



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 665 126 A5

⑤ Int. Cl.⁴: A 61 K 37/54  
A 61 K 35/74

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 831/85</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 22.02.1985</p> <p>③① Priorität(en): 24.02.1984 DE 3406772</p> <p>㉔ Patent erteilt: 29.04.1988</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 29.04.1988</p>	<p>⑦③ Inhaber: Dr. Rudolf Schuler, Berg bei Starnberg (DE) Angelo Schuler, Berg bei Starnberg (DE)</p> <p>⑦② Erfinder: Schuler, Rudolf, Dr., Berg bei Starnberg (DE) Schuler, Angelo, Berg bei Starnberg (DE)</p> <p>⑦④ Vertreter: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel</p>
---	---

⑤④ **Diätetisches Mittel zur Herabsetzung der Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten und seine Herstellung.**

⑤⑦ Ein diätetisches Mittel zur Herabsetzung der Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten ist gekennzeichnet durch einen Gehalt an Urease enthaltenden Bifidusbakterien der Art Bifidobacterium suis oder infantis.

### PATENTANSPRÜCHE

1. Diätetisches Mittel zur Herabsetzung der Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Urease enthaltenden Bifidusbakterien der Art *Bifidobacterium suis* oder *infantis*.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Bifidobacterium suis* DSM 20211 oder/und *Bifidobacterium infantis* DSM 2877 enthält.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich andere Bifidusarten enthält.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich wenigstens einen der Stämme *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, 20086 und 20087; *Bifidobacterium angulatum* DSM 20098; *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, 20215 und 20456; *Bifidobacterium breve* DSM 20091, 20213; *Bifidobacterium catenulatum* DSM 20103; *Bifidobacterium infantis* DSM 20088, 20090 und 20223; *Bifidobacterium longum* DSM 20097 und 20219 oder/und *Bifidobacterium sp* DSM 20093 enthält.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich Bestandteile des Kulturmediums der enthaltenen Bifidusstämme enthält.
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es als Kulturmediumbestandteile Milchbestandteile oder Sojamilchfeststoffe enthält.
7. Mittel nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass es Pepton- oder/und Hefeextrakt enthält.
8. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es in lyophilisierter Form vorliegt.
9. Verfahren zur Herstellung des diätetischen Mittels nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man wenigstens einen *Bifidobacterium suis* oder/und *infantis* Stamm in einem geeigneten Nährmedium züchtet und die erhaltene Kultur lyophilisiert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nährmedium Milch oder Sojamilch unter Zusatz von Pepton oder/und Hefeextrakt verwendet.

### BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein diätetisches Mittel zur Herabsetzung der Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten und dessen Herstellung.

Bei Nierenerkrankungen, Nierentransplantationen und dergleichen besteht das Problem der Harnstoffentfernung aus dem Organismus. Normalerweise werden 70% des in der Leber beim Eiweissabbau gebildeten Harnstoffs über die Niere ausgeschieden, daneben werden bis zu 30% auch durch die Darmwand abgegeben und dort von Bakterien gespalten, wobei je nach dem vorherrschenden pH-Wert des Darms entweder eine Fixierung im Darm und Ausscheidung erfolgt (bei sauren pH-Werten) bzw. bei alkalischen pH-Werten eine Resorption und Rücktransport des toxischen Ammoniaks zur Leber stattfindet. Im Falle von Nierenerkrankungen musste bisher zur Beseitigung des überschüssigen und nicht über den Darm ausgeschleusten Harnstoffs eine Dialyse in regelmässigen Abständen vorgenommen werden. Wenn es gelingen würde, einen grösseren Anteil des Harnstoffs über den Darm zu entfernen, so bestünde unter Umständen die Möglichkeit, die Häufigkeit von Dialysen herabzusetzen oder die Dialyse überhaupt umgehen zu können.

Voraussetzung hierfür wäre, dass der Harnstoff aus dem Gleichgewicht, das sich über die Darmwand einstellen muss, laufend entfernt wird. Dies könnte erfolgen, indem man im

Darm eine Mikroorganismenflora erzeugt, welche eine starke Harnstoff spaltende Aktivität entfaltet.

Von Setelae und seinen Mitarbeitern an der Universität Helsinki wurde bereits vermutet, dass die Reststickstoff-Verbindungen in den Körperflüssigkeiten nicht nur Endprodukte des Stoffwechselprozesses darstellen, die beseitigt werden müssen, sondern zu einem Teil auch für die Resynthese von Proteinen bzw. Aminosäuren nützlich sind und daher nicht vollständig entfernt werden sollten, sondern lediglich der Überschuss beseitigt werden muss. Um dies zu erreichen, haben sie schon vorgeschlagen, die Verhältnisse im Darm dann so zu verändern, dass die biologische Zerlegung von Reststickstoff dort gesteigert und damit eine Verschiebung des biologischen Gleichgewichts durch den Darm erzielt wird. Gleichzeitig sollte der Patient auf einer angemessenen Diät gehalten werden. Um nun die Verhältnisse im Darm im gewünschten Sinne zu verändern, wurden nicht näher identifizierte Bodenmikroorganismen der Arten *Serratia*, *Pseudomonas* und *Rhizobium* oder *Agrobacterium* verwendet, welche adaptive, Reststickstoff-abbauende Enzyme wie Urease, Kreatinase und dergleichen enthalten und damit einen Abbau des Reststickstoffs, wie z. B. des Harnstoffs im Darm in stärkerer Masse hervorrufen können (Kidney International, Vol. 13, Suppl. 8 (1978), S.194–202). Jedoch stellte sich heraus, dass sie im Darm die gewünschten Eigenschaften nicht mehr aufwiesen (Proceeding Eur. Soc. for Artificial Organs (ESAO) Vol V, Zürich, 6–8.11.1978). Zudem benötigen sie einen etwa neutralen pH-Wert, um gute Aktivität ihrer Urease zu erzielen. Unter derartigen Bedingungen wird jedoch bei der Spaltung des Harnstoffs entstehender Ammoniak wieder resorbiert und entfaltet höchst unerwünschte toxische Wirkungen auf die Leber. Aus diesem Grunde konnten die Arbeiten von Setelä nicht zum Erfolg führen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, dieses Problem zu lösen. Hierzu wird von der Überlegung ausgegangen, dass eine Darmflora erforderlich wäre, die eine Urease besitzt, welche auch im sauren pH-Bereich starke Aktivität entfaltet und nach Möglichkeit dort ihr Aktivitätsmaximum aufweist. Ausserdem müsste es sich um eine konstitutiv gebildete Urease handeln, nicht um eine nur aufgrund des vorhandenen Harnstoffs adaptiv entstehende Urease.

Bekannt ist, dass man den zur Ammoniakbeseitigung angestrebten niedrigen pH-Wert im Darm durch eine Bifidusflora hervorrufen kann. Nunmehr wurde gefunden, dass es bestimmte Bifidusstämme gibt, die konstitutiv eine im sauren pH-Bereich stark aktive Urease bilden und diese Urease wiederum laufend den durch die Darmwand tretenden Harnstoff spalten und damit aus dem Gleichgewicht entfernen kann.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein diätetisches Mittel zur Herabsetzung der Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Urease enthaltenden Bifidusbakterien der Art *Bifidobacterium suis* oder/und *Bifidobacterium infantis*.

Die erfindungsgemäss anzuwendenden Bifidusbakterien der Art *Bifidobacterium suis* wurden bei Schweinen gefunden. Ein Vorkommen bei Menschen ist bisher nicht bekannt geworden. Bevorzugt verwendet wird im Rahmen der Erfindung der Stamm *Bifidobacterium suis* DSM 20211. Als Stamm der Art *Bifidobacterium infantis* wird DSM 2877 bevorzugt. Dieser ist am 10. Februar 1984 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8, 3400 Göttingen (BRD) hinterlegt worden. Er besteht aus Grampositiven, pleomorphen, anaeroben Stäbchen, die aus Glucose Acetat und Milchsäure bilden. Das Murein der Zellwand ist vom Orn-Ser-Ala-Thr-Ala Typ. Diesen Mureintyp enthalten neben *B. infantis* noch *B. longum* und *B. suis*. Diese drei Arten sind vom Genom her sehr nah verwandt mit-

einander. Der Stamm kann Arabinose und Melezitose nicht vergären und unterscheidet sich hierin von *B. infantis* und *B. longum* *B. suis*.

Das erfindungsgemässe diätetische Mittel kann den Ureasehaltigen Bifidusstamm der Art *suis* oder *infantis* allein enthalten, vorzugsweise jedoch enthält es eine Kombination mit anderen Bifidusstämmen, die vor allem eine erhebliche Aziditätsbildungsfähigkeit aufweisen. Derartige Bifidustämme sind z. B. *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, 20086 und 20087; *Bifidobacterium angulatum* DSM 20098; *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082; 20215 und 20456; *Bifidobacterium breve* DSM 20091, 20213; *Bifidobacterium catenulatum* DSM 20103; *Bifidobacterium infantis* DSM 20088, 20090 und 20223; *Bifidobacterium longum* DSM 20097 und 20219; *Bifidobacterium sp* DSM 20093. Alle zuvor genannten *Bifidobacterium*-Stämme sind bekannt und der Öffentlichkeit zugänglich bei: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8, 3400 Göttingen (BRD).

Ausser den genannten Bifidusstämmen kann das erfindungsgemässe diätetische Mittel noch übliche Zusatzstoffe enthalten wie Geschmacksstoffe, Farbstoffe, Verdünnungsmittel und dergleichen. Vorzugsweise enthält das Mittel zusätzlich noch Bestandteile des Kulturmediums, d. h. die in dem Kulturmedium, in dem die Bakterien gezüchtet wurden, enthaltenen Feststoffe. Insbesondere enthält das diätetische Mittel daher Milchbestandteile oder Sojamilchfeststoffe sowie gegebenenfalls zusätzlich Pepton oder/und Hefeextrakt.

Das erfindungsgemässe diätetische Mittel kann in jeder für die orale Verabreichung geeigneten Form konfektioniert werden. Vorzugsweise liegt es in lyophilisierter Form vor und wird vor der Verabreichung durch Zusatz einer trinkbaren Flüssigkeit wie Wasser, Milch, Tee oder dergleichen bis zu einer trinkfähigen Konsistenz aufgeschlämmt und getrunken. Die Verabreichung kann aber auch in anderer Form, z. B. in Gelatine kapseln, erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemässen diätetischen Mittels. Gemäss dieser bevorzugten Ausführungsform züchtet man wenigstens einen *Bifidobacterium suis* oder *infantis* Stamm und gegebenenfalls einen weiteren *Bifidobacterium* Stamm in einem geeigneten Nährmedium und lyophilisiert die so erhaltene Kultur.

Als geeignete Nährmedien kommen alle in physiologischer, diätetischer und geschmacklicher Hinsicht geeigneten Nährlösungen in Betracht, vorzugsweise Milchprodukte, wie z. B. Sojamilch, die bevorzugt wird, oder Molke und insbesondere Magermilch. Die Nährmedien können mit weiteren Zusätzen, wie z. B. Hefeextrakt und/oder Peptonen und/oder anderen, die Verdauung fördernden Stoffe, versehen sein, vorzugsweise in Mengen von 0,1 bis 1% Gew.-Vol., bezogen auf das fertige Nährmedium. Insbesondere bei Verwendung von Magermilch, die üblicherweise aus Trockenmagermilch und Wasser bereitet wird, hat sich ein Zusatz von Hefeex-

trakt und oder Pepton als zweckmässig erwiesen. Es kann auch ein Gemisch aus zwei oder mehreren der obengenannten geeigneten Nährmedien eingesetzt werden. Vorzugsweise setzt man 0,4 bis 0,5 Gew.-% Hefeextrakt und 0,4 bis 0,6 Gew.-% Pepton, bezogen auf das Volumen der Lösung, zu.

Wie bereits erwähnt, können dem erfindungsgemässen diätetischen Mittel noch weitere übliche Zusatzstoffe, insbesondere diätetisch geeignete Zusätze wie z. B. Glucose,  $\beta$ -Lactose und Lactulose zugegeben werden. Bezogen auf den gefriergetrockneten Zustand enthält das Mittel vorzugsweise  $10^6$  bis  $10^{10}$ , insbesondere  $10^8$  bis  $10^9$  lebende *Bifidum*-Bakterienzellen pro Gramm.

Die Züchtung der Mikroorganismen selbst erfolgt in der hierfür bekannten und üblichen Weise.

Die Bebrütungszeit hängt von der Temperatur ab. Vorzugsweise wird während 15 bis 30 Stunden bei einer Temperatur von 15 bis 45 °C bebrütet und insbesondere während 24 Stunden bei  $37 \pm 2$  °C. Während der Züchtung hält man vorzugsweise den pH-Wert zwischen 5,7 und 5,9, zweckmässig durch Zugabe eines Alkali. Besonders geeignet ist Kalkmilch (Calciumhydroxidlösung), die man in der Regel zweibis viermal während der Züchtung zudosiert.

Das erfindungsgemässe diätetische Mittel schafft die Möglichkeit, die Harnstoffmenge in den Körperflüssigkeiten wesentlich stärker herabzusetzen, als dies bisher über den Darm möglich war. Dies eröffnet die Möglichkeit, auch bei einem Nierenversagen den Harnstoffgehalt so weit zu verringern, dass die verbleibenden Restharnstoffmengen unschädlich sind bzw. ohne oder nur mit wenigen Dialysebehandlungen beseitigt werden können, so dass der Abstand zwischen den einzelnen Dialysen erheblich verlängert werden kann. Hierdurch wird nicht nur eine wesentliche Erleichterung für die Kranken geschaffen, sondern es wird auch vermieden, dass dem Körper für die Resynthese benötigte Stickstoffverbindungen übermässig entzogen werden.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiter.

#### Beispiel

Eine aus Sojamilchpulver und Wasser bereitete Nährlösung, der, bezogen auf die fertige Nährlösung, je 0,5 Gew.-% Hefeextrakt und Pepton zugesetzt wurden, wird mit einer Reinkultur von *Bifidobacterium infantis*, DSM 2877 beimpft. Die Kultur wird während 24 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C bebrütet. Nach jeweils etwa 8 Stunden wird der pH-Wert auf 5,8 bis 5,9 nachgestellt durch Zusatz der erforderlichen Menge Kalkmilch. Danach wird die Kultur gekühlt und gefriergetrocknet. Das auf diese Weise erhaltene Lyophilisat wird kühl gelagert. Zur Verabreichung wird das Produkt mit lauwarmem Wasser (ca. ein Teelöffel auf  $\frac{1}{4}$  l Wasser) verrührt und die erhaltene Suspension sofort getrunken.

Anstelle von Sojamilch wurde auch Magermilch und Molke verwendet.