



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 162**

51 Int. Cl.:

A61K 36/27 (2006.01)

C07J 17/00 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

C07J 15/00 (2006.01)

C07J 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02004101 .8**

96 Fecha de presentación : **15.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1213020**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

54 Título: **Compuestos y composiciones farmacéuticas que tienen actividad supresora del apetito.**

30 Prioridad: **15.04.1997 ZA 97/3201**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2009

73 Titular/es: **CSIR**
Corporate Building, Scientia
0001 Pretoria, ZA

72 Inventor/es: **Van Heerden, Fanie Retief;**
Vleggaar, Robert;
Horak, Roelof Marthinus;
Learmonth, Robin Alec;
Maharaj, Vinesh y
Whittal, Rory Desmond

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 321 162 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos y composiciones farmacéuticas que tienen actividad supresora del apetito.

Esta invención se refiere a glicósidos esteroideos, a composiciones que contienen tales glicósidos esteroideos y a un nuevo uso para estos glicósidos esteroideos y las composiciones que los contienen. Los glicósidos esteroideos pueden extraerse y aislarse a partir de material de planta. La invención se refiere también a compuestos y procedimientos que pueden usarse en un procedimiento de producción sintética de estos glicósidos esteroideos, y de ese modo facilitan los productos de una extracción de este tipo y de un procedimiento de síntesis de este tipo.

En una aplicación particular, la invención se refiere a un agente supresor del apetito, a compuestos y procedimientos que pueden usarse en un procedimiento para producir de manera sintética el agente supresor del apetito, a una composición supresora del apetito que contiene el agente supresor del apetito, y a un procedimiento no terapéutico de supresión del apetito.

En este documento se describe un procedimiento para preparar un extracto de una planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*, comprendiendo el extracto un agente supresor del apetito, incluyendo el procedimiento las etapas de tratar el material de planta recogido con un disolvente para extraer una fracción que tiene actividad supresora del apetito, separar la solución de extracción del resto del material de planta, retirar el disolvente de la solución de extracción y recuperar el extracto. El extracto así recuperado puede purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante procedimientos de extracción con disolventes adecuados.

El procedimiento proporciona un extracto de planta hecho de plantas del grupo que comprende el género *Trichocaulon* y el género *Hoodia* y que tiene actividad supresora del apetito.

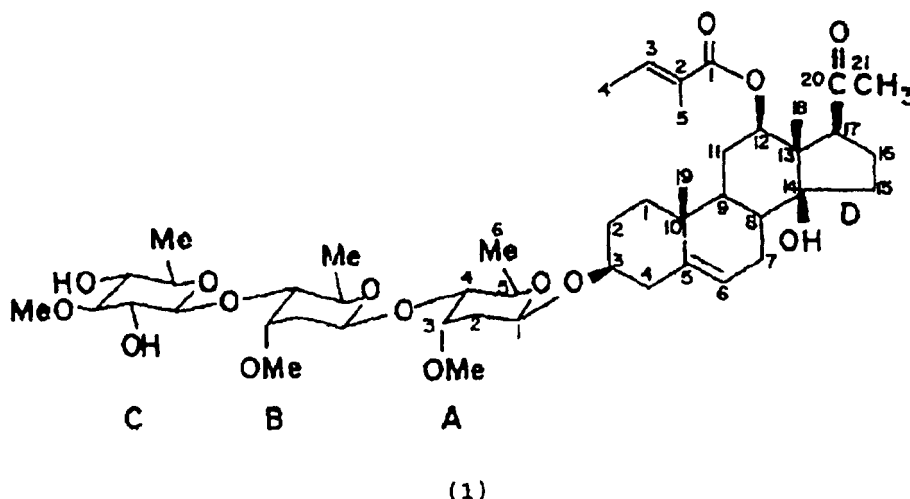
El extracto puede prepararse a partir de material de planta tal como los tallos y las raíces de dichas plantas del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*. El género *Trichocaulon* y el género *Hoodia* incluyen plantas carnosas que crecen en regiones áridas tales como las que se encuentran en África del Sur. En un ejemplo, el extracto supresor del apetito activo se obtiene de la especie *Trichocaulon piliferum*. La especie *Trichocaulon officinale* también puede usarse para proporcionar un extracto supresor del apetito activo. En otro ejemplo, el extracto supresor del apetito activo puede obtenerse de la especie *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* u *Hoodia lugardii*. Los bioensayos realizados por el solicitante en ratas han indicado que ciertos extractos tienen actividad supresora del apetito.

El material de planta puede homogeneizarse en presencia de un disolvente adecuado, por ejemplo, un disolvente de metanol/cloruro de metileno, mediante un dispositivo tal como un mezclador Waring. La solución de extracción después puede separarse del material de planta residual por un procedimiento de separación apropiado tal como, por ejemplo, filtración o centrifugación. El disolvente puede retirarse mediante un rotavapor, preferiblemente en un baño de agua a una temperatura de 60°C. El extracto bruto separado después puede extraerse adicionalmente con cloruro de metileno y agua antes de separarse en un extracto de cloruro de metileno y un extracto acuoso. Se puede retirar el disolvente del extracto de cloruro de metileno preferiblemente mediante evaporación en un rotavapor y el extracto resultante puede purificarse adicionalmente mediante extracción con metanol/hexano. El producto de extracción con metanol/hexano después puede separarse para producir un extracto de metanol y un extracto de hexano. El extracto metanol puede evaporarse para retirar el disolvente para producir un extracto activo parcialmente purificado.

El extracto activo parcialmente purificado puede disolverse en metanol, y puede fraccionarse adicionalmente por cromatografía en columna, empleando gel de sílice como medio de adsorción y una mezcla de cloroformo/metanol al 30% como eluyente. Puede obtenerse una pluralidad de diferentes fracciones, y cada una puede evaluarse por procedimientos de bioensayo adecuados, para determinar la actividad supresora del apetito de las mismas.

Una fracción que tenga actividad supresora del apetito puede preferiblemente fraccionarse adicionalmente tal como por cromatografía en columna usando gel de sílice como medio de adsorción y un disolvente de cloroformo:metanol 9:1, y las subfracciones resultantes se pueden bioensayar para su actividad supresora del apetito. Una subfracción que presente actividad supresora del apetito puede, si se desea, fraccionarse adicionalmente y purificarse, convenientemente usando un procedimiento cromatográfico en columna con gel de sílice como medio de adsorción y un disolvente de acetato de etilo:hexano 9:1. Las fracciones purificadas resultantes pueden evaluarse de nuevo por procedimientos de bioensayo adecuados para su actividad supresora del apetito.

El solicitante ha descubierto que al menos una de dichas fracciones purificadas tiene buena actividad supresora del apetito, y el principio activo de la fracción se identificó por técnicas químicas convencionales incluyendo resonancia magnética nuclear, y se descubrió que era un compuesto de la fórmula estructural



De acuerdo con la nomenclatura del S.I., el principio activo (1) es el compuesto 3-O-[-β-D-tevetopiranosil-(1→4)-β-D-cimaropiranosil-(1→4)-β-D-cimaropiranosil]-12β-O-tigloiloxi-14-hidroxi-14β-pregn-50-en-20-ona (C₄₇H₇₄O₁₅ M⁺878).

En este documento se describe también un procedimiento para preparar un extracto de una planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*, comprendiendo el extracto un agente supresor del apetito, incluyendo el procedimiento las etapas de prensar el material de planta recogido para separar la savia del material de planta sólido y recuperar la savia libre del material de planta sólido para formar el extracto.

El extracto puede secarse para retirar la humedad, por ejemplo, por secado por pulverización, secado por congelación o secado al vacío, para formar un polvo no aglomerante.

Los procedimientos facilitan una composición que tiene actividad supresora del apetito que comprende un extracto como se ha descrito anteriormente.

La composición puede estar mezclada con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico y opcionalmente está preparada en forma farmacéutica unitaria.

Los procedimientos facilitan también el uso de un extracto como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento que tiene actividad supresora del apetito, un extracto como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento que tiene actividad supresora del apetito y un procedimiento de supresión del apetito administrando a un ser humano o un animal una dosificación eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente.

El compuesto (1) es un compuesto novedoso y la presente invención se extiende al compuesto (1) y ciertos análogos o derivados de este trisacárido esteroideo que tiene propiedades supresoras del apetito. Las moléculas seleccionadas como análogos o derivados pretenden afectar a las propiedades del trisacárido esteroideo con el objetivo de aumentar la actividad del principio activo. Se tuvieron en cuenta los siguientes efectos cuando se seleccionaron los análogos:

(i) *Interacciones hidrófobas y lipofilicidad*

Se pretende que modificaciones de grupo funcional de la molécula activa cambien la hidrofobicidad y lipofilicidad de la molécula. Se ha mostrado que un aumento en la lipofilicidad aumentada está correlacionado con un aumento en la actividad biológica, peor solubilidad acuosa, aumento de detergencia/lisis celular, aumento de almacenamiento en tejidos, eliminación y metabolismo más rápidos, aumento de unión de proteínas plasmáticas y velocidad más rápida de aparición de la acción.

(ii) *Propiedades electrónicas y constantes de ionización*

Se pretende que la modificación de grupo funcional de la molécula cambien la acidez y basicidad que tendrían un papel principal en el control del transporte del compuesto hasta su sitio de acción y la unión en su sitio diana.

(iii) *Enlaces de hidrógeno*

Se pretende que modificaciones de grupo funcional de grupos carboxilo y carbonilo cambien las interacciones entre las proteínas en sistemas biológicos y los grupos funcionales modificados químicamente.

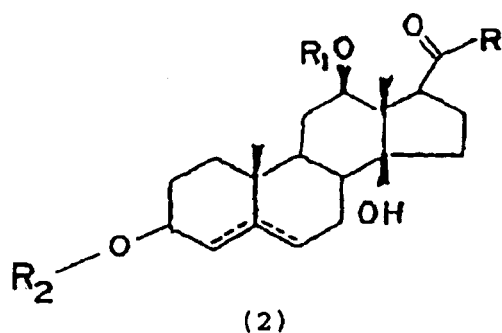
(iv) *Parámetros estéricos*

El propósito de cambiar las características estéricas de la molécula es aumentar la unión a su receptor y así aumentar su actividad biológica.

Se pretende que las siguientes modificaciones químicas en la molécula afecten a la hidrofobicidad y lipofilicidad, propiedades electrónicas, enlaces de hidrógeno y parámetros estéricos en la molécula:

- a) Modificación química del grupo C-12 y funcionalidad éster;
- b) Modificación química del doble enlace 5,6, por ejemplo hidrogenación y migración;
- c) Modificación química del grupo carbonilo C-20 y acetilo C-17;
- d) Modificación química del anillo "D" del anillo esteroideo o de aglicona;
- e) Modificación de los hidratos de carbono del resto de trisacárido.

Por consiguiente, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural general



en la que

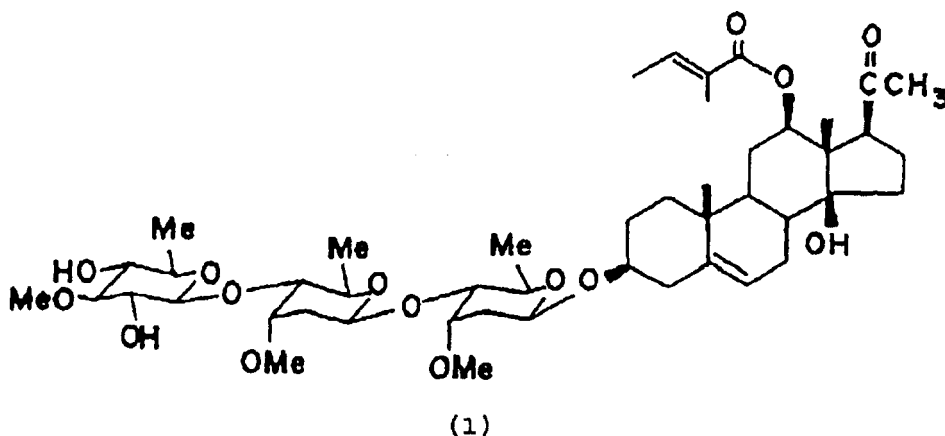
R = alquilo;

R₁ = H, alquilo, tigloilo, benzoilo o cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

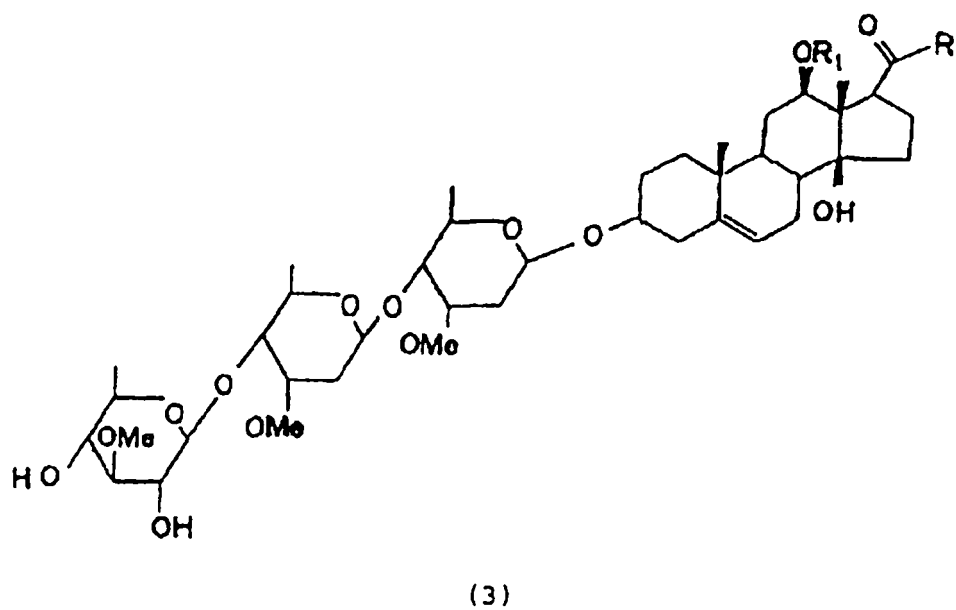
y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆, excepto ramanona, isorramanona, 12-benzoato de isorramanona y 5 β -pregnan-20-on-3 β ,12 β ,14 β -triol.

La invención proporciona también un compuesto como se ha descrito anteriormente en el que hay un enlace adicional entre C₅-C₆, R = metilo, R₁ = tigloilo, R₂ = 3-O-[- β -D-tevetopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosilo] y que tiene la fórmula estructural



ES 2 321 162 T3

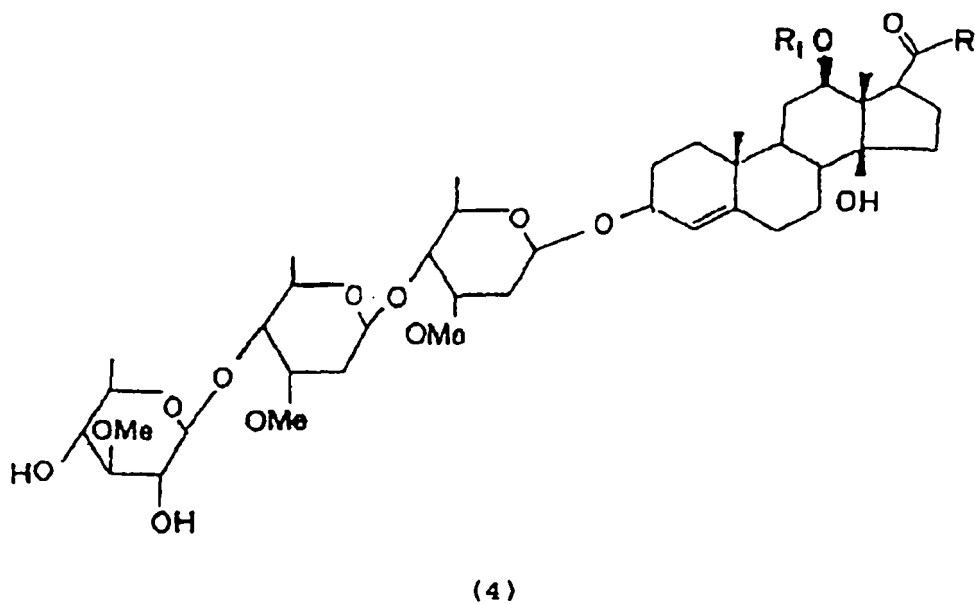
Análogos o derivados activos adicionales del compuesto (1) supresor del apetito de acuerdo con la invención son compuestos que tienen las siguientes fórmulas estructurales:



en la que

R = alquilo; y

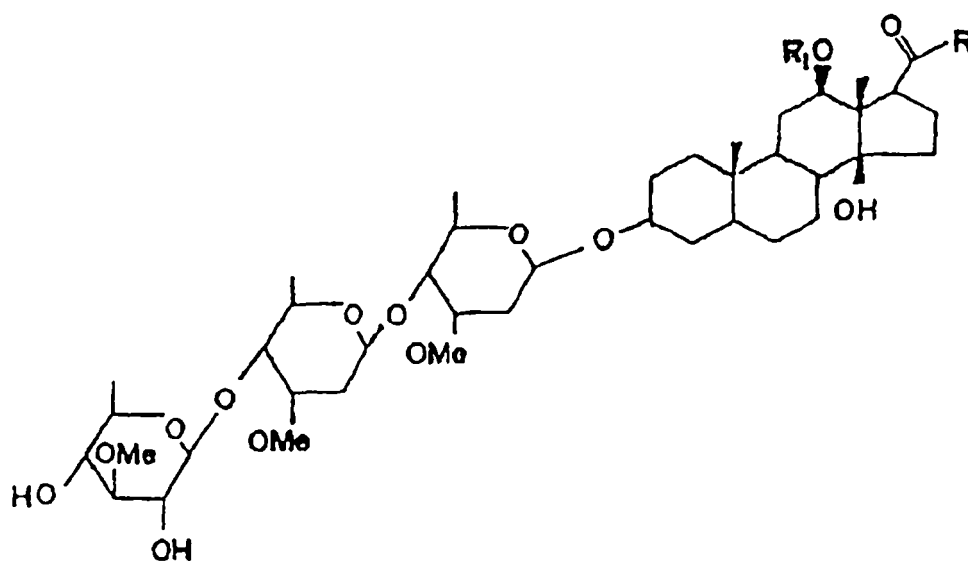
R₁ = H, o benzoílo, o tigloílo, o cualquier otro grupo éster orgánico;



en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, o tigloílo, o benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

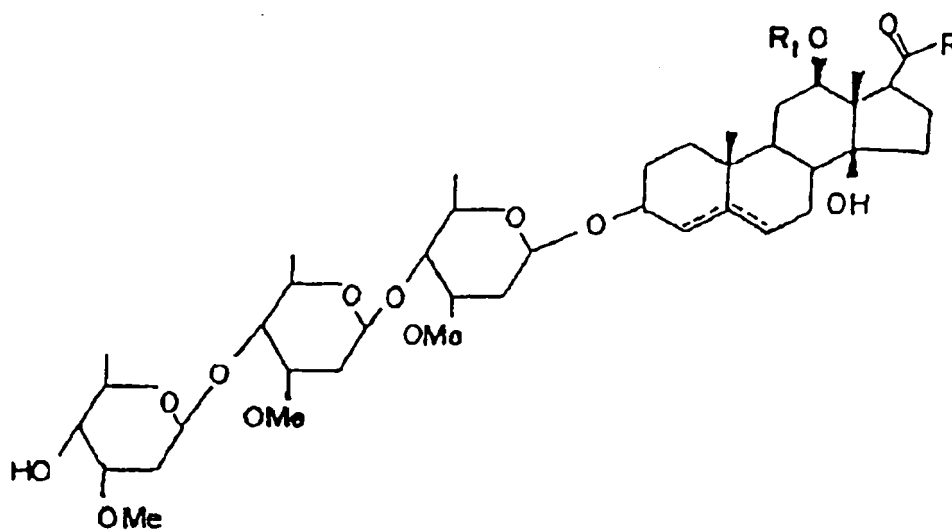


(5)

en la que

R = alquilo; y

R_1 = H, o tigloilo, o benzoilo o cualquier otro grupo éster orgánico;

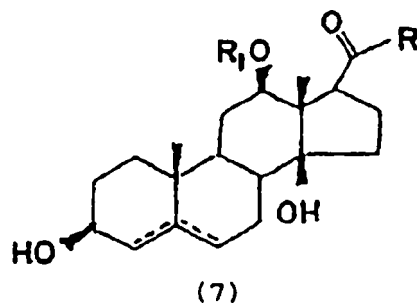


(6)

en la que

R = alquilo; y

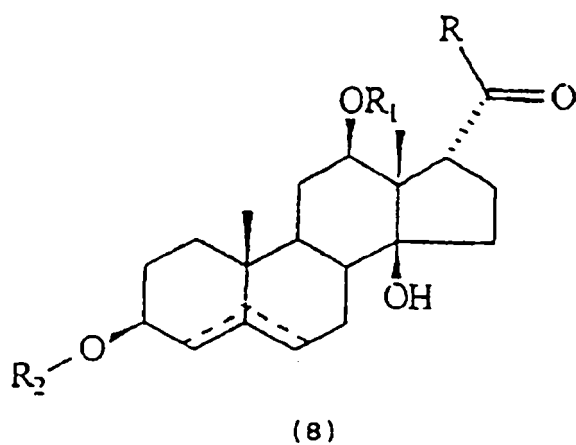
R_1 = H, o tigloilo, o benzoilo o cualquier otro grupo éster orgánico;



en la que

R = alquilo;

R₁ = H, o tigloílo, o benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico, excepto ramanona, isorramanona, 12-benzoato de isorramanona y 5β-pregnan-20-on-3β,12β,14β-triol; y



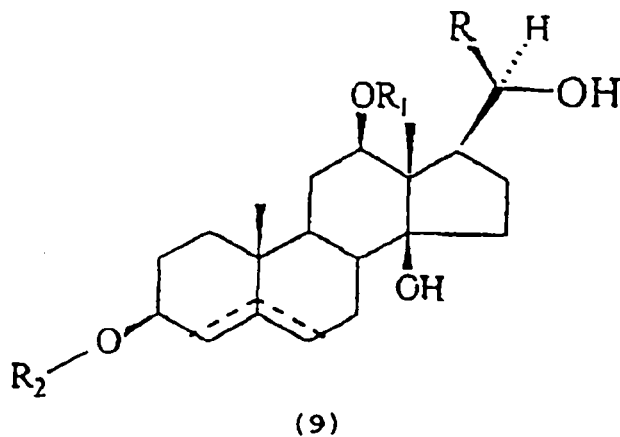
en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆, excepto ramanona. Compuestos que tienen las fórmulas:



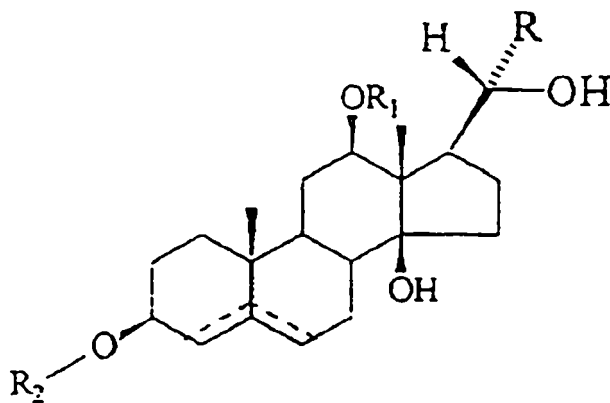
en la que

R = alquilo; y

ES 2 321 162 T3

$R_1 = \text{H}$, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

$R_2 = \text{H}$, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos; y en la que las líneas discontinuas indican la presencia de un enlace adicional entre C_4-C_5 o C_5-C_6 ;



(10)

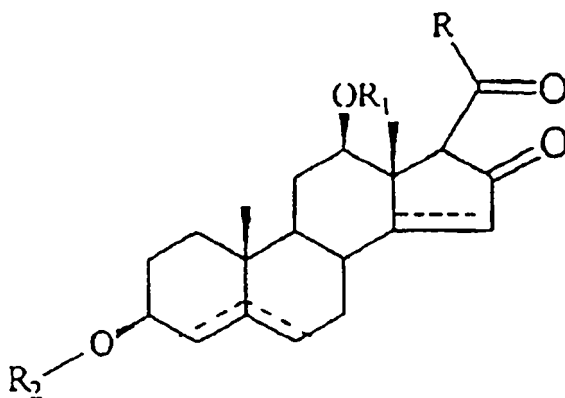
en la que

$R = \text{alquilo}$; y

$R_1 = \text{H}$, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

$R_2 = \text{H}$, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C_4-C_5 o C_5-C_6 ;



(11)

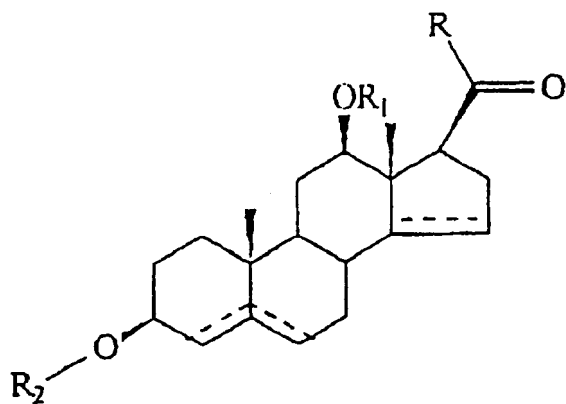
en la que

$R = \text{alquilo}$; y

$R_1 = \text{H}$, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

$R_2 = \text{H}$, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅, C₅-C₆ o C₁₄-C₁₅;



(12)

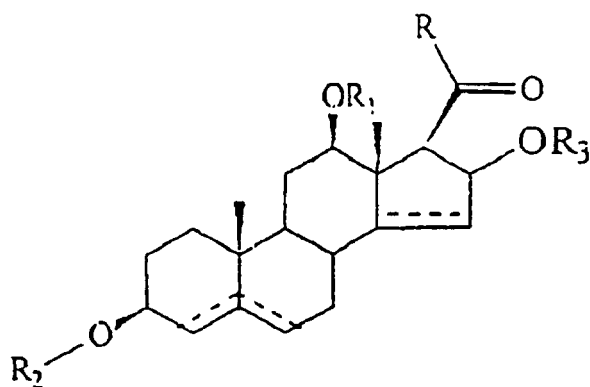
en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo, cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅, C₅-C₆ o C₁₄-C₁₅;



(13)

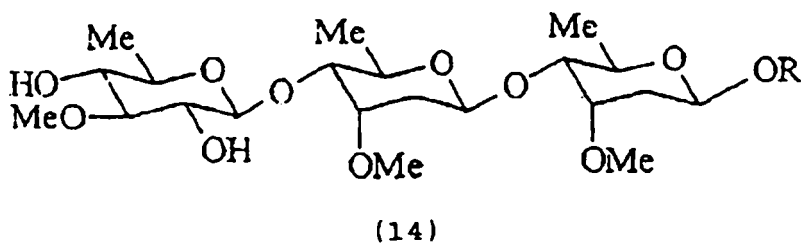
en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo, cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono, o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅, C₅-C₆ o C₁₄-C₁₅; y R₃ = H, alquilo, arilo, acilo o glucosilo; y

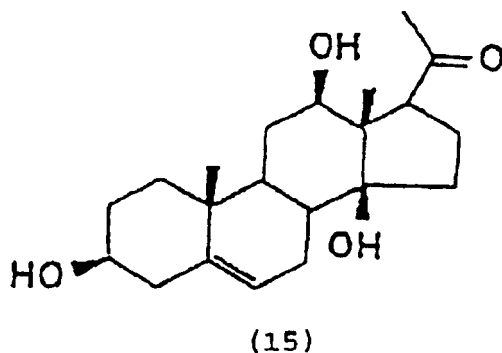


en la que R = H, alquilo, arilo o cualquier esteroide que tenga un grupo hidroxilo beta en C₁₄, o una funcionalidad hidroxilo beta en C₁₂, o un grupo acilo C₁₇, o una olefina C₅-C₆, o combinaciones de los mismos;

pueden utilizarse también como compuestos activos pero no son parte de la presente invención.

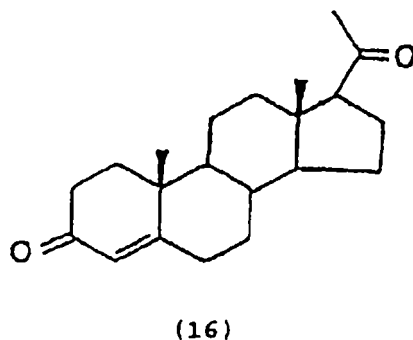
La invención se extiende todavía adicionalmente a procedimientos que pueden usarse en un procedimiento para producir de manera sintética un compuesto que tiene actividad supresora del apetito.

