



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 25 887 T2 2005.09.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 983 072 B1**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/715**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 25 887.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/02864**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 924 315.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/052578**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.09.2005**

(30) Unionspriorität:
97870069 20.05.1997 EP

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

(73) Patentinhaber:
Tiense Suikerraffinaderij N.V. (Raffinerie Tirllemontoise S.A.), Brüssel/Bruxelles, BE

(72) Erfinder:
**VAN LOO, Jan, B-3040 St.Aghatha Rode, BE;
FRIPPIAT, Anne, B-1933 Sterrebeek, BE**

(74) Vertreter:
Mitscherlich & Partner, Patent- und Rechtsanwälte, 80331 München

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON FRUKTAN ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS ZUR VORBEUGUNG UND BEHANDLUNG VON DICKDARMKREBS**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung gewisser Fruktane, vorzugsweise gewisser Inuline, für die Herstellung einer Zusammensetzung für die Verhütung und/oder Behandlung von Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern.

[0002] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung von Zusammensetzungen, welche gewisse Fruktane, vorzugsweise gewisse Inuline umfassen, für das Verhüten und/oder Behandeln von Dickdarmkrebs in nicht-bovinen Säugern.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Krebs ist in Säugern eine Erkrankung, die bereits seit Urzeiten bekannt ist. Heute ist Krebs, insbesondere Lungen-, Brust- und Dickdarmkrebs eine der Haupttodesursachen von nicht-bovinen Säugern, insbesondere Menschen, in der industrialisierten Welt geworden.

[0004] Bekanntlich schreitet die Krebserkrankung in verschiedenen Stufen voran, einschließlich die Erzeugung von Zellen eines modifizierten Genoms und einer modifizierten Funktionalität, die in der Bildung maligner Zellen resultieren; unkontrollierte lokale Proliferation der malignen Zellen und Invasion umliegender normaler Körperstrukturen; und Metastasis. Während der Metastasis verbreiten sich maligne Zellen in einer Körperhöhle und/oder über den Blutstrom und/oder die Lymphe über den Körper, unter Invasion verschiedener normaler Körperstrukturen. Die Invasion der normalen Körperstrukturen führt zu ihrer Fehlfunktion und/oder Zerstörung, was schlussendlich zum Tod des betroffenen Säugers führt.

[0005] Verschiedene Faktoren, die Karzinogenese und Krebs provozieren können, sind bereits identifiziert worden, einschließlich gewisser viraler Infektionen, Exposition gegenüber ionisierender Bestrahlung, Exposition gegenüber gewissen Mineralfasern, Aussetzen gegenüber chemischen Mutagenen und falsche Ernährung.

[0006] Als Ergebnis davon sind verschiedene Präventivmaßnahmen eingeführt worden, die sich beim Verhüten oder Vermindern des Auftretens gewisser Karzinome als erfolgreich herausgestellt haben.

[0007] Weiterhin sind verschiedene chirurgische und chemotherapeutische Verfahren für die Behandlung von Krebs entwickelt worden. Gemäß der Art des Krebses, dem Stadium der Erkrankung und der Besonderheiten des betroffenen Säugers haben sich diese Verfahren in größerem oder kleinerem Umfang als effektiv erwiesen.

[0008] Viele zuverlässige Tiermodelle für das Studium der Gene und Entwicklung verschiedener Krebsarten sind derzeit verfügbar und ermöglichen die Evaluierung präventiver und kurativer Eigenschaften unterschiedlicher Chemikalien und Nahrungsprodukte.

[0009] Epidemiologische Studien in Kombination mit Studien an Tiermodellen haben zur Identifikation von Nahrungsfasern als ein wichtiger Faktor bei der Verhütung und Hemmung gewisser Krebsarten bei Säugern geführt.

[0010] Nahrungsfasern werden allgemein als Komponenten von Pflanzenzellen definiert, die einer Hydrolyse durch die Nahrungsenzyme des Menschen widerstehen. Nahrungsfasern umfassen Cellulose, Hemi-Cellulose, Polysaccharide, Pectin, Gummis, Wachse und Lignin. Gemäß dieser Definition sind Fruktane, welche lösliche und genießbare Polysaccharide sind, Nahrungsfasern. Fruktane bestehen aus Ketten von Kohlenhydraten, die zumeist aus Fruktoseeinheiten bestehen und bei denen Fruktosyl-Fruktose-Bindungen die Mehrzahl der Bindungen bilden. Fruktane treten üblicherweise als polydispersive Kohlenhydrate auf. Sie kommen in Pflanzen vor, können aber auch durch bakterielle Aktivität entstehen und können ebenfalls enzymatisch synthetisiert werden. Alle diese Fruktane zeigen typische Nahrungsfasern-Eigenschaften; sie werden als Fruktane bezeichnet.

[0011] Fruktane sind wohlbekannt Verbindungen, einschließlich Levan und Inulin-Kohlenhydraten. Levane sind D-Fruktane, die allgemein aus Ketten von Fruktoseeinheiten bestehen, die im wesentlichen miteinander durch $\beta(2-6)$ -Bindungen verbunden sind. Inuline sind ebenfalls D-Fruktane, die allgemein aus Ketten von Fruktoseeinheiten bestehen, die aber im wesentlichen miteinander durch $\beta(2-1)$ -Bindungen verbunden sind. Die

meisten Inulinketten enden in einer Glucoseeinheit.

