



MEMORIA DESCRIPTIVA

Las disacaridasas intestinales de los animales superiores se encuentran localizadas en la membrana luminal de la mucosa intestinal; allí, estos enzimas hidrolizan los disacáridos como paso previo a la absorción de los azúcares como monosacáridos.

La deficiencia en lactasa es un error metabólico que se da muy rara vez congenitamente, pero que se desarrolla, siendo normal en ratas y conejos adultos y muy común en humanos adultos. Parece existir una marcada disminución de la actividad lactasa, independientemente de la dieta, desde el momento del destete, excepto en humanos cuyos antepasados han dependido, durante mucho tiempo, de un consumo sustancial de leche. La determinación de la lactasa intestinal es, por tanto, importante tanto en pediatría como en gastroenterología. Esta valoración puede llevarse a cabo directamente, a partir de una muestra de mucosa, o indirectamente a partir del nivel de glucosa en sangre después de una dosis de lactosa.

En esta patente se describe un procedimiento de obtención de 3-metil lactosa, cuya utilización constituye la base de un método simple, incruento y específico que puede permitir la evaluación rutinaria de la actividad de este enzima in vivo.

Generalmente, las glicosidasas no son específicas para el aglicón de los glicósidos y oligosacáridos y este es el caso de la  $\beta$ -galactosidasa intestinal, aunque se han descrito algunas excepciones. La 3-metil lactosa puede ser un buen sustrato de la lactasa intestinal dando lugar a 3-metil glucosa y galactosa. La 3-metil glucosa se absorbe fácilmente por el intestino y se elimina rápidamente en la orina debido a una favorable combinación de especificidades, ya que es un buen sustrato del portador de glucosa intestinal, es inerte a la hexokinasa y a la glucokinasa, y no es sustrato del portador de glucosa renal. Administrando a un animal 3-metil lactosa debe poder, por tanto, valorarse su actividad lactasa analizando la 3-metil glucosa eliminada en la orina.

La preparación de la 3-metil lactosa, se ha llevado a cabo a

partir de lactosa. La benzoilación de la lactosa conduce, entre otros productos a la 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6'-heptabenzoil lactosa con un rendimiento del 25 %. La metilación de este heptabenzoiato da lugar, con rendimiento casi cuantitativo, a 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6'-hepta-O-benzoil-3-O-metil lactosa. La desbenzoilación de este producto con metóxido sódico en metanol o con amoniaco metanólico conduce a 3-metil lactosa, como un sólido amorfo.

Como fuente de lactasa intestinal, libre de  $\beta$ -galactosidasa lisosomal (que tiene diferentes especificidades), se ha aislado "brush border" de la mucosa intestinal de rata por el método de Miller y Crane. Esta lactasa intestinal hidrolizó la 3-metil lactosa a pH 6, 5, con virtualmente la misma eficiencia que la lactosa:  $V_{max}$  90 %  $K_m$  25mM, frente a 20 mM para la lactosa.

La 3-metil lactosa o una mezcla de 3-metil glucosa y galactosa se administró a ratas lactantes por vía oral, recogiendo seguidamente su orina y analizando azúcares en ella. Los resultados obtenidos indican (ver tabla 1) que la 3-metil glucosa, libre de 3-metil lactosa, aparece en la orina al poco tiempo de haber sido administrada la 3-metil lactosa; la eliminación de la 3-metil glucosa liberada fue lineal durante las primeras ocho horas. La rápida eliminación de 3-metil glucosa observada en el caso de administración oral de la mezcla 3-metil glucosa + galactosa, parece indicar que la hidrólisis de 3-metil lactosa en el intestino es el factor limitante.

La valoración de 3-metil glucosa en orina se ha realizado determinando el poder reductor con controles enzimáticos de galactosa y glucosa o, mejor, por cromatografía gas-líquido.

En lo anteriormente descrito se han sentado las bases para la valoración de la actividad lactasa intestinal in vivo. La 3-metil lactosa es un buen sustrato de la lactasa intestinal y administrada por vía oral a ratas lactantes conduce a la aparición en la orina de la 3-metil glucosa, valorable por poder reductor o, más específicamente, por cromatografía gas-líquido. Con base en estos resultados se propone la utilización de 3-metil lactosa para un método incruento y sencillo de diagnóstico de las

deficiencias de lactasa.