El procedimiento usa un esteroide como material de partida (o producto intermedio o precursor), teniendo el esteroide la fórmula química

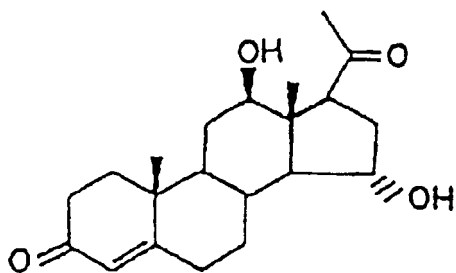


El esteroide (15) puede prepararse a partir de un compuesto que tiene la fórmula (22) mediante un procedimiento que incluye las etapas de

(i) tratar progesterona que tiene la fórmula

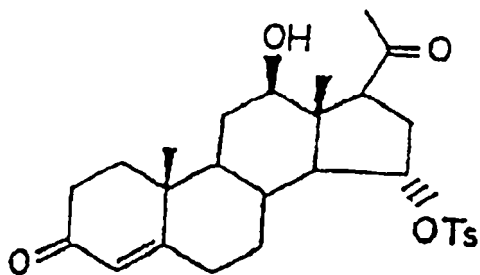


con el microorganismo *Calonectria decora* para producir un compuesto 12 β ,15 α -dihidroxi-progesterona de fórmula



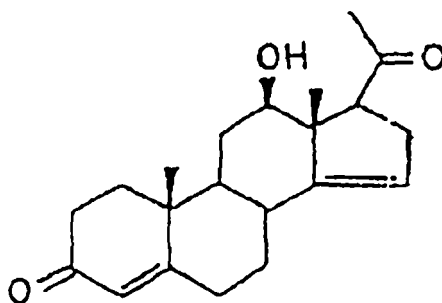
(17)

(ii) tratar el compuesto (17) con cloruro de tosilo y piridina para producir un compuesto 12 β -hidroxi-15 α -(p-toluenosulfonil)-progesterona de fórmula



(18)

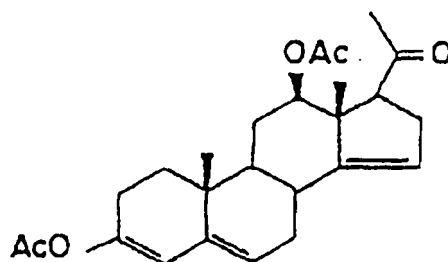
(iii) tratar el compuesto (18) con colidina a 150°C para producir un compuesto 12 β -hidroxi- Δ^{14} -progesterona de fórmula



(19)

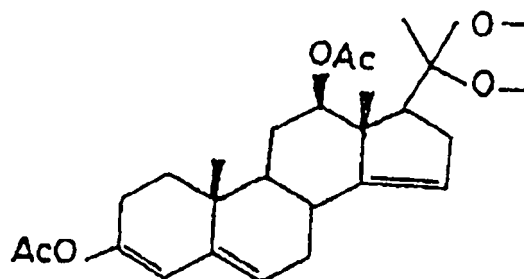
ES 2 321 162 T3

(iv) tratar el compuesto (19) con cloruro de acetilo y anhídrido acético a 120°C, para producir un compuesto 3,12β-diacetoxipregna-3,5,14-trien-20-ona de fórmula



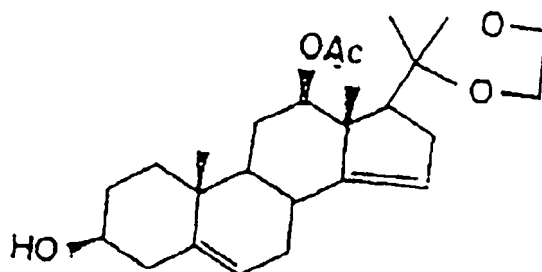
(20)

(v) tratar el compuesto (20) con etilenglicol y una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico, para producir un compuesto 3,12β-diacetoxi-20,20-etilendioxipregna-3,5,14-trieno de fórmula



(21)

(vi) tratar el compuesto (21) con NaBH₄ para producir un compuesto 12-acetato de 3β,12β-dihidroxi-20,20-etilendioxipregna-5,14-dieno de fórmula

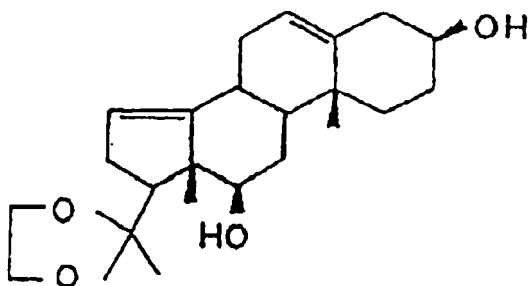


(22)

ES 2 321 162 T3

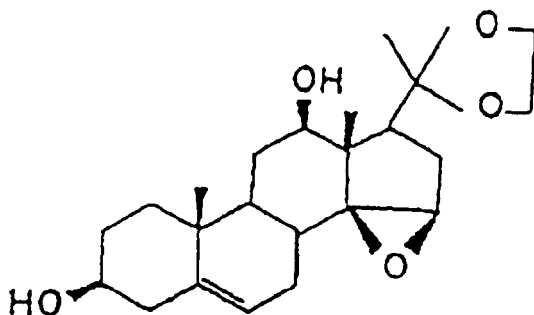
En un primer procedimiento alternativo, un procedimiento para la preparación del esteroide (15) de acuerdo con la invención incluye las etapas de

- (a) tratar el compuesto (22) con un agente reductor, por ejemplo LiAlH_4 , para producir un compuesto $3\beta,12\beta$ -dihidroxi-20,20-etilendioxipregna-5,14-dieno de fórmula



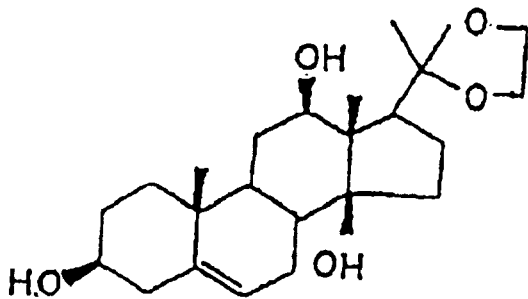
(23)

- (b) tratar el compuesto (23) con N-bromoacetamida (NBA) y una base, por ejemplo piridina, para producir un compuesto $3\beta,12\beta$ -dihidroxi-14,15-epoxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno de fórmula



(24)

- (c) tratar el compuesto (24) con un agente reductor, por ejemplo LiAlH_4 , por ejemplo con reflujo, para producir un compuesto $3\beta,12\beta,14\beta$ -trihidroxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno de fórmula

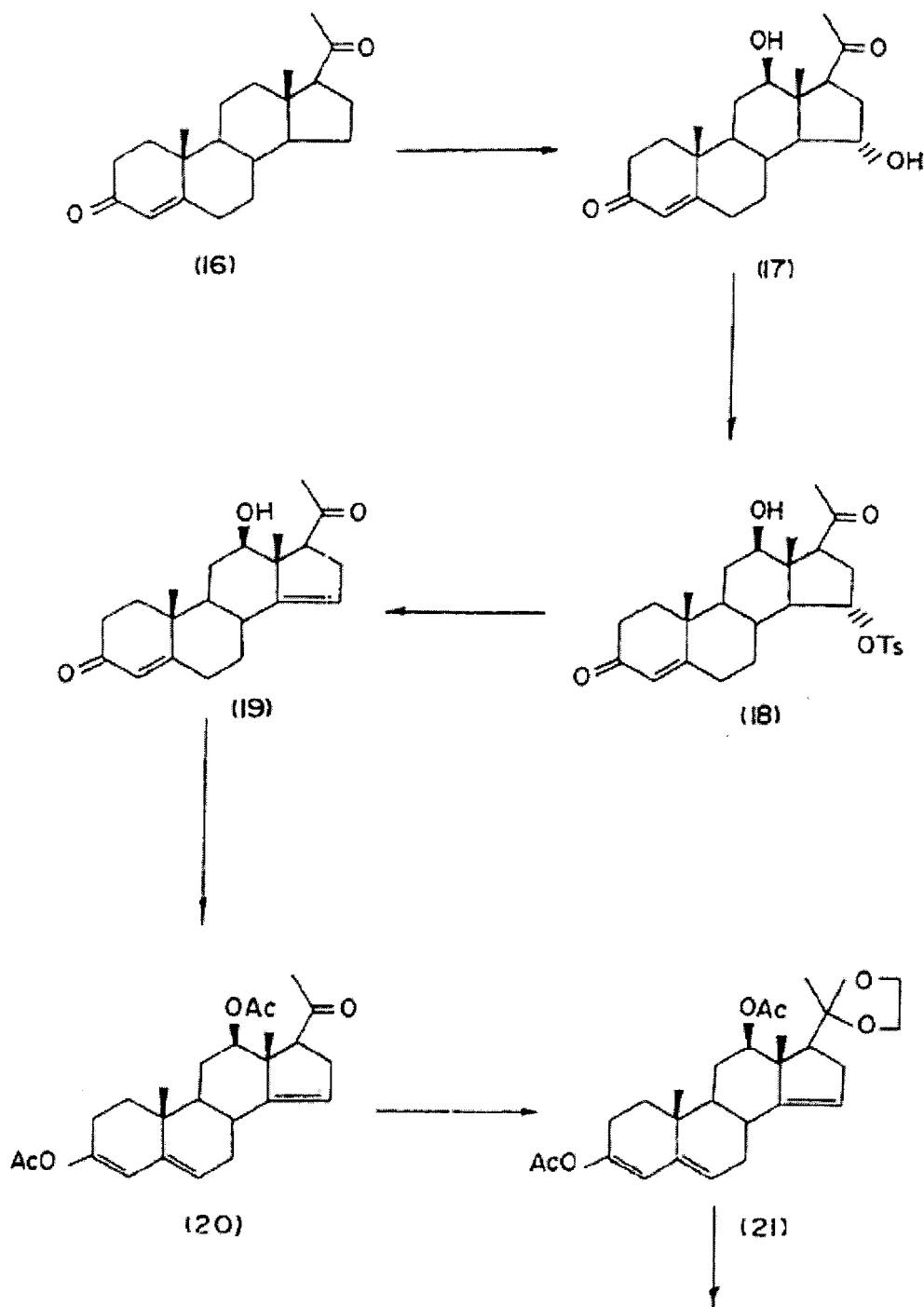


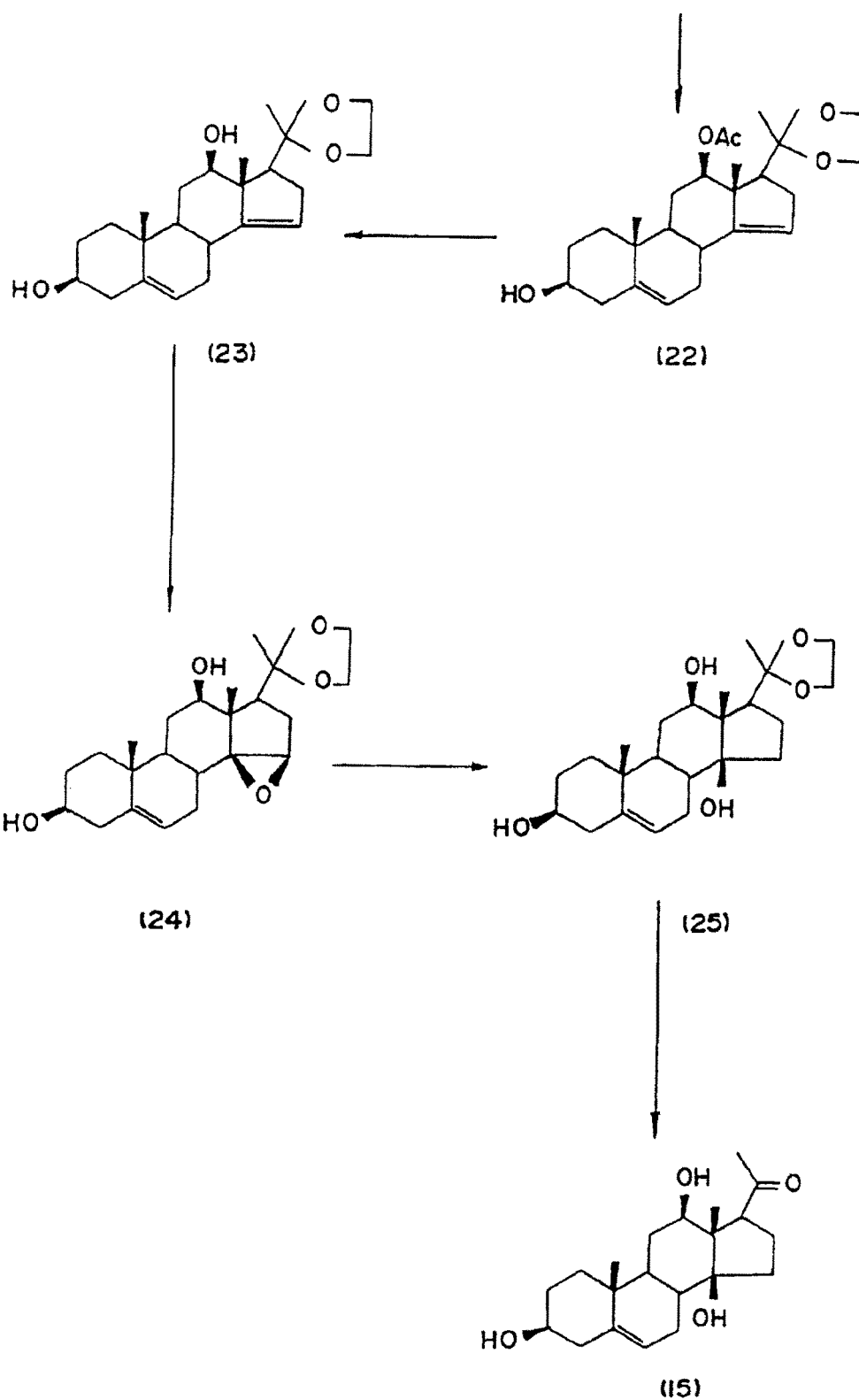
(25)

- y (d) tratar el compuesto (25) con un ácido, por ejemplo ácido acético, y agua para producir el compuesto intermedio esteroideo $3\beta,12\beta,14\beta$ -trihidroxi-pregn-5-eno (15).

El esquema de reacción A representa el procedimiento para la preparación del producto intermedio esteroideo (15) a partir del compuesto (22) de acuerdo con "el primer procedimiento alternativo" de la invención (e incluye la preparación del compuesto (22) a partir del compuesto (16) para propósitos ilustrativos).

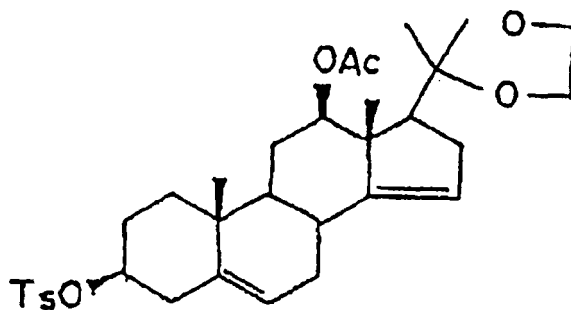
Esquema de reacción A





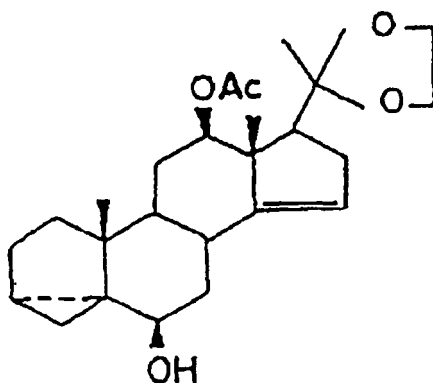
En un segundo procedimiento alternativo, un procedimiento para la preparación del esteroide (15) de acuerdo con la invención incluye las etapas de

(a) tratar el compuesto (22) (12-acetato de 3 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxi-5,14-dieno) con cloruro de p-toluenosulfonilo y una base, por ejemplo piridina, para producir un compuesto 12-acetato de 3 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxi-5,14-dieno-3-tosilo de fórmula



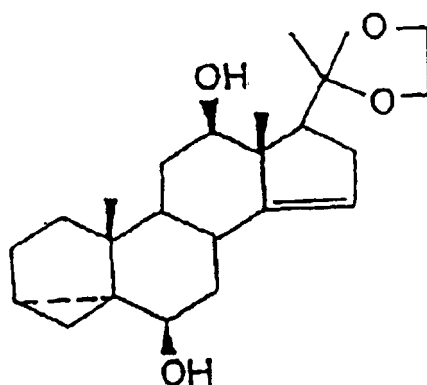
(26)

(b) tratar el compuesto (26) con acetato de potasio en un disolvente, por ejemplo acetona, para producir un compuesto 12-acetato de 6 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxi-3,5 α -ciclopregnan-14-eno de fórmula



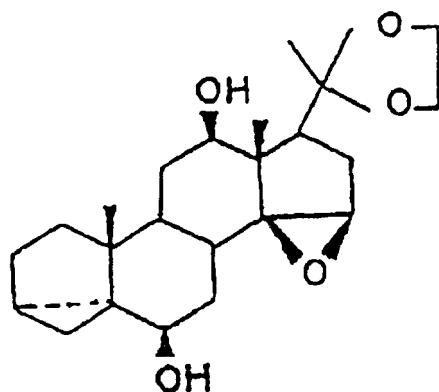
(27)

(c) tratar el compuesto (27) con un agente reductor, por ejemplo LiAlH₄, y por ejemplo tetrahidrofurano, para producir un compuesto 6 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxi-3,5 α -ciclopregnan-14-eno de fórmula



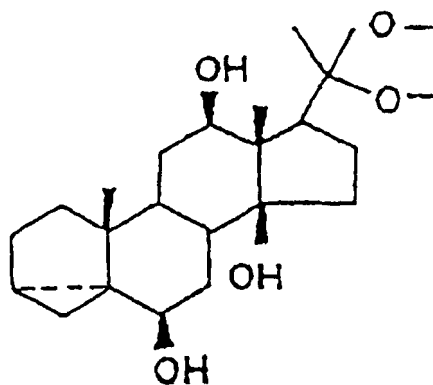
(28)

(d) tratar el compuesto (28) con N-bromoacetamida, opcionalmente ácido acético, y una base, por ejemplo piridina, para producir un compuesto 6 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxi-14,15-epoxi-3,5 α -ciclopregnano de fórmula



(29)

(e) tratar el compuesto (29) con un agente reductor, por ejemplo LiAlH₄, y por ejemplo tetrahydrofurano, para producir un compuesto 6 β ,12 β ,14 β -trihidroxi-20,20-etilendioxi-3,5 α -ciclopregnano de fórmula

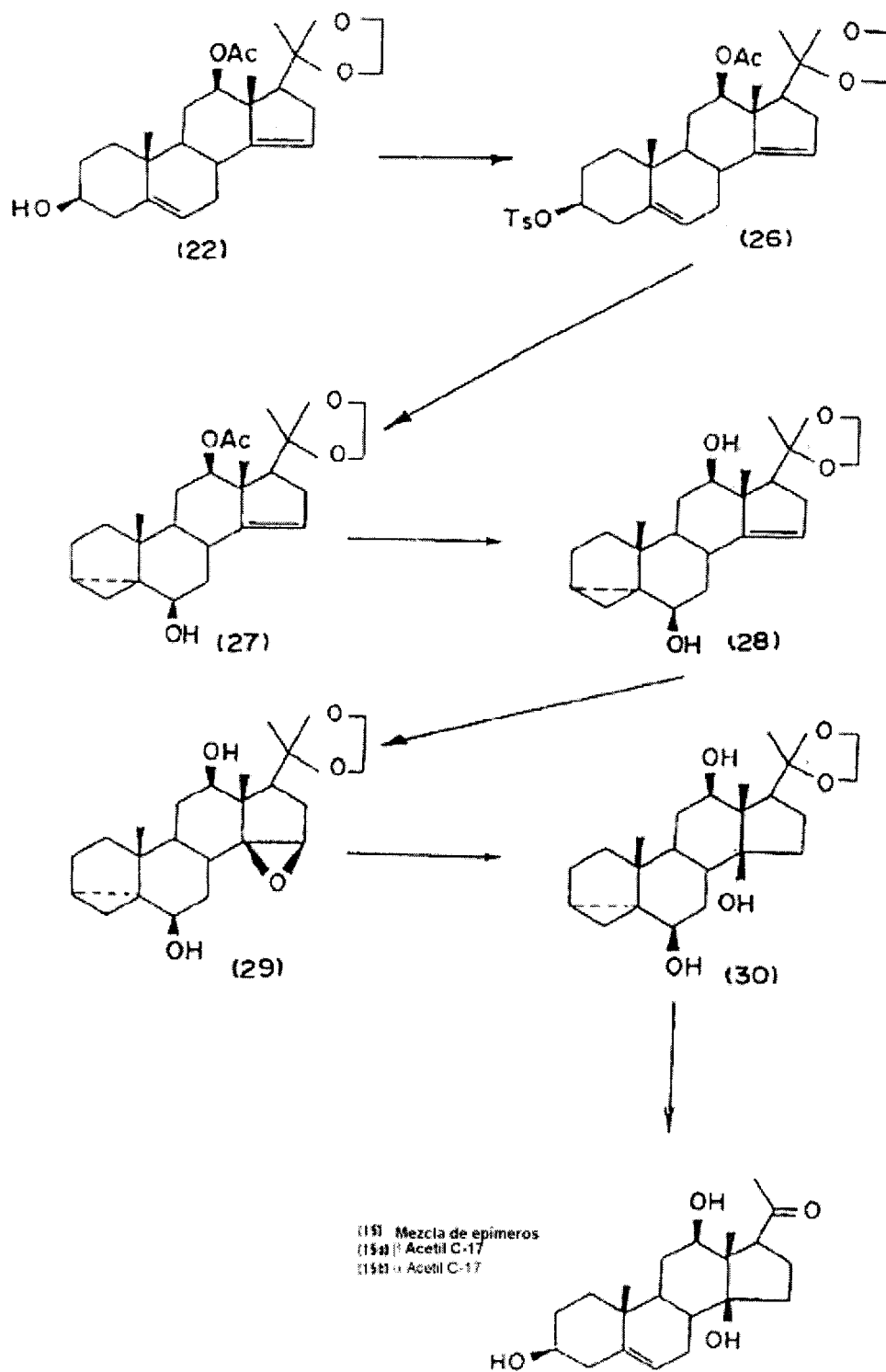


(30)

y (f) tratar el compuesto (30) con un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, y un disolvente por ejemplo acetona, para producir el compuesto (15).

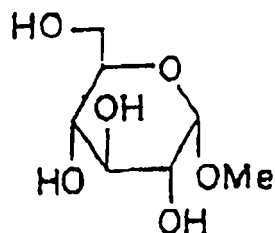
El esquema de reacción B muestra el procedimiento para la preparación del producto intermedio esteroideo (15) a partir del compuesto (22) de acuerdo con "el segundo procedimiento alternativo" de la invención.

Esquema de reacción B



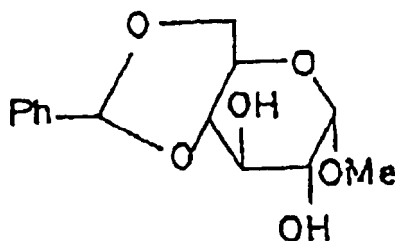
El compuesto (1) puede sintetizarse a partir de un primer producto intermedio de hidrato de carbono en forma de un resto de monosacárido cimarosa activado, que puede prepararse a partir de un compuesto que tiene la fórmula (36). El compuesto (36) puede prepararse mediante un procedimiento que incluye las etapas

(i) tratar metil- α -D-glucosa que tiene la fórmula



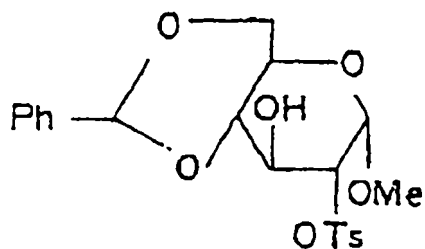
(31)

con benzaldehído y cloruro de zinc para producir un compuesto metil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosido de fórmula



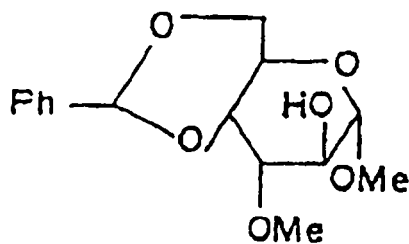
(32)

(ii) tratar el compuesto (32) con cloruro de tosilo y piridina a 0°C, para producir un compuesto metil-4,6-O-bencilideno-2-O-tosil- α -D-glucopiranosido de fórmula



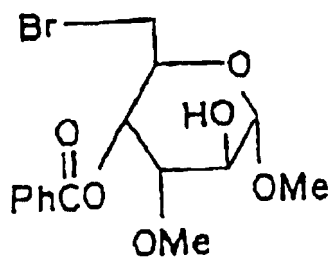
(33)

(iii) tratar el compuesto (33) con NaOMe a 100°C para producir un compuesto metil-4,6-O-bencilideno-3-O-metil- α -D-altropiranosido de fórmula



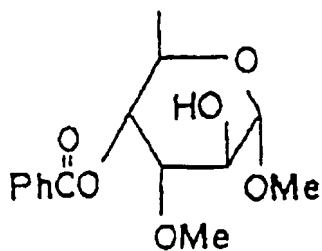
(34)

(iv) tratar el compuesto (34) con N-bromosuccinamida (NBS) para producir un compuesto metil-6-bromo-4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- α -D-altropiranosido de fórmula



(35)

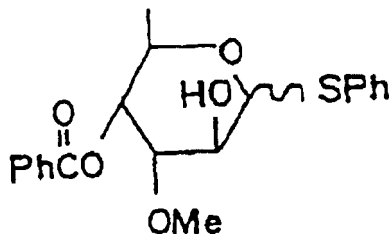
y (v) tratar el compuesto (35) con NaBH₄ y NiCl₂, para producir un compuesto metil-4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- α -D-altropiranosido de fórmula



(36)

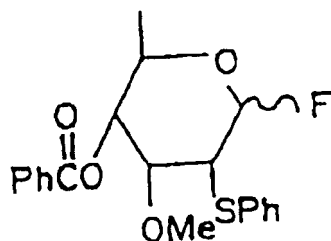
La invención se extiende a un procedimiento para la preparación de un producto intermedio de hidrato de carbono en forma de un resto de monosacárido cimarosa activado que incluye las etapas de

(i) tratar el compuesto (36) con PhSSiMe_3 , ZnI_2 y Bu_4^+I^- para producir un compuesto 4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- $\alpha\beta$ -D-feniltioaltrósido de fórmula



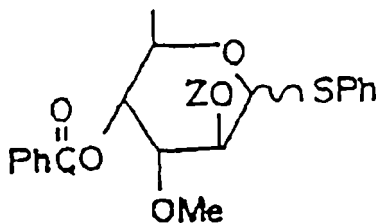
(37)

(ii) opcionalmente tratar el compuesto (37) con trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST), por ejemplo a 0°C , para producir un compuesto 4-O-benzoil-3-O-metil-2-feniltio-2,6-didesoxi- $\alpha\beta$ -D-fluorocimaropiranosido que tiene la fórmula



(38)

o (iii) opcionalmente, tratar el compuesto (37) con cloruro de t-butildimetilsililo e imidazol en un disolvente, por ejemplo piridina, para producir 4-O-benzoil-3-O-metil-2-O-t-butildimetilsilil- $\alpha\beta$ -D-feniltioaltrósido que tiene la fórmula

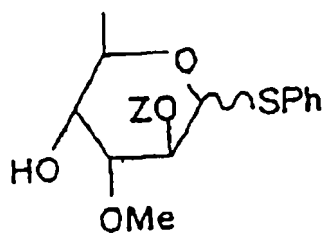


(39)

en la que $\text{Z} = \text{TBDMS} = \text{t-butildimetilsililo}$

ES 2 321 162 T3

y (iv) tratar el compuesto (39) con una base, por ejemplo metóxido de sodio, para producir 3-O-metil-2-O-t-butildimetilsilil- $\alpha\beta$ -D-feniltioaltrósido que tiene la fórmula



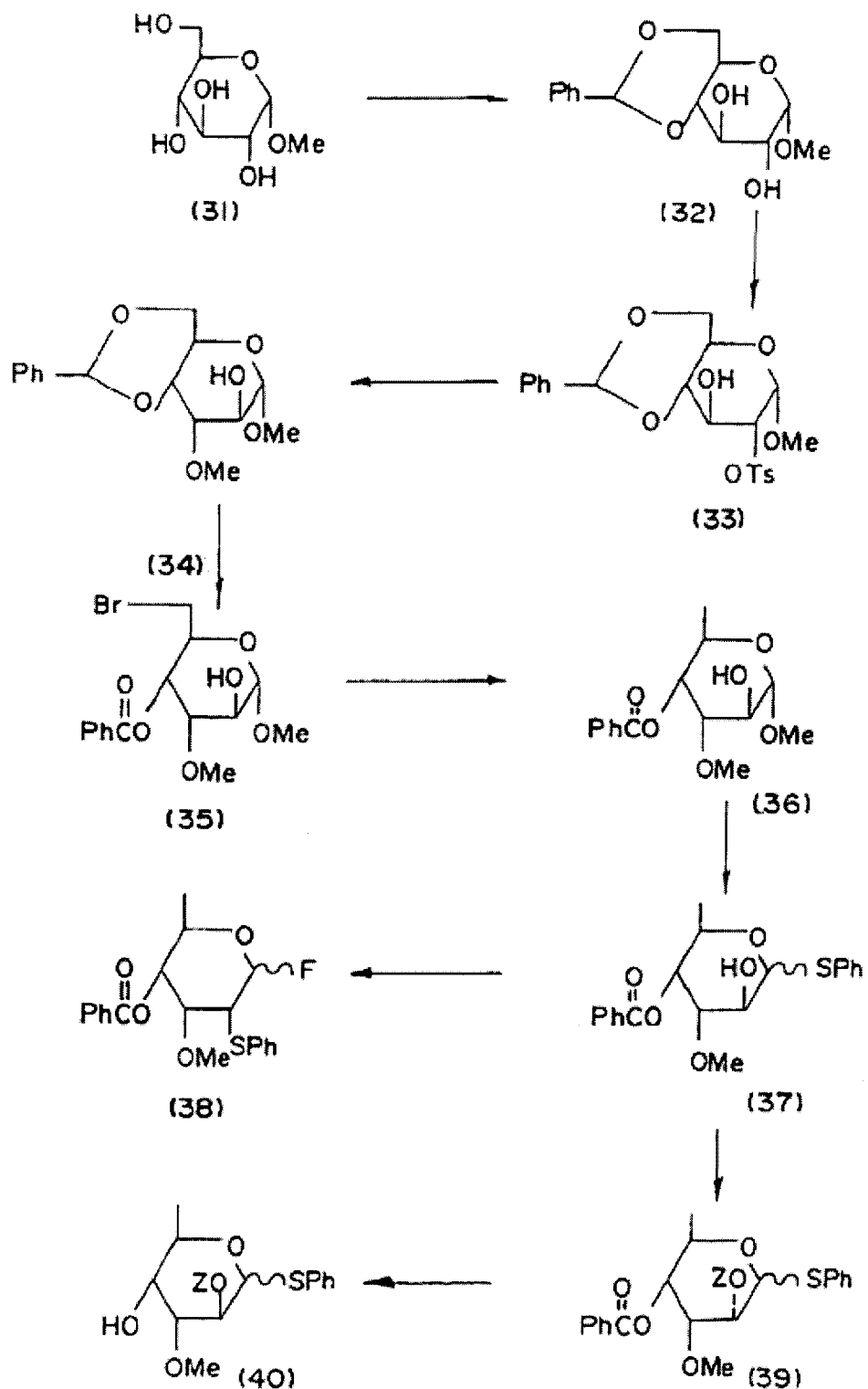
(40)

en la que Z = TBDMS = t-butildimetilsililo.

(Esquema pasa a página siguiente)

El esquema de reacción C muestra el procedimiento para la síntesis del resto de monosacárido cimarosa activado (40) a partir del compuesto (36) (e incluye la preparación del compuesto (36) a partir del compuesto (31) para propósitos ilustrativos).

Esquema de reacción C

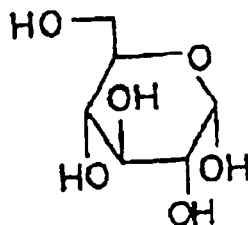


Z = t-butildimetilsililo

ES 2 321 162 T3

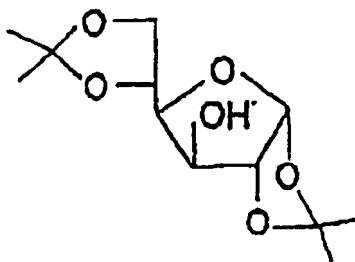
La síntesis del compuesto (1) puede implicar también un segundo producto intermedio de hidrato de carbono en forma de un resto de monosacárido tevetosa activado, que puede prepararse a partir de un compuesto que tiene la fórmula (47). El compuesto (47) puede prepararse mediante un procedimiento que incluye las etapas de

(i) tratar α -D-glucosa que tiene la fórmula



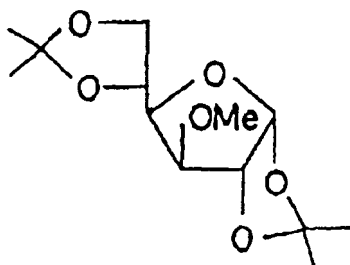
(41)

con acetona y ácido sulfúrico para producir un compuesto 1,2 : 5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa de fórmula



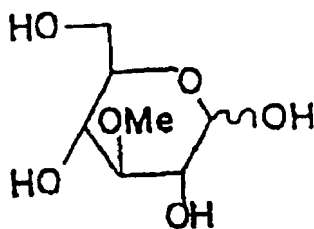
(42)

(ii) tratar el compuesto (42) con NaH y MeI para producir un compuesto 1,2 : 5,6-Di-O-isopropilideno-3-O-metil- α -D-glucofuranosa de fórmula



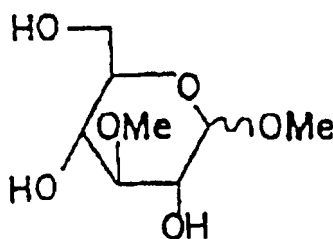
(43)

(iii) tratar el compuesto (43) con ácido acético para producir un compuesto 3-O-metil- $\alpha\beta$ -D-glucopiranososa de fórmula



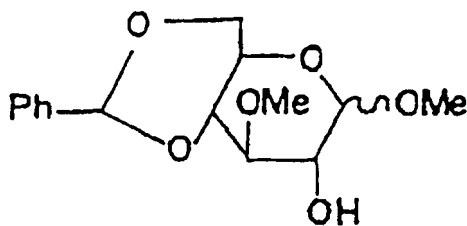
(44)

(iv) tratar el compuesto (44) con metanol y ácido clorhídrico para producir un compuesto metil-3-O-metil- $\alpha\beta$ -D-glucopiranosido que tiene la fórmula



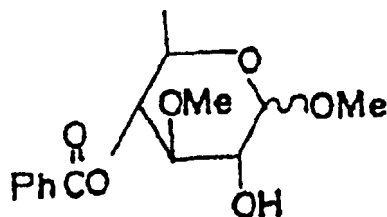
(45)

(v) tratar el compuesto (45) con benzaldehído y cloruro de zinc para producir un compuesto metil-4,6-O-bencilideno-3-O-metil- $\alpha\beta$ -glucopiranosido que tiene la fórmula



(46)

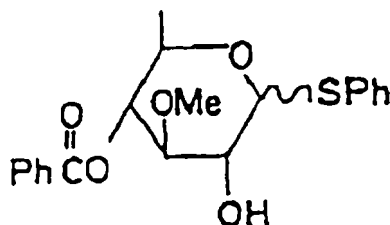
(vi) tratar el compuesto (46) con N-bromosuccinamida, cloruro de níquel y borohidruro de sodio para producir un compuesto metil-4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido que tiene la fórmula



(47)

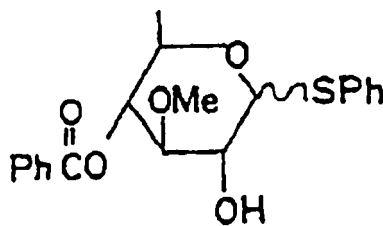
La preparación de un resto de monosacárido tevetosa activado incluye las etapas de

(i) tratar el compuesto (47) con feniltiotrimetilsilano y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo para producir un compuesto 4-O-benzoil-3-O-metil-1-feniltio-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido que tiene la fórmula



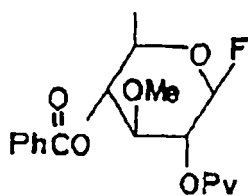
(48)

(ii) tratar el compuesto (48) con cloruro de pivaloilo y un disolvente, por ejemplo piridina, para producir un compuesto 4-O-benzoil-3-O-metil-2-O-pivaloil-1-feniltio-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido que tiene la fórmula

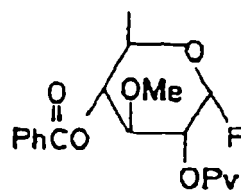


(49)

y (iii) tratar el compuesto (49) con un agente de bromación, por ejemplo N-bromosuccinimida, y trifluoruro de dietilaminoazufre para producir un compuesto 4-O-benzoil-3-O-metil-2-O-pivaloil-1-fluoro-6-desoxi- β -glucopiranosido que aparece como estereoisómeros que tienen la fórmula



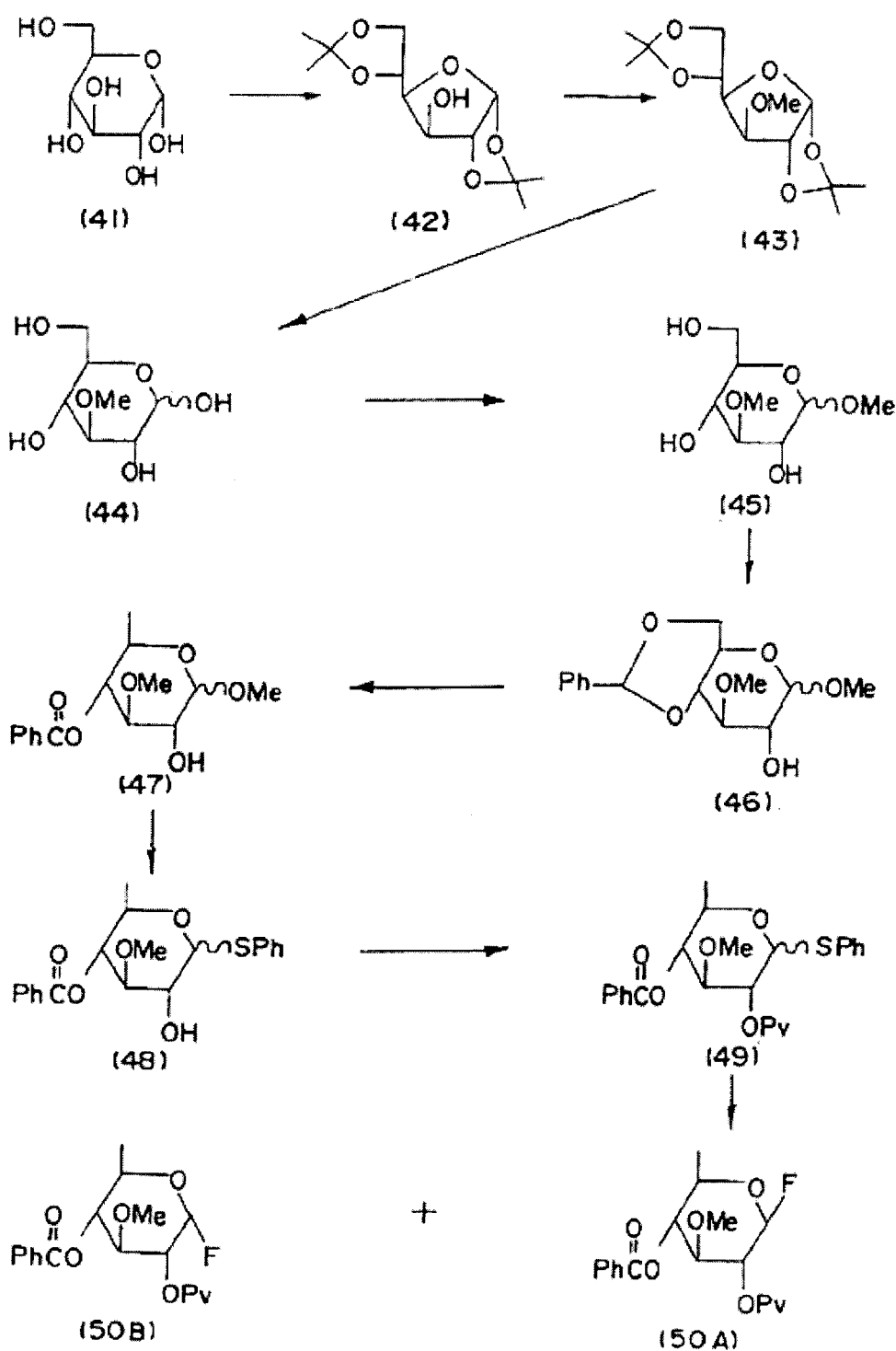
(50 A)



(50 B)

El esquema de reacción D muestra el procedimiento para la síntesis del resto de monosacárido tevetosa activado (50(A) y 50(B)) a partir del compuesto (48) (e incluye la preparación del compuesto (47) a partir del compuesto (41) para propósitos ilustrativos).