[0012] Levane können als linearkettige Kohlenhydrate auftreten, sie bestehen jedoch meist aus verzweigten Fruktoseketten, während Inuline allgemein aus linearkettigen Kohlenhydraten zusammengesetzt sind, aber sie können ebenfalls als Ketten von Fruktoseeinheiten auftreten, die mehr oder weniger verzweigt sind. Levane und Inuline, die gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet sind, beinhalten lineare und verzweigt-kettige Kohlenhydrate, wie auch Mischungen dieser linearen und verzweigt-kettigen Kohlenhydrate.

[0013] Inuline kommen in vielen Pflanzen und Nutzpflanzen vor und können in Konzentrationen von etwa 10 bis 20 % Frischgewicht bei Chicorée, Dahlienknollen und Jerusalem-Artischoke auftreten. Sie können aus diesen Pflanzen im Industriemaßstab gemäß wohl bekannten Techniken isoliert, gereinigt und optional aufbereitet werden, um Unreinheiten und unerwünschte Fraktionen von Kohlenhydraten zu entfernen.

[0014] Inuline können durch die allgemeinen Formeln GF_n und F_m repräsentiert werden, wobei G eine Glucoseeinheit, F eine Fruktoseeinheit, n die Anzahl der mit der endständigen Glucoseeinheit verbundenen Fruktoseeinheiten und m die Anzahl der miteinander in der Kohlenhydratkette verlinkten Fruktoseeinheiten repräsentiert.

[0015] Die Anzahl an Saccharideinheiten (Fruktose- und Glucoseeinheiten) in einem Fruktanmolekül, d.h. die Werte $n+1$ und m in den obigen Formeln, werden allgemein als der Polymerisationsgrad bezeichnet und mit (DP) repräsentiert. Oft wird auch der Parameter Durchschnittspolymerisationsgrad (DP) verwendet, der ein Wert entsprechend der Gesamtzahl von Saccharideinheiten, geteilt durch die Gesamtzahl von Saccharidmolekülen, die in einer gegebenen (Poly)saccharid-Zusammensetzung vorhanden sind, ist.

[0016] Inulin pflanzlichen Ursprungs ist eine polydisperse Zusammensetzung von Fruktoseketten mit einem Polymerisationsgrad (DP) im Bereich von 2 bis etwa 100, während Inulin bakteriellen Ursprungs üblicherweise einen höheren Polymerisationsgrad aufweist.

[0017] Fruktane, einschließlich Inuline der allgemeinen Formeln GF_n und F_m , mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad, der üblicherweise als ein (DP) < 10 definiert ist, werden üblicherweise Oligofruktosen genannt und werden hierin entsprechend bezeichnet.

[0018] Inulin ist kommerziell erhältlich. Beispielsweise ist Inulin aus Chicorée als RAFTILINE® von ORAFTI (Tienen, Belgien) in verschiedenen Graden erhältlich. Typische RAFTILINE®-Grade sind beispielsweise ST, ST-Gel und GR (die einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad (DP) von 10 aufweisen und insgesamt etwa 8 Gew.% Glucose, Fruktose und Saccharose enthalten), LS (das ebenfalls einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 10 hat, aber weniger als 1 Gew.% Glucose, Fruktose und Saccharose enthält), und HP (Hochleistungs-Inulin) und HP-Gel (welche einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von ≈ 23 , üblicherweise etwa 25, haben und im wesentlichen frei von Glucose, Fruktose und Saccharose sind).

[0019] Oligofruktosen werden üblicherweise durch partielle, saure oder enzymatische Hydrolyse von Inulin erhalten und können ebenfalls durch enzymatische Synthese aus Saccharose erhalten werden, gemäß im Stand der Technik wohlbekannten Techniken.

[0020] Oligofruktosen sind kommerziell erhältlich. Verschiedene Grade von Oligofruktosen sind beispielsweise von ORAFTI (Tienen, Belgien) als RAFTILOSE® erhältlich, z.B. RAFTILOSE® P95, welches etwa 95 Gew.% Oligofruktosen mit einem Polymerisationsgrad im Bereich von 2 bis 7 und etwa insgesamt 5 Gew.% an Glucose, Fruktose und Saccharose enthält.

Stand der Technik

[0021] Nahrungsfasern, insbesondere Fruktane, sind bekannt dafür, Effekte auf verschiedene physiologische Funktionen und Mechanismen in Säugern zu haben.

[0022] Bei nicht-bovinen Säugern werden diese Fasern im Mund, dem Magen und dem Dünndarm fast nicht metabolisiert und gelangen dadurch fast quantitativ in den Dickdarm, wo sie durch die Dickdarmmikroflora vollständig fermentiert werden. Dieses Phänomen führt zu verschiedenen günstigen Gesundheitseffekten bei nicht-bovinen Säugern, wie beispielsweise einer Verminderung der Darmdurchtrittszeit, einem Absinken des Darm-pHs, einer Bifidus-stimulierenden Aktivität im Dickdarm, einem Anwachsen des Stuhlgewichts (Volumen) und der Stuhlfrequenz.