EJEMPLO:

Preparación de 3-metil lactosa

5 A una solución de  $\alpha$ -lactosa hidrato (20 g) en hidróxido sódico al 20 % (1 l) se añadió en pequeñas porciones, con agitación, cloruro de benzoilo (100 ml). La mezcla se agitó durante 1 h., se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h., se filtró y el sólido se lavó con agua hasta neutralidad y se extrajo con metanol a ebullición. El sólido siruposo se cristalizó de cloroformo-metanol para dar 16 g de 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6'-hepta-O-benzoil lactosa, p.f. 195-197°. Este compuesto (10 g) se metiló con diazometano en diclorometano y en presencia de trifluoruro de boro etera to para dar 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6'-hepta-O-benzoil-3-O-metil lactosa (7 g), p.f. 204-205°. Este producto (10 g) se disolvió en dioxano seco (20 ml) y metanol absoluto (20 ml) y a la solución se añadieron 50 ml de metóxido sódico 0, 2 M en metanol, se dejó estar a temperatura ambiente durante media hora. Al cabo de este tiempo la solución se neutraliza con Amberlita IR-120 (H), se filtra y se evapora a sequedad. El residuo (producto si ruposo) aparece impurificado por pequeñas cantidades de productos secun darios en cromatografía en capa fina (acetona-agua 17:3). Una muestra del producto se purifica cromatográficamente, la muestra mostró caracte rísticas espectroscópicas (IR, RMN) de acuerdo con la estructura pro puesta; la hidrólisis ácida y enzimática del producto, conduce a galactosa y 3-metil glucosa.

25 Eliminación de 3-metil glucosa en orina tras administración oral de 3-metil lactosa.

30 Un grupo de cuatro ratas lactantes, de la misma camada y con quince días de edad ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  y  $B_2$ ) se mantuvieron en ayuno duran te cuatro horas en jaulas metabólicas a 30° C. A estas ratas se les admi nistraron los azúcares en solución de 0, 5 ml con cloruro sódico para man tener la osmolaridad como se indica (Tabla 1).

Otro grupo de cuatro ratas similares, pero de diferente cama da ( $B_3$  a  $B_6$ ) se trataron del mismo modo, pero se les administró 3-metil

Ratas	Azúcares administrados por vía oral				Azúcares eliminados en orina en 8 horas				
	3MG	GAL	3ML	Osmolaridad	mg	Distribución %		% 3MG	
	mg		ml	osm/l		3MG	Glu Gal	(a partir de 3ML)	
CONTROLES	A <sub>1</sub>	24	25	-	0,5	24	89	3 8	-
	A <sub>2</sub>	24	25	-	0,5	22	85	3 11	-
PROBLEMAS	B <sub>1</sub>	-	-	50	0,5	4	95	2 2	18
	B <sub>2</sub>	-	-	50	0,5	5	95	2 2	20
	B <sub>3</sub>	-	-	50	0,25	3,2 ± 0,5	95	3 2	12 ± 4
	B <sub>4</sub>	-	-	50	0,25				
	B <sub>5</sub>	-	-	50	0,25				
	B <sub>6</sub>	-	-	50	0,25				

( + Na<sup>+</sup> )

( + Na<sup>+</sup> )

lactosa en 0,5 ml.

Se recogió orina, tras presionar la vejiga transabdominalmente, cada dos horas durante ocho horas. Los azúcares eliminados durante este tiempo se indican en la tabla 1. Los controles eliminaron la mayor parte de la 3-metil glucosa dentro de las primeras cuatro horas (68 % de la 3-metil glucosa administrada); la eliminación de la 3-metil glucosa en las ratas tratadas con 3-metil lactosa fue lineal con el tiempo durante el periodo observado.

Los azúcares totales se estimaron con el reactivo de Somogy-Nelson; galactosa y glucosa se determinaron enzimáticamente con galactosa deshidrogenasa y glucosa oxidasa respectivamente.

#### REIVINDICACIONES

Se reivindica como de nueva y propia invención la propiedad y explotación exclusiva de:

1) "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE 3-METIL-LACTOSA UTILIZABLE PARA LA EVALUACION DE LA LACTASA INTESTINAL" caracterizado porque en una primera etapa tiene lugar una benzoilación de la  $\alpha$ -lactosa, obteniéndose la 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6' hepta benzoil lactosa, la cual, en una segunda etapa, se somete a una metilación para dar la 1, 2, 6, 2', 3', 4', 6'-hepta-O-benzoil-O-metil lactosa; en la tercera y última etapa tiene lugar la desbenzoilación de este compuesto dando lugar a la 3-metil lactosa.

2) Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque la segunda etapa se emplea como agente metilante diazometano-trifluoruro de boro eterato disuelto en cloroformo.

3) Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque la desbenzoilación de la tercera etapa se realiza empleando metóxido sódico en metanol y dioxano o bien amoníaco metanólico.

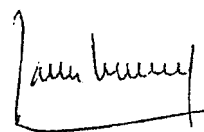
4) Un procedimiento según reivindicación 1 caracterizado porque la 3-metil lactosa obtenida se administra por vía oral y conduce a la aparición en la orina de 3-metil glucosa, que una vez valorada nos indica,

de manera incruenta y sencilla, las deficiencias de lactasa.

5) "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE 3-METIL-LACTO-  
SA UTILIZABLE PARA LA EVALUACION DE LA LACTASA INTESTINAL"  
tal y como se describe en el cuerpo de esta memoria y reivindicaciones  
que consta de siete páginas escritas por una sola cara.

5

Madrid, 13 de Marzo de 1.979

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis...' followed by a horizontal line.