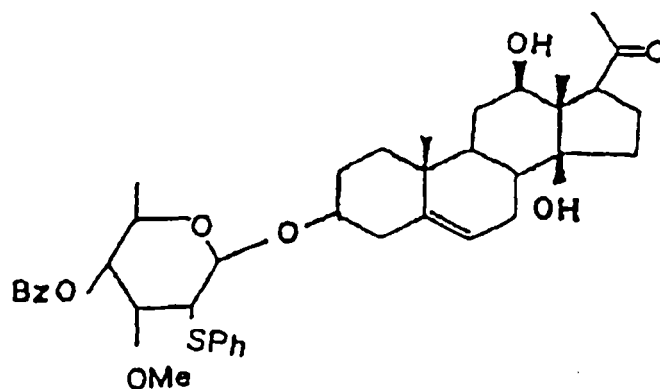
Esquema de reacción D



De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la invención se proporcionan procedimientos que pueden usarse en un procedimiento de producción sintética de un compuesto de fórmula (1) y análogos y derivados del mismo que incluye las etapas de sintetizar un producto intermedio esteroideo o precursor adecuado y acoplar el número requerido de monosacáridos adecuados con el producto intermedio esteroideo.

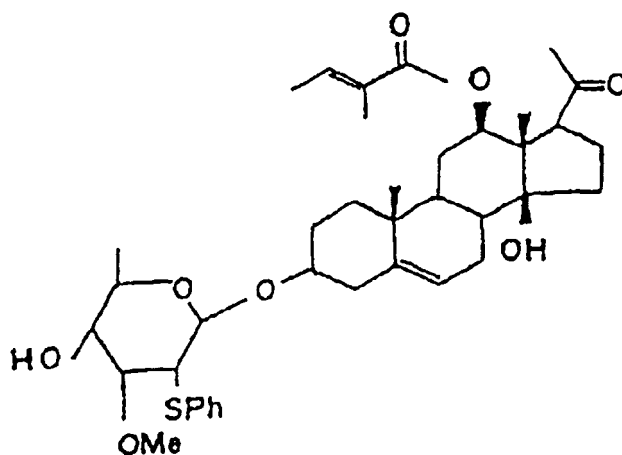
La invención proporciona también un procedimiento de acoplamiento de un monosacárido cimarosa con el producto intermedio esteroideo, que incluye las etapas de

(i) hacer reaccionar un resto de cimarosa (38) con un producto intermedio esteroideo (15), por ejemplo a -15°C , y en presencia de cloruro de estaño, en un disolvente, por ejemplo éter, para producir un compuesto 3-O-[4-O-benzoil-2-feniltio- β -D-cimaropiranosil]-12,14-6-dihidroxi-pregn-5-en-20-ona de fórmula



(51)

y (ii) tratar el compuesto (51) con cloruro de ácido tiglico en piridina y después con una base, por ejemplo NaOMe, para producir un compuesto 3-O-[-2-feniltio- β -D-cimaropiranosil]-12 β -tigloiloxi-14-hidroxi-14 β -pregn-5-en-20-ona de fórmula



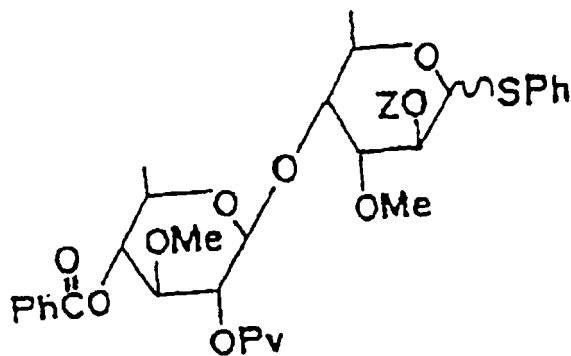
(52)

La invención se extiende a un procedimiento que incluye el acoplamiento de un resto de monosacárido cimarosa con un resto de monosacárido tevetosa y el acoplamiento del disacárido resultante con el producto esteroideo combinado (52) para formar el compuesto (1).

ES 2 321 162 T3

El procedimiento de acoplamiento del resto de monosacárido cimarosa con el resto de monosacárido tevetosa y el acoplamiento del disacárido resultante con el producto esteroideo combinado (52) puede incluir las etapas de

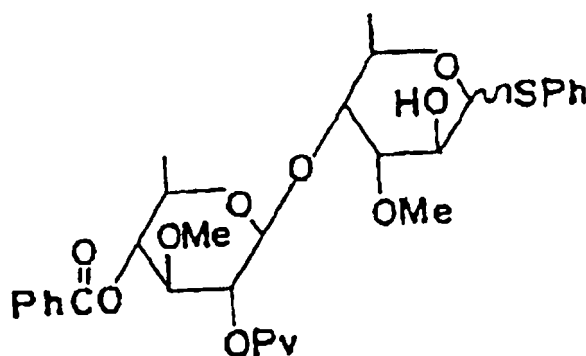
- (i) acoplar un resto de cimarosa protegido de manera selectiva (40) y un resto de tevetosa protegido de manera selectiva (50 A) usando cloruro de estaño (SnCl_2) y trifluorometanosulfonato de plata, por ejemplo a -15°C , para producir un compuesto de fórmula



(53)

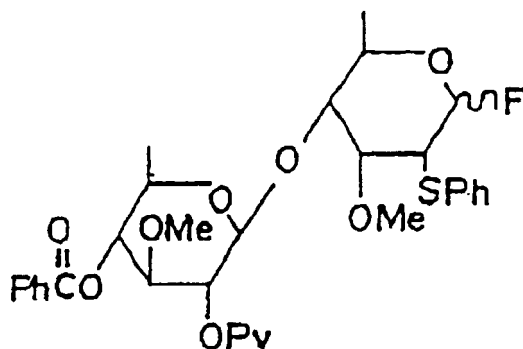
en la que $Z = \text{TBDMS} = \text{t-butildimetilsililo}$

- (ii) tratar el compuesto (53) con fluoruro de tetrabutilamonio para producir un compuesto de fórmula



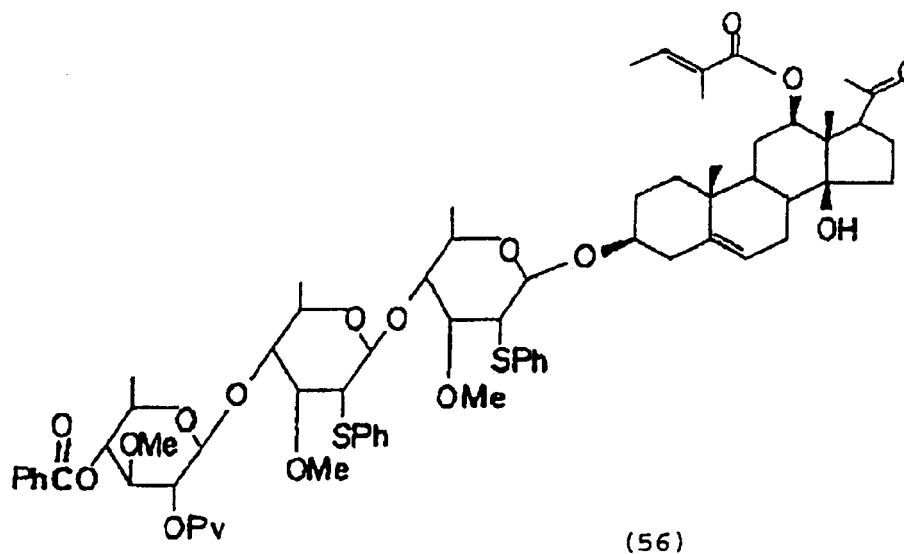
(54)

- (iii) tratar el compuesto (54) con trifluoruro de dietilaminoazufre, por ejemplo a 0°C , para producir un compuesto de fórmula



(55)

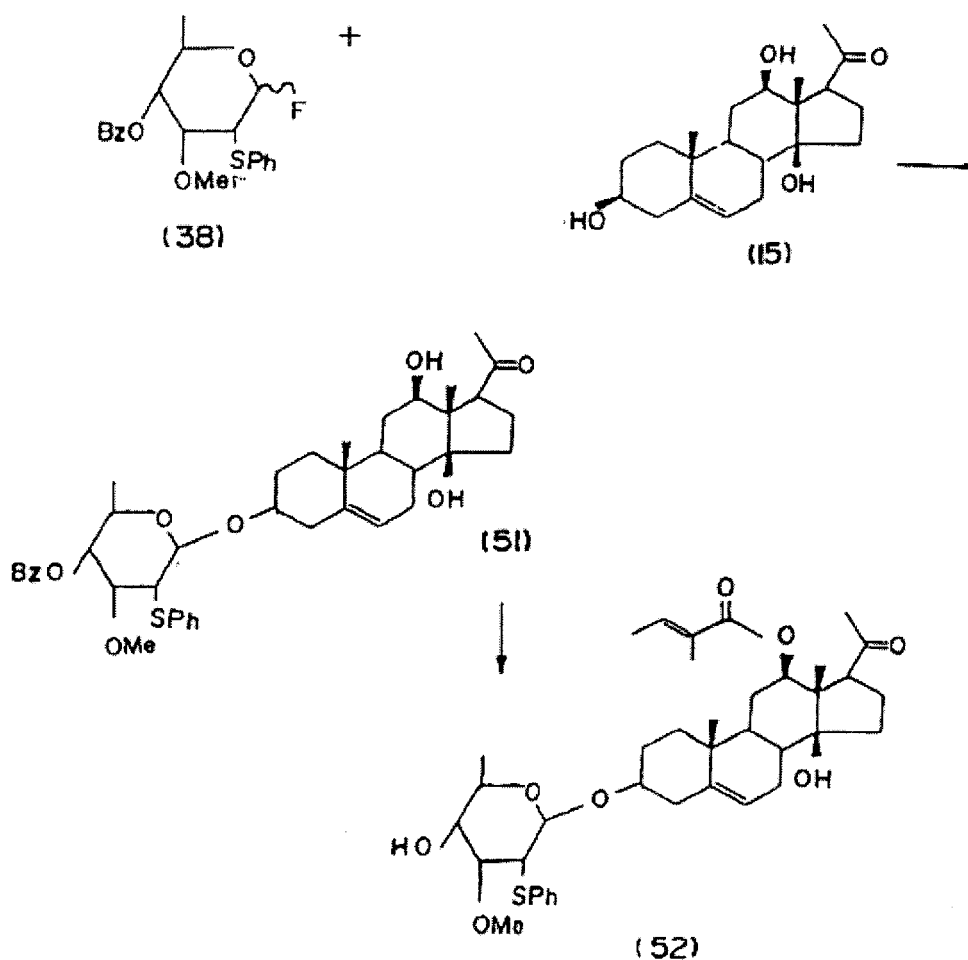
(iv) hacer reaccionar el compuesto (55) con el compuesto (52) para producir un compuesto de fórmula

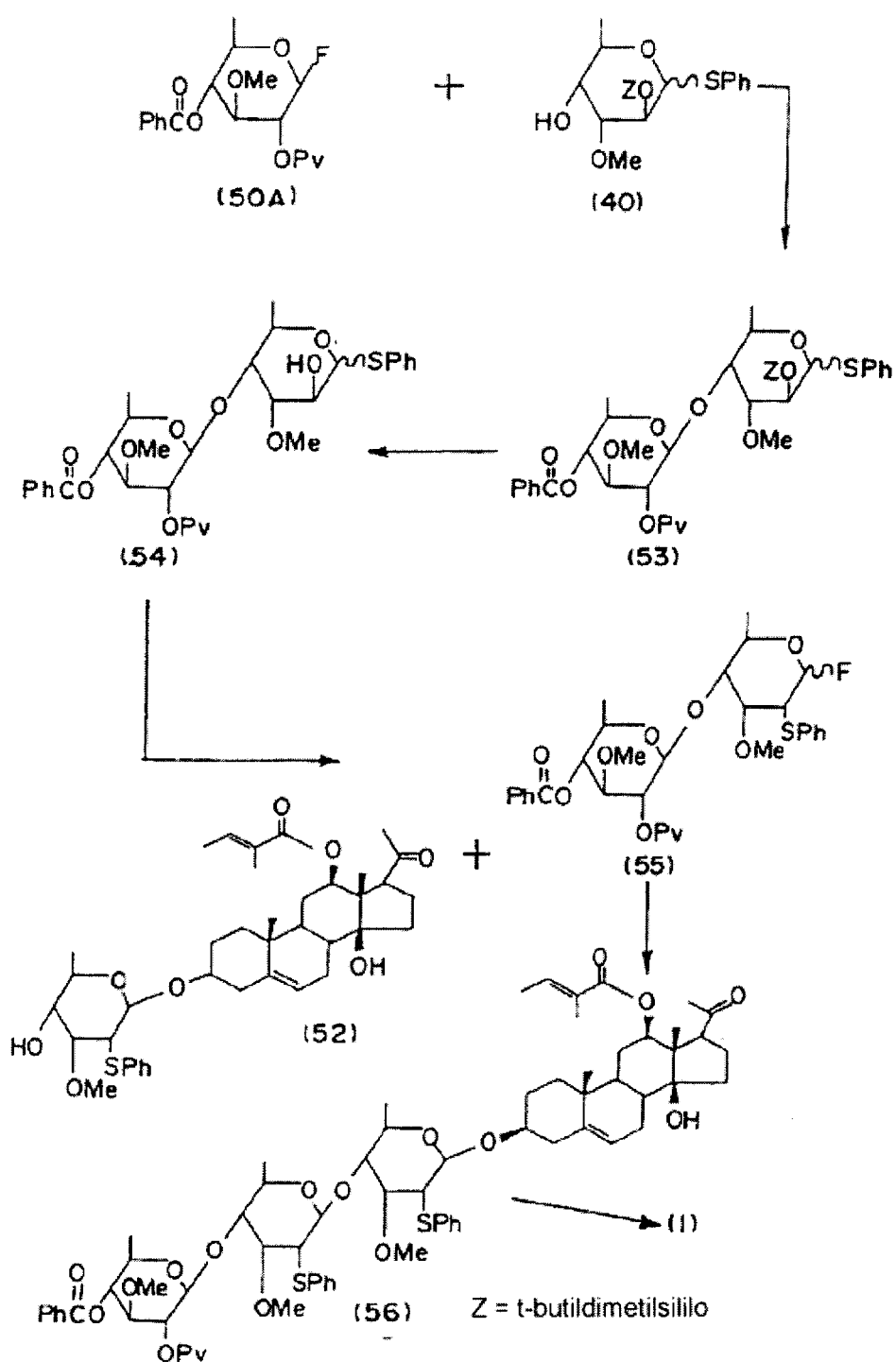


y (v) tratar el compuesto (56) en una reacción con níquel Raney y después con una base, por ejemplo NaOMe, para producir el compuesto (1) como se ha descrito anteriormente.

El esquema de reacción E muestra el procedimiento para la síntesis de los productos intermedios (52) y (55) y acoplarlos para formar el compuesto (56).

Esquema de reacción E

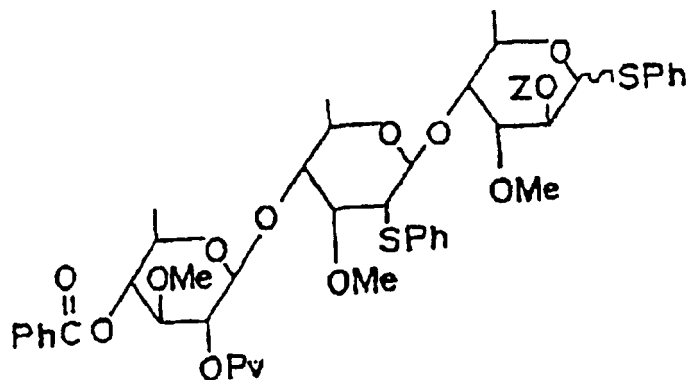




De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento alternativo que incluye acoplar restos de cimarosa y tevetosa para formar un trisacárido y acoplar el trisacárido en un derivado esteroideo para formar un compuesto de fórmula (1).

El procedimiento de formación del trisacárido y acoplamiento del trisacárido resultante con un derivado esteroideo puede incluir las etapas de

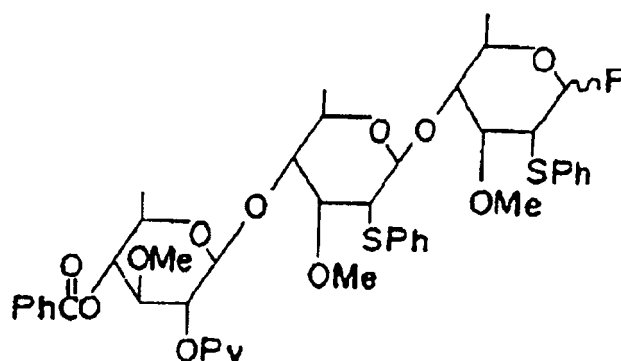
- (i) acoplar un resto de cimarosa protegido de manera selectiva (40) y el compuesto (45) usando cloruro de estaño (II), AgOTf, Cp_2ZrCl_2 para producir un compuesto de fórmula



(57)

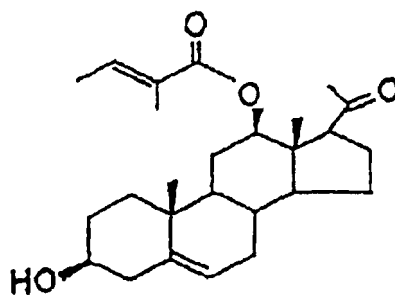
en la que $Z = \text{TBDMS} = \text{t-butildimetilsililo}$

- (ii) tratar el compuesto (57) con fluoruro de tetrabutilamonio y trifluoruro de dietilaminoazufre para producir un compuesto trisacárido que tiene la fórmula



(58)

- y (iii) acoplar el trisacárido (58) con un producto intermedio esteroideo de fórmula



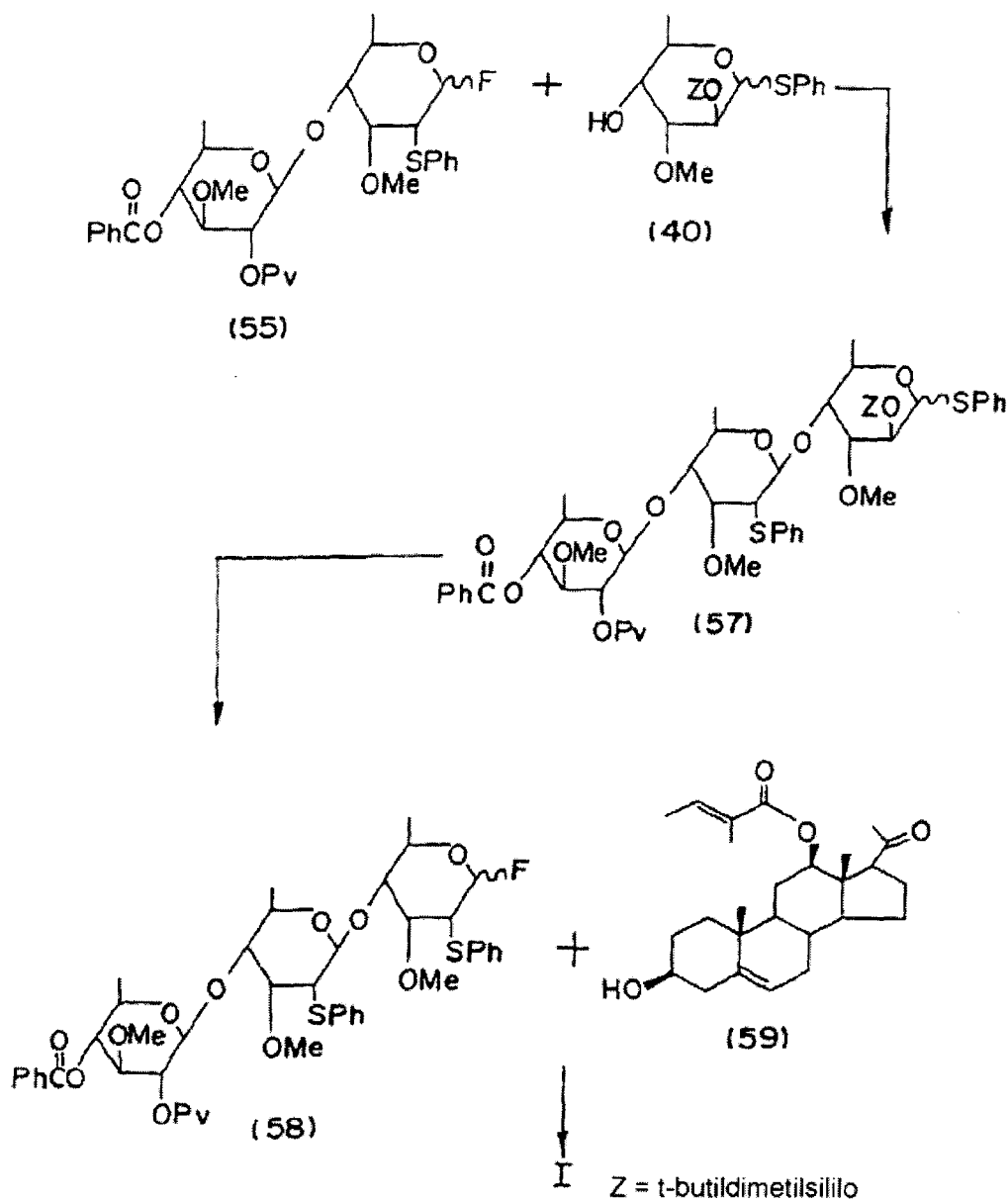
(59)

usando cloruro de estaño (II), AgOTf, Cp_2ZrCl_2 para producir el compuesto (1).

El producto intermedio esteroideo (59) puede producirse tratando el esteroide (15) con cloruro de ácido tíglico.

El esquema de reacción F muestra el procedimiento para la síntesis del trisacárido (58) y la síntesis del compuesto (1) acoplando el trisacárido (58) con el producto intermedio esteroideo (59).

Esquema de reacción F



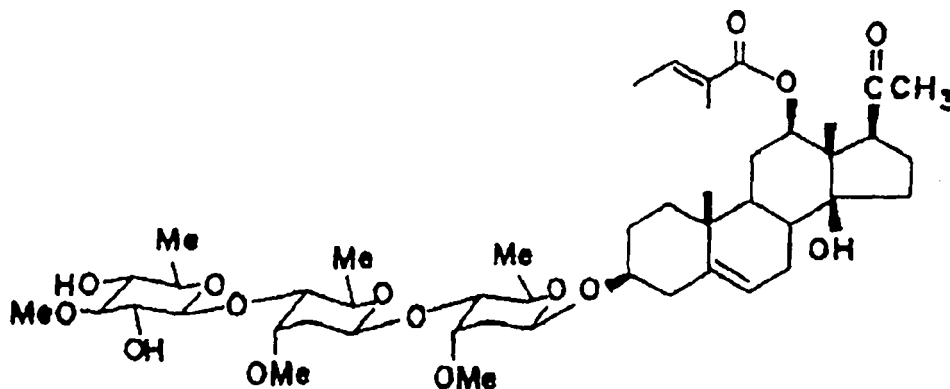
Los productos intermedios (23), (24), (25), (27), (28), (29), (30), (37), (38), (39), (40), (48), (49), (50), (51), (53), (54), (55), (56), (57) y (58) descritos anteriormente son compuestos novedosos y ciertos de estos compuestos se reivindican como tal.

Se ha descubierto que el compuesto (1), 3-O-[- β -D-tevetopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosil]-12 β -O-tigloiloxi-14-hidroxi-14 β -pregn-5-en-20-ona, y diversos análogos y derivados del mismo tienen actividad supresora del apetito.

El principio activo puede ser un compuesto de fórmula (1), extraído de una planta del género *Trichocaulon* o *Hoodia* o un derivado del mismo. La planta puede ser de la especie *Trichocaulon officinale* o *Trichocaulon piliferum*, o la especie *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* o *Hoodia lugardii*.

La invención se extiende también a una composición o formulación que tiene actividad supresora del apetito, en la que el principio activo es un compuesto de fórmula (1) producido de manera sintética o un derivado o análogo del mismo, tal como se expuso anteriormente en este documento con referencia a los compuestos (2) a (14).

El agente supresor del apetito puede ser un compuesto químico sintético o un compuesto químico natural aislado de fórmula:



(1)

o derivados o análogos del mismo, tal como se expuso anteriormente.

La composición o formulación supresora del apetito puede constar del agente supresor del apetito mezclado con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico. Pueden añadirse otros aditivos adecuados, incluyendo un estabilizante y otros de dichos ingredientes que puedan desearse.

La invención se extiende al uso del compuesto (1) o sus derivados o análogos en la fabricación de un medicamento que tiene actividad supresora del apetito.

La invención se extiende además al compuesto (1), o sus derivados o análogos tal como se expuso anteriormente, para su uso como medicamento que tiene actividad supresora del apetito.

Se proporciona también un procedimiento para suprimir el apetito administrando un ser humano o un animal una dosificación eficaz de una composición descrita anteriormente.

En este documento se ha descrito un procedimiento para extraer un glicósido esteroideo que tiene actividad supresora del apetito a partir de material de planta obtenido de una planta del género *Trichocaulon* o *Hoodia*. Por tanto, la invención puede usar un glicósido esteroideo sustancialmente puro de fórmula (1) que puede obtenerse a partir de un extracto de material de planta del género *Hoodia* o *Trichocaulon*.

La invención también se extiende a un producto alimenticio o una bebida que contenga una cantidad eficaz del glicósido esteroideo de fórmula (1), o sus derivados o análogos tal como se expuso anteriormente, para que tenga un efecto supresor del apetito cuando se ingiere.

Los estudios genéticos moleculares han conducido a un aumento considerable en la comprensión de la regulación del apetito, la saciedad y el peso corporal. Estos estudios han revelado numerosas vías reguladoras centrales, mediadas por varios neuropéptidos. El mantenimiento de un peso corporal normal se consigue por un equilibrio complejo entre la ingesta de energía, el consumo de alimento, y el gasto de energía. La homeostasis de la energía está sometida a un amplio intervalo de influencias, finalmente controladas por el cerebro. Las diferentes señales incluyen cosas tales como el sentido del olfato y el gusto y señales gastrointestinales tales como la dilatación del tracto gastrointestinal, señales químicas a la mucosa gástrica y metabolitos en la sangre tales como ácidos grasos y glucosa.

De forma central, el neuropéptido "Y" (NPY) que está regulado de forma negativa por la leptina, se ha establecido como uno de los reguladores positivos del comportamiento de la alimentación. La expresión del antagonista endógeno para receptores de melanocortina también ha demostrado ser la base para la obesidad en un modelo particular (el ratón ob/ob). De hecho, la deficiencia en el receptor de melanocortina MC4 replica completamente el síndrome de obesidad. Otros mediadores que han demostrado tener papeles en el equilibrio energético incluyen la bombesina, la galonina y el péptido 1 de tipo glucagón.

Sin querer restringirse a la teoría, el solicitante cree que el compuesto (1) y sus análogos como se ha descrito anteriormente actúan como antagonista del receptor 4 de melanocortina. El efecto de éste es regular el NPY pero también aumentar la colecistocinina. El efecto de la colecistocinina entre otras cosas es inhibir el vaciado gástrico.

ES 2 321 162 T3

La invención y su eficacia se describirán ahora adicionalmente, sin limitación del alcance de la invención, con referencia a los siguientes ejemplos y dibujos.

En los dibujos,

la Figura 1 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento general para extraer un primer extracto supresor del apetito bruto y un extracto supresor del apetito purificado a partir del material de planta del género *Trichocaulon* u *Hoodia*;

la Figura 2 muestra una representación gráfica de un bioensayo realizado en ratas usando un extracto de metanol parcialmente purificado de *Trichocaulon piliferum*;

las Figuras 3 y 4 juntas muestran una representación esquemática de una realización preferida del procedimiento de la invención para producir un extracto de material de planta del género *Trichocaulon* u *Hoodia*; y

las Figuras 5 y 6 muestran una representación gráfica del porcentaje de cambio en la masa corporal de las ratas para diferentes grupos durante los días -7 a 7 y los días 0 a 7 respectivamente en un estudio de dosis repetida usando un extracto de savia y un extracto de savia secada por pulverización de material de planta de la especie *Hoodia gordonii*.

Ejemplo preparativo 1

El procedimiento general para extraer un primer extracto supresor del apetito bruto y un extracto supresor del apetito purificado a partir de material de planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia* se ilustra a modo de diagrama de flujo de la Figura 1.

Ejemplo preparativo 2

Los bioensayos realizados en ratas usando un extracto de metanol parcialmente purificado obtenido del modo ilustrado en el Ejemplo 1, indicaron que el extracto muestra de hecho actividad supresora del apetito. La actividad supresora del apetito del extracto activo puede ilustrarse a modo de ejemplo típico del efecto del extracto de metanol de *Trichocaulon piliferum* sobre ratas, a modo de representación gráfica en la Figura 2.

Será evidente a partir de la Figura 2 que el grupo de ensayo de ratas dosificadas con el extracto en el día 5 mostraron una ingesta de alimento sustancialmente disminuida sobre los siguientes dos días, mientras que el grupo de control no describe una ingesta de alimento reducida comparable. La ingesta de alimento del grupo de ensayo volvió a la normalidad y de hecho aumento desde el día 8 en adelante.

Ejemplo 3

Se ilustra un procedimiento para producir un extracto que tiene actividad supresora del apetito de forma esquemática a modo de ejemplo en las Figuras 3 y 4, ilustrando las dos Figuras juntas el procedimiento completo. Sin embargo, pueden usarse diversos procedimientos diferentes, como entenderán los especialistas en la técnica.

Con referencia a la Figura 3, se suministra material de planta del género *Trichocaulon* o el género *Hoodia* en un mezclador 3, por ejemplo un mezclador Waring, mediante el conducto de suministro 1, con un disolvente en forma de una disolución de cloruro de metileno/metanol introducida por el conducto de suministro 2. El producto homogeneizado se suministra por el conducto 4 a una fase de separación 5, por ejemplo en forma de un filtro o centrífuga y el material de planta residual se retira por el conducto 27.

La mezcla de disolvente/extracto se suministra mediante el conducto 6 a una fase de evaporación 7, donde el disolvente se retira, por ejemplo, mediante un rotavapor. El extracto bruto secado se suministra por el conducto 8 a una fase de extracción adicional 9 con la adición de una disolución de cloruro de metileno/agua introducida por el conducto de suministro 29 para la extracción adicional y después a una fase de separación 13 mediante el conducto 11, donde la fracción acuosa se retira mediante el conducto 31. La fracción del extracto disuelto se suministra mediante el conducto 15 a una fase secadora 17 donde se evapora el disolvente, por ejemplo por un rotavapor.

Con referencia a la Figura 4, el extracto secado se suministra mediante el conducto 10 a una fase de extracción 12. También se suministra una disolución de metanol/hexano mediante el conducto 14 a la fase de extracción 12 para purificación adicional y extracción del extracto secado. La mezcla de extracto/metanol/hexano se suministra mediante el conducto 16 a una fase de separación 18, se retira la fracción de hexano mediante el conducto 20 y después se suministra la mezcla de metanol/extracto mediante el conducto 22 a una fase de secado 24. En la fase de secado 24, se retira el disolvente, por ejemplo por evaporación en un rotavapor.

El extracto activo parcialmente purificado y secado se suministra mediante el conducto 26 y con la adición de metanol mediante el conducto 28 en una fase de disolución 30 y la fracción disuelta se suministra mediante el conducto 36 a una columna de cromatografía 38.

ES 2 321 162 T3

- En la columna 38, se fracciona adicionalmente la fracción soluble en metanol, usando gel de sílice y un disolvente de cloroformo/metanol al 30%, en diferentes fracciones esquemáticamente indicadas como fracciones I a V. De acuerdo con un procedimiento de fraccionamiento real realizado por el solicitante, el procedimiento de fraccionamiento produjo los siguientes pesos de fracción: I(3,9 g); II(2,6 g); III(2,1 g); IV(1,1 g) y V(2,0 g). Estas fracciones se evalúan individualmente por un procedimiento de bioensayo adecuado (en una etapa no mostrada) y las fracciones identificadas como fracciones I y II, que presentan una marcada actividad supresora del apetito, se suministran por los conductos de suministro 40 y 42 en las columnas 44 y 46 respectivamente donde se fraccionan adicionalmente y se purifican por cromatografía en columna, de nuevo usando gel de sílice y un sistema de cloroformo:metanol 9:1.
- Las subfracciones II(A)-(C) obtenidas de la columna 44 no presentan, cuando se ensayan, una actividad supresora del apetito notable y pueden reciclarse para cromatografía adicional.
- Las subfracciones I(A)-(L) obtenidas de la columna 46 también se evalúan (por una etapa de ensayo no mostrada) y se descubre que la subfracción I(C) tiene una marcada actividad supresora del apetito.
- La subfracción I(C) se suministra mediante el conducto 48 en la columna 50 para un fraccionamiento y purificación adicionales, usando gel de sílice y el eluyente acetato de etilo:hexano 9:1. De las fracciones purificadas resultantes, se descubre que la fracción I(C)(ii), después del ensayo, tiene una marcada actividad supresora del apetito.
- El producto purificado se identifica por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (como se indica en las Tablas 1 y 2 a continuación) como el compuesto (1).

TABLA 1

Datos de ^1H r.m.n. (300,13 MHz) para el tratamiento (1) CDCl_3

Compuesto (1)			
	Átomo de hidrógeno	J (Hz) / Hz	$\delta\text{H/p.p.m.}$
30	Aglicona-3	–	3,522 m
	6	–	5,381 m
	12	11,5, 4,1	4,607 dd
35	17	9,3, 9,3	3,157 dd
	18	–	1,029 s
	19	–	0,951 s
40	21	–	2,164 s
	3 *	7,1, 1,5	6,888 qq
	4 *	7,1, 1,2	1,806 dq
45	5 *	1,6, 1,2	1,853 dq
	Cim-1'	9,4, 2,1	4,816 dd
	2' _{ac}	13,8, 3,7, 2,1	2,055 ddd
50	2' _{ax}	13,8, 9,4, 2,6	1,552 ddd
	3'	3,7, 2,9, 2,6	3,776 ddd
	4'	9,4, 2,9	3,179 dd
55	5'	6,3, 9,4	3,821 dd
	6'	6,3	1,279 d ^a
	3' -OMe	–	3,408 s ^d
60	1' '	9,4, 2,1	4,730 dd
	2''	13,8, 3,7, 2,1	2,108 ddd
	2' ' _{ac}	13,8, 9,4, 2,6	1,601 ddd
65	3' ' _{ax}	3,7, 2,9, 2,6	3,755 ddd
	4''	9,4, 2,9	3,239 dd
	5''	6,3, 9,4	3,898 dd

ES 2 321 162 T3

	6''	6,3	1,243 d ^b
5	3''-OMe	-	3,392 s ^e
	Tev-1'''	7,7	4,273 d
	2'''	7,7, 8,0	3,469 dd
10	3'''	8,0, 2,9	3,099 dd
	4'''	9,3, 2,9	3,179 dd
	5'''	6,3, 9,3	3,351 dd
15	6'''	6,3	1,183 d' ^c
	3'''-OMe	-	3,622 s
20	a,b,c en cada columna puede ser intercambiable. d,e en cada columna puede ser intercambiable,		
	* Se refiere a los átomos del grupo tigloato		

TABLA 2

Datos de ¹³C r.m.n. (75,25 MHz) relevantes para el compuesto (1) en CDCl₃

Resto de Aglicona		Resto de azúcar	
Carbono	δ _c /p.p.m.	Carbono	δ _c /p.p.m.
1	37,04 T	cim- 1'	95,84 D
2	29,44 T	2'	35,57 T
3	77,24 D	3'	77,05 D
4	38,62 T	4'	82,57 D
5	138,95 S	5'	68,48 D
6	131,90 D	6'	18,14 Q
7	27,30 T	3'-OMe	57,93 Q
8	35,30 D	1''	99,54 D
9	43,04 D	2''	35,17 T
10	37,22 S	3''	76,99 D
11	26,04 T	4''	82,52 D
12	75,88 D	5''	68,30 D
13	53,71 S	6''	18,36 Q
14	85,69 S	3''-OMe	57,09 Q
15	34,36 T	Tev- 1'''	104,28 D
16	24,31 T	2'''	74,62 D
17	57,18 D	3'''	85,30 D

ES 2 321 162 T3

18	9,85 Q	4'''	74,62 D
19	19,27 Q	5'''	71,62 D
20	216,85 S	6'''	17,75 Q
21	33,01 Q	3'''-OMe	60,60 Q
1 *	167,60 S		
2 *	128,69 D		
3 *	137,66 D		
4 *	14,41 Q		
5 *	12,08 Q		

* Se refiere a los átomos del grupo tigloato

20 Compuesto (1)

Datos IR: 3440 cm^{-1} (OH), 2910 cm^{-1} (CH), 1700 cm^{-1} (C=O) [α_D]²⁰ 589 = 12,67° (C=3, CHCl_3) p.f. 147°C - 152°C

25 Los ejemplos 4 a 13 ilustran los procedimientos sintéticos por medio de los cuales pueden prepararse los compuestos intermedios y el esteroide (15) de acuerdo con “el primer procedimiento alternativo”.

30 Ejemplo 4

12 β ,15 α -Dihidroxiprogesterona (17)

35 Se preparan cultivos de *Calonectria decora* (ATCC 14767) mediante la inoculación de un medio de cultivo compuesto por sacarosa (900 g), K_2HPO_4 (30 g), concentrado Czapek (300 ml), aguas de maceración de maíz (300 ml) y agua destilada (30 l) (matraces, 150 X 500 ml). Tras 5 días de agitación a 26°C, se añade progesterona (16) (150 g) en una suspensión de Tween 80 (disolución al 0,1%, 1,5 l) a los matraces. Se incuban los cultivos durante 5 días adicionales y entonces se tratan mediante centrifugación, decantación, extracción del medio con cloroformo y después evaporación para dar la dihidroxiprogesterona (17) (75 g, 45%).

40 ¹H RMN (CDCl_3): 5,71 (1H, s, H-4); 4,12-4,22 (1H, m, H-15) 4,43 (1H, s.a., OH); 3,46-3,53 (1H, dd, J = 4,6 Hz, H-12); 2,16 Hz (3H, s, H-21); 1,18 (3H, s, H-19); 0,74 (3H, s, H-18)

45 Ejemplo 5

12 β -Hidroxi-15 α -(p-toluenosulfonil)-progesterona (18)

50 Se disuelve la dihidroxiprogesterona (17) (75 g, 0,22 mol) en piridina seca (300 ml) y se enfría hasta 0°C. Se añade gota a gota cloruro de p-toluenosulfonilo (46 g, 0,24 mol) en piridina seca (200 ml) a la mezcla de reacción a 0°C. Se agita la reacción durante la noche a 0°C y se extingue mediante la adición de H_2O (500 ml). Se extrae la fase acuosa con acetato de etilo (1 l) y se lava el extracto orgánico con ácido clorhídrico (6 M, 3 X 1 l), bicarbonato de sodio saturado acuoso (500 ml), cloruro de sodio saturado acuoso (500 ml) y agua (500 ml). Se seca la fase orgánica (MgSO_4), se filtra y se evapora para dar progesterona p-toluenosulfonada (18) (98 g, 92%) como un aceite amarillo oscuro viscoso.

55 ¹H RMN (CDCl_3): 7,7 (2H, d, J = 14 Hz, H-2,6); 7,34 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-3,5); 5,67 (1H, s, H-4); 4,86-4,93 (1H, m, H-15); 3,45-3,50 (1H, dd, J = 4,6 Hz, H-12); 2,44 (3H, s, H-4Me); 2,15 (3H, s, H-21) 1,13 (3H, s, H-19); 0,74 (3H, s, H-18).

60 Ejemplo 6

12 β -Hidroxi- Δ^{14} -progesterona (19)

65 Se somete a reflujo una disolución de la progesterona tosilada (18) (98 g, 0,19 mol) en 2,4,6-trimetilcolidina (500 ml) a 150°C durante 3 h. Se enfría la mezcla de reacción y se vierte en agua (500 ml). Se extrae la fase acuosa con acetato de etilo (1 l), tras lo cual se lava la fase orgánica con ácido clorhídrico (6 M, 3 X 1 l), bicarbonato de sodio

ES 2 321 162 T3

saturado acuoso (500 ml), cloruro de sodio saturado acuoso (500 ml) y agua (500 ml). Tras secar (MgSO_4) y filtrar, se evapora el acetato de etilo y se purifica la mezcla bruta mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetona:cloroformo (1:10) para proporcionar Δ^{14} -progesterona (19) (50 g, 78%) como un aceite rojo oscuro.

- 5 ^1H RMN (CDCl_3): 5,73 (1H, s, H-4), 5,28 (1H, dd, $J = 2,2$ Hz, H-15), 4,41 (1H, s.a., OH), 3,49-3,52 (1H, dd, $J = 4,3$ Hz, H-12), 2,80-2,84 (1H, dd, $J = 9,2$ Hz, H-17), 2,14 (3H, s, H-21), 1,19 (3H, s, H-19), 0,89 (3H, s, H-18).

Ejemplo 7

- 10 *3,12 β -Diacetoxipregna-3,5,14-trien-20-ona (20)*

Se somete a reflujo una disolución de Δ^{14} -progesterona (19) (50 g, 0,15 mol) en cloruro de acetilo (1,5 l) y anhídrido acético (750 ml) durante 2 horas. Se vierte la mezcla de reacción en acetato de etilo frío (1 l) y se añade bicarbonato de sodio saturado acuoso con agitación hasta que cesa la efervescencia. Se separa la fase de acetato de etilo de la fase de bicarbonato de sodio y se lava con porciones adicionales de bicarbonato de sodio acuoso (3 X 700 ml), después con cloruro de sodio saturado acuoso (700 ml) y finalmente con agua (700 ml). Se seca la fase orgánica (MgSO_4), se filtra y se evapora para proporcionar la 3,12 β -diacetoxipregna-3,5,14-trien-20-ona (20) (60 g, 93%) como un aceite naranja.

- 20 ^1H RMN (CDCl_3): 5,68 (1H, s, H-4), 5,44 (1H, m, H-6), 5,31 (1H, dd, $J = 2,2$ Hz, H-15), 4,82-4,86 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz, H-12), 3,10-3,18 (1H, t, $J = 9,5$ Hz, H-17), 2,18 (3H, s, 3-Ac), 2,11 (3H, s, 12-Ac), 2,08 (3H, s, H-21), 1,02 (3H, s, H-19), 1,01 (3H, s, H-18)

Ejemplo 8

- 25 *3,12 β -Diacetoxi-20,20-etilendioxipregna-3,5,14-trieno (21)*

30 Se disuelve el compuesto de diacetoxilo (20) (60 g, 0,14 mol) en benceno (1 l) y se añaden etilenglicol (60 ml) y ácido p-toluenosulfónico (1 g). (Se somete a reflujo previamente el benceno con una trampa de Dean-Stark). Se somete a reflujo la mezcla con agitación y eliminación azeotrópica del agua durante 16 horas. Se añade disolución saturada de bicarbonato de sodio acuosa (500 ml) a la disolución enfriada. Entonces se lava esto con salmuera (500 ml) y con agua (500 ml) y se seca (MgSO_4). Se evapora el disolvente y se purifica la mezcla bruta mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:hexano (2:8) para dar el etilendioxipregna-3,5,14-trieno (21) (35 g, 53%).

- 35 ^1H RMN (CDCl_3): 5,68 (1H, s, H-4), 5,45 (1H, m, H-6), 5,31 (1H, dd, $J = 2,2$ Hz, H-15), 4,73-4,85 (1H, dd, $J = 4,4$ Hz, H-12), 3,78-3,98 (4H, m, etilendioxilo), 2,16 (3H, s, 3-Ac), 2,04 (3H, s, 12-Ac), 1,29 (3H, s, H-21), 1,12 (3H, s, H-19), 1,02 (3H, s, H-18).

Ejemplo 9

- 45 *12-Acetato de 3 β -12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxipregna-5,14-dieno (22)*

Se suspende el dienol-acetato (21) (35 g, 0,077 mol) en etanol (500 ml) y se añade borohidruro de sodio (2,8 g, 0,074 mol) a 0°C. Se deja calentar la mezcla hasta temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se elimina la mayoría del disolvente a vacío y la mezcla se diluye con agua (500 ml) y se extrae con acetato de etilo (500 ml). El tratamiento seguido por cromatografía en gel de sílice con acetona/cloroformo (1:10) da el 3 β -alcohol (22) (25 g, 80%).

- 50 ^1H RMN (CDCl_3): 5,41 (1H, m, H-6), 5,28 (1H, dd, $J = 2,2$ z, H-15), 4,72-4,81 (1H, dd, $J = 4,4$ z, H-12), 3,82-4,02 (4H, m, etilendioxilo), 3,45-3,59 (1H, m, H-3), 2,03 (3H, s, 12-Ac), 1,28 (3H, s, H-21), 1,10 (3H, s, H-19), 1,01 (3H, s, H-18).

Ejemplo 10

- 60 *3 β ,12 β -Dihidroxi-20,20-etilendioxipregn-5,14-dieno (23)*

Se añade gota a gota el 3 β -alcohol (22) (25 g, 60,2 mmol) en tetrahidrofurano seco (300 ml) a una suspensión de hidruro de aluminio y litio (2,7 g, 72,2 mmol) en tetrahidrofurano seco (500 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas tras lo cual se añade cuidadosamente agua (2,7 ml) y se agita durante 10 min adicionales. Entonces se añade hidróxido de sodio (disolución al 15%, 2,7 ml) y se agita la suspensión. Tras 10 min, se añade agua (8,1 ml) y se agita la suspensión durante 10 minutos, se filtra, se seca (MgSO_4) y se evapora el disolvente para proporcionar el 3 β ,12 β -dihidroxipregna-dieno (23) (20 g, 90%).

ES 2 321 162 T3

¹H RMN (CDCl₃): 5,36 (1H, m, H-6), 5,23 (1H, dd, J = 2,2 Hz, H-15), 3,94-4,06 (4H, m, etilendioxilo), 3,41-3,52 (1H, m, H-3), 3,32-3,36 (1H, dd, J = 4,3 Hz, H-12), 1,31 (3H, s, H), 1,01 (3H, s, H-19), 0,96 (3H, s, H-18).

¹³C RMN (CDCl₃): 152,4 (C-14), 140,2 (C-5), 121,1 (C-15), 119,7 (C-6), 111,1 (C-20), 79,8 (C-12), 71,6 (C-3), 63,7 y 63,6 (etilendioxilo), 58,8 (C-17), 19,0 (C-19), 11,9 (C-18).

3β,12β-Dihidroxi-14,15-epoxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno;

10 *3β,12β-Dihidroxi-5,6-epoxi-20,20-etilendioxipregn-14-eno*

Se añade N-bromoacetamida (211 mg, 1,5 mmol) a una disolución con agitación del 5,14-dieno (23) (500 mg, 1,34 mmol) en acetona (100 ml), ácido acético (2,5 ml) y agua (5 ml) a 0°C. Tras 15 min se añade sulfito de sodio (disolución al 5%, 50 ml) a la mezcla de reacción. Se evapora la acetona y se extrae la fase acuosa con diclorometano (3 X 50 ml). Se seca la fase orgánica (MgSO₄), se filtra y se evapora. Se añade piridina (1 ml) al producto y se agita durante 0,5 h. Entonces se añade diclorometano (100 ml) a la mezcla de reacción y se lava el diclorometano con ácido cítrico (disolución al 5%, 3 X 100 ml), bicarbonato de sodio saturado (50 ml) y agua (50 ml). Se seca la fase orgánica (MgSO₄), se filtra y se evapora para dar la mezcla de 14,15- y 5,6-epóxidos (360 mg, 69%) como una espuma blanca. No pudo separarse la mezcla de epóxidos mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Ejemplo 11

25 *3β,12β-Dihidroxi-14,15-epoxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno (24)*

Se añade la mezcla de 14,15- y 5,6-epóxidos (14,4 g, 37,0 mmol) en tetrahidrofurano seco (200 ml) a una suspensión de hidruro de aluminio y litio (1,69 g, 44,4 mmol) en tetrahidrofurano seco (300 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual se trata como se ha descrito anteriormente mediante la adición de agua (1,69 ml) e hidróxido de sodio (disolución al 15%, 1,69 ml). Tras la filtración y evaporación del disolvente, se purifica el producto bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol/cloroformo (1:9) como disolvente para dar el 14,15-epoxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno (24) que no reaccionó (300 mg, 2,1%).

35 ¹H RMN (CDCl₃): 5,31 (1H, m, H-6), 3,82-3,98 (4H, m, etilendioxilo), 3,43-3,52 (1H, m, H-3), 3,41 (1H, s, H-15), 3,31-3,35 (1H, dd, J=4,3 Hz, H-12), 1,29 (3H, s, H-21), 1,17 (3H, s, H-19), 1,02 (3H, s, H-18).

¹³C RMN (CDCl₃): 139,8 (C-5), 120,8 (C-6), 112,1 (C-20), 77,2 (C-12), 75,4 (C-14), 61,0 (C-15), 22,3 (C-21), 19,2 (C-19), 9,5 (C-18).

Ejemplo 12

3β,12β,14β-Trihidroxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno (25)

45 Se añade el 14,15-epóxido (24) (300 mg, 0,77 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 ml) a una suspensión de hidruro de aluminio y litio (300 mg, 7,89 mmol) en tetrahidrofurano y se somete a reflujo la reacción durante 48 h. Tras la adición de agua (0,3 ml), hidróxido de sodio (disolución al 15%, 0,3 ml) y filtración como se ha descrito anteriormente, se purifica la mezcla mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol: cloroformo (1:9) como disolvente para dar el trihidroxipregneno (25) (250 mg, 83%).

50 ¹H RMN (CDCl₃): 5,38 (1H, m, H-6), 3,98 (4H, m, etilendioxilo), 3,43-3,53 (1H, m, H-3), 3,25-3,32 (1H, dd, J = 4,1 Hz, H-12), 1,32 (3H, s, H-21), 1,01 (3H, s, H-19), 0,98 (3H, s, H-18)

55 ¹³C RMN CDCl₃: 139,1 (C-5), 122,1 (C-6), 112,2 (C-20), 85,1 (C-14), 75,1 (C-12), 71,6 (C-3), 23,4 (C-21), 19,4 (C-19), 8,9 (C-18)

Ejemplo 13

60 *3β,12β,14β-Trihidroxi-pregn-5-eno (15)*

Se disuelve el etilendioxipregneno (25) (250 mg, 0,64 mmol) en ácido acético (13,4 ml) y agua que tras el secado por pulverización proporciona el trihidroxiesteroide (15) (200 mg, 89%), p.f.: 228°-235°C (bibl. 225°-235°C), M+ 348, [α_D]²⁰ + 35° (bibl. [α_D]²⁰ + 29°).

65 ¹H RMN (CDCl₃): 5,39 (1H, m, H-6), 3,56-3,62 (1H, t, J = 8,1 Hz, H-17), 3,42-3,51 (1H, m, H-3), 3,28-3,39 (1H, dd, J = 4,3 Hz, H-12), 2,23 (3H, s, H-21), 1,01 (3H, s, H-19), 0,90 (3H, s, H-18)

ES 2 321 162 T3

¹³C RMN (CDCl₃): 217,7 (C-20), 138,9 (C-5), 122,2 (C-6), 85,5 (C-14), 73,6 (C-12), 71,6 (C-3), 57,0 (C-17), 55,1 (C-13), 43,6 (C-9), 42,1 (C-4), 37,3 (C-1), 36,8 (C-10), 35,9 (C-8), 34,5 (C-15), 32,9 (C-21), 31,5 (C-16), 30,1 (C-2), 27,4 (C-7), 24,4 (C-11), 19,4 (C-19), 8,3 (C-18).

- 5 Los ejemplos 14 a 19 ilustran los procedimientos sintéticos por medio de los cuales pueden prepararse los compuestos intermedios y el esteroide (15) de acuerdo con “el segundo procedimiento alternativo”.

Ejemplo 14

10

Acetato de 20,20-etilendioxi-3β-tolueno-p-sulfonilo-pregn-5,14-dien-12β-ol (26) - Se añadió gota a gota una disolución de cloruro de p-toluenosulfonilo (650 mg, 3,4 mmol) en piridina (10 ml) a una mezcla del 12-acetato de 20,20-etilendioxi-pregna-5,14-dieno-3β,12β-diol (22) (1,3 g, 3,1 mmol) en piridina (15 ml) a 0°C. Se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas tras lo cual se añadió agua a la mezcla de reacción. Se extrajo la disolución con acetato de etilo (2x50 ml), se lavó la fase de acetato de etilo con ácido cítrico (5x50 ml), disolución saturada de bicarbonato de sodio (100 ml), disolución saturada de cloruro de sodio (100 ml) y agua (100 ml). Se secó el acetato de etilo (MgSO₄), se filtró, y se evaporó y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando hexano-acetato de etilo (8:2 v/v) como eluyente dando el β-O-tosilesterioide (26), (1,5 g, 84%), como un aceite amarillo, (hallado *M* 570,271, C₃₂H₄₂O₇S requiere: *M* 570,273).

20

δ_H 1,021 (3H, s, 19-H), 1,131 (3H, s, 18-H), 1,282 (3H, s, 21-H), 2,021 (CH₃ de acetato), 2,431 (3H, s, CH₃ Ar), 3,883 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,750 (1H, dd, ³*J* 10,8 Hz, 5,2 Hz, 12-H), 4,890 (1H, m, 30H), 5,281 (1H, dd, ³*J* 4,2 Hz, 2,1 Hz, 15-H), 5,388 (1H, m, 6-H), 7,341 (2H, d, ³*J* 8,2 Hz, ArH), 7,746 (2H, d, ³*J* 8,2 Hz, ArH).

25

δ_C 13,493Q (C-18), 19,002Q (C-19), 21,612Q (metilo Ar)*, 21,671Q (C-21)*, 24,175Q (metilo de acetato), 63,401T (etilendioxi), 63,498T (etilendioxi), 71,531S (C-13), 80,912D (C-12), 82,531D (C-3), 111,363S (C-20), 120,881D (C-15), 121,461D (C-6), 123,715-133,917 (aromático), 139,903S (C-14), 151,722S (C-5), 170,819S (carbonilo de éster). * pueden intercambiarse

30

Ejemplo 15

12-Acetato de 20,20-Etilendioxi-3α,5-ciclo-5α-pregn-14-eno-6β,12β-diol (27) - Se sometió a reflujo una disolución de 3β-tolueno-p-sulfonilo-pregn-5,14-dieno (26) (1,2 g, 2,1 mmol) y acetato de potasio (2,2 g, 22,4 mmol) en agua (250 ml) y acetona (500 ml) a 60°C durante 16 horas. Se evaporó la acetona y se extrajo el agua con acetato de etilo (200 ml). Se secó (MgSO₄) el acetato de etilo, se filtró y se evaporó. La separación cromatográfica ultrarrápida de la mezcla usando cloroformo-acetona (9:1 v/v) como eluyente dio el 3α,5-cicloderivado (27), (530 mg, 61%) como un aceite amarillo, (Hallado *M* 416,262, C₂₅H₃₆O₅ requiere: *M* 416,263).

40

δ_H 0,288 (1H, dd, ³*J* 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H_a), 0,477 (1H, dd, ³*J* 4,4 Hz, 4,4 Hz, 4-H_b), 1,025 (3H, s, 19-H), 1,121 (3H, s, 18-H), 1,256 (3H, s, 21-H), 1,989 (3H, s, CH₃ de acetato), 3,302 (1H, dd, ³*J* 2,8 Hz 2,8 Hz, 6-H), 3,784-3,947 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,721 (1H, dd, ³*J* 8,5 Hz, 5,6 Hz, 12-H), 5,232 (1H, dd, ³*J* 3,9 Hz, 1,9 Hz, 15-H).

45

δ_C 11,678T (C-4), 12,298Q (C-18), 19,971Q (C-19), 23,623Q (C-21), 24,153Q (metilo de acetato), 63,700T (etilendioxi), 63,788T (etilendioxi), 73,591D (C-6), 80,551D (C-12), 111,126S (C-20), 118,778D (C-15), 152,959S (C-14), 170,991S (carbonilo de éster).

Ejemplo 16

50

20,20-Etilendioxi-3α,5-ciclo-5α-pregn-14-eno-6β,12β-diol (28) - Se añadió gota a gota una disolución del 3α,5-cicloderivado (27), (500 mg, 1,2 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) a una suspensión de hidruro de aluminio y litio (50 mg, 1,3 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 4 horas y se extinguió mediante la adición de agua (50 μl). Tras 30 minutos, se añadió hidróxido de sodio (disolución al 15%, 50 μl) y la agitación continuó durante 30 minutos adicionales. Se añadió agua (150 μl) y se filtró la mezcla de reacción. Se secó (MgSO₄) el tetrahidrofurano, se filtró y se evaporó y la purificación cromatográfica ultrarrápida usando cloroformo-acetona (8:2 v/v) como eluyente dio el diol (28), (370 mg, 83%) como un aceite, (Hallado *M* 374,250, C₂₃H₃₄O₄ requiere: *M* 374,252)

60

δ_H 0,298 (1H, dd, ³*J* 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H₂), 0,510 (1H, dd, ³*J* 4,4 Hz, 4,4 Hz, 4-H_b), 0,985 (3H, s, 19-H), 1,055 (3H, s, 18-H), 1,325 (3H, s, 21-H), 3,318 (1H, dd, ³*J* 3,0 Hz, 3,0 Hz, 6-H), 3,363 (1H, dd, ³*J* 11,4 Hz, 4,2 Hz, 12-H), 4,019 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,622 (1H, s, OH), 5,255 (1H, dd, ³*J* 3,9 Hz, 1,9 Hz, 15-H).

65

δ_C 11,681T (C-4), 12,243Q (C-18), 19,844Q (C-19), 23,604Q (C-21), 63,620T (etilendioxi), 63,733T (etilendioxi), 73,569D (C-6), 77,478D (C-12), 111,125S (C-20), 118,702D (C-15), 152,912S (C-14).

ES 2 321 162 T3

Ejemplo 17

20,20-Etilendioxi-14,25 β -epoxi-3 α ,5-ciclo-5 α ,14 β -pregnano-6 β ,12 β -diol (29) - Se añadió N-bromoacetamida (150 mg, 1,1 mmol) a una disolución del 20,20-etilendioxi-3 α ,5-ciclo-5 α -pregn-14-eno-6 β ,12 β -diol (28) (340 mg, 0,91 mmol) en acetona (20 ml), agua (0,25 ml) y ácido acético (0,25 ml) a 0°C. Tras 15 min, se añadió sulfito de sodio (disolución al 5%, 20 ml) a la mezcla de reacción. Se evaporó la acetona a presión reducida y se extrajo la disolución restante con diclorometano (3x30 ml). Se secó (MgSO₄) la fase de diclorometano, se filtró y se evaporó hasta un volumen concentrado (50 ml). Se añadió piridina (0,5 ml) a la mezcla y se agitó durante 1 hora adicional tras lo cual se lavó la fase de diclorometano con una disolución de ácido cítrico (5%, 3x30 ml), disolución saturada de bicarbonato de sodio (30 ml) y agua (30 ml). Se secó (MgSO₄) la fase de diclorometano, se filtró y se evaporó y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cloroformo-metanol (9,5:0,5 v/v) como eluyente para dar el epóxido (29) (180 mg, 51% como una espuma, (Hallado *M* 390,245, C₂₃H₃₄O₂ requiere: *M* 390,247).

δ_H 0,287 (1H, dd, ³ *J* 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H_a), 0,501 (1H, dd, ³ *J* 4,4 Hz, 4,4 Hz, 4-H_b), 0,978 (3H, s, 19-H), 1,048 (3H, s, 18-H), 1,321 (3H, s, 21-H), 3,318 (1H, dd, ³ *J* 3,1 Hz, 3,1 Hz, 6-H), 3,355 (1H, dd, ³ *J* 11,2 Hz, 4,1 Hz, 12-H), 3,491 (1H, s, 15-H), 4,001 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,901 (1H, s, OH).

δ_C 11,668T(C-4), 11,973Q(C-18), 19,515Q (C-19), 23,519Q(C-21), 59,910D (C-15), 63,601T (etilendioxi), 63,713T (etilendioxi), 72,501S (C-14), 73,571D (C-6), 77,471D (C-12), 111,085S (C-20).

Ejemplo 18

20,20-Etilendioxi-6 β ,12 β ,14-trihidroxi-3 α ,5-ciclo-5 α ,14 β -pregnano (30) - Se añadió una disolución del epóxido (29) (170 mg, 0,44 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a una suspensión de hidruro de aluminio y litio (20 mg, 0,53 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 2 horas tras lo cual se añadió agua (20 μ l) y la agitación continuó durante 05 horas. Se añadió disolución de hidróxido de sodio (15%, 20 μ l) y la agitación continuó durante 0,5 horas adicionales. Se añadió una cantidad adicional de agua (60 μ l) y se agitó la suspensión durante 1 hora. Tras la filtración, se secó (MgSO₄) la suspensión, se filtró y se evaporó el tetrahidrofurano. La separación cromatográfica ultrarrápida de la mezcla resultante eluyendo con cloroformo-metanol (9:1 v/v) dio el triol requerido (30), (90 mg, 53%) como un aceite transparente, (Hallado *M* 392,261, C₂₃H₃₈O₅ requiere: *M* 392,263).

δ_H 0,287 (1H, dd, ³ *J* 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H₂), 0,510 (1H, dd, ³ *J* 4,4 Hz, 4,4 Hz, 4-H_b), 0,971 (3H, s, 19-H), 1,042 (3H, s, 18-H), 1,319 (3H, s, 21-H), 3,321 (1H, dd, ³ *J* 3,0 Hz, 3,0 Hz, 6-H), 3,321 (1H, dd, ³ *J* 11,1 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,561 (1H, s, OH), 4,084 (4h, m, OCH₂CH₂O) 4,671 (1H, s, OH).

δ_C 11,668T(C-4), 11,971Q(C-18), 19,511Q (C-19), 23,520Q (C-21), 63,612T (etilendioxi), 63,711T (etilendioxi), 73,483D (C-6), 76,051D (C-12), 84,307S (C-14), 111,099S (C-20).

Ejemplo 19

3 β ,12 β ,14-Trihidroxi-14 β -pregn-5-en-20-ona (15) - Se sometió a reflujo una mezcla del triol (30) (80 mg, 0,20 mmol) en acetona (20 ml) y ácido clorhídrico (1 M, 10 ml) a 60°C durante 2 horas. Se enfrió la mezcla de reacción y se añadió disolución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml). Se evaporó la acetona y se extrajo la fase acuosa con cloroformo (3 x 20 ml), se secó (MgSO₄) la fase de cloroformo, se filtró y se evaporó dando los trihidroxiesteroides epiméricos (15a, 15b) (42 mg, 61%). Se logró la separación de la mezcla epimérica (15a, 15b) (15 mg) mediante separación cromatográfica ultrarrápida usando cloroformo:metanol (9:1 v/v) como eluyente dando el epímero 17 β puro (15a), (10 mg), p.f. 224-229°C (acetona), (bibl. 226-223°), (Hallado *M* 348,234, $\bar{C}$; 72,32, H 9,21% C₂₁H₃₂O₄ requiere: C, 72,38; H 9,26%, *M* 348,236) y el epímero 17 α (15b) (3 mg), p.f. 183-191°C (acetona), (bibl. 184-196°).

3 β ,12 β ,14-Trihidroxi-14 β -pregn-5-en-20-ona (15a): δ_H 0,963 (1H, s, 19-H), 1,192 (3H, s, 18-H), 2,236 (3H, s, 21-H), 3,325 (1H, dd, ³ *J* 11,2 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,464 (1H, s, OH), 3,5140 (1H, m, 3-H), 3,598 (1H, dd, ³ *J* 9,6 Hz, 9,6 Hz, 17-H), 4,255 (1H, s, OH), 5,383 (1H, m, 5-H).

δ_C 8,275Q (C-18), 19,414Q (C-19), 24,400T (C-11) 24,581T (C-16), 27,443T (C-7), 30,062T (C-2), 32,972Q (C-21), 34,543T (C-15), 35,864D (C-8), 36,975S (C-10), 37,337T (C-1), 42,144T (C-4), 43,565D (C-9), 55,101S (C-13), 57,038D (C-17), 71,597D (C-3), 73,558D (C-12), 85,566S (C-14), 122,223D (C-6), 138,932S (C-5), 217,011S (C-20).

3 β ,12 β ,14-Trihidroxi-14 β -pregn-5-en-20-ona (15b): δ_H 0,996 (1H, s, 19-H), 1,144 (3H, s, 18-H), 2,221 (3H, s, 21-H), 3,339 (1H, dd, ³ *J* 9,4 Hz, 9,4 Hz, 17-H), 3,492 (1H, m, 3-H), 3,629 (1H, dd, ³ *J* 11,1 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,712 (1H, s, OH), 4,325 (1H, s, OH), 5,383 (1H, m, 5-H).

Los ejemplos 20 a 28 ilustran los procedimientos por medio de los cuales pueden prepararse los compuestos intermedios para formar el primer monosacárido (40).

Ejemplo 20

Metil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosido (32)

Se agita una mezcla de metil- α -D-glucopiranosido (30 g, 0,15 mol), benzaldehído (70 ml) y cloruro de zinc (20 g) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se vierte el producto de reacción en agua helada y la agitación continuó durante 15 min. Se filtra el precipitado blanco y se lava con dietil éter. Se agita el material sólido con una disolución de metabisulfito de sodio (disolución al 10%), durante 15 min, se filtra y se lava con agua. Se cristaliza el material sólido en cloroformo y éter para dar el producto de bencilideno (32) (31 g, 72%).

Ejemplo 21

Metil-4,6-O-bencilideno-2-O-tosil- α -D-glucopiranosido (33)

Se añade gota a gota cloruro de p-toluenosulfonilo (25 g, 1,2 eq) en piridina (100 ml) a una disolución de la bencilideno-glucosa (32) (31 g, 0,12 mol) en piridina (100 ml) a 0°C. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añade hielo a la mezcla de reacción. Se lava el material sólido blanco resultante con agua y se recrystaliza en etanol caliente para dar la glucosa tosilada (33) (28 g, 60%).

Ejemplo 22

Metil-4,6-O-bencilideno-3-O-metil- α -D-altropiranosido (34)

Se calienta el tosilato (33) (28 g, 64 mmol) en una disolución de sodio (7 g) en metanol (150 ml) a 110°C durante 48 horas en un autoclave. Se enfría el vaso de reacción y se añade dióxido de carbono sólido a la mezcla de reacción. Tras la filtración, se evapora el metanol y entonces se lleva el material sólido a agua. Se extrae la fase acuosa con cloroformo (X 3). Se seca (MgSO₄) el cloroformo, se filtra y se evapora. Se purifica la mezcla bruta mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con cloroformo:acetona (9:1) para dar el altrósido (34) (10 g, 52%).

Ejemplo 23

Metil-6-bromo-4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- α -D-altropiranosido (35)

Se añade el bencilideno-altrósido (34) (10 g, 33 mmol) a una disolución de N-bromosuccinimida (7,6 g) y carbonato de bario (20 g) en tetracloruro de carbono y se somete a reflujo la mezcla de reacción a 75°C durante 3 horas. Se filtra la mezcla de reacción y se lava la fase de tetracloruro de carbono con agua. Se seca (MgSO₄) la fase orgánica, se filtra y se evapora para dar 6-bromo-altrósido (35), (9 g, 69%).

Ejemplo 24

Metil-4-O-benzoil-3-O-metil-6-desoxi- α -D-altropiranosido (36)

Se añade gota a gota borohidruro de sodio (18 g) en agua (30 ml) a una disolución del bromoaltrósido (35) (9 g, 23 mmol) y cloruro de níquel (18 g) en etanol (300 ml) a 0°C. Se somete a reflujo la mezcla de reacción a 75°C durante 1 hora y después se filtra. Se evapora el etanol y se extrae la fase acuosa restante con cloroformo (X 3). Se seca (MgSO₄) el cloroformo, se filtra y se evapora, para dar el 6-desoxi-altrósido (36) (5 g, 72%).

Ejemplo 25

4-O-Benzoil-3-O-metil-6-desoxi- α -D-feniltioaltropiranosido (37)

Se añaden feniltiotrimetilsilano (5 ml) y sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (2 ml) a 0°C a una disolución del 6-desoxi-altrósido (36) (5 g, 17 mmol) en diclorometano (200 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Se añade bicarbonato de sodio saturado a la mezcla de reacción. Se seca (MgSO₄) la fase de diclorometano, se filtra y se evapora. Se purifica la mezcla bruta mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con cloroformo:acetona (9:1) para dar el α -feniltioaltrósido (37) (4 g, 63%).

ES 2 321 162 T3

Ejemplo 26

4-O-Benzoil-3-O-metil-2-feniltio-2,6-didesoxi- α -D-fluorocimaropiranosido (38)

- 5 Se añade trifluoruro de dietilaminoazufre (0,65 g) rápidamente a una disolución del α -D-feniltioaltrósido (37) (0,5 g, 1,33 mmol) en diclorometano a 0°C. Se agita la reacción durante 0,5 h a 0°C y después se añade bicarbonato de sodio saturado. Se separa el diclorometano de la fase acuosa, se seca (MgSO_4), se filtra y se evapora para dar la α -fluorocimarosa (38) (450 mg, 90%).

10 Ejemplo 27

4-O-Benzoil-3-O-metil-2-O-t-butildimetilsilil- α -D-feniltio-altrósido (39)

- 15 Se silila el 6-desoxialtrósido (37) (5 g) usando cloruro t-butildimetilsililo (3 g) e imidazol (3 g) en piridina (50 ml). Se trata la reacción extrayendo con acetato de etilo, lavando el acetato de etilo con ácido clorhídrico (6 N), después con bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se seca (MgSO_4) la fase de acetato de etilo, se filtra y se evapora para dar el benzoilfeniltioaltrósido sililado (39) (80%).

20 Ejemplo 28

3-O-Metil-2-O-t-butildimetilsilil- α -D-feniltioaltrósido (40)

- 25 Se trata el benzoilfeniltioaltrósido sililado (39) (6 g) con metóxido de sodio (100 ml) durante 4 horas. Se evapora el metanol y se añade agua a la reacción. Se acidifica la fase acuosa (pH 5, ACOH) y se extrae con acetato de etilo. Se lava el acetato de etilo con agua, se seca (MgSO_4), se filtra y se evapora para dar metilfeniltioaltrósido sililado (40) (75%).

- 30 Los Ejemplos 29 a 37 ilustran los procedimientos sintéticos por medio de los cuales pueden prepararse los compuestos intermedios para formar el segundo monosacárido (50).

Ejemplo 29

- 35 *1,2 : 5,6-Di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (42)*

- Se añade gota a gota ácido sulfúrico (40 ml) a una disolución de α -D-glucosa (41) (50 g, 0,28 mol) en acetona (1 l) a 0°C. Se agita la mezcla de reacción durante 24 h y después se neutraliza usando hidróxido de sodio (6 M). Se evapora la acetona y se extrae la fase acuosa con cloroformo (X2). Se seca (MgSO_4) el cloroformo, se filtra y se evapora. La cristalización en ciclohexano dio la di-isopropilideno-glucosa (42) (41 g, 57%).

Ejemplo 30

- 45 *1,2 : 5,6-Di-O-isopropilideno-3-O-metil- α -D-glucofuranosa (43)*

- Se añade gota a gota la α -D-glucofuranosa (42) (41 g, 0,16 mol) en tetrahidrofurano (300 ml) a una suspensión de hidruro de sodio (5 g) en tetrahidrofurano (200 ml). Tras 0,5 h, se añade gota a gota yoduro de metilo (25 g) en tetrahidrofurano (100 ml) a la mezcla de reacción que entonces se agita durante 24 h. Se añade agua a la mezcla de reacción que entonces se extrae con éter (X 3). Se seca (MgSO_4) la fase de éter, se filtra y se evapora para dar el glucosa metil-protégida (43) (38 g, 83%).

55 Ejemplo 31

3-O-Metil- α -D-glucopiranosido (44)

- 60 Se disuelve el compuesto de metil-diisopropilideno (43) (38 g, 0,14 mol) en ácido acético (50%, 700 ml) y se somete a reflujo la disolución durante 18 h. Tras enfriar se evapora el ácido acético. Se purifica el producto bruto mediante cromatografía en columna eluyendo con cloroformo:metanol:acetona:agua (70:27:2:1) para dar 3-O-metil- α -D-glucopiranosido (44) (13 g, 50%).

65

Ejemplo 32

Metil-3-O-metil- $\alpha\beta$ -D-glucopiranosido (45)

- 5 Se disuelve el 3-O-metil- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (44) (10 g) en metanol (50 ml) y HCl (conc.) (1 ml) y se somete a reflujo durante la noche. Se añade NaHCO_3 sólido y se filtra la reacción. Se evapora el metanol para dar 1,3-di-O-metil- $\alpha\beta$ -D-glucopiranosido (45), (95%).

10 Ejemplo 33

Metil-4,6-O-bencilideno-3-O-metil- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (46)

- 15 Se agita el glucopiranosido (45) (8 g) a temperatura ambiente en una disolución de benzaldehído (20 ml) y cloruro de zinc (5 g). Tras 24 horas, se añade hielo y se extrae la fase acuosa con cloroformo. Se seca (MgSO_4) la fase de cloroformo, se filtra y se evapora. Se elimina el benzaldehído mediante destilación a vacío y se purifica el producto mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con acetona:cloroformo (0,5:9,5), para dar bencilideno- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (46) (60%).

20 Ejemplo 34

Metil-4-O-benzoil-O-metil-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (47)

- 25 Se somete a reflujo el compuesto de bencilideno (46) (5 g) a 80°C en una mezcla de N-bromosuccinimida (3,7 g) y carbonato de bario (4 g) en tetracloruro de carbono. Tras 4 horas, se filtra la reacción y se lava el tetracloruro de carbono con agua, se seca (MgSO_4), se filtra y se evapora para dar el compuesto de bromo (70%).

- 30 Se disuelve el compuesto de bromo (4,3 g) en una disolución de etanol (300 ml) y cloruro níquel (8,6 g) a 0°C. A esta disolución, se le añade gota a gota borohidruro de sodio (8,6 g) en agua (50 ml) a lo largo de un periodo de 15 minutos. Se somete a reflujo la mezcla de reacción a 100°C durante 45 minutos, se enfría, se filtra y se evapora. Se añade cloroformo y se lava la fase de cloroformo con agua, se seca (MgSO_4), se filtra y se evapora para dar el 6-desoxi-azúcar (47) (70%).

35 Ejemplo 35

4-O-Benzoil-3-O-metil-1-feniltio-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (48)

- 40 Se disuelve el 6-desoxiglucopiranosido (47) (3 g) en diclorometano (50 ml). A esta disolución, se le añaden feniltiotrimetilsilano (2 g) y sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (0,2 ml). Se agita la disolución a temperatura ambiente durante la noche, tras lo cual se añade bicarbonato de sodio saturado. Se seca (MgSO_4) la fase de diclorometano, se filtra y se evapora. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (2:8), para dar el compuesto (48) (60%).

45 Ejemplo 36

4-O-Benzoil-3-O-metil-2-O-pivaloil-1-feniltio-6-desoxi- $\alpha\beta$ -glucopiranosido (49)

- 50 A una disolución del glucopiranosido (48) (2 g) en piridina (20 ml), se le añade cloruro de pivaloilo (2 ml). Se agita la disolución a temperatura ambiente durante la noche tras lo cual se añade agua. Se extrae la fase acuosa con acetato de etilo y se lava la fase orgánica con HCl (6 N). Se seca (MgSO_4) la fase orgánica, se filtra y se evapora para dar el éster de pivaloilo (49) (80%).

55 Ejemplo 37

4-O-Benzoil-3-O-metil-2-O-pivaloil-1-fluoro-6-desoxi- β -glucopiranosido (50)

- 60 Se añaden N-bromosuccinimida (1,2 g) y trifluoruro de dietilaminoazufre (1,2 g) a una disolución del éster de pivaloilo (49) (2 g) en diclorometano (100 ml) a 0°C. Tras 1 hora, se añade bicarbonato de sodio saturado. Se seca (MgSO_4) la fase de diclorometano, se filtra y se evapora. Se purifica el β -fluoropiranosido (50) mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (2:8), (rendimiento del 45%).

- 65 El ejemplo 38 ilustra el procedimiento sintético por medio del cual puede prepararse el compuesto 3-O-[4-O-benzoil-2-feniltio- β -D-cimaropiranosil]-12,14 β -dihidroxi-pregnan-5-en-20-ona (51).

ES 2 321 162 T3

Ejemplo 38

3-O-[4-O-Benzoil-2-feniltio-β-D-cimaropiranosil]-12,14β-dihidroxi-pregn-5-en-20-ona (51)

5 Se añade cloruro de estaño (190 mg, 1 mmol) a una disolución de 3,12,14β-trihidroxipregnan-5-en-20-ona (15) (100 mg, 0,28 mmol) y el fluorocimaropiranosido (38) (210 mg, 0,56 mmol), en dietil éter seco y tamices moleculares de 4Å a -15°C. Se mantiene la mezcla de reacción a -15°C durante 3 días. Se añade bicarbonato de sodio saturado a la mezcla de reacción. Se seca (MgSO₄) la fase de éter, se filtra y se evapora. Se purifica el producto mediante
10 cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con cloroformo:metanol (9, 5:0,5) para dar el glicósido (51) (30 mg, 15%)

Los ejemplos 39 a 41 ilustran los procedimientos sintéticos por medio de los cuales pueden acoplarse los restos de cimarosa y tevetosa.

15 Ejemplo 39

Disacárido de tevetosa-cimarosa (53)

20 Se agita una disolución de tevetosa (50 A) (1,5 g), cimarosa (40) (1,3 g) tamices moleculares de 4Å en diclorometano a temperatura ambiente durante 1 hora. Se enfría la mezcla de reacción hasta -15°C y se añaden cloruro de estaño (II) (0,8 g) y trifluorometanosulfonato de plata (1,1 g). Se agita la mezcla a -15°C durante 16 horas, tras lo cual se añade trietilamina (0,5 ml). Se filtra el producto de reacción y se evapora el diclorometano. Se purifica el disacárido
25 (53) mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (2:8), rendimiento del 15%.

Ejemplo 40

30 *Disacárido de tevetosa-cimarosa (54)*

A una disolución del disacárido (53) (200 mg) en tetrahydrofurano (20 ml), se le añade fluoruro de tetrabutilamonio (0,4 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora, tras lo cual se añade bicarbonato de sodio saturado. Se extrae la mezcla de reacción con acetato de etilo y se seca (MgSO₄) la fase de acetato de etilo, se filtra
35 y se evapora. Se purifica el disacárido (54) mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetona:cloroformo, 0,5:9,5) rendimiento del 60%.

Ejemplo 41

40 *Disacárido de tevetosa-cimarosa (55)*

A una disolución del disacárido (54) (80 mg) en diclorometano (10 ml), se le añade trifluoruro de dietilaminoazufre (80 ml) a 0°C. Tras agitar a 0°C durante 0,5 horas, se añaden bicarbonato de sodio saturado y más diclorometano. Se
45 seca (MgSO₄) el diclorometano, se filtra y se evapora. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano 1:9), da el disacárido (55) en un rendimiento del 65%.

Ejemplo 42

50 Los resultados de los siguientes tres bioensayos sobre la suspensión del apetito se exponen a continuación viz.

a) Ensayo de Irwin;

55 b) Ensayo de Toxicidad Aguda; y

c) Ensayo Anoréctico de Dosis Oral.

60 a) *Ensayo de Irwin*

El propósito de este ensayo fue evaluar el agente supresor del apetito de la invención producido a partir de un extracto de planta como se ha descrito anteriormente en este documento, de acuerdo con el ensayo de Irwin reducido en animales para la acción tranquilizante y sedante.

65 *Procedimiento experimental*

El agente supresor del apetito se extrajo del material de planta por el solicitante por el procedimiento que se ha descrito anteriormente en este documento y se administró a dos de cuatro grupos de tres animales cada uno: un

grupo no recibió tratamiento, un grupo recibió el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), un grupo recibió la muestra de ensayo a 50 mg/kg, y un grupo recibió la muestra de ensayo a 300 mg/kg. El tratamiento tuvo lugar por inyección intraperitoneal, y se hicieron observaciones a intervalos específicos hasta cinco horas después del tratamiento. En la interpretación de los resultados se usaron solamente los síntomas diferentes a los observados en los animales tratados con DMSO.

Resultados

Quedó claro que el disolvente, DMSO, tenía un efecto marcado sobre los animales, especialmente sobre el mecanismo regulador del calor. Las temperaturas corporales de todos los animales tratados con el disolvente, solo o junto con la muestra de ensayo, mostraron una disminución marcada.

Los animales en el grupo de dosis baja mostraron una dispersión disminuida en la jaula y una actividad locomotora disminuida, como en todos los demás grupos, incluyendo el grupo de control. Se observó apatía en el mismo grado que en el grupo tratado con DMSO. La respiración disminuida se observó 15-60 minutos después del tratamiento. También se observó ptosis (cierre de los párpados de los ojos) a un grado superior que en el grupo de DMSO. Se observó una respuesta de la pinna (oreja) así como una respuesta positiva a los dedos, indicando timidez. La temperatura corporal bajó hasta 32,7°C después del tratamiento.

Los animales en el grupo de dosis elevada mostraron, como en los otros grupos, una dispersión inicial disminuida en la jaula y actividad locomotora disminuida, pero mostraron una dispersión y actividad locomotora aumentadas antes de la muerte, que sucedía aproximadamente 1 hora después del tratamiento. Hubo varias convulsiones simétricas clónicas 30 minutos después del tratamiento. La respiración disminuyó inicialmente, pero aumentó antes de la muerte.

Se retardó la respuesta de la pinna (oreja) y se observó una respuesta positiva a los dedos, indicando timidez, como se observó en animales en el grupo de dosis baja. La temperatura corporal bajó hasta 30,7°C después del tratamiento. Se observó una pasividad posicional aumentada así como un tono corporal disminuido. Se observó una rotación anormal de las extremidades, la fuerza de agarre disminuyó, no estuvo presente una respuesta al dolor y sucedió una pérdida del reflejo de estiramiento.

Análisis

Cuando se comparan con los animales de control y tratados con DMSO, los animales que recibieron solamente la dosis baja (50 mg/kg) mostraron una respiración disminuida y un grado aumentado de ptosis. Los animales que recibieron la dosis elevada (300 mg/kg) de la muestra de ensayo reaccionaron de forma muy intensamente mostrando convulsiones y muerte. Todas las demás observaciones hechas en estos animales pueden atribuirse a los animales que tienen convulsiones y mueren. No se observaron signos que sugieran acciones tranquilizantes y sedantes tales como una marcada dispersión disminuida en las jaulas, actividad locomotora disminuida y apatía que pudieran atribuirse a la muestra de ensayo en los grupos de ensayo.

Por lo tanto puede concluirse que la muestra de ensayo es letal para ratones a 300 mg/kg y tiene efectos supresores de la respiración en ratones a 50 mg/kg, cuando se da forma de forma intraperitoneal con DMSO como disolvente.

b) Ensayo de Toxicidad Aguda

El propósito de este ensayo fue obtener información sobre la toxicidad de la muestra de ensayo.

Procedimiento experimental

Se purificó un extracto de planta preparado de acuerdo a como se ha descrito anteriormente en este documento, y que tiene acción supresora del apetito y se ensayó una muestra de ensayo a dosis crecientes por tratamiento oral en ratones. Se usaron dos animales por grupo de dosis, excepto en el grupo de la dosis más alta donde sólo se trató un animal. Los animales se examinaron para la buena salud y se determinaron sus masas corporales en el día de tratamiento.

Las dosis variaron de 100 mg/kg hasta 3.028,5 mg/kg. La dosis se calculó y se mezcló en almidón de patata preparado, de modo que cada animal recibió una dosis total de 0,2 ml. El animal 13 recibió 0,25 ml. El almidón de patata se preparó mezclando 20 g de almidón en un pequeño volumen de agua fría, y añadiéndolo a agua hirviendo, para componer un volumen de 1 litro. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de dosificarla.

Los animales en los grupos 1 y 2 se trataron en el mismo día. Se observaron durante 24 horas y si no se desarrollaban signos de toxicidad, se trataba el segundo grupo. Se siguió el mismo enfoque hasta que se trataron todos los animales. Este programa se siguió para asegurar que los animales no se trataran innecesariamente cuando se hubiera alcanzado una dosis tóxica aguda en el grupo previo.

Los animales se observaron para los signos clínicos de toxicidad inmediatamente (1-2 horas) después del tratamiento y diariamente después de ello. Se determinó la masa corporal una vez a la semana y se midió la ingesta total de alimento y agua de cada animal.

ES 2 321 162 T3

Los animales supervivientes se sacrificaron con eutanasia por inyección intraperitoneal de pentobarbitona sódica (disponible en el mercado con el nombre comercial Euthanaze, Centaur^R) en el día 14 del experimento. Se realizó un examen post-mortem de estos animales, así como del animal que murió durante el experimento. Se recogieron muestras para histopatología.

Resultados

Grupo 1 (Grupo de Control)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el periodo de observación de 14 días. La ingesta de alimento y agua estuvo en los parámetros normales y los cambios en la masa corporal también estuvieron en los parámetros normales. No se registraron cambios histopatológicos en las muestras hepáticas.

Grupo 2 (100 mg/kg)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el periodo de observación. La ingesta de alimento y agua fue normal y los cambios en la masa corporal durante el periodo de observación también fueron normales. No se observó patología macroscópica ni se registraron cambios histopatológicos o morfológicos en las muestras hepáticas.

Grupo 3 (200 mg/kg)

Los animales en este grupo no mostraron signos clínicos de toxicidad durante el experimento. La ingesta de alimento y agua fue normal, así como el cambio en la masa corporal. No se observó patología macroscópica, pero los hígados mostraron cambios histopatológicos en el examen. La hinchazón de aspecto opaco de los hepatocitos fue leve en el animal 6, pero moderada en el animal 5. También sucedió degeneración hidrópica moderada en los hepatocitos del animal 5.

Grupo 4 (400 mg/kg)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el periodo de observación, y no se observó patología macroscópica durante el examen post-mortem. Se observó hinchazón de aspecto opaco moderada y cambios hidróticos leves de los hepatocitos en la histología.

La ingesta de agua y alimento y el aumento en la masa corporal del animal 7 fueron normales. El animal 8 consumió casi el doble de la ingesta total de alimento del animal 7 (144,6 g y 73,9 g respectivamente), pero el aumento en la masa corporal fue sólo de 0,81 g comparado con 2,7 g.

Grupo 5 (800 mg/kg)

Un animal (animal 10) murió tres horas después de la dosificación sin mostrar ningún signo específico. El otro animal (animal 9) sobrevivió al periodo completo de observación sin ningún signo de toxicidad. La ingesta de agua del animal superviviente fue normal (42,42 ml), mientras que la ingesta de alimento fue elevada (134,2 g). La masa corporal aumentó en 2,85 g que fue la más elevada de todos los animales del experimento.

En el examen post-mortem del animal 10, que murió poco después de la dosificación oral, se congestionaron los pulmones. No se presentó ninguna reacción por cuerpos extraños que hubiera indicado inhalación de material de ensayo. No se observó patología macroscópica en el animal 9. Hubo vacuolización citoplásmica leve (degeneración hidrópica) en el animal 10, pero moderada en el animal 9. El aspecto citoplásmico glandular del hígado se clasificó como moderado en ambos animales.

Grupo 6 (1.600 mg/kg)

Ninguno de los animales presentó ningún signo clínico de toxicidad durante el transcurso del experimento. No se observó patología macroscópica en el examen post-mortem, pero se observaron cambios degenerativos moderados en el hígado del animal 11 en el examen histopatológico. El animal 12 mostró hinchazón de aspecto opaco moderada y cambios hidróticos leves de los hepatocitos. La ingesta de alimento y agua fue normal, así como el aumento en la masa corporal durante el periodo experimental.

Grupo 7 (3.028,5 mg/kg)

Se trató sólo un animal en esta dosis. Este animal no mostró signos de toxicidad durante el periodo de observación, y no se observó patología macroscópica. En el examen histopatológico se observó hinchazón de aspecto opaco mode-

rada y degeneración hidrópica de los hepatocitos. El animal mostró una pérdida de masa corporal durante el periodo de observación (-0,82 g), pero la ingesta de alimento y agua fue normal.

Análisis

Como se usó una cantidad muy pequeña de animales en cada grupo de dosis, es difícil hacer ninguna conclusión. El hecho de que sólo un animal muriera a un índice bajo de dosis, sin mostrar ningún síntoma, puede indicar que la muerte no estaba relacionada con la muestra de ensayo, sino debida al estrés durante y/o después del tratamiento. Ningún animal en grupos de dosis más altas murió o mostró ningún signo de toxicidad, que apoya adicionalmente esta suposición.

La ingesta de alimento aumentada observada en el animal 8 podría atribuirse posiblemente a un excesivo vertido de comida como se reflejó en el pequeño aumento en la masa corporal. Debe tenerse también en mente que todos los animales en este experimento se trataron sólo una vez, y que es improbable que un supresor del apetito tuviera una influencia marcada sobre la ingesta de alimento o agua, o la masa corporal en un periodo de 14 días, como fue el caso en este experimento.

A partir del examen histopatológico de las muestras hepáticas, quedó claro que los cambios patológicos estaban relacionados con la dosis, mostrando los animales que recibieron dosis más altas cambios extensivos. La patología observada no era de naturaleza metabólica, sino que posiblemente estaba inducida por la muestra de ensayo. Los cambios fueron sólo degenerativos y por lo tanto reversibles. No se observaron signos de cambios hepatocelulares irreversibles.

Puede, por lo tanto, concluirse que sólo un animal murió a una dosis inferior (800 mg/kg), pero que la muerte posiblemente no estaba relacionada con la muestra de ensayo. Ninguno de los demás animales en ninguno de los grupos de dosis mostró ningún signo de toxicidad durante el periodo de observación de 14 días después del tratamiento, o murió como resultado del tratamiento. Una dosis oral única de la muestra de ensayo indujo cambios hepatocelulares reversibles relacionados con la dosis.

c) Ensayo Anoréctico de Dosis Oral

El propósito de este ensayo fue determinar la actividad de un extracto de planta preparado de acuerdo con la invención, y la dosis eficaz mínima, y en el mismo momento investigar cualquier posible efecto secundario tal como supresión de la respiración, como se experimenta en el ensayo de Irwin (mencionado anteriormente).

Procedimiento experimental

Se asignaron animales a grupos de tratamiento usando tablas de aleatorización. Cada grupo de tratamiento constaba de tres animales, con 6 animales en el grupo de control. La muestra de ensayo se dosificó a ratas hembras jóvenes con un peso corporal de 100-150 g en la aclimatación, durante tres días consecutivos. Los animales se identificaron mediante crotales metálicos y marcas cutáneas de KMnO_4 para una fácil identificación. Los animales se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato convencionales para roedores, y estuvieron disponibles *ad libitum* agua y gránulos en polvo comerciales para roedores. Se midió la ingesta de agua y alimento y se calculó para cada día. Para encontrar la dosis eficaz mínima de la muestra de ensayo, se ensayaron cinco dosis. El tratamiento fue por sonda oral, con la muestra de ensayo suspendida en almidón de patata.

La sustancia de ensayo era compuesto (1), un polvo granular blanco preparado a partir de un extracto de material de planta de acuerdo con la invención, y la cantidad medida de la muestra de ensayo se mezcló con almidón de patata preparado y se dosificó. La mezcla con almidón de patata tuvo lugar inmediatamente antes de la dosificación en cada día. Antes de retirar el volumen de dosificación para cada animal, las suspensiones mezclaron minuciosamente usando un agitador Vortex.

Se ensayó un intervalo de cinco dosis, recibiendo un grupo de control sólo la sustancia de vehículo. Las dosis se eligieron en base a los efectos observados en el ensayo de Irwin descrito anteriormente y fueron:

Grupo 1: 0,00 mg/kg (Grupo de Control)

Grupo 2: 6,25 mg/kg

Grupo 3: 12,50 mg/kg

Grupo 4: 25,00 mg/kg

Grupo 5: 37,50 mg/kg

Grupo 6: 50,00 mg/kg

Resultados

El tratamiento no afectó a la salud de los animales durante el periodo de estudio. Los animales tratados con la muestra de ensayo en todos los grupos de dosis, mostraron una ganancia de masa corporal media significativamente reducida durante el periodo total del estudio, y animales en tres de los cinco grupos de tratamiento realmente perdieron masa corporal.

La ingesta media de alimento para todos los grupos de tratamiento se redujo durante el periodo de estudio. Los animales en los grupos de dosis más altas mostraron un consumo de agua aumentado.

La velocidad respiratoria en ninguno de los animales en ningún grupo de dosis se vio afectada significativamente.

Los animales en todos los grupos de dosis presentaron hígados desmenuzables en el examen post-mortem, pero no se observó patología macroscópica.

Análisis

Los datos recogidos durante el periodo de aclimatación confirmaron que todos los animales incluidos en el experimento estaban sanos y la ganancia de masa corporal era comparable entre los animales.

La reducción, y en algunos animales incluso una pérdida, en la ganancia de masa corporal, en combinación con la ingesta reducida de alimento es fuertemente indicativa de supresión del centro del apetito.

La ingesta reducida de alimento y la ganancia reducida de masa corporal se experimentó incluso con el grupo de dosis más baja (6,25 mg/kg). Se experimentó una pérdida real de masa corporal en el grupo de 12,50 mg/kg.

Es importante observar que todos los grupos de tratamiento tuvieron un consumo de agua aumentado cuando disminuyó el consumo de alimento (Figura 2). Esto podía deberse a un efecto diurético de la muestra de ensayo, o a la estimulación del centro de la sed en el cerebro.

El hecho de que no sucediera supresión respiratoria como se había observado en el ensayo de toxicidad aguda mencionado anteriormente, con la vía intraperitoneal, se ve como un aspecto positivo. Esto podría deberse a una absorción reducida del tracto gastrointestinal, con una consecuente biodisponibilidad reducida. La biodisponibilidad a las dosis orales ensayadas fue, sin embargo, suficiente para que la muestra de ensayo fuera eficaz. La ligera reducción en la velocidad de la respiración 1 hora después del tratamiento en la mayoría de los grupos podría atribuirse al llenado del estómago con el volumen de dosis y la consecuente pasividad de los animales.

Los hígados desmenuzables observados en los grupos de tratamiento podrían deberse a un cambio en el metabolismo energético después de la ingesta reducida de alimento, causando un metabolismo aumentado de las grasas y una sobrecarga en el hígado. Si de hecho éste el caso, estos cambios probablemente podrían considerarse como transitorios que podrían recuperarse con el tiempo después de que se haya alcanzado un estado estacionario, o después de la retirada de la muestra de ensayo. El posible efecto sobre el hígado también tiene que investigarse adicionalmente.

Como este estudio estaba pretendido principalmente como ensayo de exploración, se usaron grupos pequeños de animales de ensayo. Esto hace que la interpretación estadística de los datos sea difícil, especialmente cuando los animales individuales reaccionaron de forma totalmente diferente. Sin embargo, los datos indican que la muestra de ensayo tiene acción supresora del apetito, incluso la dosis más baja ensayada (6,25 mg/kg). No sucedieron signos clínicos de supresión respiratoria a las dosis ensayadas.