[0023] Es ist auch bekannt, dass Fruktane, insbesondere Inulin, einen günstigen Effekt auf den Lipidmetabolismus haben, einschließlich eines Absenkungseffekts auf Blutcholesterin und Serumtriglyceride und eines Steigerungseffekts auf das HDL/LDL-Verhältnis.

[0024] P. D. Cooper et al., *Molecul. Immunol.*, 23 (8), 895 (1986) beschreiben die Aktivierung des alternativen Komplementwegs durch gamma-Inulin (eine spezifische polymorphe Form von Dahlieninulin), und es ist bekannt, dass ein Aktivator des alternativen Komplementwegs einen potentiellen nicht-spezifischen Antitumoreffekt haben kann.

[0025] Weiterhin sind Fruktane, insbesondere Inulin, als ein Potential beim Verhüten und Hemmen von Krebs aufweisend beschrieben.

[0026] P. D. Cooper et al., (*Molecul. Immunol.*, 23 (8), 903 (1986) haben gezeigt, dass intraperitoneal injiziertes gamma-Inulin das Überleben Melanom-tragender Mäuse verlängern kann.

[0027] Es ist ebenfalls offenbart worden, dass Kulturen von Bifidobakterien 2-Amino-3-Methylimidazol[4,5-f]Chinolin-induzierte Kolon-, Leber- und Mammakarzinogenese (B. S. Reddy et al., *Cancer Res.*, 53, 3914-3918 (1993) und Azoxymethan-induzierte Kolonkarzinogenese (N. Kulkarni et al., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 207, 278-283 (1994) in Ratten hemmen.

[0028] Die europäische Patentanmeldung EP 0 692 252 A1 offenbart den Suppressionseffekt der Oligofruktose RAFTILOSE® P95 (von ORAFIT, Belgien; bestehend aus 95 % Oligofruktoseketten mit einem Polymerisationsgrad (DP) zwischen 2 und 7) und der Inuline RAFTILINE® ST, GR und LS (zuvor definiert und mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von etwa 10) auf Brustkarzinogenese, welche durch die Injektion von N-Methylnitroharnstoff (MNU) in Ratten induziert wurde, wie auch auf das Wachstum transplantierbarer TLT-Tumore (Taper-Lebertumor) in Mäusen. Die untersuchten Oligofruktose und Inuline zeigten, dass sie etwa gleiche Karzinogenese-protective und Krebs-inhibierende Effekte hatten.

[0029] Weiterhin ist die Beziehung zwischen Aufnahme an Nahrungsfasern und der Verminderung des Risikos von Dickdarmkrebs in verschiedenen Veröffentlichungen offenbart worden, z.B. J. Potter et al., *Principles of Chemoprevention*, IARC Scientific Publication Nr. 139, 61-90 (1996); G. R. Howe et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 1887-1896 (1992); und B. S. Reddy et al., *Gastroenterol.*, 102, 1475-1482 (1992).

[0030] R. J. Hambly et al., *Anticancer Research*, Band 15(5a), 1656-1657 (1995) offenbaren den Effekt von Hochrisiko- und Niederrisiko-Nahrungsfaktoren, die mit durch 1,2-Dimethylhydrazin in Humanflora-assoziierten Ratten induziertem kolorektalem Krebs assoziiert sind. Es werden günstige Effekte für die Verhütung von kolorektalem Krebs des Niederrisiko-Nahrungsfaktors bei einer Diät mit wenig Fett und viel Stärke, Calcium und Fasern, einschließlich Inulin, offenbart.

[0031] JP-A-02 172921 (T. Oba et al.) offenbart die Herstellung einer gereinigten Inulinsubstanz mit Antitumoreffekten aus kultivierten oder transformierten Pflanzenzellen, die aus *Platicodon grandiflorum* A. DC stammen. Der Antitumoreffekt der Inulinsubstanz, die oral oder intraperitoneal verabreicht wird, auf hydroperitoneale Tumore in Mäusen, welche durch die Inokulation von Ehrlich-Hydroperitoneumkrebszellen in den rechten Schenkelabschnitt der Peritonealhöhle hervorgerufen wurden, wird offenbart.

[0032] JP-A-60 089427 (M. Kubo et al.) offenbart ein Antitumoragens, welches eine Inulinsubstanz als aktive Komponente enthält, die aus den Wurzeln von *Platicodon grandiflorum* A. DC. erhalten wurde. Das Inulin hat ein Molekulargewicht von 2000 bis 6000 (entsprechend einem Polymerisationsgrad von 12 bis 37). JP-A-60 089427 offenbart die Antitumoraktivität des Inulins, das oral oder intraperitoneal verabreicht wurde, auf Tumore bei Mäusen, welche durch die Inokulation von Ehrlich-Abdominalödemkrebszellen in den rechten Schenkelabschnitt der Peritonealhöhle hervorgerufen wurden.

[0033] JP-A-63 093729 (K. Kawamura et al.) offenbart ein Verfahren zur Behandlung maligner Tumore, gemäß dem aus einem Lebendorganismus mit einem malignen Tumor erhaltenes Blutserum oder Blutplasma in Kontakt mit einem Blutserum oder Blutplasma in seiner unlöslichen Form einer oder mehrerer ausgewählter makromolekularer Komponenten, umfassend verschiedene Polysaccharide einschließlich Inulin, gebracht wird und danach in denselben oder dieselbe Art von lebenden Körper injiziert wird. Der Antitumoreffekt wird für zahme Kaninchen beschrieben, die mit Vx2 Krebszellen im Rücken inokuliert waren, und für Mäuse, die mit MethA Krebszellen im Abdomen inokuliert waren, wobei Blutserum verwendet wurde, das mit quervernetztem Dextran, Natriumalginat-beladenen Silikagel, Polyacrylsäure oder Lipopolysaccharid kontaktiert war.

[0034] G. R. Gibson et al., Gastroenterology, Band 108(4), 975-982 (1995) offenbaren Effekte oraler Aufnahme von Oligofruktose mit einem Polymerisationsgrad zwischen 2 und 6 und einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 4 und von Inulin aus Chicoréewurzeln mit einem Polymerisationsgrad zwischen 2 und 60 und einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 10 auf die Flora des menschlichen Dickdarms bei gesunden Freiwilligen. Wie durch Stuhlanalyse indiziert, wurden die Gesamtbakterienzahlen unverändert gefunden, jedoch erhöhten sowohl Oligofruktose als auch Inulin signifikant die Anzahl von Bifidobakterien, während sie einen Abfall unerwünschter Bakterienspezies hervorriefen. Günstige Effekte der Nahrungsaufnahme von Oligofruktose und Inulin auf den Stuhl wurden ebenfalls offenbart. Weiterhin wurden günstige Effekte von Bifidobakterien und der oralen Aufnahme von Bifidobakterien in Verbindung mit Oligofruktose, auf die Verminderung von karzinogen induzierter Dickdarmkarzinogenese in Mäusen erwähnt, die zuvor durch M. Koo et al., Nutr. Rev., Band 51, 137-146 (1991) offenbart worden sind.

[0035] Selektive wachstumsstimulierende Effekte auf koloniebildende Milchsäure-erzeugende Bakterien, einschließlich Lactobacillus und Bifidusbakterien bei Menschen und Ratten, und assoziierte günstige Gesundheitseffekte, wie etwa die Unterdrückung der Erzeugung intestinaler putrefaktiver Substanzen, die durch nicht verdauliche Oligosaccharide, einschließlich Neosugar, einer synthetischen Frukt-Oligosaccharid-Mischung mit einem Polymerisationsgrad im Bereich von 2 bis etwa 5, der aus Saccharose unter Verwendung einer Fruktosyltransferase erzeugt wurde, bereitgestellt wurden, wurden durch H. Hidaka et al., Bifidobacteria Microflora, Band 5(1), 37-50 (1986) offenbart.

[0036] Jedoch ist, trotz der enormen Anstrengung, die bereits im Kampf gegen Krebserkrankungen und Dickdarmkrebs im Besonderen unternommen worden sind, die Verhütung und erfolgreiche Hemmung und Heilung von Dickdarmkrebs noch nicht immer möglich. Daher sucht die Medizin immer noch nach Verbesserungen zur Verhütung, Hemmung und Heilung von Dickdarmkrebs. Aus verschiedenen Gründen, wie Patientenannehmlichkeit, sind chemotherapeutische Verfahren am bevorzugtesten. Dementsprechend gibt es eine kontinuierlich stattfindende Suche nach verbesserten und/oder alternativen Zusammensetzungen und therapeutischen Verfahren, die einen günstigen Effekt in Bezug auf die Hemmung und/oder Behandlung von Kolonkarzinomen zeigen, oder weniger unerwünschte Nebenwirkungen im Vergleich zu bekannten Zusammensetzungen und therapeutischen Verfahren zeigen.

Beschreibung der Erfindung

[0037] Der Anmelder stellt mit der vorliegenden Erfindung eine Lösung für eines oder mehrere der oben erwähnten Probleme bereit, die sogar zusätzliche Vorteile zeigen kann.

[0038] Unter dem Ausdruck Dickdarmkrebs versteht man hierin die Dickdarmdarmkrebserkrankung in jeder ihrer Stufen, einschließlich Kolonkarzinogenese, die Ausbildung maligner Zellen im Dickdarm, Proliferation der malignen Zellen und Bildung von Tumoren im Dickdarm und/oder Invasion von normalen Dickdarmstrukturen durch die malignen Zellen.

[0039] Die Erfindung basiert auf den von den Erfindern während ausgedehnter Studien gemachten Erkenntnissen, dass Fruktane mit einem höheren Polymerisationsgrad, insbesondere Fruktane mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 15 oder mehr, verbesserte präventive und Hemmungseigenschaften gegenüber Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern im Vergleich zu Fruktan mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad zeigen.

[0040] Im Hinblick auf den Stand der Technik könnte erwartet werden, dass Fruktane mit einem höheren Polymerisationsgrad, wie gewisse Fruktane mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad, präventive und/oder inhibitorische Eigenschaften gegenüber Dickdarmkrebs aufweisen. Jedoch konnten die überraschenden Erkenntnisse der Erfinder, dass Fruktane, insbesondere Inuline, mit einem höheren durchschnittlichen Polymerisationsgrad signifikant verbesserte präventive und inhibitorische Eigenschaften gegenüber Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern zeigen, im Vergleich zu Fruktanen mit einem niedrigeren durchschnittlichen Polymerisationsgrad, im Hinblick auf den Stand der Technik überhaupt nicht erwartet werden.

[0041] Demgemäß bezieht sich in einem Aspekt die vorliegende Erfindung auf die Verwendung des Fruktans mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 15 für die Herstellung einer Zusammensetzung für das Verhindern und/oder die Behandlung von Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern, insbesondere bei Menschen.

[0042] In einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung einer Zusammensetzung,

welche ein Fruktan mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von mindestens 15 umfasst, zur Verhütung und/oder Behandlung von Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern, insbesondere Menschen.

[0043] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fruktan Levan, vorzugsweise mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 20, bevorzugterweise im Bereich von 20 bis 50.

[0044] Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Fruktan Inulin, vorzugsweise mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 20, noch bevorzugterweise im Bereich von 20 bis 70. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das Inulin einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad im Bereich von 20 bis 40. Ein typischerweise bevorzugtes Inulin hat einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von etwa 25.

[0045] Im wesentlichen aus linearen Polysaccharidketten bestehendes Inulin oder bis zu etwa 2 Gew.% verzweigte Polysaccharidketten enthaltendes Inulin sind gemäß der Erfindung geeignet, aber Inulin, welches einen höheren Prozentsatz verzweigter Ketten enthält, und sogar Inulin, das im wesentlichen aus verzweigten Polysaccharidketten besteht, und sogar Mischungen der linearen und verzweigten Inuline sind ebenfalls erfindungsgemäß geeignet. Typische gemäß der Erfindung geeignete Inuline sind Chicoréeinulin, beispielsweise RAFTILINE® HP und RAFTILINE® HP-Gel (beide hochleistungsfähige Inuline [kurz HP-Inulin] von ORAFIT, Belgien), mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von etwa 25.

[0046] Unter dem Begriff Zusammensetzung, wie in der vorliegenden Erfindung verwendet, versteht man hier ein Medikament (d.h. eine Zusammensetzung, die einen prophylaktischen und/oder heilenden Effekt auf einen Säuger hat, dem sie verabreicht worden ist), wie auch ein Funktionsnahrungsmittel (d.h. ein Nahrungsmittelprodukt für Menschen oder für einen nicht-menschlichen Säuger, das zusätzliche funktionelle Ingredienzien enthält und das außer seinen Nahrungseigenschaften diesen Lebewesen zusätzlich einen oder mehrere günstige physiologische Effekte bereitstellt). Bei den gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Funktionsnahrungsmittel-Zusammensetzungen versteht man unter dem zusätzlichen Funktionsbestandteil ein Fruktan, einschließlich Levanen und Inulinen, wie hier zuvor definiert. Typische günstige physiologische Effekte sind beispielsweise günstige Effekte auf den Verdauungstrakt, Effekte auf den Lipidmetabolismus und präventive Effekte gegen Krebs, insbesondere Dickdarmkrebs.

[0047] Wenn gemäß der vorliegenden Erfindung die Zusammensetzung ein Medikament ist, kann es aus dem definierten Fruktan bestehen oder kann das Fruktan in Kombination mit jeglichem pharmazeutisch akzeptablen Träger umfassen, und optional auch in Kombination mit einer oder mehreren physiologisch aktiven Verbindungen, Medikamenten oder Medikamentenvorstufen. Das Medikament kann jegliche im Stand der Technik bekannte Form haben und kann gemäß bekannten Verfahren verabreicht werden. Vorzugsweise liegt das Medikament in Form eines Pulvers, einer Tablette, einer Weichgelpkapsel, eines Sirups, einer Lösung oder einer Suspension vor und wird oral verabreicht. Wenn jedoch in einer geeigneten galenischen Form vorliegend, kann die Zusammensetzung auch parenteral verabreicht werden, über Sondenernährung oder rektal.

[0048] Wenn die Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung ein Funktionsnahrungsmittel ist, soll sie oral verabreicht werden und kann sie in jeglicher bekannten Nahrungsmittelform vorliegen, wie etwa beispielsweise ein Aufstrich, ein Milchprodukt, wie etwa z.B. eine Milch, ein Milchdessert, ein Joghurt oder ein Käse, ein alkoholisches oder nicht-alkoholisches Getränk, ein Bäckereiprodukt, eine Schokolade, eine Eiscreme, ein Fleischprodukt, ein Fruchtzubereitung, ein Confiserieprodukt, ein Cerealienprodukt, eine Sauce, eine Suppe, ein Snack, eine Trockenmischung, ein Nahrungsmittelerersatz, ein Haustierfutter und dergleichen.

[0049] Die zum Bereitstellen von Verhütung gegen Mastdarmkrebs effektive tägliche Dosis reicht, abhängig von der Säugerspezies und der Fruktanart, von 0,01 bis 2 g/kg Körpergewicht, bevorzugterweise von 0,05 bis 0,5 g/kg Körpergewicht.

[0050] Die zum Bereitstellen eines inhibativen und/oder heilenden Effekts bei Dickdarmkrebs effektive Tagesdosis reicht vorzugsweise, abhängig von der Säugerspezies, der Fruktanart und dem Entwicklungsstadium des Dickdarmkrebses von 0,2 bis 3 g/kg Körpergewicht, bevorzugterweise von 0,5 bis 1,5 g/kg Körpergewicht.

[0051] Die Tagesdosis der gemäß der hier vorstehend beschriebenen vorliegenden Erfindung verwendeten Zusammensetzung kann einem für Dickdarmkrebs empfindlichen Säuger gemäß bekannten Verfahren in einer oder mehrerer Einheitsdosen während eines kürzeren oder längeren Zeitraums verabreicht werden, als Funktion der Stärke des von der Zusammensetzung bereitgestellten Effekts. Wenn die Zusammensetzung ein

Funktionsnahrungsmittel ist und auf einen präventiven Effekt abgezielt wird, kann das Funktionsnahrungsmittel vorzugsweise in einer oder mehrerer Formen über einen längeren Zeitraum verabreicht werden, am bevorzugtesten während der gesamten Lebenszeit des Säugers.

[0052] Neben den verbesserten physiologischen, prophylaktischen und/oder therapeutischen Effekten der Fruktane mit einem höheren Polymerisationsgrad im Vergleich zu Fruktanen mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad zeigen die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Zusammensetzungen signifikant zusätzliche Vorteile. Die Zusammensetzungen können beispielsweise leicht aufgenommen oder verabreicht werden, ohne signifikantes Unwohlsein für den betroffenen Säuger. Weiterhin vermindert die Anwesenheit von Fruktanketten mit einem höheren Polymerisationsgrad gewisse Unannehmlichkeiten, denen man oftmals bei der Aufnahme nicht verdaulicher Kohlenhydrate begegnet, wie etwa weichem Stuhl, Diarrhö, Flatulenz, Blähungen und Darmkrämpfe.

[0053] Ein weiterer, von Fruktanen, insbesondere dem bevorzugten Chicoréeinulin, gezeigter, beachtenswerter Vorteil, der sich auf die vorliegende Erfindung bezieht, liegt darin, dass sie natürlich auftretende biodegradierbare Produkte sind, die frei von toxischen Effekten sind und dass sie von neugeborenen wie auch erwachsenen, einschließlich schwangeren und alten Säugern, genommen und ihnen verabreicht werden können. Verglichen mit vielen bekannten chemotherapeutischen Zusammensetzungen wird die Aufnahme von oder Verabreichung von und die Behandlung mit einer Zusammensetzung, welche die oben definierten Fruktane umfasst, üblicherweise vom Säuger gut vertragen und ruft keine signifikanten unerwünschten Nebenwirkungen oder signifikantes Missbehagen, falls überhaupt, am Säuger hervor. Weiterhin sind die gemäß der vorliegenden Erfindung geeigneten Fruktane weitgehend kommerziell zu vertretbaren Kosten erhältlich.

Experimenteller Teil

[0054] Zur Stützung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden illustrativen experimentellen Daten bezüglich einer Studie gegeben, die gemacht worden ist, um den Effekt von Oligofruktose und HP-Inulin auf Karzinogen-induzierte kolonaberrante Krypten-Foci-(ACF)-Bildung in Ratten zu bestimmen.

[0055] Aberrante Krypten-Foci (ACF), die als frühe präneoplastische Läsionen im Dickdarm wahrgenommen werden, sind durchgängig in experimentell induzierter Kolonkarzinogenese bei Labortieren beobachtet worden (McLellan, E. A. et al., *Cancer Res.*, 51, 5270-5274 (1991) und Wargovich, M. H., et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.*, 5, 355-360 (1996)).

[0056] Pretlow, T. P., et al., *J. Cell. Biochem.*, 16G (Suppl.), 55-62 (1992) haben ebenfalls gezeigt, dass diese Läsionen in der Dickdarmmucosa von Patienten mit Dickdarmkrebs vorhanden sind und haben darauf hingewiesen, dass aberrante Krypten mögliche Vorläuferläsionen sind, aus denen sich Adenome und Karzinome im Dickdarm entwickeln können. ACF exprimieren Mutationen im *apc* Gen und im *ras* Oncogen, welche als Biomarker der Dickdarmkrebsentwicklung erscheinen (Vivona, A. A., et al., *Carcinogenesis (Lond.)* 14, 1777-1781 (1993)).

[0057] Es gibt eine gewisse Evidenz dafür, dass verschiedene Inhibitoren der ACF-Bildung das Auftreten von Dickdarntumoren bei Labortieren vermindern (Wargovich, M. H., et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.*, 5, 355-360 (1996)), was nahe legt, dass die ACF-Induktion verwendet werden kann, um neue Agenzien auf ihre potentiellen chemopräventiven Eigenschaften gegen Dickdarmkrebs zu evaluieren.

MATERIALIEN UND VERFAHREN

Tiere, Diäten, Karzinogen und chemopräventive Agenzien.

[0058] Azoxymethan (AOM) wurde von Ash Stevens (Detroit, MI, USA) erhalten. RAFTILOSE® P95 und RAFTILINE® HP, welche an Trockensubstanz hauptsächlich Oligofruktose (95 %) bzw. Inulin (99,5 %) enthielten, wurden von ORAFTI (Tienen, Belgien) erhalten. RAFTILOSE®, welche durch partielle enzymatische Hydrolyse von Chicoréeinulin hergestellt wurde, ist ein polydisperses β [2-1]Fruktan mit einem (DP), der von 2 bis 7 reicht und einen (DP) von 4,5. RAFTILINE® HP (d.h. Hochleistungsinulin und hier als HP-Inulin abgekürzt) ist Chicoréeinulin, aus dem die Nieder-(DP)-Fraktion entfernt worden ist. Sein (DP) reicht von 10 bis 60 und es hat einen (DP) von 25. Die Auswahl von Testsubstraten gestattet daher, Effekte des Polymerisationsgrads zu beobachten.

[0059] Männliche Weanling F344-Ratten wurden von den Charles River Breeding Laboratories (Kingston, NY,

USA) erhalten. Alle Zutaten der AIN-76A halbgereinigten Diät wurden von Dyets Inc., (Bethlehem, PA, USA) erhalten und wurden bei 4°C gelagert, bis die experimentellen Diäten vorbereitet wurden. Die Prozentsatzzusammensetzung der halbgereinigten Diät ist wie folgt: Casein, 20; D,L-Methionin, 0,3; Maisstärke, 52; Dextrose, 13; Maisöl, 5; Alphacel, 5; Mineralienmix (AIN-76A), 3,5; Vitamin-Mix (AIN-76A), 1; und Cholinbitartrat, 0,2 (Reddy B. S., et al., Cancer Res., 48, 6642-6647 (1988)). Die Ratten wurden 1 Woche in Quarantäne gehalten und hatten Zugriff auf modifizierte AIN-76A halbgereinigte Kontrolldiät. Sie wurden zufällig gewichtsverteilt in verschiedene Diätgruppen und in einen Tierhalteraum transferiert, wo sie in Plastik Käfigen zu 3 Ratten pro Käfig unter kontrollierten Bedingungen von 12 h Licht/12 h Dunkelheitszyklus, 50 relative Luftfeuchte und 21°C Raumtemperatur gehalten wurden. RAFTILOSE® und RAFTILINE® wurden der Kontrolldiät mit 10 Level auf Kosten von Stärke zugeführt.

[0060] Experimentelle Prozedur. Beginnend im Alter von 5 Wochen wurden Gruppen von Tieren die Kontroll- oder experimentelle Diät gefüttert. Alle Tiere außer den Vehikel-behandelten Ratten erhielten AOM s.c. einmal wöchentlich im Alter von 7 und 8 Wochen in einer Dosisrate von 15 mg/kg Körpergewicht/Woche. Für Vehikel-behandlung vorgesehenen Tieren wurde ein gleiches Volumen normaler Kochsalzlösung gegeben. Die Ratten wurden, bis zum Ende der Studie, wenn sie ein Alter von 16 Wochen hatten, auf Kontroll- oder experimentellen Diäten gehalten. Alle Tiere wurden durch CO₂-Euthanasie geschlachtet. Die Dickdärme wurden entfernt, mit Krebs-Ringerlösung gespült, vom Cecum bis zum Anus geöffnet und zwischen zwei Stücken Filterpapier in 10 % gepuffertem Formalin flach fixiert. Nach einem Minimum von 24 h in gepuffertem Formalin wurden die Dickdärme in 2-cm-Segmente geschnitten, in einer Petrischale platziert, die 0,2 Methylenblau in Krebs-Ringer-Lösung enthielt und für 5 bis 10 min aufbewahrt. Sie wurden dann mit der Mucosaseite nach oben auf einem mikroskopischen Objektträger platziert und durch ein Lichtmikroskop beobachtet. ACF wurden gemäß Standardverfahren aufgezeichnet (McLellan E. A., et al., Cancer Res., 51, 5270-5274 (1991)).

[0061] Aberrante Krypten wurden von umgebenen normalen Krypten durch ihre vergrößerte Größe, signifikant vergrößerten Abstand von Lamina- bis Basaloberfläche der Zellen und die leicht unterscheidbare perikryptale Zone unterschieden. Die Kryptenmultiplizität wurde als die Anzahl von Krypten in jedem Focus bestimmt und als solche, die bis zu 3, oder 4 und mehr aberrante Krypten pro Focus enthielten, kategorisiert. Alle Dickdärme wurden durch einen Beobachter bewertet, ohne die Identität von untersuchten Agenzien zu kennen; die Ergebnisse wurden zufallsbedingt durch einen zweiten Beobachter überprüft.

[0062] Statistische Analyse. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD ausgedrückt und wurden durch einen einseitigen Student's t-Test analysiert. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bei $p < 0,05$ angesehen.

ERGEBNISSE

[0063] Allgemeine Beobachtungen. Die Körpergewichte von AOM- und Vehikel-behandelten Tieren, denen die Kontroll- und experimentellen Diäten, die 10% Inulin oder Oligofruktose enthielten, gefüttert wurden, waren während der Studie vergleichbar (Tabelle 1, nachfolgend). Es gab keine Anzeichen jeglicher negativer Effekte bei Leber, Niere, Magen, Darm oder Lungen von Tieren, denen Inulin oder Oligofruktose gefüttert wurde.

[0064] Aberrante Krypten-Foci. Die nachfolgende Tabelle fasst die AOM-induzierten ACF im Dickdarm von Ratten, denen die Kontroll- und experimentellen Diäten gefüttert wurden, zusammen. Die Tiere, denen Kochsalzlösung (Vehikel) zugeführt und denen die Kontrolle und experimentellen Diäten, die Inulin oder Oligofruktose enthielten, gefüttert wurden, zeigten keine Evidenz von ACF-Bildung im Dickdarm (Daten nicht gezeigt). Bei den Tieren, denen die Kontrolldiät gefüttert worden war, induzierte die AOM-Behandlung im Durchschnitt etwa 120 ACF/Dickdarm. ACF wurden hauptsächlich in den distalen Dickdärmen beobachtet. In dieser Studie verwendete Wirksamkeitseindpunkte waren die Inhibition der Gesamtzahl von ACFs/Dickdarm wie auch die Verminderung der Zahl von Multikrypten-Clustern (2 oder mehr) von aberranten Krypten/Focus. Die Verabreichung von Oligofruktose oder HP-Inulin in der Diät unterdrückte die Gesamtzahl von ACF/Dickdarm im Vergleich zur Kontrolldiät signifikant; der Inhibierungsgrad war signifikant stärker betont bei Tieren, denen HP-Inulin gefüttert wurde ($p < 0,006$) als bei denen, denen Oligofruktose gefüttert wurde ($p < 0,02$). Die Kryptenmultiplizität, ausgedrückt als 2 oder 3 aberrante Krypten/Focus war ebenfalls bei HP-Inulin ($p < 0,02 - 0,0001$) oder Oligofruktose ($p < 0,04 - 0,01$) gefütterten Tieren signifikant inhibiert.

[0065] Da die Multiplizität von aberranten Krypten ein wahrscheinlicher Vorhersageindikator von Dickdarmtumormolgen (Pretlow, T. P., et al., Carcinogenesis (Lond.), 13, 1509-1512 (1992)) gewesen ist, verwendete die vorliegende Studie dieses Kriterium, um Oligofruktose und HP-Inulin auf ihre potentiellen inhibitorischen Eigenschaften zu evaluieren.

Tabelle 1. Körpergewichte von Tieren, die mit Kontrolldiät und experimentelle Diäten gefüttert wurden, die Oligofruktose und HP-Inulin enthielten.

Experimentelle Gruppen	Körpergewichte (g) bei Kontroll- und experimentellen Diäten			
	in Woche:			
	()	3	6	10
<u>AOM-behandelt</u>				
1. Kontrolldiät	119 ± 5,9 ^a	173 ± 9,1	257 ± 11	320 ± 14
2. Oligofruktose, 10%	119 ± 6,6	167 ± 9,8	258 ± 15	327 ± 16
3. HP-Inulin, 10%	120 ± 7,1	73 ± 7,8	259 ± 12	328 ± 15
<u>Kochsalzlg.-behandelt</u>				
4. Kontrolldiät	117 ± 8,5	179 ± 9,7	256 ± 9,8	329 ± 12
5. Oligofruktose, 10%	120 ± 5,9	175 ± 7,3	264 ± 9,3	338 ± 12
6. HP-Inulin, 10%	119 ± 5,7	171 ± 6,0	256 ± 8,1	329 ± 13

^a Mittelwert ± SD

Tabelle 2. Effekt von Nahrungs-Oligofruktose und HP-Inulin auf die Dickdarm-ACF-Bildung bei männlichen F344-Ratten.

Experimentelle Gruppen	Gesamt-ACF/ Dickdarm	die Anzahl von aberranten Krypten enthaltenden Foci			
		1 Krypta/ Focus	2 Krypten/ Focus	3 Krypten/ Focus	4 oder mehr Krypten/ Focus
Kontrolldiät	120 ± 28	19,5 ± 7,3	43,7 ± 7,8	28,2 ± 7,5	28,3 ± 8,2
Oligofruktose, 10%	92 ± 28 ^b (p<0,024)	15,4 ± 7,5	31,2 ± 13 ^b (p<0,01)	21,3 ± 7,8 ^b (p<0,04)	23,9 ± 8,2
HP-Inulin, 10%	78 ± 37 ^b (p<0,006)	15,7 ± 8,2	24 ± 12 ^b (p<0,0001)	16,6 ± 7,2 ^b (p<0,02)	21,8 ± 14,2

^a Mittel ± SD

^b Signifikant anders bei der Kontrolldiät. Das Signifikanzniveau ist in Klammern gezeigt.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Fruktans mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 15 für die Herstellung einer Zusammensetzung für die Prävention und/oder Behandlung von Dickdarmkrebs bei nicht-bovinen Säugern.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Säuger ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus einem Menschen, einem Hund und einer Katze besteht.
3. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Fruktan ein Levan ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei das Levan einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 20 aufweist.
5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Fruktan ein Inulin ist.
6. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei das Inulin einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von zumindest 20 aufweist.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei das Inulin einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad im Bereich von 20 bis 40 aufweist.
8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei das Inulin Chicoréeinulin ist.
9. Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei das Inulin Chicoréeinulin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von ≥ 23 ist.
10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zusammensetzung ein Medikament ist.
11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei das Medikament in einer galenischen Form zur oralen, parenteralen oder rektalen Verabreichung oder zur Verabreichung über Sondenernährung vorliegt.
12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zusammensetzung ein funktionelles Nahrungsmittel ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen