes Produkt zugesetzt wird. Entscheidend ist, dass das Nahrungsmittel so formuliert wird, dass die gewünschte Stimulation der ASP-Bildung erreicht wird.
- [0021] Die Bedeutung der Tatsache, fähig zu sein, Nahrungsmittel herzustellen, die ASP bei einem vorher

festgesetzten Level induzieren, wird aus der Tatsache deutlich, dass es viele Situationen gibt, wo eine verringerte Ausscheidung erwünscht ist, zum Beispiel bei extremer körperlicher Anstrengung. So ist es gut bekannt, dass Athleten mit weichem Stuhlgang ein Problem erhalten, wenn sie sich bis zum Äußersten anstrengen, gleichzeitig eine große Menge an Nahrungsmitteln und Flüssigkeitsvolumina aufnehmen, um den Körper mit energiereichen Kohlenhydraten zu versorgen. Feuerwehrleute und Soldaten haben ähnliche Probleme und bekommen infolge der Stresssituationen, denen sie unterworfen sind, weichen Stuhl. Ein spezielles Problem entsteht bei der Steuerung schneller Flugzeuge; die Piloten müssen infolge der hohen G-Kräfte eine Windel tragen, was vermieden werden kann, wenn der Stuhl durch eine neue Diät (bzw. Nahrung) fester gemacht wird. In solchen Situationen haben Nahrungsmittel, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, einen großen potentiellen Wert.

[0022] Die Erfindung wird anhand der folgenden nichtlimitierenden, spezifischen Beispiele näher erläutert.

BEISPIEL 1

Experimente mit gemälzten Getreiden an Personen, die für experimentellen Zwecken eingesetzt wurden

[0023] Eine Anzahl von Personen, die zu experimentellen Zwecken eingesetzt wird, wurde verschiedene Frühstücks-Mahlzeiten, die aus verschiedenen Getreideprodukten bestehen, versuchen gelassen. Vor und nach dem Versuchszeitraum wurden Blutproben entnommen; aus diesen Blutproben wurde durch Affinitätschromatographie nach dem Verfahren, das in 5E 9000028-2 beschrieben ist, antisekretorische Proteine (ASP) isoliert. Der Gehalt an ASP in den Proben wurden in einem Bioassay in Ratten nach einem Verfahren, das früher beschrieben wurde, gemessen (Lange, S., FEMS Microbiol. Letters 15: 239–242, 1982). Kurz ausgedrückt, das Verfahren läuft auf eine gebundene Schlaufe in der Mitte des Dünndarms der Ratte hinaus, die ASP-Probe wird kurz vor Injizieren von 3 µg Choleratoxin in die Darmschleife intravenös injiziert. Nach 5 Stunden wird das Tier getötet und das Gewicht wie auch die Länge der frei seziierten Darmschleife werden gemessen; die Reaktion (mg Flüssigkeit pro cm Darm) der Tiere, die die ASP-Probe erhalten hatten, wird mit der von Kontrolltieren, die nur Puffer erhalten hatten, verglichen.

[0024] Die Diät (die Nahrung), die gegeben wurde, war:

- 1) Brot, gebacken mit Weizenmehl im Gemisch mit 30% „Friskplus“-Ferkelfutter (Göransson L. et al., J. Vet. Med., B, 40: 478–484, 1993);
- 2) Brot, gebacken mit Weizenmehl im Gemisch mit 30% normalem Gerstemehl;
- 3) wie 2), aber mit gemälztem Gerstemehl;
- 4) Flocken, umfassend gemälzten Hafer.

[0025] Die Resultate der Experimente sind in der folgenden Tabelle angegeben, wobei die Initialen der Personen, die dem Experiment unterzogen wurden, ebenso wie die Aktivität von ASP in Einheiten pro ml angegeben (1 Einheit = die Menge an ASP, die eine 50 %-ige Inhibierung der Choleratoxinantwort liefert). Die Nettomenge der zugesetzten Getreide (Nicht-Weizenmehl oder andere Getreide, die von den Testpersonen, die am Experiment beteiligt waren, nach der Mahlzeit, die die Testgetreide umfasst, aufgenommen wurden), ist in Klammern angegeben.

Tag	Nahrung, Tage	ASP-Aktivität im Blut, Einheiten/ml		
		EE	SL	
- 135	-	0,0	0,0	
- 150	„Frisk+“ Brot, 8 d	1,4 (15 g)	0,9 (26 g)	
- 52	-	0,0	0,0	
- 31	Gerstebrot ctr, 10 d	0,0 (29 g)	0,0 (50 g)	
0	-	0,0	0,1	
8	Brot mit gemälzter Gerste, 7 d	1,0 (25 g)	0,5 (50 g)	
21	-	0,0	0,4	
28	gemälzte Haferflocken, 13 d	1,3 (25+25 g)	0,6 (60 g)	
37	-	0,6	1,1	
62	-	0,4	0,0	
		EJ	IJ	IL
0	-	0,0	0,0	0,1
12	gemälzte Haferflocken, 10 d	1,0 (25+25g)	0,7 (25+25g)	1,0 (25+25g)
19	-	0,5	-	0,8