Ejemplo 43

Las plantas *Hoodia* recogidas recibidas del entorno natural o a través de un programa de cultivo se almacenan primero a 4°C durante un máximo de 48 horas. Las plantas se lavan en agua corriente y después se trocean en porciones de ± 1 cm. Los pedazos troceados se combinan todos y después se prensan a través de una prensa hidráulica a 30 MPa (300 bares) de presión durante un mínimo de 0,5 horas por prensado. Durante el prensado se recoge por separado la savia de la planta. La savia se almacena a -18°C hasta que se requiere el procesamiento adicional.

La savia se seca por pulverización en condiciones adecuadas para obtener un polvo no aglomerante. El contenido de humedad en el polvo es preferiblemente menor del 5% después del secado por pulverización y, si es necesario, se seca adicionalmente en un horno de vacío o usando un secador de lecho fluido.

Tanto la savia como el material secado por pulverización han demostrado ser eficaces como agente supresor del apetito en ensayos biológicos en ratas.

Parte experimental

Se lavaron 50 kg de plantas de *Hoodia gordonii* con agua corriente y después se trocearon en porciones de 1 cm. Las plantas troceadas se prensaron después a través de una prensa hidráulica a 30 MPa (300 bares) durante un mínimo de 0,5 horas por lote. La savia se recogió y se descubrió que la masa era de 10 kg cuando se usaron plantas de *Hoodia gordonii* del entorno, y 20 kg cuando se usaron plantas de *Hoodia gordonii* del programa de cultivo. La savia (500 g) se secó por pulverización usando las siguientes condiciones:

Caudal: 2,85 ml/min

Temperatura de entrada: 110°C

Temperatura de salida: 70°C

Temperatura de la cámara: 78°C

El polvo secado por pulverización obtenido era un polvo no aglomerante (22 g) con un contenido de humedad del 6,9%.

El polvo secado por pulverización se analizó para la concentración de ingrediente activo usando técnicas de HPLC. Se determinó que la concentración del activo era de 13 g/kg de polvo secado por pulverización.

Procedimiento de Análisis por HPLC

Eluyente: Acetonitrilo:agua (7:3), isocrático

Columna: C-18 fase inversa

Absorbancia UV: 225 nm

Caudal: 1 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Procedimiento

Se disolvió el polvo secado por pulverización (10 mg) en agua (0,5 ml) y acetonitrilo (0,5 ml) y se inyectaron 10 µl de esta solución en la HPLC y se determinó la concentración del compuesto activo (1) usando una curva patrón que se preparó a partir del compuesto puro (1).

Ejemplo 44

A continuación se presentan los resultados de un estudio diseñado para evaluar los posibles efectos anorécticos del compuesto (1) en ratas. En lo siguiente, las muestras ensayadas son savia pura (Muestra 1), savia secada por pulverización (Muestra 2) y un resto activo (Muestra 3). Las Muestras 1 y 2 son la savia y la savia secada por pulverización respectivamente, como se describe en el Ejemplo 5 anterior. La Muestra 3 es compuesto (1) extraído con disolvente de una pureza de $\geq 95\%$.

Las Muestras 1 a 3 se administraron cada una como una dosis oral única a ratas Wistar macho. Dos grupos de control adicionales recibieron vehículo (agua destilada o DMSO). Se incluyó fenfluramina administrada por vía oral (7,5 mg/kg) como patrón de referencia.

La Muestra 1 (savia pura) administrada por vía oral, produjo reducciones dependientes de la dosis en el consumo de alimento que fueron estadísticamente significativas a dosis de 1600 mg/kg y superiores en comparación con los controles tratados con vehículo. También se registraron reducciones concomitantes en el peso corporal (o índice de crecimiento). En el día de la dosificación, se registraron aumentos estadísticamente significativos en el consumo de agua 3 horas después de la dosis (6.400 y 10.000 mg/kg) y 6 horas después de la dosis (10.000 mg/kg). Entre 24 y 48 horas después de la dosis, se registraron reducciones estadísticamente significativas en el consumo de agua a dosis de 3.200 mg/kg y superiores.

La Muestra 2 (savia secada por pulverización) administrada por vía oral a 76 mg/kg también produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento y el peso corporal en comparación con animales tratados con vehículo. No se registraron efectos estadísticamente significativos sobre el consumo de agua.

ES 2 321 162 T3

La Muestra 3 (resto activo) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a una dosis oral de 5,0 mg/kg. No se produjeron efectos estadísticamente significativos sobre los pesos corporales por el resto activo aunque el examen de los datos reveló un ligero retardo en el crecimiento en comparación con animales de control tratados con vehículo. No se registraron efectos estadísticamente significativos sobre el consumo de agua.

El patrón de referencia, fenfluramina (7,5 mg/kg), produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a las 6 y 24 horas después de la dosis en comparación con el grupo de control relevante tratado con vehículo. No se registraron efectos estadísticamente significativos sobre el consumo de agua o el peso corporal.

No se registraron efectos relacionados con el tratamiento en los hígados.

Sustancia de ensayo

Identidad	Muestra 1 (savia pura)	Muestra 2 (savia secada por pulverización)	Muestra 3 (resto activo)
Aspecto	Líquido marrón	Polvo	Polvo blanco
Condiciones de almacenamiento	-20°C en la oscuridad	Temperatura ambiente en la oscuridad	4°C en la oscuridad
Pureza	Savia pura	Savia secada por pulverización	≥95%
Vehículo	Agua destilada	Agua destilada	Dimetilsulfóxido (DMSO)

Procedimiento experimental

Se usaron cincuenta y cinco ratas Wistar macho para el estudio.

Se registraron los pesos corporales, consumo de alimento (peso de la tolva de comida) y consumo de agua (peso del frasco) diariamente en el mismo momento cada día desde el día de la llegada hasta la terminación del estudio.

ES 2 321 162 T3

En el día 1, las ratas recibieron una dosis oral única (sonda) de acuerdo con la siguiente tabla:

	Grupo	n	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)
5	1	5	Vehículo (agua destilada)	-
10	2	4	Muestra 1 (savia pura)	800
	3	5	Muestra 1 (savia pura)	1600
15	4	5	Muestra 1 (savia pura)	3200
20	5	5	Muestra 1 (savia pura)	6400
	6	5	Muestra 1 (savia pura)	10000
25	7	5	Muestra 2 savia secada por pulverización	38
30	8	5	Muestra 2 savia secada por pulverización	76
	9	5	Muestra 3 (resto activo)	2,5
35	10	5	Muestra 3 (resto activo)	5,0
40	11	3	Fenfluramina	7,5
	12	3	Vehículo (DMSO)	-

45 Se dosificó a los grupos 1 - 8 usando un volumen de dosis constante de 10 ml/kg y se dosificó a los grupos 9 - 12 usando un volumen de dosis de 1 ml/kg.

También se midió el consumo de alimento y agua a las 1,3 y 6 horas después de la dosificación en el Día 1.

50 Después de las mediciones del Día 8, se sacrificó a los animales por asfixia con dióxido de carbono, y se escindieron los hígados y se colocaron en formalina tamponada al 10%, antes de la histología. Se tomaron secciones en cera parafina de cada hígado a 4 - 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se cortaron secciones adicionales en un criostato a 12 μ m y se tiñeron para las grasas con Aceite Rojo O (ORO).

55 *Análisis de los Datos*

Se compararon las mediciones de consumo de alimento y agua después de la dosis y los pesos corporales en cada momento puntual para los animales tratados con P57 con las del grupo de control relevante tratado de forma similar vehículo usando el análisis de la varianza seguido por el ensayo de Williams para comparaciones con los controles.

Los datos de los animales tratados con fenfluramina se compararon con los del grupo de control tratado con vehículo usando el ensayo t de Student.

65

Resultados

Los resultados se resumen en las tablas.

5 La Muestra 1 (savia pura) administrada por vía oral produjo reducciones marcadas relacionadas con la dosis en el consumo diario de alimento. La duración y amplitud de estas reducciones en el consumo de alimento fueron dependientes de la dosis. A las 24 horas después de la dosis, la Muestra 1 (savia pura) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a dosis de 1.600 mg/kg y superiores en comparación con los controles tratados con vehículo. La dosis más elevada de Muestra 1 (savia) (10.000 mg/kg) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento en una base diaria hasta 5 días después de la dosis.

15 La Muestra 2 (savia secada por pulverización) y la Muestra 3 (resto activo) produjo reducciones marcadas y estadísticamente significativas en el consumo de alimento a dosis orales de 76 y 5,0 mg/kg respectivamente. En ambos casos los efectos duraron 48 horas después de la dosis.

El patrón de referencia, fenfluramina (7,5 mg/kg, p.o.) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a las 6 y 24 horas después de la dosis en comparación con el grupo de control relevante tratado con vehículo (Grupo 2).

20 La Muestra 2 (savia secada por pulverización) y la Muestra 3 (resto activo) no produjeron efectos marcados relacionados con la dosis sobre el consumo de agua. En el día de la dosificación, la savia pura produjo aumentos estadísticamente significativos en el consumo de agua a las 3 horas después de la dosis (6.400 y 10.000 mg/kg) y 6 horas después de la dosis (10.000 mg/kg). Dos días después de la dosificación, sin embargo, se registraron disminuciones estadísticamente significativas en el consumo de agua en animales que recibieron Muestra 1 (savia) a 3.200, 6.400 y 25 10.000 mg/kg. Estas reducciones, sin embargo, no estuvieron claramente relacionadas con la dosis y solamente sucedieron entre 1 y 2 días después de la dosis. El significado biológico de estos efectos, por lo tanto, sigue sin estar claro.

La Muestra 1 (savia pura) produjo efectos estadísticamente significativos relacionados con la dosis en los pesos corporales en comparación con el grupo de control tratado con vehículo (Grupo 1). Cuando se administraron por vía oral, a dosis de 3.200 mg/kg y superiores, la Muestra 1 (savia pura) produjo reducciones estadísticamente significativas en el peso corporal o índices de crecimiento disminuidos en comparación con los animales tratados con vehículo. Estos efectos fueron estadísticamente significativos desde 48 horas después de la dosis hasta el final del estudio.

35 La Muestra 2 (savia secada por pulverización) administrada por vía oral a 76 mg/kg también produjo reducciones estadísticamente significativas en el crecimiento de los animales en comparación con el grupo de control tratado con vehículo (Grupo 1). Estos efectos fueron estadísticamente significativos entre los Días 3 (48 horas después de la dosis) y 5, ambos incluidos.

40 Aunque la Muestra 3 (resto activo) pareció retardar el crecimiento de los animales a la dosis más elevada (5,0 mg/kg) en comparación con el grupo de control relevante tratado con vehículo (Grupo 12), este efecto no fue estadísticamente significativo.

La fenfluramina (7,5 mg/kg) no produjo efectos marcados o estadísticamente significativos sobre el consumo de agua o los pesos corporales en comparación con el grupo de control tratado con vehículo (Grupo 12).

No se registraron efectos relacionados con el tratamiento en los hígados.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 321 162 T3

TABLA 1a

Efectos de la administración oral sobre el consumo de alimento en ratas (datos diarios antes de la dosis)							
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio por grupo (g $\pm$ sd) entre los				
			Días:				
			-6- -5	-5- -4	-4- -3	-3- -2	-2- -1
1	Vehículo (agua)	-	27,8 $\pm 1,54$	24,2 $\pm 1,83$	27,6 $\pm 3,67$	28,3 $\pm 3,50$	29,4 $\pm 2,66$
2	Muestra 1 savia	800	28,3 $\pm 1,43$	24,9 $\pm 0,82$	27,7 $\pm 0,76$	28,4 $\pm 1,51$	30,1 $\pm 0,27$
3	Muestra 1 savia	1600	29,0 $\pm 1,39$	25,0 $\pm 2,16$	27,4 $\pm 1,96$	28,8 $\pm 0,61$	29,5 $\pm 1,55$
4	Muestra 1 savia	3200	27,2 $\pm 2,33$	25,1 $\pm 2,46$	26,0 $\pm 2,52$	28,5 $\pm 2,29$	27,6 $\pm 1,15$
5	Muestra 1 savia	6400	28,7 $\pm 1,64$	25,3 $\pm 1,73$	27,3 $\pm 1,46$	29,2 $\pm 1,09$	30,3 $\pm 0,90$
6	Muestra 1 savia	10000	28,5 $\pm 2,38$	23,7 $\pm 2,73$	26,0 $\pm 2,31$	27,0 $\pm 3,50$	28,7 $\pm 2,26$
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	28,1 $\pm 1,24$	23,9 $\pm 1,79$	24,5 $\pm 2,30$	27,6 $\pm 1,61$	28,5 $\pm 1,87$
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	28,7 $\pm 0,91$	26,5 $\pm 1,55$	27,1 $\pm 1,01$	28,7 $\pm 1,99$	28,9 $\pm 1,37$
9	Muestra 3 resto activo	2,5	28,8 $\pm 1,49$	26,4 $\pm 3,12$	29,0 $\pm 1,99$	29,4 $\pm 1,76$	29,5 $\pm 2,81$
10	Muestra 3 resto activo	5,0	28,3 $\pm 2,1$	25,8 $\pm 1,86$	28,1 $\pm 2,65$	28,0 $\pm 2,65$	28,5 $\pm 3,03$
11	Fenfluramina	7,5	29,1 $\pm 0,66$	25,3 $\pm 4,03$	27,0 $\pm 1,53$	30,8 $\pm 0,54$	29,7 $\pm 2,84$
12	Vehículo (DMSO)	-	27,9 $\pm 1,8$	26,7 $\pm 2,11$	28,7 $\pm 1,99$	28,1 $\pm 4,06$	30,5 $\pm 2,54$
sd Desviación típica							

ES 2 321 162 T3

TABLA 1b

Efectos de la administración oral sobre el consumo de alimento en ratas (datos diarios después de la dosis)									
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio por grupo (g ± sd) entre los Días:						
			1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
1	Vehículo (agua)	-	29,5 ±3,15	29,6 ±2,84	30,6 ±3,49	31,8 ±3,21	30,7 ±2,24	31,7 ±3,03	32,9 ±3,18
2	Muestra 1 savia	800	26,1 ±0,98	29,3 ±1,49	30,7 ±1,15	30,9 ±0,60	33,3 ±1,69	32,7 ±0,80	40,1 ±13,40
3	Muestra 1 savia	1600	22,6** ±3,17	26,9 ±2,06	30,9 ±2,54	30,9 ±1,22	34,1 ±1,36	33,7 ±1,69	33,8 ±1,61
4	Muestra 1 savia	3200	20,1** ±1,39	19,0** ±1,88	22,8** ±1,77	28,0 ±3,14	31,4 ±2,82	32,3 ±2,91	33,0 ±3,01
5	Muestra 1 savia	6400	18,2** ±4,18	14,8** ±1,75	18,4** ±0,97	22,4** ±3,01	26,9 ±2,81	31,0 ±2,31	32,0 ±2,34
6	Muestra 1 savia	10000	15,1** ±2,98	12,4** ±2,61	16,0** ±3,15	19,7** ±4,31	22,6* ±5,70	30,1 ±4,79	32,6 ±5,90
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	25,6 ±2,85	27,3 ±0,95	30,3 ±2,06	31,0 ±2,13	31,8 ±1,63	31,1 ±1,94	31,8 ±2,45
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	24,2* ±3,25	25,2* ±3,24	29,9 ±1,85	30,2 ±2,28	31,2 ±2,26	32,3 ±1,44	33,1 ±0,61
9	Muestra 3 resto activo	2,5	26,8 ±3,33	29,1 ±3,43	31,7 ±3,08	34,0 ±2,95	34,4 ±4,32	33,1 ±4,11	34,8 ±3,71
10	Muestra 3 resto activo	5,0	22,1†† ±2,19	21,0†† ±3,07	27,6 ±5,26	30,5 ±3,33	33,0 ±3,16	32,4 ±3,25	33,0 ±3,84
11	Fenfluramina	7,6	22,4† ±3,19	31,9 ±0,84	32,7 ±2,50	33,0 ±2,55	30,4 ±0,23	32,7 ±1,90	32,4 ±1,60
12	Vehículo (DMSO)	-	29,9 ±3,36	30,6 ±4,43	30,1 ±4,17	32,4 ±5,26	31,8 ±3,08	32,8 ±3,98	33,3 ±3,76
sd Desviación típica									
Grupos 2 - 8 se compararon con el grupo de vehículo 1:									
*p<0,05,									
** p†<0,01									
Grupos 9 - 11 se compararon con el grupo de vehículo 12: †p<0,05,									
††p<0,01									

ES 2 321 162 T3

TABLA 2a

Efectos de la administración oral sobre el consumo de agua en ratas (datos diarios antes de la dosis)							
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de agua por grupo (g $\pm$ sd) entre los Días:				
			- 6 - -5	- 5 - -4	- 4 - -3	- 3 - -2	- 2 - -1
1	Vehículo (agua)	-	40,9 $\pm 4,61$	34,8 $\pm 4,15$	37,6 $\pm 5,63$	33,5 $\pm 7,42$	32,2 $\pm 6,32$
2	Muestra 1 savia	800	38,6 $\pm 1,96$	37,1 $\pm 9,74$	36,4 $\pm 4,81$	28,1 $\pm 1,83$	30,4 $\pm 4,75$
3	Muestra 1 savia	1600	43,4 $\pm 10,53$	35,9 $\pm 3,84$	38,4 $\pm 4,56$	31,1 $\pm 4,47$	36,5 $\pm 5,39$
4	Muestra 1 savia	3200	40,1 $\pm 5,58$	33,3 $\pm 3,01$	37,3 $\pm 4,46$	31,3 $\pm 3,48$	31,7 $\pm 3,18$
5	Muestra 1 savia	6400	43,8 $\pm 8,67$	36,3 $\pm 9,02$	35,4 $\pm 8,18$	34,0 $\pm 6,62$	35,1 $\pm 5,72$
6	Muestra 1 savia	10000	37,4 $\pm 6,34$	32,7 $\pm 3,35$	33,2 $\pm 4,86$	29,0 $\pm 5,11$	32,2 $\pm 3,27$
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	40,0 $\pm 4,36$	35,8 $\pm 4,92$	34,7 $\pm 3,20$	30,2 $\pm 1,88$	31,4 $\pm 2,98$
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	38,6 $\pm 1,98$	37,0 $\pm 1,96$	48,8 $\pm 21,5$	31,6 $\pm 4,56$	39,0 $\pm 17,27$
9	Muestra 3 resto activo	2,5	42,0 $\pm 6,70$	37,0 $\pm 5,05$	34,1 $\pm 3,16$	28,0 $\pm 2,58$	31,6 $\pm 3,12$
10	Muestra 3 resto activo	5,0	40,9 $\pm 4,48$	34,2 $\pm 3,00$	32,7 $\pm 1,26$	28,2 $\pm 1,65$	33,1 $\pm 4,82$
11	Fenfluramina	7,5	47,0 $\pm 5,3$	35,5 $\pm 7,49$	34,7 $\pm 3,73$	30,9 $\pm 2,12$	31,6 $\pm 2,80$
12	Vehículo (DMSO)	-	43,3 $\pm 5,67$	34,5 $\pm 4,97$	35,2 $\pm 4,34$	28,3 $\pm 4,64$	31,4 $\pm 6,44$
sd Desviación típica							

ES 2 321 162 T3

TABLA 2b

Efectos de la administración oral sobre el consumo de agua en ratas (datos diarios después de la dosis)									
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de agua por grupo (g ± sd) entre los						
			Días:						
			1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
1	Vehículo (agua)	-	34,9 ±5,45	36,9 ±6,06	38,0 ±7,59	37,2 ±6,18	37,7 ±5,54	35,3 ±2,86	36,5 ±6,85
2	Muestra 1 savia	800	30,9 ±3,77	34,4 ±8,12	38,2 ±13,71	35,9 ±13,51	39,5 ±11,20	28,8 ±1,22	31,8 ±5,58
3	Muestra 1 savia	1600	29,2 ±1,66	31,7 ±5,35	41,3 ±11,21	34,6 ±4,10	48,1 ±12,27	37,8 ±7,28	36,9 ±9,28
4	Muestra 1 savia	3200	35,9 ±5,88	26,2 ±2,66	30,5 ±2,44	34,1 ±4,80	45,8 ±18,54	51,0 ±35,21	42,6 ±13,88
5	Muestra 1 savia	6400	33,4 ±12,04	27,4* ±8,13	32,6 ±10,67	35,4 ±10,78	45,2 ±8,72	36,2 ±6,72	35,9 ±9,58
6	Muestra 1 savia	10000	31,7 ±12,74	28,5* ±8,85	32,4 ±8,87	36,6 ±6,50	40,7 ±11,51	38,0 ±6,66	37,5 ±6,21
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	36,0 ±6,02	34,5 ±1,79	38,2 ±7,16	39,6 ±7,09	42,7 ±9,74	45,6 ±17,15	46,1 ±9,49
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	45,0 ±19,03	39,1 ±16,59	46,9 ±18,34	35,9 ±3,40	41,9 ±12,37	36,9 ±8,47	38,1 ±8,93
9	Muestra 3 resto activo	2,5	32,2 ±4,01	36,1 ±12,42	38,3 ±11,71	41,5 ±16,60	34,7 ±7,57	33,0 ±4,20	35,3 ±8,70
10	Muestra 3 resto activo	5,0	33,9 ±2,40	31,5 ±8,12	35,1 ±3,82	37,7 ±5,99	39,5 ±7,78	37,4 ±11,07	37,8 ±6,42
11	Fenfluramina	7,5	34,1 ±3,60	37,2 ±1,48	36,7 ±3,92	33,8 ±2,89	33,7 ±5,43	32,1 ±1,93	33,6 ±2,50
12	Vehículo (DMSO)	-	40,7 ±9,10	33,8 ±9,37	32,9 ±7,07	35,2 ±11,49	33,8 ±9,82	32,3 ±7,44	32,0 ±7,22
sd Desviación típica									
Grupos 2 - 8 se compararon con el grupo de vehículo 1: *p<0,05									
Grupos 9 - 11 se compararon con el grupo de vehículo 12 (sin significancias)									

ES 2 321 162 T3

TABLA 3a

Efectos de la administración oral sobre el peso corporal en ratas (datos diarios antes de la dosis)							
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Peso corporal medio por grupo (g $\pm$ sd) en el				
			Día:				
			-5	-4	-3	-2	-1
1	Vehículo (agua)	-	130,9 $\pm$ 5,56	150,7 $\pm$ 5,37	157,3 $\pm$ 5,29	168,1 $\pm$ 6,20	177,5 $\pm$ 6,70
2	Muestra 1 savia	800	131,6 $\pm$ 4,34	150,1 $\pm$ 4,84	158,5 $\pm$ 4,35	169,6 $\pm$ 4,99	177,7 $\pm$ 4,10
3	Muestra 1 savia	1600	130,1 $\pm$ 4,3	148,6 $\pm$ 6,59	156,7 $\pm$ 6,38	167,5 $\pm$ 6,04	176,6 $\pm$ 6,37
4	Muestra 1 savia	3200	130,8 $\pm$ 6,19	147,7 $\pm$ 7,66	154,4 $\pm$ 8,06	165,2 $\pm$ 8,43	175,8 $\pm$ 9,10
5	Muestra 1 savia	6400	132,6 $\pm$ 7,01	151,3 $\pm$ 7,23	158,4 $\pm$ 8,60	169,0 $\pm$ 8,79	178,1 $\pm$ 7,75
6	Muestra 1 savia	10000	132,3 $\pm$ 6,75	151,8 $\pm$ 9,08	157,3 $\pm$ 9,37	167,1 $\pm$ 10,41	175,4 $\pm$ 10,90
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	131,7 $\pm$ 8,28	149,0 $\pm$ 5,85	156,2 $\pm$ 5,81	166,7 $\pm$ 5,54	175,6 $\pm$ 8,42
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	130,0 $\pm$ 6,99	146,1 $\pm$ 6,00	155,9 $\pm$ 6,59	166,0 $\pm$ 6,87	175,1 $\pm$ 6,55
9	Muestra 3 resto activo	2,5	132,6 $\pm$ 7,63	148,9 $\pm$ 8,51	157,3 $\pm$ 8,91	169,8 $\pm$ 8,96	179,4 $\pm$ 8,71
10	Muestra 3 resto activo	5,0	133,5 $\pm$ 6,45	150,5 $\pm$ 9,55	158,8 $\pm$ 8,48	171,0 $\pm$ 7,72	179,0 $\pm$ 9,20
11	Fenfluramina	7,5	133,2 $\pm$ 9,21	152,7 $\pm$ 9,09	160,0 $\pm$ 9,82	170,0 $\pm$ 9,15	182,8 $\pm$ 10,21
12	Vehículo (DMSO)	-	129,1 $\pm$ 3,17	147,3 $\pm$ 4,37	155,0 $\pm$ 6,29	166,0 $\pm$ 5,91	174,8 $\pm$ 8,26
sd Desviación típica							

TABLA 3b

Efectos de la administración oral sobre le peso corporal en ratas (datos diarios después de la dosis)										
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Peso corporal medio por grupo (g ± sd) en el Día:							
			Pre-dosis (1)	2	3	4	5	6	7	8
1	Vehículo (agua)	-	185,4 ±7,77	192,6 ±7,16	202,0 ±10,17	211,2 ±7,98	220,2 ±10,35	227,2 ±10,26	235,0 ±11,02	242,8 ±11,97
2	Muestra 1 savia	800	188,0 ±4,90	187,0 ±4,55	198,5 ±4,20	206,8 ±5,91	214,8 ±4,65	222,8 ±4,99	231,5 ±3,70	240,0 ±3,05
3	Muestra 1 savia	1600	185,0 ±6,67	186,0 ±8,28	193,2 ±6,42	204,0 ±6,40	212,4 ±5,81	223,0 ±6,33	232,6 ±7,70	240,4 ±6,06
4	Muestra 1 savia	3200	181,8 ±9,18	184,6 ±8,88	186,2* ±8,67	189,8** ±9,99	199,2** ±9,34	210,6** ±10,21	219,0* ± 11,29	228,4* ± 12,18
5	Muestra 1 savia	6400	106,6 ±7,96	185,6 ±6,39	183,8** ±6,87	185,2* ±9,18	191,2** ±7,89	201,0 ±6,09	213,0** ±6,98	222,0** ±7,94
6	Muestra 1 savia	10000	182,8 ±12,22	181,4 ±14,08	179,8** ±15,86	180,6** ±13,85	185,6** ±11,28	192,2** ±10,99	203,4 ±11,60	212,4** ±11,35
7	Muestra 2 secada por pulverización	38	183,4 ±8,11	185,8 ±9,23	195,8 ±7,79	205,6 ±9,79	214,4 ±9,61	222,6 ±9,34	231,4 ±10,62	239,6 ±11,46
8	Muestra 2 secada por pulverización	76	180,6 ±6,47	183,4 ±7,57	188,6* ±6,73	198,2* ±8,50	206,0* ±9,43	214,0 ±9,51	222,0 ±9,49	232,2 ±9,68
9	Muestra 3 resto activo	2,5	188,2 ±9,42	191,2 ±11,15	200,0 ±11,25	209,6 ±12,28	219,6 ±12,95	229,4 ±13,69	238,4 ±14,50	247,0 ±14,35
10	Muestra 3 resto activo	5,0	186,4 ±10,02	192,0 ±9,93	192,4 ±9,84	201,0 ±11,27	209,4 ±12,70	219,8 ±11,86	228,2 ±12,28	236,0 ±13,95

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

11	Fenfluramina	7,5	190,3 ±9,71	190,3 ±10,97	197,7 ±7,37	207,7 ±7,23	217,7 ±10,69	224,3 ±10,12	234,3 ±12,70	243,3 ±9,24
12	Vehículo (DMSO)	-	183,3 ±8,33	190,3 ±10,26	199,0 ±10,82	207,7 ±12,66	215,7 ±14,05	222,3 ±14,04	230,7 ±15,95	239,0 ±17,35
sd Desviación típica Grupos 2 - 8 se compararon con el grupo de vehículo 1; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ Grupos 9 - 11 se compararon con el grupo de vehículo 12 (sin significancias)										

Informe histopatológico

El examen histológico se restringió al hígado. No se detectaron cambios relacionados con el tratamiento para la Muestra 1 (líquido), Muestra 2 (savia secada por pulverización), Muestra 3 (resto activo), fenfluramina o el grupo de control con DMSO.

Los descubrimientos registrados fueron de una incidencia similar en los grupos de control y tratados.

TABLA
Resumen de incidencia de patología microscópica

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
	0	800	1600	3200	6400	10000
Sexo: Machos	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Machos en el estudio	5	4	5	5	5	5
Animales completados	5	4	5	5	5	5
Hígado						
Examinado	5	4	5	5	5	5
Sin anomalías detectadas	0	0	1	2	3	3
Focos celulares de inflamación del parénquima (Total)	0	1	0	0	0	1
Mínimo	0	1	0	0	0	1
Hipertrofia de hepatocitos - centrilobular (Total)	0	0	0	0	0	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Hemopoyesis extramedular (Total)	2	0	0	0	0	0
Mínimo	2	0	0	0	0	0
Necrosis de hepatocitos - focal (Total)	1	0	0	0	0	0
Mínimo	1	0	0	0	0	0
Infiltración linfocítica portal (Total)	3	4	4	3	2	2
Mínimo	3	4	4	3	2	2
Hepatocitos eosinófilos - focal (Total)	1	0	0	0	0	0
Mínimo	1	0	0	0	0	0
Fibrosis portal (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0
Hígado (tinción con ORO)						
Examinado	5	4	5	5	5	5
Sin anomalías detectadas	2	3	2	4	3	3
Grasa de los hepatocitos - centrilobular (Total)	3	1	2	1	2	2
Mínimo	3	1	2	1	2	2
Grasa de los hepatocitos - periportal (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0

		Grupo 7 38 mg/kg	Grupo 8 76 mg/kg	Grupo 9 2,5 mg/kg	Grupo 10 5 mg/kg	Grupo 11 7,5 mg/kg	Grupo 12 0 mg/kg
Sexo: Machos Machos en el estudio Animales completados		5 5	5 5	5 5	5 5	3 3	3 3
Hígado							5
Examinado		5	5	5	5	3	3
Sin anomalías detectadas		2	2	0	1	0	2
Focos celulares de inflamación del parénquima (Total)		0	0	0	0	0	1
Mínimo		0	0	0	0	0	1
Necrosis de hepatocitos - focal (Total)		0	0	1	0	0	0
Mínimo		0	0	1	0	0	0
Infiltración linfocítica portal (Total)		3	3	5	4	3	1
Mínimo		3	3	5	4	3	1
Leucocitos portales (Total)		0	0	1	0	0	0
Mínimo		0	0	1	0	0	0
Hígado (tinción con ORO)							
Examinado		5	5	5	5	3	3
Sin anomalías detectadas		5	3	3	3	2	2
Grasa de los hepatocitos - centrilobulillar (Total)		0	2	2	2	1	1
Mínimo		0	2	2	2	1	0

Ejemplo 45

A continuación se describe un bioensayo adicional, que empleó las mismas muestras de ensayo que las descritas en el Ejemplo 44. Los animales en este estudio recibieron una dieta restringida, es decir, los animales sólo recibieron comida entre las 12:00 y 3:00 pm diariamente. Esto es diferente de todos los otros ensayos biológicos realizados hasta ahora, en los que el alimento estaba disponible para las ratas *ad libitum*. Los animales se aclimataron durante un periodo de siete días (días -7 a -1), la dosificación tuvo lugar desde el día 0 al día 6 a las 9:00 am por sonda oral. El periodo de recuperación fue del día 7 al día 13. Los grupos de dosificación se describen en la siguiente Tabla 1. Debe observarse que el grupo de control real está marcado como Grupo 09. El Grupo 5 es un grupo controlado que recibió una dieta equivalente a la del Grupo 4. El propósito de este grupo fue evaluar el efecto que una dieta restringida tiene sobre la vida de los animales.

Resultados

Los resultados generados durante el estudio mostraron que el periodo de aclimatación fue demasiado corto. Las ratas se alimentaron principalmente durante la noche y el cambio repentino a un acceso restringido al alimento durante 3 horas durante el periodo de día, produjo una ingesta diaria inferior. La ingesta diaria de comida aún aumentaba en la mayoría de los grupos al final del periodo de aclimatación cuando comenzó la dosificación con los artículos de ensayo. Como resultado de esto, el efecto de los materiales de ensayo no afectó significativamente a la ingesta de alimento de las ratas durante el periodo de dosificación.

Las masas corporales medias para los diferentes grupos durante los días -7 a -1 y los días 0 a 6 se muestran en la Tabla D1 y Tabla D2. El efecto de las diferentes dosificaciones de la savia y savia secada por pulverización se muestra en los gráficos adjuntos como % de cambio en la masa corporal del día 0 a 7 (Figura 5), y % de cambio en la masa corporal del día -7 a 7 (Figura 6). La pérdida en la masa corporal está claramente relacionada con la dosis especialmente con las dosificaciones más elevadas.

El examen histopatológico de los hígados no mostró ninguna patología significativa en los grupos que recibieron los artículos de ensayo.

Alimento

El consumo de alimento se midió diariamente, durante la aclimatación y durante el estudio. El alimento estuvo disponible durante un periodo diario de alimentación de 3 horas, comenzando a las 12:00 y finalizando a las 15:00.

Los animales estuvieron en ayunas durante el resto del tiempo. Los animales del Grupo 5 recibieron una cantidad medida de alimento en el Día 1, equivalente al consumo promedio de alimento del Grupo 4 en el Día 0. Este patrón de alimentación controlado para el Grupo 5, determinado a partir del consumo promedio de alimento del Grupo 4 del día previo, se siguió durante los Días 1 - 7.

Agua

El agua se proporcionó en recipientes convencionales. El agua (Agua Corriente de Magalies Agua Board, adecuada para el consumo humano) estuvo disponible *ad libitum*. El consumo de agua se midió una vez al día, en el mismo momento cada día, después de la determinación del consumo de alimento.

Aclimatación

Los animales se aclimataron durante siete días antes del inicio del estudio, tiempo durante el cual se determinó el consumo de alimento y agua como se ha descrito anteriormente. Se determinaron las masas corporales en una base diaria durante este tiempo.

TABLA 1

DISEÑO DEL ESTUDIO				
GRUPO	ENSAYO	NÚMERO	DOSIS	ARTÍCULO DE ENSAYO
01	6♂	001 - 006	100 mg/kg	Savia congelada
02	6♂	007 - 012	400 mg/kg	Savia congelada
03	6♂	013 - 018	1.600 mg/kg	Savia congelada
04	6♂	019 - 024	3.200 mg/kg	Savia congelada
05	6♂	025 - 030	CONTROL	Agua purificada Elga Opción 4
06	6♂	031 - 036	2,2 mg/kg	Savia secada por pulverización
07	6♂	037 - 042	8,8 mg/kg	Savia secada por pulverización
08	6♂	043 - 048	35 mg/kg	Savia secada por pulverización
09	6♂	049 - 054	CONTROL	Agua purificada Elga Opción 4

Vía de Administración

Los artículos de ensayo se administraron en una base diaria durante siete días, usando una aguja intra-gástrica. Los animales se dejaron en ayunas durante 18 horas antes de la administración del artículo (comenzando a las 09:00).

Duración del Tratamiento

Se trató a los animales durante 7 días consecutivos (desde el Día 0 - Día 6). Tres animales de cada grupo se sacrificaron 24 horas después de la última dosis (Día 7). Los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento (Día 13). Este procedimiento se siguió para todos los grupos excepto para el Grupo 5 en el que se sacrificaron tres animales 24 horas después de la última alimentación controlada (Día 8), los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento (Día 13).

Masas Corporales

Las masas corporales se determinaron diariamente, a aproximadamente el mismo momento cada día durante el transcurso del estudio, incluyendo durante el periodo de aclimatación.

Eutanasia

Se sacrificaron tres animales de cada grupo 24 horas después de la última dosificación (Día 7).

Los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento. Este procedimiento se siguió para todos los grupos excepto para el Grupo 5 en el que se sacrificaron tres animales 24 horas después de la última alimentación controlada (Día 8), los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento (Día 13). Los animales se sacrificaron con eutanasia al final del periodo de estudio con gas CO₂.

ES 2 321 162 T3

Exámenes Oftalmoscópicos

Los exámenes oftalmoscópicos, usando un oftalmoscopio, se hicieron antes de la primera administración del artículo de ensayo y al final, en todos los animales en todos los grupos.

Patología Macroscópica

Se realizó un examen *post-mortem* completo en cada animal que se sacrificó con eutanasia al final del periodo de estudio.

Histopatología

Se realizó el examen histopatológico del hígado de cada uno de los animales.

TABLA D.1

MASAS CORPORALES MEDIAS / GRUPO / SEMANA									
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día -7	Día -6	Día -5	Día -4	Día -3	Día -2	Día -1
01	Muestra 1 (Savia)	100	203,38 ±95,39	197,13 ±90,63	192,75 ±89,49	188,62 ±86,75	184,95 ±84,80	182,48 ±83,47	182,25 ±82,57
02	Muestra 1 (Savia)	400	192,53 ±65,60	183,92 ±61,20	178,25 ±59,37	173,17 ±58,10	170,82 ±57,42	168,25 ±58,40	169,37 ±59,25
03	Muestra 1 (Savia)	1.600	149,25 ±54,80	142,87 ±51,89	136,85 ±52,17	132,37 ±49,64	131,50 ±49,50	129,67 ±48,89	131,12 ±48,22
04	Muestra 1 (Savia)	3.200	224,15 ±80,70	214,45 ±77,25	207,10 ±76,38	201,82 ±75,42	198,25 ±74,82	194,83 ±75,34	196,77 ±74,56
05	Agua purificada Elga Opción 4 (control)	-	214,55 ±74,90	204,85 ±72,41	198,57 ±71,79	193,48 ±68,49	192,40 ±67,48	190,87 ±67,39	190,15 ±65,24
06	Muestra 2 (Savia secada por pulverización)	2,2	208,65 ±65,74	199,37 ±62,49	193,18 ±61,18	188,25 ±60,89	186,22 ±59,98	184,55 ±58,86	185,97 ±58,76
07	Muestra 2 (Savia secada por pulverización)	8,8	256,95 ±77,55	246,02 ±73,67	237,47 ±73,53	232,62 ±71,73	229,78 ±71,76	228,07 ±69,88	228,45 ±68,81
08	Muestra 2 (savia secada por pulverización)	35	194,37 ±43,74	185,83 ±42,70	177,53 ±41,10	172,05 ±40,13	170,10 ±39,49	167,25 ±37,61	168,00 ±38,83
09	Agua purificada Elga Opción 4 (control)	-	171,52 ±69,81	162,67 ±62,68	154,95 ±61,83	151,38 ±59,48	149,63 ±57,66	148,30 ±57,12	149,07 ±56,01

ES 2 321 162 T3

TABLA D.2

MASAS CORPORALES MEDIAS / GRUPO / SEMANA (CONTINUACIÓN)									
Grupo	Trata- miento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
01	Muestra 1 (Savia)	100	183,87 ±83,33	175,83 ±81,82	175,72 ±79,05	175,48 ±77,54	175,53 ±76,20	177,95 ±73,99	178,43 ±72,68
02	Muestra 1 (Savia)	400	173,45 ±60,73	164,58 ±58,52	164,75 ±58,37	166,22 ±57,69	166,55 ±57,79	169,93 ±57,47	171,77 ±57,29
03	Muestra (Savia)	1.600	134,38 ±46,01	129,20 ±44,74	127,53 ±43,20	127,20 ±41,36	126,70 ±39,19	128,00 ±39,22	128,07 ±38,66
04	Muestra (Savia)	3.200	199,60 ±75,16	196,38 ±73,96	192,20 ±71,20	189,05 ±69,11	186,57 ±66,29	186,05 ±67,45	185,68 ±65,73
05	Agua purificada Elga Opción 4(control)	-	194,27 ±67,46	187,93 ±65,48	181,97 ±65,01	177,53 ±64,73	174,73 ±61,08	172,85 ±58,63	171,45 ±56,79
06	Muestra 2 (Savia secada por pulveri- zación)	2,2	189,07 ±60,15	181,52 ±58,99	181,48 ±57,79	184,42 ±55,64	185,75 ±55,29	189,35 ±54,66	189,68 ±53,70
07	Muestra 2 (Savia secada por pulveri- zación)	8,8	230,28 ±69,32	221,55 ±68,02	220,17 ±66,63	221,80 ±63,88	222,82 ±63,56	224,82 ±62,38	224,90 ±62,05
08	Muestra 2 (Savia secada por pulveri- zación)	35	169,10 ±38,40	164,42 ±38,03	162,50 ±36,81	162,75 ±36,36	162,52 ±36,93	164,30 ±37,69	164,22 ±37,18
09	Agua purificada Elga Opción 4(control)	-	151,02 ±55,45	146,55 ±53,77	148,10 ±52,67	149,70 ±52,05	152,58 ±60,37	155,82 ±49,91	157,85 ±49,70

ES 2 321 162 T3

TABLA D.3

MASAS CORPORALES MEDIAS / GRUPO / SEMANA (CONTINUACIÓN)									
Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13
01	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	100	185,38 ±72,64	234,73 ±62,44	236,73 ±62,39	234,07 ±62,09	236,33 ±62,31	239,07 ±60,24	238,43 ±59,85
02	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	400	178,83 ±58,24	225,63 ±13,05	277,13 ±14,18	227,10 ±14,03	229,43 ±16,97	234,93 ±18,35	236,20 ±15,97
03	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	1.600	132,22 ±37,08	133,80 ±55,17	135,23 ±455,74	134,53 ±54,96	138,30 ±53,03	139,30 ±51,10	142,80 ±49,51
04	Muestra 1 (Savia) (GHA 9 35A)	3.200	188,57 ±66,14	199,63 ±61,07	198,90 ±57,48	198,70 ±54,55	194,73 ±52,78	194,93 ±50,78	197,93 ±51,57
05	Agua purificada Elga Opción 4(control)	-	173,97 ±54,29	172,98 ±52,06	157,80 ±58,62	158,87 ±57,76	160,80 ±57,67	163,40 ±56,27	167,80 ±58,49
06	Muestra 2 (Savia secada por pulverización) (GHA I 59)	2,2	196,00 ±53,09	190,27 ±27,78	190,27 ±29,54	192,60 ±29,09	194,73 ±29,68	196,97 ±29,04	198,60 ±30,18
07	Muestra 2 (Savia secada por pulverización) (GHA I 59)	8,8	231,30 ±61,91	177,27 ±24,48	178,17 ±23,79	180,67 ±25,04	182,03 ±25,31	185,10 ±24,60	189,73 ±23,58
08	Savia secada por pulverización (GHA I 59)	35	167,48 ±36,75	164,90 ±22,54	166,63 ±23,08	168,43 ±22,66	171,67 ±24,42	174,90 ±25,70	178,57 ±23,58
09	Agua purificada Elga Opción 4(control)	-	165,50 ±49,27	193,73 ±22,37	196,87 ±21,86	198,07 ±21,02	199,83 ±20,21	204,93 ±8,65	207,13 ±18,22

ES 2 321 162 T3

TABLA 1

Evaluación histológica de secciones hepáticas de ratas macho

Muestra 1

GRUPO 1: 100 mg/kg Muestra 1			GRUPO 2: 400 mg/kg Muestra 1		
	Animal n°	Lesiones hepáticas		Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	01	NPL		07	FSH1+
	02	NPL		08	NPL C1+
	03	NPL C1+		09	NPL
Día 13	04	NPL MLC	Día 13	10	DHS1+
	05	FSH1+		11	NPL
	06	NPL		12	DHS1+

GRUPO 3: 1.600 mg/kg Muestra 1			GRUPO 4: 3.200 mg/kg Muestra 1		
	Animal n°	Lesiones hepáticas		Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	13	NPL		19	NPL
	14	NPL		20	NPL
	15	NPL		21	NPL
Día 13	16	NPL	Día 13	22	DHS1+
	17	DHS1+		23	FSH1+
	18	NPL		24	NPL

GRUPO 5: CONTROL: AGUA PURIFICADA ELGA OPCIÓN 4: INGESTA DE ALIMENTO RESTRINGIDA

GRUPO 5: Control: Agua purificada Elga Opción 4		
	Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	25	NPL MLC
	26	NPL
	27	NPL
Día 13	28	DHS1+
	29	DHS1+
	30	NPL

Leyenda

C = Congestión

DHS = Hinchazón celular hidrópica difusa

FHS = Hinchazón celular hidrópica focal

NPL = Si lesiones del parénquima

MLC = Agrupamiento linfocítico mínimo

1+ = leve

2+ = moderado

3+ = grave

ES 2 321 162 T3

TABLA 2

Evaluación histológica de secciones hepáticas de ratas macho

Muestra 2

GRUPO 6: 2,2 mg/kg Muestra 2			GRUPO 7: 8,8 mg/kg Muestra 2		
	Animal n°	Lesiones hepáticas		Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	31	NPL		37	NPL
	32	NPL MLC		38	NPL
	33	FSH1+		39	NPL C1+
Día 13	34	NPL	Día 13	40	DHS1+
	35	DHS1+		41	NPL
	36	NPL		42	MLC FSH1+

GRUPO 8: 35 mg/kg Muestra 2		
	Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	43	NPL
	44	NPL
	45	NPL
Día 13	46	NPL
	47	NPL C1+
	48	MLC FSH1+

GRUPO 9: CONTROL: AGUA PURIFICADA ELGA OPCIÓN 4

GRUPO 9: Agua purificada Elga Opción 4		
	Animal n°	Lesiones hepáticas
Día 7	49	NPL
	50	NPL
	51	FSH1+
Día 13	52	DHS1+
	53	NPL
	54	FSH1+

Leyenda

- C = Congestión
- DHS = Hinchazón celular hidrópica difusa
- FHS = Hinchazón celular hidrópica focal
- NPL = Sin lesiones del parénquima
- MLC = Agrupamiento linfocítico mínimo
- 1+ = leve
- 2+ = moderado
- 3+ = grave

No se registraron lesiones específicas en las secciones hepáticas de las ratas experimentales que recibieron la savia congelada así como la savia secada por pulverización que podría atribuirse a la administración oral de los compuestos químicos mencionados anteriormente. La hinchazón celular hidrópica registrada en las ratas tanto de control como experimentales puede indicar una hinchazón celular metabólica normal y cambios anóxicos. Se encontraron focos mínimos de agrupamiento perivascular linfocítico en algunos animales y muy probablemente es una observación fortuita. En unas pocas ratas se presentó congestión de grado leve en los sinusoides hepáticos y deben considerarse como una observación fortuita.

Una característica importante de la invención mostrada por los resultados de este estudio es que no se desarrolló tolerancia a ninguna de las muestras durante el periodo de ensayo. Esto puede proporcionar un beneficio considerable, particularmente en relación con el uso de los compuestos y composiciones de la invención en el tratamiento de la obesidad.

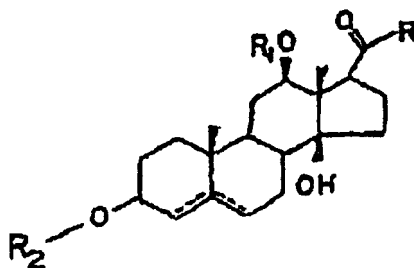
Aunque los compuestos y composiciones de la invención se han descrito principalmente en relación a sus propiedades como supresores del apetito, debe observarse que esta expresión -“supresor del apetito”- se usa en este documento para indicar la actividad que tiende a limitar el apetito y/o aumentar la sensación saciedad, y por tanto tiende a reducir la ingesta calórica total; esto a su vez tiende a contrarrestar la obesidad. Por consiguiente, esta invención deja disponible un procedimiento para tratar, prevenir o combatir la obesidad en un ser humano o un animal no humano que comprende administrar a dicho ser humano o animal no humano una cantidad de tratamiento, prevención o combate de la obesidad de un compuesto de fórmula (2). Una realización preferida de este aspecto de la invención utiliza una composición o extracto que contenga un compuesto de fórmula (1).

El término “animal” como se usa en este documento se extiende a, pero sin restricción, animales de compañía, por ejemplo, mascotas del hogar y animales domesticados; incluyendo ejemplos no limitantes de dichos animales, ganado, ovejas, hurones, cerdos, camellos, caballos, aves, peces, conejos, cabras, perros y gatos.

Como agente anoréctico o en el tratamiento o prevención de la obesidad en un ser humano, un compuesto de fórmula (2), preferiblemente de fórmula (1), se administra de forma ventajosa a dicho ser humano en una cantidad de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. Un intervalo de dosificación preferido es de 0,05 mg/kg/día a 0,5 mg/kg/día. Cuando se usa la forma en polvo secado por pulverización del extracto de esta invención, un intervalo de dosificación preferido es de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día; se prefiere especialmente de 0,5 mg/kg/día a 5 mg/kg/día.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula estructural general



(2)

en la que

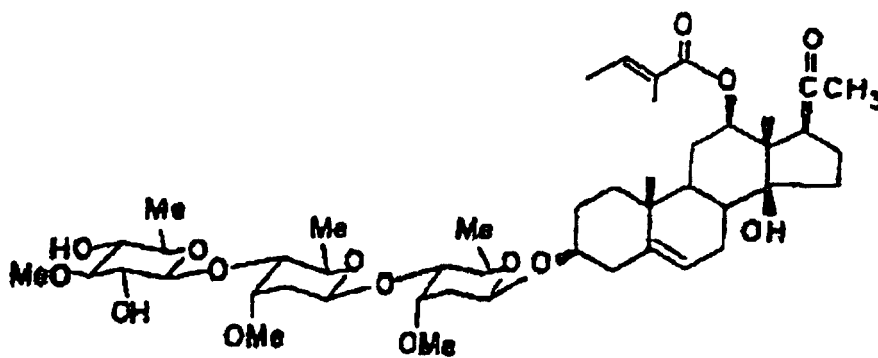
R = alquilo;

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzofilo o cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

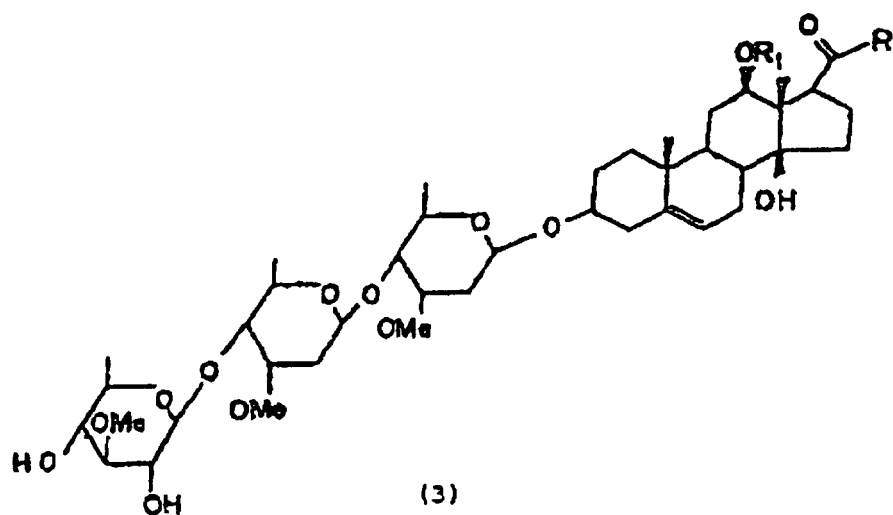
y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆, excepto ramanona, isorramanona, 12-benzoato de isorramanona y 5 β -pregnan-20-on-3 β ,12 β ,14 β -triol.

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que hay un doble enlace entre C₅-C₆, R = metilo, R₁ = tigloílo, R₂ = 3-O-[- β -D-tevetopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cimaropiranosil], teniendo el compuesto la fórmula estructural



(1)

3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general

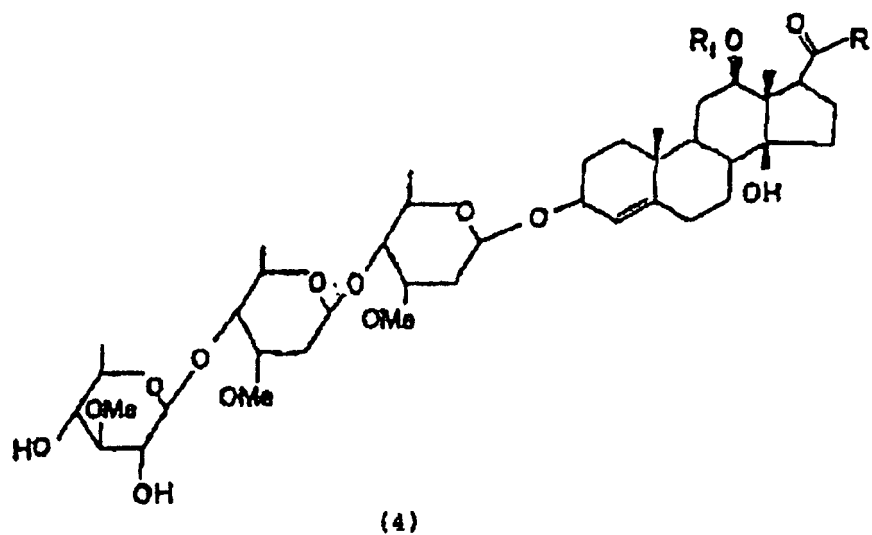


en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico.

4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general

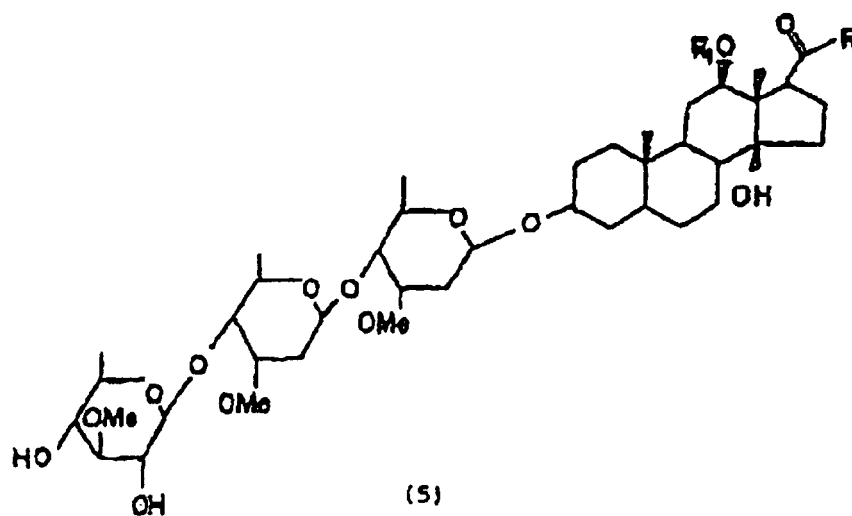


en la que

R = alquilo; y

R₂ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico.

5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general

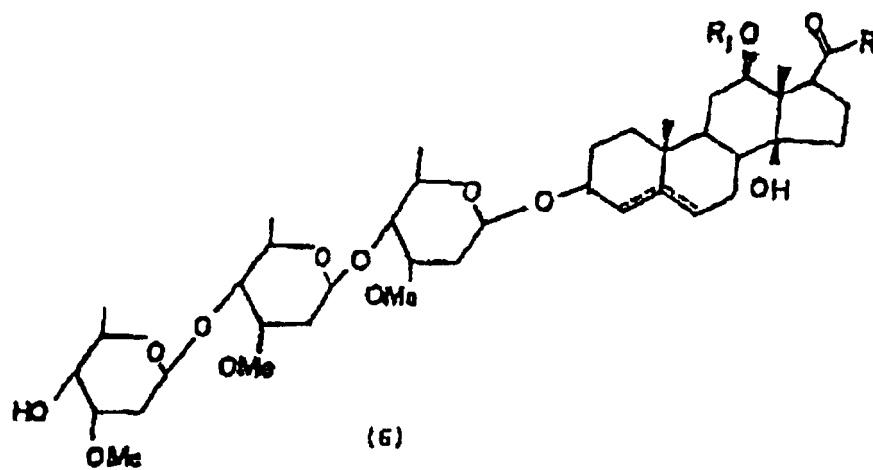


en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico.

6. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general



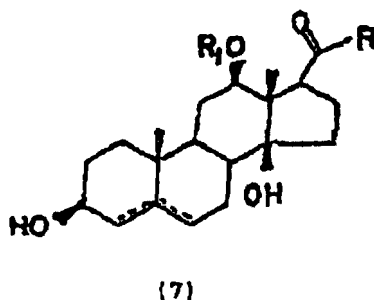
en la que

R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆.

7. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general



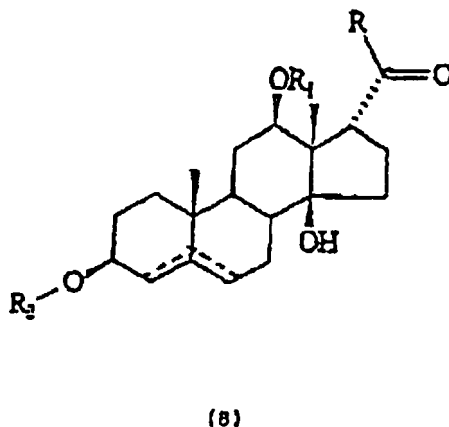
en la que

R = alquilo;

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico,

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆.

8. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural general



en la que

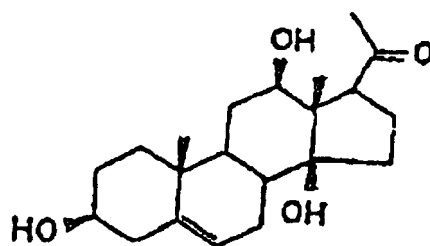
R = alquilo; y

R₁ = H, alquilo, tigloílo, benzoílo o cualquier otro grupo éster orgánico;

R₂ = H, o uno o más 6-desoxi-hidratos de carbono, o uno o más 2,6-didesoxi-hidratos de carbono o moléculas de glucosa, o combinaciones de los mismos;

y en la que las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un enlace adicional entre C₄-C₅ o C₅-C₆.

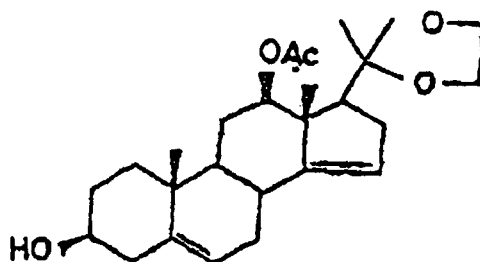
9. Procedimiento para la preparación de un producto intermedio esteroideo de fórmula



(15)

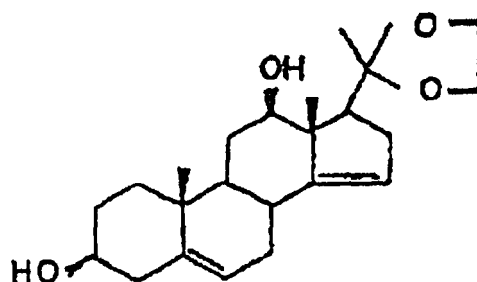
que incluye las etapas de

(a) tratar el compuesto



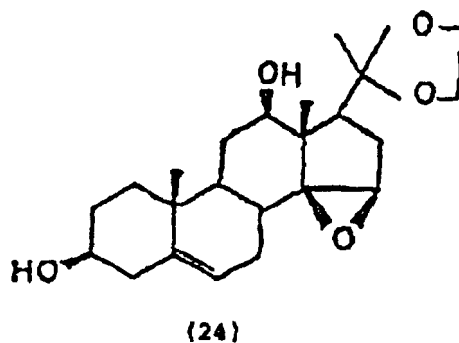
(22)

con un agente reductor para producir un compuesto 3 β ,12 β -dihidroxi-20,20-etilendioxipregna-5,14-dieno de fórmula

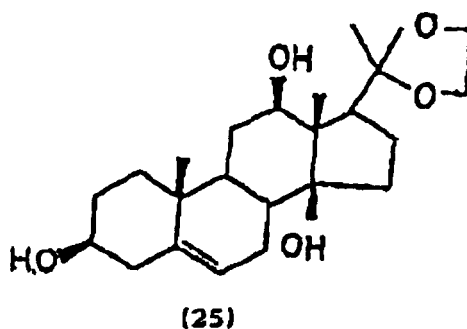


(23)

(b) tratar el compuesto (23) con N-bromoacetamida (NBA) y una base para producir un compuesto $3\beta,12\beta$ -dihidroxi-14,15-epoxi-20,20-etilendioxipregn-5-eno de fórmula



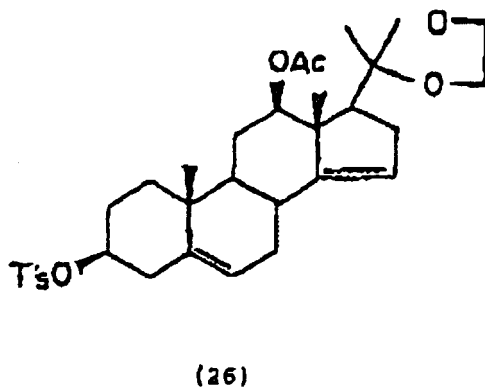
(c) tratar el compuesto (24) con un agente reductor para producir un compuesto $3\beta,12\beta,14\beta$ -trihidroxi-20,20-etilenedoxipregn-5-eno de fórmula



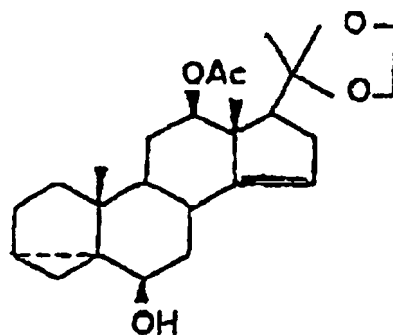
y (d) tratar el compuesto (25) con un ácido y agua para producir el compuesto (15).

10. Procedimiento para la preparación del compuesto (15) que incluye las etapas de

(a) tratar el compuesto (22) tal como se muestra en la reivindicación 9 con cloruro de p-toluenosulfonilo y una base para producir un compuesto 12-acetato de $3\beta,12\beta$ -dihidroxi-20,20-etilendioxipregna-5,14-dieno-3-tosilo de fórmula

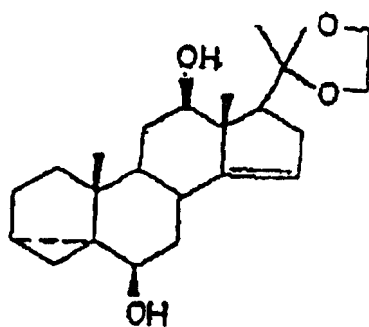


(b) tratar el compuesto (26) con acetato de potasio en un disolvente para producir un compuesto 12-acetato de $6\beta,12\beta$ -dihidroxi-20,20-etilenedioxi-3,5 α -ciclopregnan-14-eno de fórmula



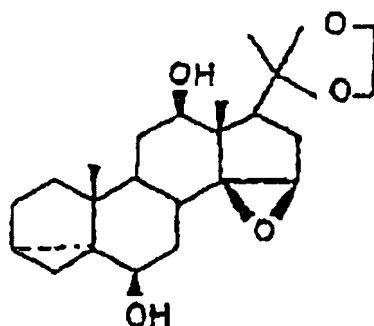
(27)

(c) tratar el compuesto (27) con un agente reductor para producir un compuesto $6\beta,12\beta$ -dihidroxi-20,20-etilendioxi-3,5 α -ciclopregnan-14-eno de fórmula



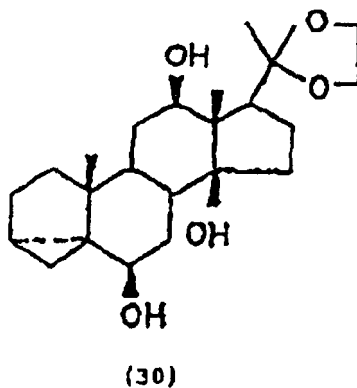
(28)

(d) tratar el compuesto (28) con N-bromoacetamida, y una base para producir un compuesto $6\beta,12\beta$ -dihidroxi-20,20-etilendioxi-14,15-epoxi-3,5 α -ciclopregnano de fórmula



(29)

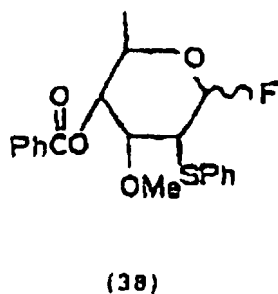
(e) tratar el compuesto (29) con un agente reductor para producir un compuesto 6 β ,12 β ,14 β -trihidrox-20,20-etilendioxi-3,5 α -ciclopregnano de fórmula



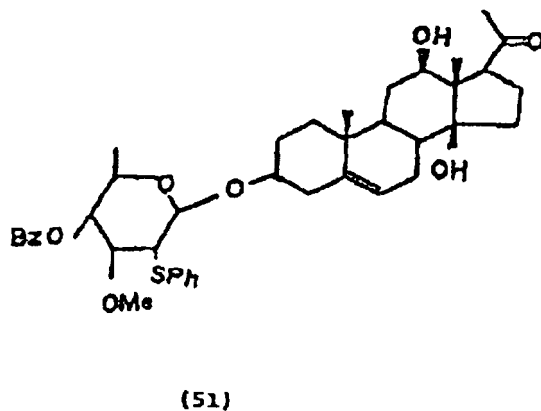
y (f) tratar el compuesto (30) con un ácido y un disolvente para producir el compuesto (15).

11. Procedimiento de acoplamiento de un monosacárido cimarosa con un producto intermedio esteroideo, que incluye las etapas de

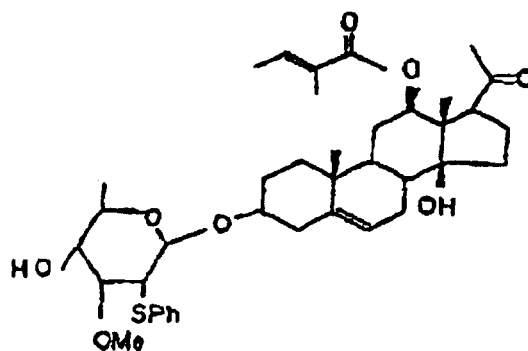
i) hacer reaccionar un resto de cimarosa de fórmula (38)



con un producto intermedio esteroideo de fórmula (15) tal como se muestra en la reivindicación 9 en presencia de cloruro de estaño en un disolvente para producir un compuesto 3-O-[4-O-benzoil-2-feniltio- β -D-cimaropiranosil]-12,14- β -dihidroxipregnan-5-en-20-ona de fórmula



y (ii) tratar el compuesto (51) con cloruro de ácido tíglico en piridina y después con una base para producir un compuesto 3-O-[2-feniltio- β -D-cimaropiranosil]-12 β -tigloiloxi-14-hidroxi-14 β -pregnan-5-en-20-ona de fórmula

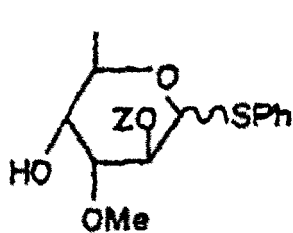


(52)

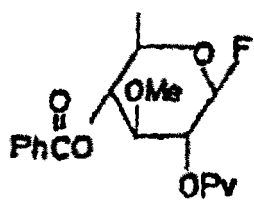
12. Compuesto de fórmula (52) de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Procedimiento de acoplamiento de un resto de monosacárido cimarosa con un resto de monosacárido tevetosa y acoplamiento del disacárido resultante con el compuesto de fórmula (52) de acuerdo con la reivindicación 12, que incluye las etapas de

i) acoplar un resto de cimarosa protegido de manera selectiva de fórmula (40) a continuación y un resto de monosacárido tevetosa de fórmula (50A) a continuación:

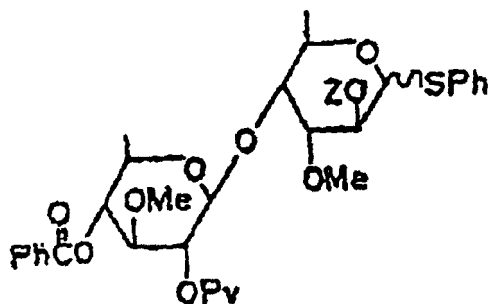


(40)



(50 A)

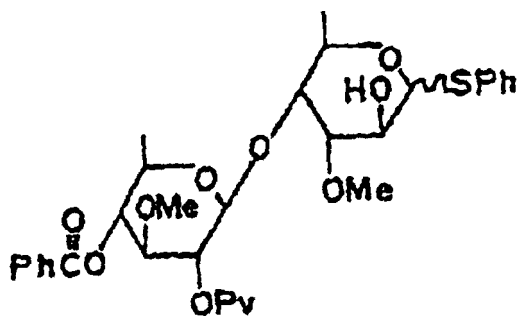
usando cloruro de estaño, SnCl_2 , y trifluorometanosulfonato de plata para producir un compuesto de fórmula



(53)

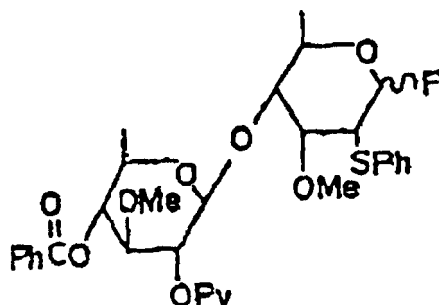
en la que Z = TBDMS = t-butildimetilsililo

ii) tratar el compuesto (53) con fluoruro de tetrabutilamonio para producir un compuesto de fórmula



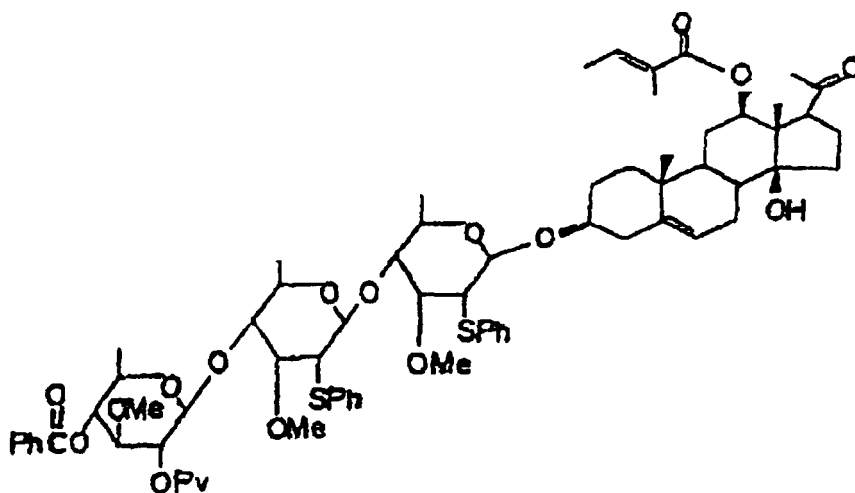
(54)

iii) tratar el compuesto (54) con trifluoruro de dietilaminoazufre para producir un compuesto de fórmula



(55)

iv) hacer reaccionar el compuesto (55) con el compuesto (52) de acuerdo con la reivindicación 12 para producir un compuesto de fórmula

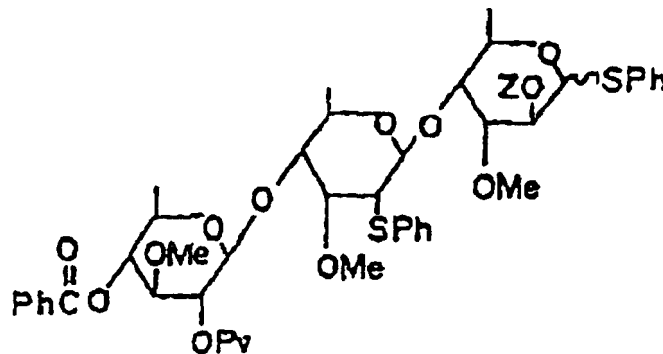


(56)

y (v) tratar el compuesto (56) en una reacción con níquel Raney y después con una base para producir el compuesto (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

14. Procedimiento de formación de un trisacárido y acoplamiento del trisacárido resultante con un producto intermedio esteroideo, que incluye las etapas de

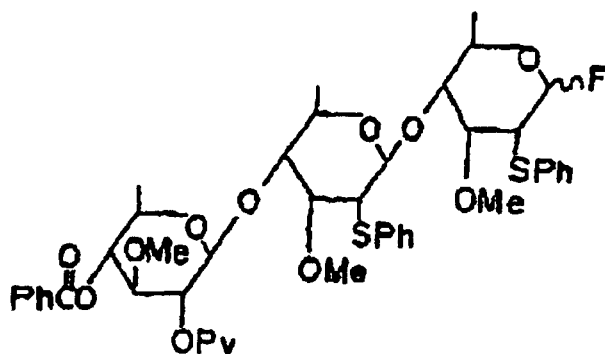
- i) acoplar un resto de cimarosa protegido de manera selectiva de fórmula (40) y el compuesto (45) usando cloruro de estaño (II), AgOTf, Cp_2ZrCl_2 para producir un compuesto de fórmula



(57)

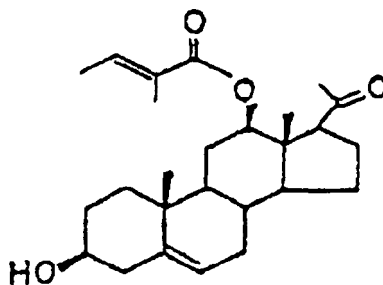
en la que $Z = \text{TBDMS} = \text{t-butildimetilsililo}$;

- ii) tratar el compuesto (57) con fluoruro de tetrabutilamonio y trifluoruro de dietilaminoazufre para producir un compuesto trisacárido que tiene la fórmula



(58)

y (iii) acoplar el trisacárido de fórmula (58) con un producto intermedio esteroideo de fórmula



(59)

usando cloruro de estaño (II), AgOTf, Cp_2ZrCl_2 para producir el compuesto (1) de acuerdo con la reivindicación

2.

ES 2 321 162 T3

15. Composición que tiene actividad supresora del apetito que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ambas incluidas.

5 16. Composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el compuesto es el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

17. Composición de acuerdo con la reivindicación 15 o reivindicación 16, mezclada con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico.

10 18. Composición de acuerdo con la reivindicación 15, 16 ó 17, que está preparada en forma farmacéutica unitaria.

19. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ambas incluidas, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas, en la fabricación de un medicamento que tiene actividad supresora del apetito.

15 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, de un compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

21. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ambas incluidas, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas, para su uso como medicamento que tiene actividad supresora del apetito.

20 22. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 21, que es el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 11.

23. Producto alimenticio o bebida que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ambas incluidas, para tener un efecto supresor del apetito cuando se ingiere.

24. Producto alimenticio o bebida de acuerdo con la reivindicación 23, siendo el compuesto el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

30 25. Composición que tiene actividad supresora del apetito que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas, para su uso para tratar, prevenir o combatir la obesidad de un ser humano o animal.

35 26. Composición de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el compuesto es el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

27. Composición de acuerdo con la reivindicación 25 o reivindicación 26, mezclada con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico.

40 28. Composición de acuerdo con la reivindicación 25, 26 ó 27, que está preparada en forma farmacéutica unitaria.

29. Composición de acuerdo con la reivindicación 25, en la que la obesidad es de un ser humano.

45 30. Producto alimenticio o bebida que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas, para tener un efecto supresor del apetito cuando se ingiere, para su uso para tratar, prevenir o combatir la obesidad de un ser humano o animal.

50 31. Producto alimenticio o bebida de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el compuesto es el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

32. Producto alimenticio o bebida de acuerdo con la reivindicación 30, en el que la obesidad es de un ser humano.

55 33. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas, para su uso para tratar, prevenir o combatir la obesidad de un ser humano o animal.

34. Compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso para tratar, prevenir o combatir la obesidad de un ser humano o animal.

60 35. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34, en el que la obesidad es de un ser humano.

36. Método no terapéutico de reducción de la ingesta calórica total de un ser humano o animal, comprendiendo el método administrar a dicho ser humano o animal un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas.

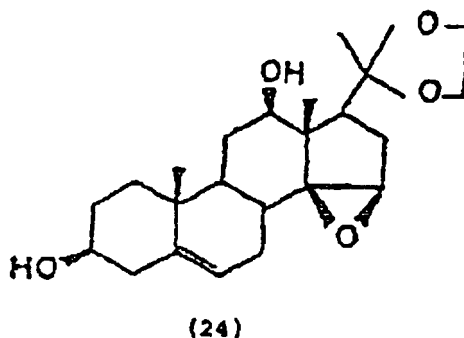
65 37. Método no terapéutico de supresión del apetito de un ser humano o animal, comprendiendo el método administrar a dicho ser humano o animal un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, sin tener en cuenta las cláusulas de excepción en las mismas.

38. Método de acuerdo con la reivindicación 36 ó 37, en el que el compuesto se administra en un producto alimenticio o una bebida que comprende una cantidad eficaz del compuesto para tener un efecto supresor del apetito cuando se ingiere.

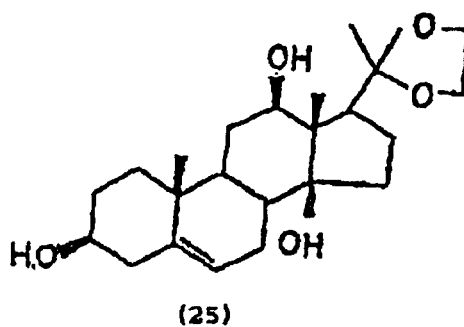
39. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en el que el compuesto es el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 2.

40. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en el que el compuesto se administra a un ser humano.

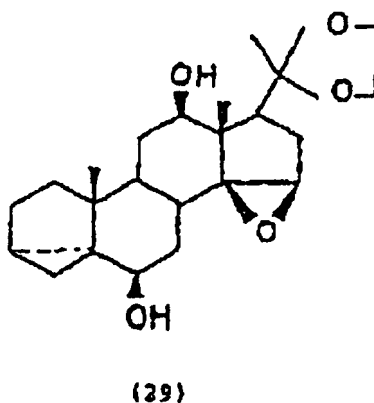
41. Compuesto que tiene la fórmula estructural



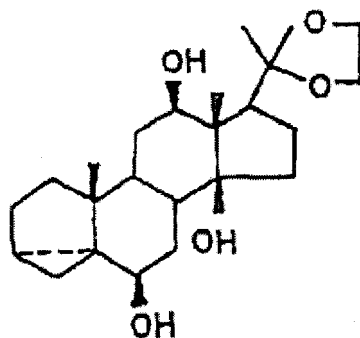
42. Compuesto que tiene la fórmula estructural



43. Compuesto que tiene la fórmula estructural

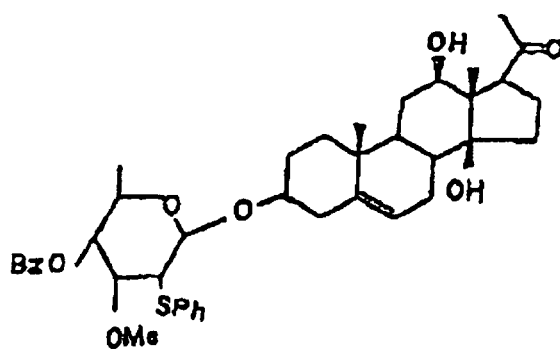


44. Compuesto que tiene la fórmula estructural



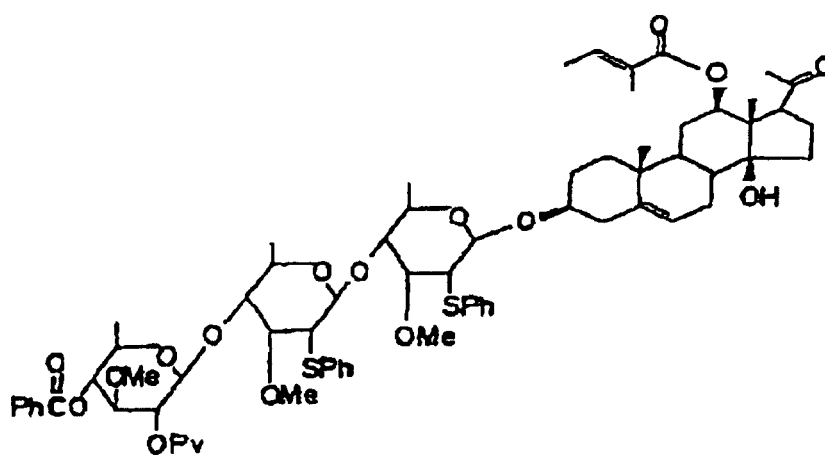
(30)

45. Compuesto que tiene la fórmula estructural



(51)

46. Compuesto que tiene la fórmula estructural



(56)

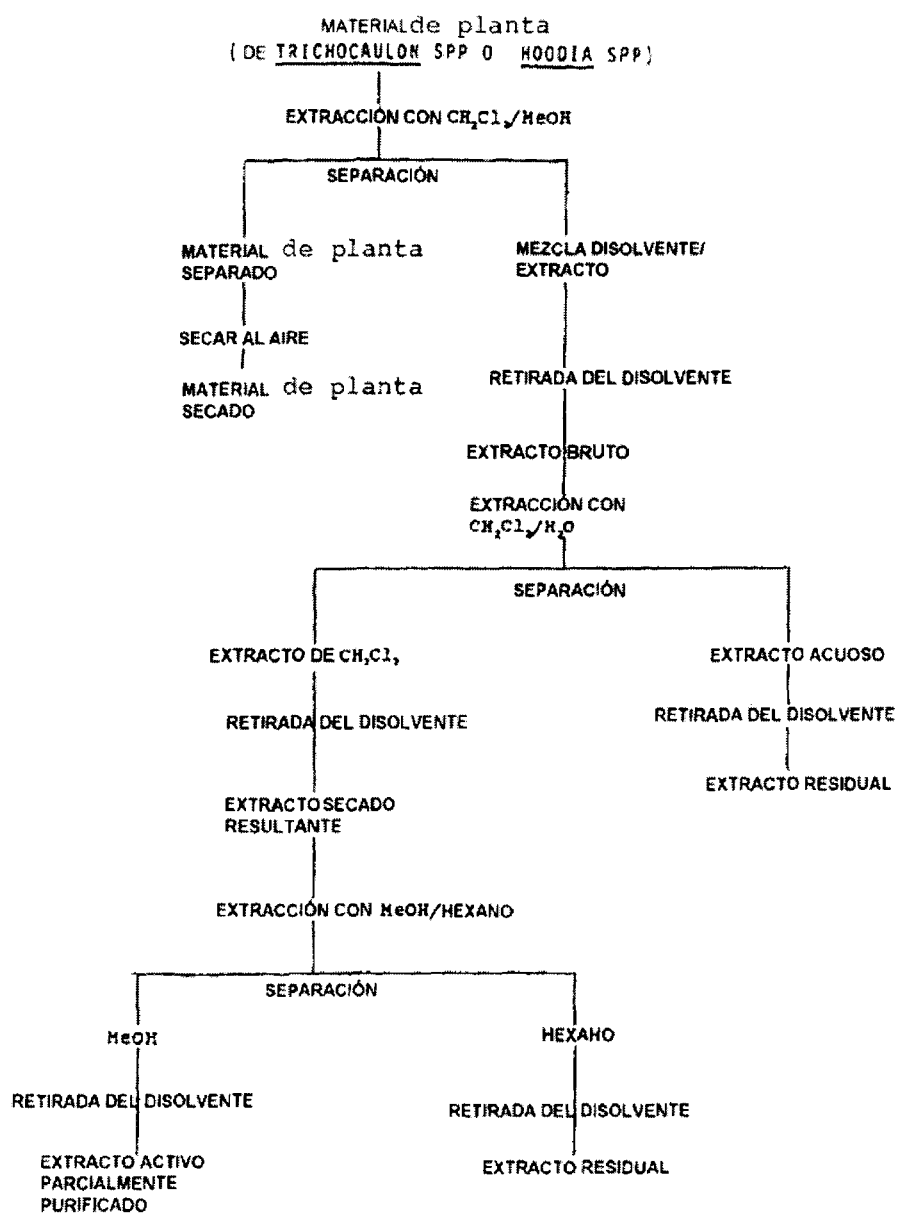


FIG 1

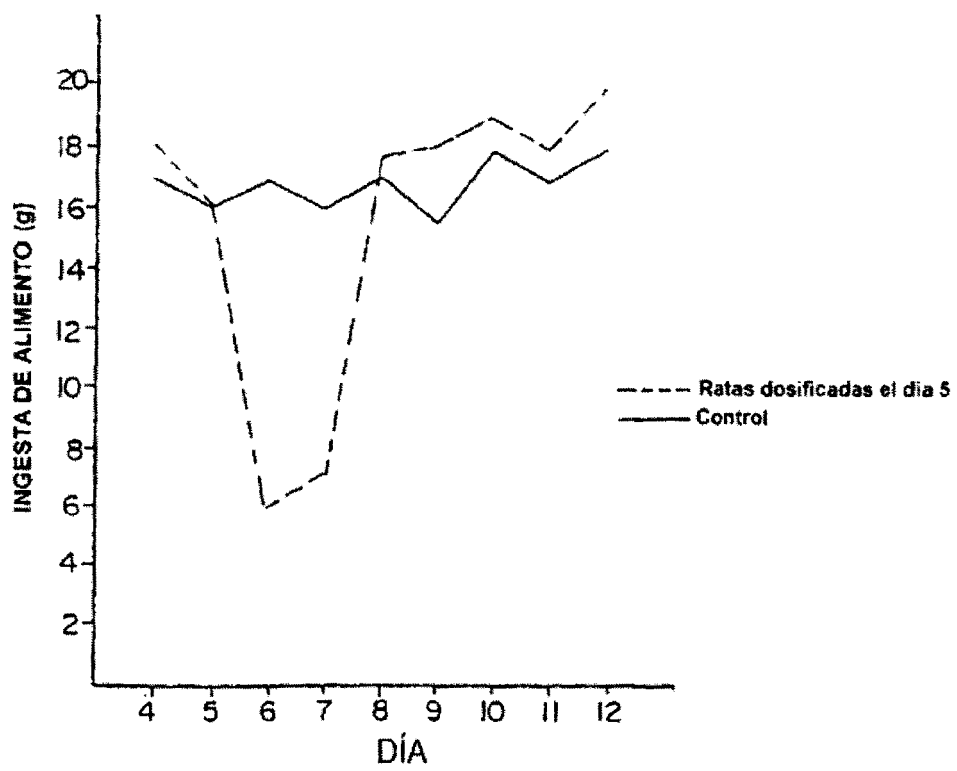


FIG 2

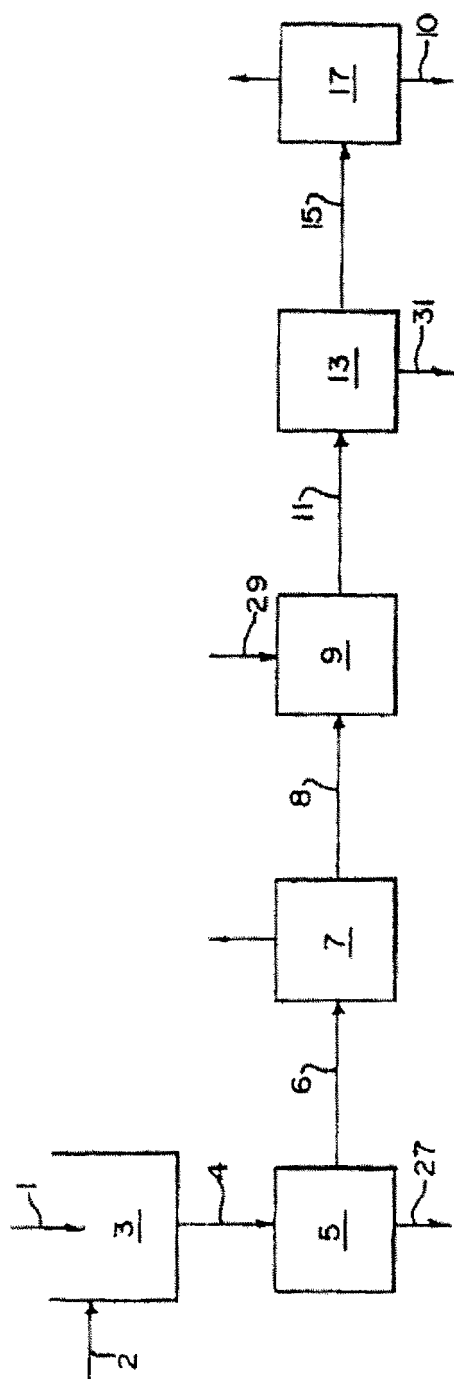


FIG 3

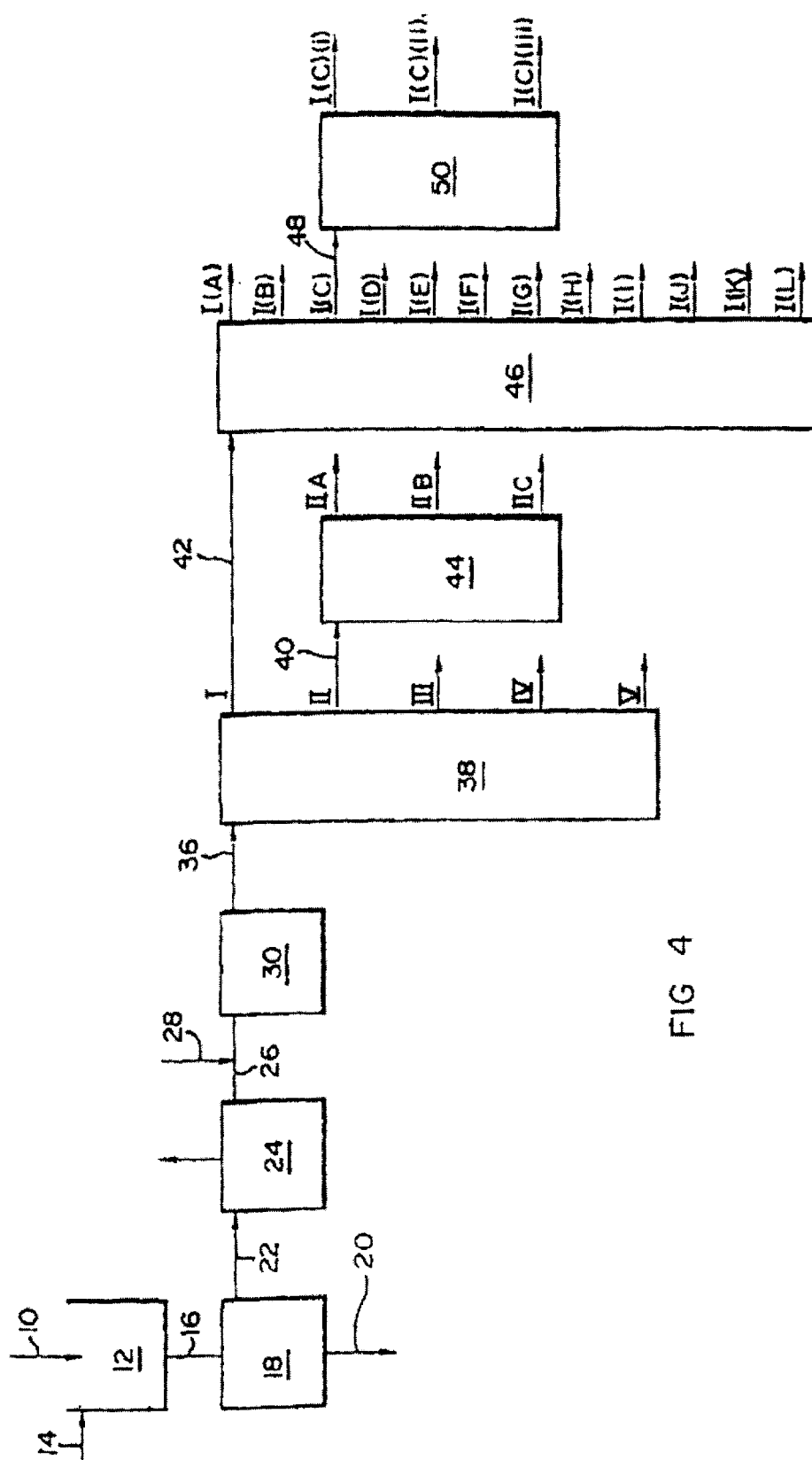


FIG 4

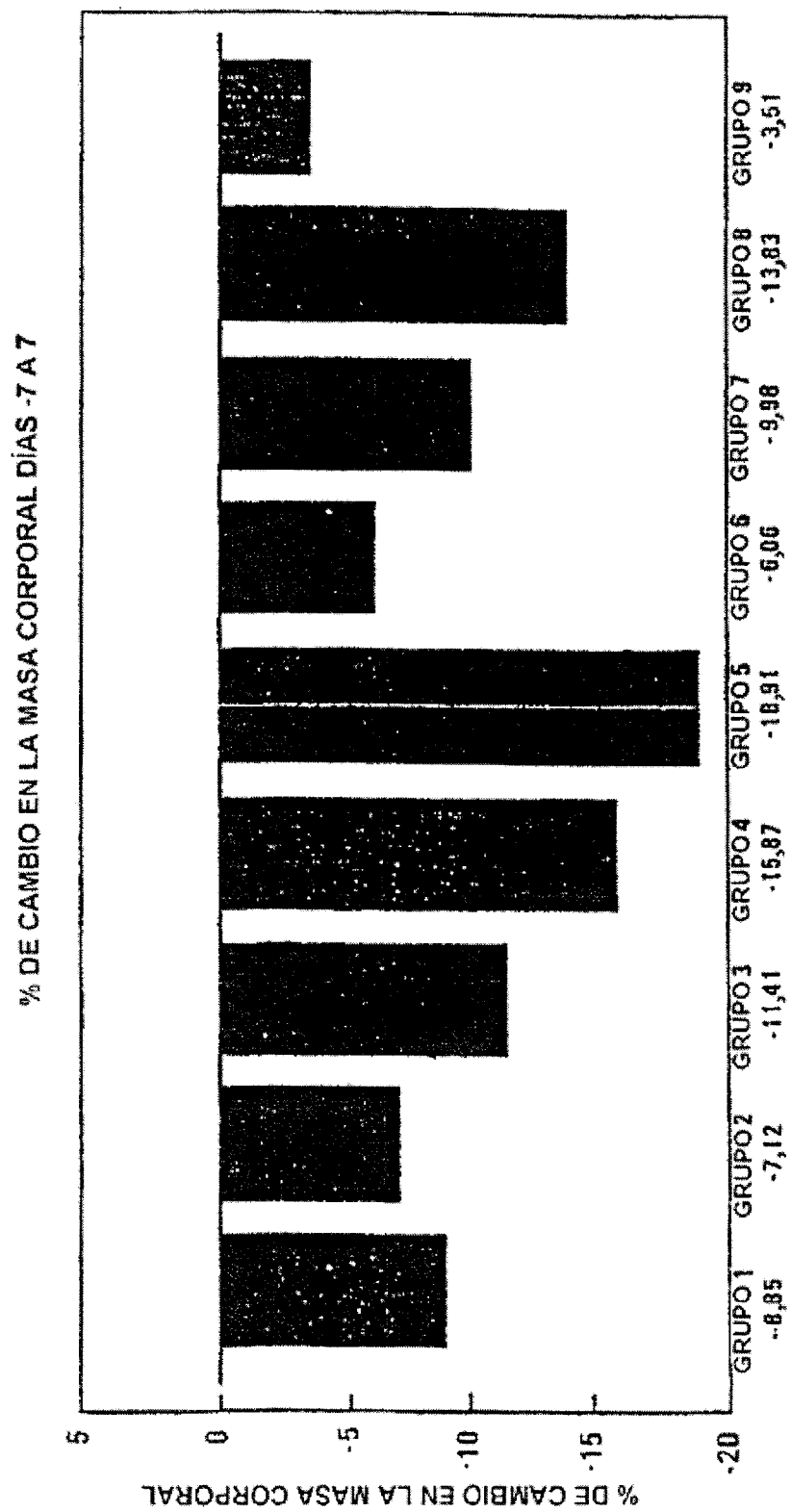


FIG 5

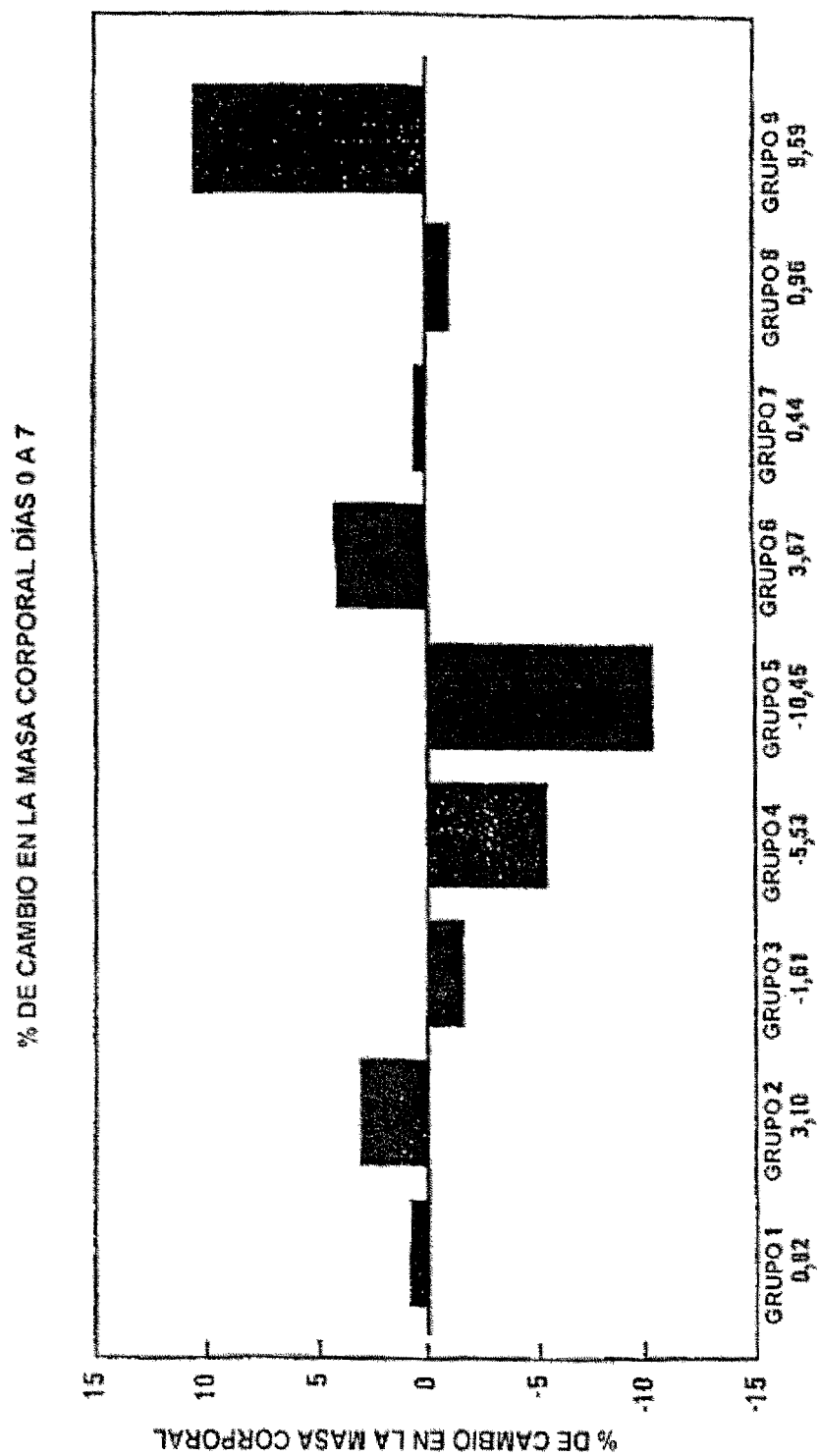


FIG 6