



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

211253

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 16 01 79  
(21) (PV 1959-80)  
(32)(31)(33) Právo přednosti  
od 31 01 78 (P 28 04 138.5)  
Německá spolková republika

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 7/16  
(A 61 K 7/16,  
7/28)

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 15 08 83

(75)

Autor vynálezu

LEMBKE ANDREAS prof., EUTIN SIELBECK, GORNY DIETRICH,  
FRANKFURT/M (NSR)

(54) Přípravky pro výživu, popřípadě prevenci lidí a zvířat, chudé na vodu, šetřící chrup a popřípadě obsahující cukr

1

Vynález se týká přípravků pro výživu, popřípadě prevenci lidí a zvířat, chudých na vodu, šetřících chrup a popřípadě obsahujících cukr, zejména potom prostředků péče o chrup a zubní dutinu.

Je známo, že v ústní dutině dochází v přítomnosti mikroorganismů vlivem potravin, pochutin a léků s vysokým obsahem cukru, k vytvoření tzv. plaky a vznikají zde kyselé produkty odbourání, které silně napadají zubní sklovinu. Toto působení je známo pod názvem karies. Pod tím se rozumí nejdříve povrchový atak zubů, který pokračuje a rozrušuje dále zuby za vzniku kavit.

Pro vznik karies zubů mají význam v první řadě ty mikroorganismy, které se nacházejí v povlacích zubů, označovaných jako plaky, popřípadě pod nimi. Mikroorganismy, přítomné v zubních povlacích žijí, právě tak jako všechny ostatní zárodky, přítomné v ústní dutině ze zbytků jídla, zbývajících tam po požití potravy. Zvláště vítané jsou bakteriím nízkomolekulární uhlohydráty, především různé druhy cukrů, protože tyto představují nejlepší zdroje energie pro jejich pochody intenzivního růstu a látkové výměny.

Mechanismu tvorby karies se nezdá být dosud ve všech podrobnostech exaktně vysvětlen. Kariogenní mikroby, například *Streptococcus mutans* tvoří ferment dextran-sacharózu, který rozkládá surový cukr v anhydroglukózu a fruktózu. Anhydroglukóza se může potom spojovat do polymerních molekul, které se označují jako dextranové gely.

Mezi nimi vykazují zejména dextranové gely s molekulovou hmotností 10 000 až 20 000 obzvláštní lepidlost. Tyto dextranové gely slouží do jisté míry jako lepidla, která udržují dotyčné bakterie na povrchu zubů, tj. vytváří plaky. Uvedené bakterie mohou potom pod plaky za nepřístupu vzduchu vyrábět například ze vdifundovaného cukru kyseliny, například kyselinu mléčnou nebo jiné kyseliny, porušující zuby, což vede ke vzniku prvních porušení skloviny (počáteční karies), tj. dochází ke korozi dentinu se známými následnými zjevy. Po vytvoření plaky se při mezitím následující kariézní demineralizaci rozpouští zejména z apatitu skloviny zubu působením kyselin pozvolna vápník a fosforečnan.

U dosavadních pokusů zábrany karies byly navrženy dvě cesty. Tyto spočívají v zásadě buď ve zvýšení odolnosti zuboviny vůči napadení kyselinami, nebo v zeslabení účinku na zub.

Pod řešení uvedená jako první lze zahrnout pokusy fluorizace pitné vody, soli nebo mléka, které byly prováděny ve velkém rozsahu především v USA a ve Švýcarsku. Vedle toho se lze zmínit i o lokálních aplikacích tablet obsahujících fluor, popřípadě použití fluorizovaných sloučenin, jako fluoridu sodného, monofluorofosforečnanu sodného, fluoridu cínu s pyrofosforečnanem vápenatým nebo aminfluoridu. Ačkoliv podle zpráv došlo tímto ke zmenšení kariézních lezí, tak přece ale nemohou dosažené výsledky uspokojit. Vedle toho existují proti vnášení chemikálií, zejména do pitné vody a potravin, jako mléka, značné námitky, a to i fyziologického rázu. Kolektivní a individuální opatření fluorizace také nepostačují při nynější výživě civilního obyvatelstva k zabránění kariézního rozkladu zubů.

Zkoušelo se ale také bojovat proti karies kontrolou tvorby dextranu, například působením chemikálií. Tak je například v "Journal of Dental Health" sv. 22, č. 4, prosinec 1972 popsáno použití natriumolejanu a natriumlinoleátu k tomuto účelu, přičemž jejich vliv na tvorbu dextranu se podle DOS 2 442 825 má v prostředcích pro zubní hygienu zvýšit ještě přidávkou dihydrogenfosforečnanů rozpustných ve vodě. V DAS 1 467 809 bylo vzato také v úvahu použití vápenatých, sodných nebo hořečnatých solí esterů kyseliny fosforečné se sacharózou, glukózou nebo laktózou pro výrobu kariostaticky působících produktů péče o zuby. Tato opatření pro blokování metabolismu ústní mikroflóry, která používají systém dextran-sacharóza-enzym k výrobě "Dentalplaques" přinesly sebou sice určité zlepšení prostředků péče o zuby, avšak ne požadované rozhodující potření kariézního rozpadu zubů.

Ani známé pokusy využití principu lyolysy, totiž zabránit karies buď rozrušením kariogenních mikroorganismů jejich rozkladem, popřípadě narušením lepicích dextranových gelů, nemohly dosud uspojit. Tak je v DAS 2 011 935 popsáno rozrušení, popřípadě napadení kariogenních mikroorganismů enzymy, které byly izolovány z určitých kmenů Streptokoků. K tomuto účelu jsou uvedeny tři definované kmeny a jejich zavedení do prostředků péče o zuby. Vedle toho byl podle DOS 1 955 956 použit princip lyolysy na již vytvořeném dextranu pomocí enzymu dextranázy. Podle rakouského patentu č. 318 815 je dextranáza schopna rozložit pouze rozpustný dextran, protože nerozpustný dextran vykazuje podíl mutanu, který nemůže být dextranázou atakován. Proto je v tomto rakouském patentu navrhováno použití mutanázy.

Avšak ani tyto pokusy o zlepšení prostředků péče o zuby rozrušením mikroorganismů vyrábějících dextran nebo rozpuštěním samotných dextranů a inkorporací takových systémů do prostředků péče o zuby, nemohly až dosud uspokojit. To lze zčásti odvozovat z toho, že péče o zuby po každém jídle, požití sladkosti atd. není vždy možná, a nelze zabránit poškozením vzniklým mezitím.

Další cesta potírání karies spočívá v částečné, popřípadě úplné náhradě surového cukru jinými, nekariogenními cukry nebo alkoholickými cukry, popřípadě syntetickými sladidly.

Úplná náhrada sacharózy málo, popřípadě nekariogenními výměnnými látkami cukru, například alkoholickými cukry, xylitem a sorbitem, nepřichází z technologických, ekonomických, organoleptických nebo lékařských důvodů při mnoha použitích v úvahu.

Mezi syntetickými sladidly má sacharin, jedna z nejznámějších a nejpoužívanějších náhražek cukru, ten nedostatek, že vytváří u spotřebitelů nepříjemnou pachuti. U jiných látek, například cyklamátů, mají lékaři vážné námítky a ohledem na jejich škodlivost. Syntetická sladidla mají naproti tomu ten nedostatek, že je nelze s ohledem na jejich vysokou sladivost snadno dávkovat v malých množstvích, která se mají používat. V této souvislosti se mluví například o "prázdné chuti", tj. chybí požadované "tělo". Také fyziologické účinky brání všeobecně rozšíření těchto syntetických sladidel.

Bylo doporučováno také použití enzymů pro urychlení odbourání zbytků jídel a zabránění vzniku plaky. Uvádí se alfa-glukosidáza a/nebo beta-fruktosidáza (DOS 1 927 411), jakož i sloučenina polymerů a enzymů, která obsahuje neutrální alkalické a kyselé proteázy vedle amyláz, lipáz, dextranáz (DOS 1 948 298).

Navzdory těmto početným pokusům o potírání karies, které byly založeny na různých principech, existuje ještě naléhavá nutnost dodatečných, popřípadě nových opatření pro zabránění škodlivým následkům ataku kyselin v přítomnosti kariogenních mikroorganismů, aby se umožnilo při obvyklé výživě potlačit karies.

Úkolem předloženého vynálezu je působit proti škodlivým vlivům karies buď zlepšením obvyklých, na vodu chudých potravin, které byly vyrobeny za použití cukru, tak i popřípadě dodatečně, současným zlepšením prostředků péče o zuby, jakož i farmaceutických prostředků. Zlepšení potravin má zejména vyhovět těm okolnostem, že ke kariogennímu napadení dochází právě v době mezi obvyklým čištěním zubů. Zejména se podle vynálezu přihlíží k tomu, aby se potraviny bez náhrady pro ně obvykle používaného cukru, přeměnily přidávkou fyziologicky nezávadných látek v potraviny šetřící chrup.

Tato úloha je podle vynálezu vyřešena přípravky pro výživu, popřípadě prevenci lidí a zvířat, chudými na vodu a šetřícími chrup a popřípadě obsahujícími cukr, zejména prostředky pro péči o chrup a zubní hygienu, obsahujícími enzymy, jejichž podstata spočívá v tom, že obsahují enzym laktatdehydrogenázu v množství 0,2 mg až 0,5 g/kg, s výhodou 0,5 mg až 0,05 g/kg těchto přípravků, vztaženo na specifickou aktivitu 300 U/mg.

V alternativním provedení obsahují tyto přípravky enzym laktatdehydrogenázu v kombinaci s enzymem sacharázou, přičemž poměr enzymu laktatdehydrogenázy k enzymu sacharáze činí 4:1 až 1:10.

Pro zesílení účinku enzymu laktatdehydrogenázy obsahují tyto přípravky akceptor vodíku, například nikotinamidadeninnukleotid.

Při pokusech s těmito přípravky se ukázalo, že se přidávkou enzymu laktatdehydrogenázy značně zmenší atak karies. To se dá nejspíše vysvětlit tím, že se u těchto přípravků vytvoří přidávkou uvedeného enzymu obranný systém, při jehož požití se zabrání škodlivému vlivu produktů, vzniklých vlivem odbourání cukru v přítomnosti kariogenních bakterií.

Na vodu chudé potraviny jsou takové potraviny, jejichž obsah vlhkosti je velmi malý. S výhodou se těmito potravinami rozumí potraviny se zbytkovou vlhkostí 0,1 až 2 %.

Pod pojmem potraviny obsahující cukr se rozumí potraviny, které obsahují podíl přirozených cukrů jako sacharózy, glukózy, fruktózy atd. nebo jako náhrádku cukru alkoholické cukry. S výhodou to jsou zejména potraviny obsahující sacharózu. Je známo, že sacharóza má oproti jiným druhům cukrů u určitých na vodu chudých potravin značné technologické přednosti.

Podle vynálezu mohou přicházet v úvahu dokonce i takové potraviny, popřípadě cukrovinky nebo farmaceutické přípravky, které neobsahují žádné obvyklé cukry nebo jsou v podstatě prosty cukru. Toto mohou být materiály, které jsou slazeny náhradkami cukru, například

sacharinem, cyklamátem, proteinovými sladkými látkami, extrahovanými z tropických rostlin, xylitem atd. Může se ale také jednat o produkty, které nevykazují od přírody v podstatě žádný podíl cukru a ani nepotřebují rozhodující slazení. I u těchto sladkostí je vpracování enzymu laktatdehydrogenázy výhodné. Tato může totiž při požívání potravin zůstat v ústní dutině spolu se zbytky jídel, lpících na zubech a tam zneškodňovat kariogenní produkty rezultující například z odbourání uhlohydrátů.

Výraz na vodu chudé, cukr obsahující potraviny má ale zahrnovat především sladkosti. Příklady těchto nebo příbuzných produktů jsou pečivo, dezerty a umělý med. Produkty obzvláštního zájmu jsou stimulanty jako například různé druhy sladkostí, tj. tvrdé a měkké karamely (bonbóny), fondant, pěnové cukroví, gumové sladké zboží, lékořičové zboží, dražé, ovocné pasty, krokant, šumicí prášky, marcipán, persipan, nugát, čokolády a kakaové výrobky, cukrlata, pastilky, žvýkácká guma atd. Předmětem obzvláštního zájmu jsou žvýkačky, protože takové produkty jsou v dlouhodobém styku se slinami a jsou v ústech dlouhou dobu. Ačkoliv se žvýkačky normálně nepolykají, pohlíží se zde na ně přesto jako na potraviny a spadají tedy do rozsahu vynálezu.

Jako dlouhodobý styk ve spojení s delšími prodlevami se rozumí u perorálně konzumovaných produktů doby minimálně několika minut.

Podle vynálezu může potravina představovat i krmivo pro zvířata.

Podle jiné formy provedení vynálezu se enzym laktatdehydrogenáza přidává k farmaceutickým přípravkům jako účinná látka, která může přirozeně také existovat jako doplněk vedle jiných obvyklých účinných látek. Z takových farmaceutických přípravků přichází v úvahu především tablety a dražé, které obsahují vedle farmakologicky účinných látek cukr. Z produktů, pro něž je vynález použitelný, mohou být uvedeny různé druhy tak zvaných quasi-léčivých produktů, jako například elixíry a sirupy proti kašli atd. Takové produkty se často berou před ulehnutím na lůžko, tj. poté co již byly vyčištěny zuby a působí tedy dlouho na povlak zubů.

Farmaceutické přípravky, které lze označit v rámci vynálezu jako výhodné jsou mimo jiné tablety pro ústní hygienu v nejširším slova smyslu, jako například dražé pro ústní hygienu, žvýkácké tablety, popřípadě zuby čistící žvýkačka. Výhodný účinek účinné látky zde spočívá v tom, že se v důsledku tvorby slin v ústní dutině může ukládat na zuby enzymatický ochranný film, který je schopen zabránit přeměně pravděpodobně existujících zbytků cukru na kariogenní produkty.

Uvedené prostředky péče o zuby mohou existovat například ve formě zubní tablety, která obsahuje obvyklé lešticí prostředky, pojiva, zahušťovadla a prostředky udržující vlhkost.

Vhodné lešticí prostředky, které jsou použitelné například pro prostředky péče o zuby, jsou například obvyklé fosforečnany vápenaté jako fosforečnan vápenatý, metafosforečnan alkalického kovu, uhličitán hořečnatý, práškovité syntetické hmoty jako polymethylmethakrylát, kondenzační produkty močoviny a formaldehydu atd., nebo směsi takovýchto látek.

Vedle tohoto mohou prostředky péče o zuby obsahovat také konzervační prostředky, aromatické látky a jiné pomocné látky. V jednotlivých případech může být ale požadováno, aby se přidávkem enzymu laktatdehydrogenázy podnítil účinek jiných aktivních látek, které dosahují ochrany proti karies na základě jiných principů, popřípadě aby se jejich účinek mnohonásobil. Jako obvyklé účinné látky lze uvést zejména sloučeniny fluoru, jako aminfluoridy, fluoridy alkalických kovů atd., nebo i dextranázy.

Enzym laktatdehydrogenáza, používaný podle vynálezu, je prodejný. Tento enzym se může mimo jiné vyrobit i z různých mikrobtů, například z kvasinek. Laktatdehydrogenáza, získaná z kvasinek je poměrně stabilní, například preparát enzymu rozpuštěný v glycerinu zůstává

při +18 °C aktivní déle než jeden rok. Vedle toho se laktatdehydrogenáza může skladovat delší dobu také v pufračních roztocích v definované oblasti pH aniž by došlo ke ztrátě aktivity hodné zmínky. Jak ukazují pokusy v rámci vynálezu dochází v potravinách, chudých na vodu, popřípadě v bezvodých potravinách nebo farmaceutických přípravcích jen k poměrně malé ztrátě aktivity, pokud k ní vůbec dojde.

Množství enzymu laktatdehydrogenázy, které se má vpravit do potravin, sladkostí nebo farmaceutických přípravků, jako zubních čistících tablet, zejména ale do prostředků pro ošetřování zubních protéz v tabletové formě, může odborník na základě specifické enzymatické aktivity, přibližného podílu cukru v materiálu, pokud je tento udán, jakož i na základě oblasti hodnot pH existujících v pojivovém materiálu, popřípadě při jeho výrobě, zjistit.

Podle vynálezu je výhodné zvolit podíl vpravené enzymatické hodnoty v souladu s předpokládanou dobou skladování materiálu, při nejmenším tak, aby tato v okamžiku přijímání potravy byla přibližně postačující pro vyvolání požadovaného účinku.

Obecně je vhodné množství laktatdehydrogenázy 0,2 mg až 0,5 g/kg. S výhodou se používá 0,5 mg až 0,05 g/kg, vztaheno na specifickou aktivitu asi 300 U/mg.

Kromě toho je nutné zde brát v úvahu ještě teplotu a popřípadě obsah vody v materiálu při přidávání enzymu, popřípadě jeho obvyklou skladovací teplotu. Výhodný přidávaný podíl enzymu lze zjistit jednoduchými pokusnými šaržemi.

I pro farmaceutické přípravky a zejména pro prostředky péče o zuby, popřípadě ústní hygieny, do nichž se může přidávat enzym laktatdehydrogenáza, platí, že se přidávané množství enzymu zjistí přibližnými výpočty nebo empirickými pokusy. V takovýchto prostředcích péče o zuby, popřípadě ústní hygieny, není obvykle přítomen žádný podíl cukru a není proto nutné orientovat na něj vnášenou enzymatickou aktivitu. V tomto případě slouží přidávání enzymu k tomu účelu, aby se v ústní dutině a zejména na zubech vytvořil film kapaliny, který brání vzniku karies, takže event. zbylé a ani zubním kartáčkem neodstraněné zbytky jídla nemohou vést ani v přítomnosti kariogenních bakterií ke vzniku karies.

Podle vynálezu se pamatuje i na to, že se účinek laktatdehydrogenázy může popřípadě zvýšit přidávkou vhodného akceptoru vodíku, například nikotinamidadeninnukleotidu.

Rozložení enzymu laktatdehydrogenázy v potravíně je obvykle homogenní, ale může být také výhodné, zejména tehdy když potravina sama o sobě nevykazuje žádné isotropní rozdělení cukru, rozdělit v ní enzym rovněž nerovnoměrně. Příkladem pro toto nerovnoměrné rozdělení může být čokoláda, která je prostoupená celými oříšky, které není nutno prokládat rovnoměrně enzymem.

Dále jsou popsány pokusy, které ukazují antikariogenní účinek přidávku laktatdehydrogenázy:

Jako kariogenní substrát byla použita pomazánka na chleba, obsahující tuk a cukr a chudá na vodu. Za pokusná zvířata sloužily bílé, homocygotní (čistokrevné) krysy typu Wistar. Uvedená pomazánka na chleba byla v množství 50 % přimíchána ke standardnímu suchému krmivu (vztaheno na celkové množství krmiva Herilanu -RM 20), sestávajícímu z diety bohaté na vitamíny, obsahující protein a tuk, která byla vyvinuta s přihlédnutím ke všem potřebám látkové výměny pro krysy.

Vzdušně suchá pokusná dieta byla rozdělena do porcí a dávkována tak, aby zvířata mohla během období krmení 280 dní dále přibírat na váze. Zvířata byla držena v klecích z umělé hmoty, které byly opatřeny napájecími a krmicími automaty. K pitné vodě bylo v rozmezí 30 dní přidáváno  $50 \times 60 \times 10^3$  zárodků *Streptococcus mutans* na mililitr. Jako stelivo sloužil

sterilizovaný jemný granulát dřeva, který byl vyměňován v rozmezí 36 hodin. Vzduch prostoru byl klimatizován.

Byly vytvořeny pokusné skupiny, které sestávaly ze 60 zvířat. Všechna zvířata byla denně prohlížena a v odstupu 30 dnů vážena, přičemž nebyly zjištěny žádné vedlejší účinky vyvolané obsaženou laktatdehydrogenázou.

Stanovení kariogenního nálezu, zejména kariogenních poškození, se provádělo pomocí stereo-mikroskopu při 12násobném zvětšení:

Byla zaznamenána následující odstupňování:

- 0 = žádná karies
- 1 = 1 až 5 poškození
- 2 = 5 až 10 poškození
- 3 = více než 10 poškození

Zkoušena byla následující složení diet:

A = 50 % suchého krmiva + 50 % pomazánky na chleba

B = 50 % suchého krmiva + 50 % pomazánky na chleba + laktatdehydrogenáza

Množství laktatdehydrogenázy činilo 0,5 mg/kg pomazánky na chleba.

Při zkrmování diety A se objevily četné kariogenní poškození: z pokusných zvířat bylo napadeno celkem 30 (50 %). V následující tabulce jsou shrnuty výsledky pokusů s ohledem na počet poškození, jakož i stupeň poškození. Jak ukazují výsledky byly při zkrmování diety A zjištěny u pokusných zvířat zčásti velmi těžké případy kariex (> 10 poškození). Přídavkem laktatdehydrogenázy u diety B byl jak počet, tak i stupeň těžkých poškození maximálně snížen. Toto ukazuje, že dieta doplněná laktatdehydrogenázou má zřetelný, zuby šetřící účinek.

#### T a b u l k a

| pokusná skupina | kariogenní poškození<br>(počet x stupeň) |
|-----------------|------------------------------------------|
| A (dieta A)     | 15 x 1; 9 x 2; 6 x 3;                    |
| B (dieta B)     | 6 x 1; 3 x 2.                            |

Dále jsou uvedeny další příklady, a to jednak potravin a jednak farmaceutického přípravku, které obsahují přísadu laktatdehydrogenázy.

#### P ř í k l a d 1

mléčná tabulková čokoláda obsahující:

|                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| kakaové hmoty                                                                                                                | 26 g       |
| sacharózy                                                                                                                    | 60 g       |
| mléčného tuku                                                                                                                | 3,2 g      |
| sušiny prosté tuku                                                                                                           | 9,5 g      |
| laktatdehydrogenázy, která byla<br>vmíchána v homogenním rozdělení<br>před zchlazením hotové čokolády asi<br>při 40 až 45 °C | 5 až 10 mg |

## Příklad 2

| dražé na čištění zubů, obsahující: | % hmot. |
|------------------------------------|---------|
| uhličitán hořečnatý                | 10,0    |
| kysličník křemičitý                | 20,0    |
| dvojfosforečnan vápenatý           | 55,0    |
| kondenzát močoviny s formaldehydem | 5,80    |
| aromatické látky                   | 2,0     |
| tragant                            | 1,5     |
| natriumlaurylsulfoacetát           | 2,5     |
| aminfluor s dlouhým řetězcem       | 2,0     |
| laktatdehydrogenáza                | 0,01    |

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Přípravky pro výživu, popřípadě prevenci lidí a zvířat, chudé na vodu, šetřící chrup a popřípadě obsahující cukr, zejména prostředky pro péči o chrup a ústní hygienu, obsahující enzymy, vyznačující se tím, že obsahují enzym laktatdehydrogenázu v množství 0,2 mg až 0,5 g/kg, s výhodou 0,5 mg až 0,05 g/kg přípravku, vztaženo na specifickou aktivitu 300 U/mg.

2. Přípravky podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahují enzym laktatdehydrogenázu v kombinaci s enzymem sacharózou, přičemž poměr enzymu laktatdehydrogenázy k enzymu sacharóze činí 4:1 až 1:10.

3. Přípravky podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že pro zesílení účinku enzymu laktatdehydrogenázy obsahují akceptor vodíku, například nikotinamidadeninnukleotid.