[0026] Normalerweise scheinen ASP im menschlichen Blut nicht aufzutreten. Nach der Aufnahme von gebacktem Brot aus „Frisk+“-Ferkelfutter wurde ASP im Blut von EE und SL induziert. Diese zwei Personen aßen dann gebackenes Brot aus normalem Gerstemehl bzw. Mehl aus gemälzter Gerste. Das Brot aus normaler Gerste induzierte keine ASP. Allerdings induzierte das Brot aus gemälzter Gerste ASP. Zwölf Tage später stoppten EE und SL den Verzehr des Brotes, der ASP-Wert hatte sich bei EE auf 0,0 und bei SL auf 0,4 verringert. Dieselben Personen aßen dann gemälzte Haferflocken, die Dickmilch zugesetzt worden waren. Auch in diesem Fall wurden ASP induziert. Ähnlich wie im vorhergehenden Experiment erhöhte sich der ASP-Wert von EE während des Versuchszeitraums auf einen hohen Level und fiel dann rasch ab, wohingegen SL den höchsten ASP-Wert eine Woche nach dem Versuchszeitraum hatte. Das Experiment mit gemälzten Haferflocken wurde mit drei weiteren Personen wiederholt. Sie hatten während des Versuchszeitraums alle hohe ASP-Werte; ein gewisser Anstieg wurde auch in der Woche, nachdem sie das Essen der Testflocken beendet hatten, registriert.

BEISPIEL 2

Experimente mit Schweinefutter, dem Enzyme zugesetzt worden waren

[0027] Experimente an Schweinen, die gerade entwöhnt worden waren, wurden in ähnlicher Weise, wie es früher von Göransson et al (1993) beschrieben worden war, durchgeführt. Ein herkömmliches Ferkelfutter ohne Zusatz von Antibiotika, ähnlich wie „Lantmännens Våxfor“ und dasselbe Futter, verdaut mit zugesetzten Enzymen (ein Gemisch aus α - und β -Amylase), wurde 2 $\times$ 5 Würfen, beginnend drei Tage vor dem Entwöhnungstag, gegeben. Blutproben wurden am Tag der Entwöhnung (Tag 0) wie auch sechs Tage nach der Entwöhnung (Tag 6) entnommen. Die Resultate zeigten, dass im Blut der Kontrollgruppe keine nachweisbaren Mengen an ASP festgestellt werden konnten, wohingegen die Testgruppe bereits am Tag 0 einen Level von 0,0 Einheiten/ml hatte, wobei sich der Level dann auf 1,5 Einheiten/ml ($n = 10$ pro Gruppe) erhöhte.

BEISPIEL 3

[0028] Während der experimentellen Arbeiten zeigte sich, dass Ratten ähnliche Reaktionen auf antisekretorisch induzierende Agentien haben wie Menschen. Folglich ist es für den Fachmann einfacher, kontrollierte Ex-

perimente an Ratten als an Menschen durchzuführen. Das Verfahren zur Messung der Induzierung einer antisekretorischen Wirkung bei Ratten ist in SE 9000028-2 beschrieben.

[0029] In einem traditionellen Labortest wurde ein Teil des Rattenfutters durch Testmaterial ersetzt. Die Ratten wurden vor dem Experiment sieben Tage lang mit Kontroll- und Testnahrung gefüttert. Am Tag 8 wurde ein Aufquellen (Ausscheidung) im Darm durch Injektion von 3,5 Mikrogramm Cholera toxin induziert. Das Gewicht des aufgequollenen Darms wurde bestimmt und sein Gewicht bezüglich des Darmgewichts der Kontrollgruppe ist ein Maß für den Grad der antisekretorischen Wirkung oder der Hemmung der Sekretion (bzw. Ausscheidung).

[0030] In einem experimentellen Lauf wurden die folgenden Darmgewichte und Inhibierungsgrade aufgezeichnet:

Nahrung (Diät)	Zahl der Tiere	Darmgewicht, mg/cm	% Inhibierung
Kontrollfutter	3	453 $\pm$ 3	-
80% Kontrollfutter und 20% dampfbehandelte Haferkörner	3	443 $\pm$ 16	2 (nicht signif.)
80% Kontrollfutter und 20% gemälzter Weizen	3	82 $\pm$ 5	82 (signif.)

[0031] Wie aus den obigen Resultaten zu ersehen ist, wurde die signifikanteste Inhibierung der Sekretion in der Rattengruppe erreicht, die 20% des Futters als gemälzten Weizen erhielt; oder anders ausgedrückt, mit diesem Futter wurde ein signifikanter Grad einer antisekretorischen Wirkung erreicht.

Patentansprüche

1. Verwendung von Produkten mit enzymatischer Aktivität für die Herstellung von Nahrungsmitteln, die, wenn sie konsumiert werden, antisekretorische Proteine (ASP) induzieren, die den Strom von Flüssigkeiten und Elektrolyten im Darm regulieren, so daß 1 ml Blut mindestens 0,5 Units ASP enthalten wird.

2. Die Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Produkte mit enzymatischer Aktivität gemälzte Getreide sind.

3. Die Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gemälzten Getreide Gerste, Weizen, Roggen oder Hafer sind.

4. Die Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gemälzten Getreide Reis, Mais oder Sorghum sind.

5. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die gemälzten Getreide in Beimischung zu nicht gemälzten Getreiden vorliegen.

6. Die Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hergestellten Nahrungsmittel Frühstücksflocken, Brot, Brötchen oder Nudelprodukte sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen