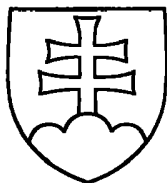


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 15.04.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 97/3201
(32) Dátum priority: 15.04.1997
(33) Krajina priority: ZA
(40) Dátum zverejnenia: 12.09.2000
(86) Číslo PCT: PCT/GB98/01100, 15.04.1998

(21) Číslo dokumentu:

1418-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7:

A 61K 35/78
C 07J 17/00
A 61K 31/58
A 61K 31/57
C 07J 15/00
C 07J 7/00

(71) Prihlasovateľ: CSIR Corporate Building, Scientia, Pretoria, ZA;

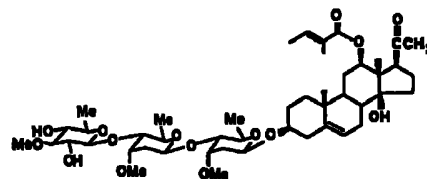
(72) Pôvodca vynálezu: Van Heerden Fanie Retief, Fairland, Johannesburg, ZA;
Vleggaar Robert, Facrie Glen, Pretoria, ZA;
Horak Roelof Marthinus, Pretoria, ZA;
Learmonth Robin Alec, Pretoria, ZA;
Maharaj Vinesh, Heuveloord, Pretoria, ZA;
Whittal Rory Desmond, Pretoria, ZA;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Farmaceutická kompozícia znižujúca chuť do jedla

(57) Anotácia:

Je opísaná farmaceutická kompozícia obsahujúca extrakt, ktorý je možné získať z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia* obsahujúcej činidlo potláčajúce chuť do jedla, majúce vzorec (1). Takisto je zahrnutý spôsob získavania extraktu a spôsob prípravy zlúčeniny (1) a jej analógov. Ďalej je opísané použitie extraktov a zlúčeniny (1) a jej analógov pri príprave liečiv majúcich aktivitu znižovania chuti do jedla a medziprodukty na prípravu zlúčeniny (1).



(1)

Farmaceutická kompozícia znižujúca chuť do jedla

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka steroidných glykozidov, kompozícií, ktoré obsahujú steroidné glykozidy a nového použitia týchto steroidných glykozidov a kompozícií, ktoré ich obsahujú. Vynález sa týka spôsobu extrakcie a izolácie týchto steroidných glykozidov z rastlinného materiálu, spôsobu syntetickej prípravy týchto steroidných glykozidov a produktov takejto extrakcie a takýchto syntetických spôsobov.

Podstata vynálezu

Predovšetkým sa prihláška vynálezu týka činidla znižujúceho chuť do jedla, spôsobu syntetickej prípravy činidla znižujúceho chuť do jedla, spôsobu extrakcie činidla znižujúceho chuť do jedla z rastlinného materiálu, kompozície znižujúcej chuť do jedla obsahujúcej činidlo znižujúce chuť do jedla a spôsobu zníženia chuti do jedla.

Predkladaný vynález poskytuje postup prípravy extraktu rastliny rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, pričom extrakt zahrnuje činidlo znižujúce chuť do jedla, postup zahrnuje stupne spracovania zozbieraného rastlinného materiálu rozpúšťadlom s cieľom extrakcie frakcií majúcich aktivitu znižujúcu chuť do jedla, separáciu extrakčného roztoku od zvyšku rastlinného materiálu, odstránenie rozpúšťadla z extrakčného roztoku a získanie extraktu. Takto získaný extrakt môže byť ďalej čistený, napríklad vhodnými rozpúšťadlovými extrakčnými postupmi.

Vynález ďalej poskytuje rastlinný extrakt pripravený zo skupiny zahrnujúcej rod *Trichocaulon* a rod *Hoodia* a majúci aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

Extrakt sa môže pripraviť z rastlinného materiálu, ako sú stonky alebo korene uvedených rastlín rodu *Trichocaulon* alebo

rodu *Hoodia*. Rod *Trichocaulon* a rod *Hoodia* sú šľavnaté rastliny rastúce vo vyprahnutých oblastiach, aké sa nachádzajú v Južnej Afrike. V jednej prihláške vynálezu sa extrakt znižujúci chuť do jedla získa z druhu *Trichocaulon piliferum*. Druh *Trichocaulon officianale* sa môže tiež použiť na ciele získania extraktu znižujúceho chuť do jedla. V ďalšej prihláške vynálezu sa extrakt znižujúci chuť do jedla môže získať z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*. Biologické skúšky uskutočnené prihlasovateľom ukázali, že niektoré tieto extrakty vykazujú aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

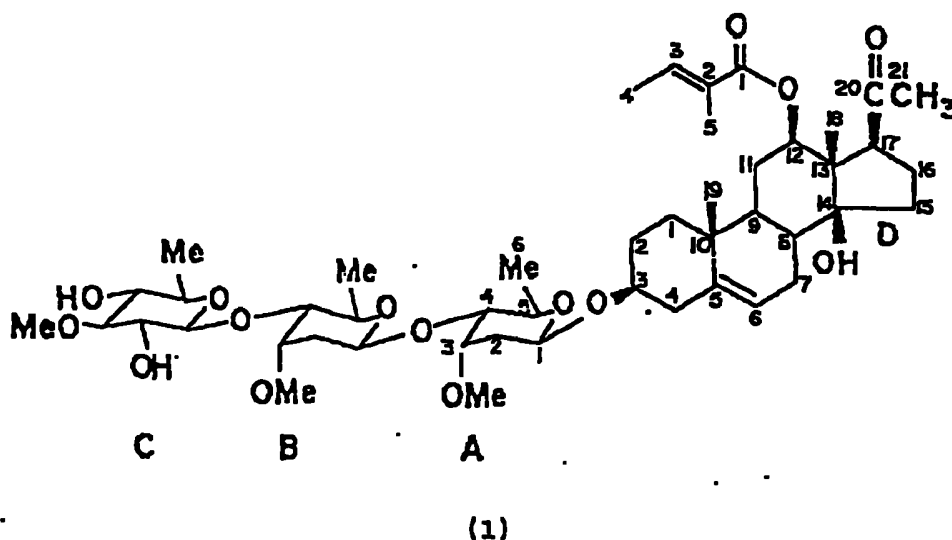
Rastlinný materiál sa môže homogenizovať v prítomnosti vhodného rozpúšťadla, ako je napríklad zmes metanolu a metylénchloridu, zariadením akým je Waringov miešač. Extrakčný roztok sa potom môže oddeliť od zvyšku rastlinného materiálu vhodnou separačnou technikou, ako napríklad filtráciou alebo odstredením. Rozpúšťadla sa môže odstrániť na rotačnej odparke, výhodne vo vodnom kúpeli pri teplote 60 °C. Oddelený surový extrakt sa môže ďalej extrahovať metylénchloridom a vodou, skôr než sa rozdelí na metylénchloridový extrakt a vodný extrakt. Metylénchloridový extrakt môže mať rozpúšťadlo, ktoré sa môže výhodne odstrániť na rotačnej odparke a výsledný extrakt sa môže ďalej čistiť extrakciou zmesou metanolu a hexánu. Extrakčný produkt z extrakcie zmesou metanolu a hexánu sa potom môže rozdeliť na metanolový extrakt a hexánový extrakt. Metanolový extrakt sa môže odpariť s cieľom odstránenia rozpúšťadla, aby sa získal čiastočne čistý aktívny extrakt.

Čiastočne čistý aktívny extrakt sa môže rozpustiť v metanole a ďalej sa môže frakcionovať stĺpcovou chromatografiou pri použití silikagélu ako adsorpčného média a zmesi chloroformu a 30% metanolu ako eluenta. Získa sa veľké množstvo rôznych frakcií a každá môže byť hodnotená vhodnou biologickou skúškou s cieľom určenia aktivity na zníženie chuti k jedlu.

Frakcie majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla sa môžu výhodne ďalej frakcionovať stĺpcovou chromatografiou na

silikagéle ako adsorpčnom médiu a rozpúšťadle 9:1 chloroform:metanol a výsledné subfrakcie sa biologicky skúšajú na aktivitu znižujúcu chuť do jedla. Subfrakcie vyznačujúce sa aktivitou znižujúcou chuť do jedla môžu byť ďalej, ak je to potrebné, frakcionované a čistené pri použití stĺpcovej chromatografie so silikagélom ako adsorpčnom médiu a zmesou etylacetátu a hexánu 9:1 ako rozpúšťadlom. Výsledné čistené frakcie môžu byť opäť hodnotené vhodnými biologickými postupmi na aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

Prihlasovateľ zistil, že aspoň jedna takáto čistená frakcia má dobrú aktivitu znižujúcu chuť do jedla a aktívna látka vo frakcii bola identifikovaná konvenčnými chemickými technikami zahrnujúcimi nukleárnu magnetickú rezonanciu a zistilo sa, že ide o zlúčeninu štruktúrneho vzorca



V súlade s nomenklatúrou S.I., aktívna látka 1 je zlúčenina 3-O-[- α -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-cymaropyranosyl]-12 α -O-tigloyloxy-14-hydroxy-14 α -pregn-5-en-20-on ($C_{47}H_{74}O_{15}$ M^+ 878).

Ďalším aspektom vynálezu je spôsob prípravy rastlinného

extraktu rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, pričom extrakt zahrnuje činidlo znižujúce chuť do jedla, postup zahrnujúci lisovanie zozbieraného rastlinného materiálu na oddelené šťavy z pevného rastlinného materiálu a získanie voľnej šťavy pevného rastlinného materiálu za vzniku extraktu.

Extrakt môže byť sušený s cieľom odstránenia vlhkosti, napríklad sušením rozprašovaním, vymrazovaním alebo vákuovým sušením za vzniku voľne tečúceho prášku.

Vynález sa ďalej týka kompozície majúcej aktivitu znižujúcu chuť do jedla zahrnujúcej extrakt, ako je popísaný vyššie.

Kompozícia môže byť zmiešaná s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom a prípadne sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

Vynález sa ďalej rozširuje na použitie extraktu, ako je popísaný vyššie, na prípravu liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla, na extrakt, ako je popísaný vyššie, ktorý sa použije ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla a na spôsob zníženia chuti k jedlu tak, že sa človeku alebo zvieratu podá účinná dávka kompozície popísanej vyššie.

Zlúčenina 1 je nová zlúčenina a vynález je rozšírený na zlúčeninu 1 a určité analógy alebo deriváty tohoto steroidného trisacharidu znižujúce chuť do jedla. Predpokladá sa, že molekuly vybrané ako analógy alebo deriváty dodávajú steroidnému trisacharidu vlastnosti zvyšujúce aktivitu aktívnej zložky. Pri výbere analógov boli brané do úvahy tieto účinky:

(i) Hydrofóbná interakcia a lipofilita

Modifikácia funkčnej skupiny aktívnej molekuly sa uskutočňuje s cieľom dosiahnutia hydrofóbnosti a lipofility molekuly. Bolo dokázané, že zvýšená lipofilita koreluje so zvýšenou biologickou aktivitou, menšou rozpustnosťou vo

vode, zvýšenou detergenciou a bunkovou lýzou, zvýšeným ukladaním v tkanivách, rýchlejším metabolizmom a elimináciou zvýšenou väzbou plazmových proteínov a rýchlejším začiatkom pôsobenia.

(ii) Elektronické vlastnosti a ionizačné konštanty

Modifikácia funkčnej skupiny sa tiež uskutočňuje s cieľom dosiahnutia zmeny kyslosti a bazicity, ktorá bude hrať hlavnú úlohu pri regulácii transportu zlúčeniny na miesta pôsobenia a pri väzbe na tomto cieľovom mieste.

(iii) Viazanie vodíka

Modifikácia funkčnej skupiny karboxylovej a karbonylovej skupiny v aktívnej molekule sa uskutočňuje s cieľom dosiahnutia zmeny interakcie medzi proteínmi v biologických systémoch a chemicky modifikovanými funkčnými skupinami.

(iv) Sterické parametre

Úlohou zmeny sterických črt molekuly je zvýšenie väzby k jej receptoru a tak zvýšenie jej biologickej aktivity.

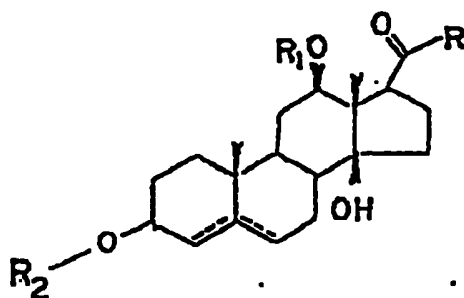
Nasledujúce chemické modifikácie sa uskutočňujú s cieľom dosiahnutia hydrofóbnosti a lipofility, elektronického viazania a sterických parametrov molekuly:

- a) Chemická modifikácia skupiny C-12 a esterovej funkčnej skupiny;
- b) Chemická modifikácia 5,6-dvojitej väzby, napríklad hydrogenácia a migrácia;
- c) Chemická modifikácia C-20 karbonylovej skupiny a C-17 acetylovej skupiny;

d) Chemická modifikácia kruhu "D" steroidného alebo aglykónového kruhu;

e) Modifikácia cukrov trisacharidovej časti.

Predkladaný vynález poskytuje zlúčeninu všeobecného vzorca



(2)

kde

R je alkyl;

R₁ je H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R₂ je H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5 alebo C5-C6.

Predkladaný vynález tiež zahrnuje zlúčeninu, ako je popísaná vyššie, kde ďalej je ďalšia väzba medzi C5-C6, R = metyl, R₁ = tigloyl, R₂ = 3-O-[- β -D-thevetopyranozyl-(1->4)- β -D-cymaropyranozyl-(1->4)- β -D-cymaropyranozyl] a kde zlúčenina má všeobecný vzorec

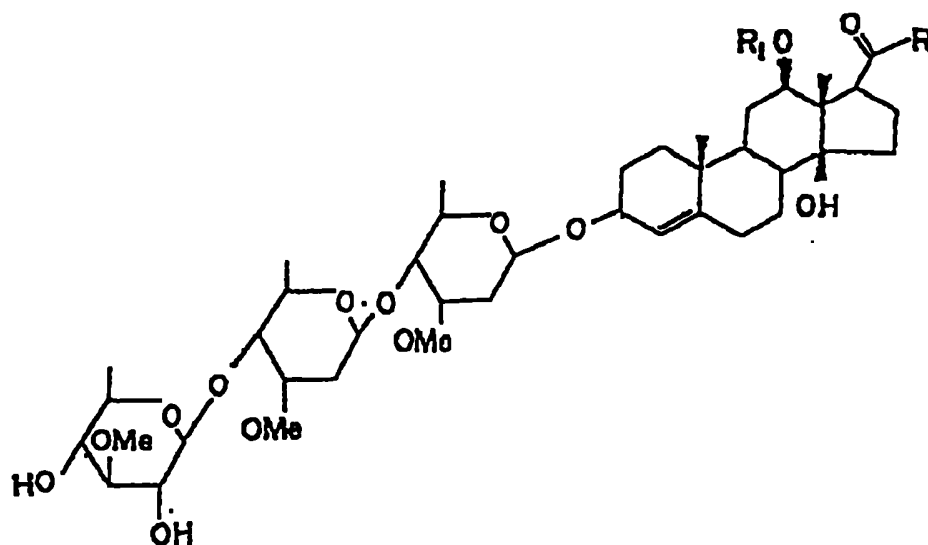


Ďalšie aktívne analógy derivátov zlúčeniny 1 znižujúce chuť do jedla podľa vynálezu sú zlúčeniny majúce nasledujúci štruktúrny vzorec



kde R = alkyl; a

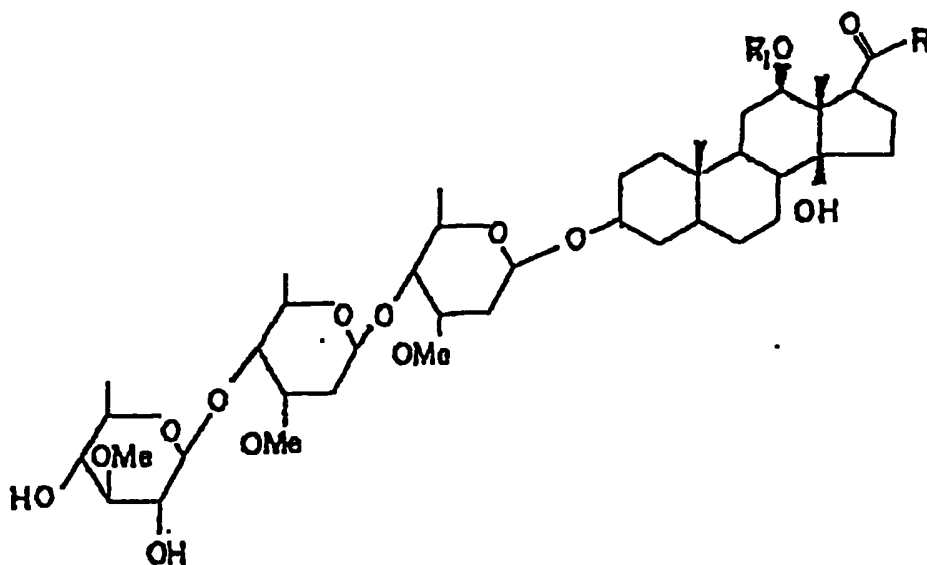
R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.



(4)

kde R = alkyl; a

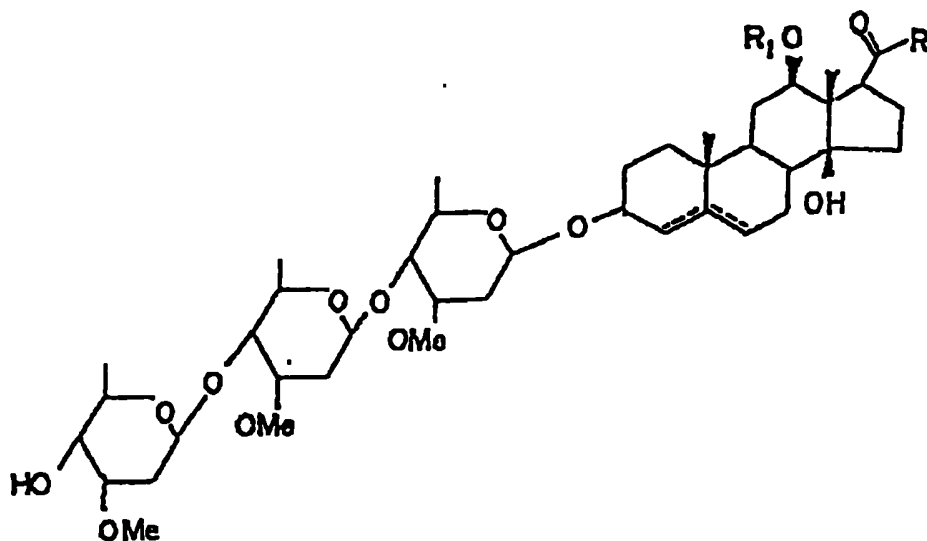
R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.



(5)

kde R = alkyl; a

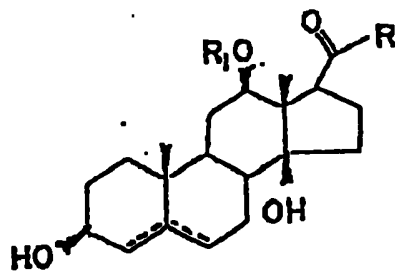
R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina,



(6)

kde R = alkyl; a

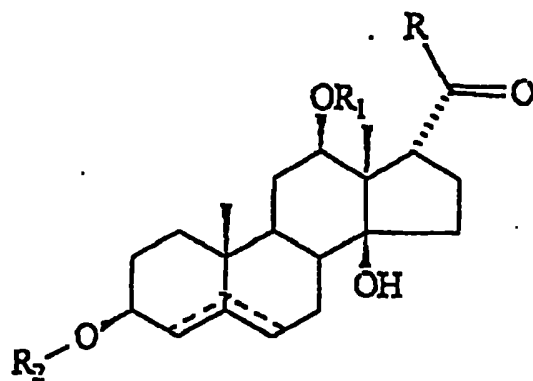
R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina,



(7)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.



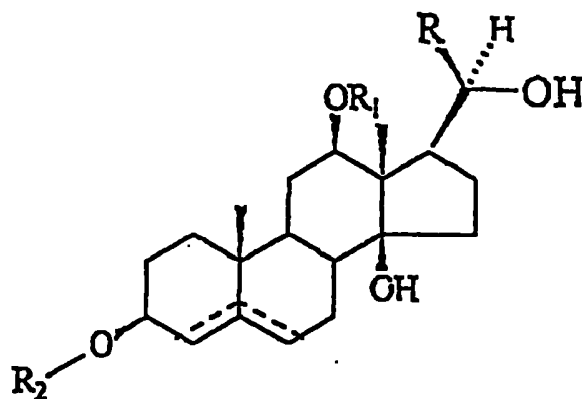
(8)

kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5 alebo C5-C6.



(9)

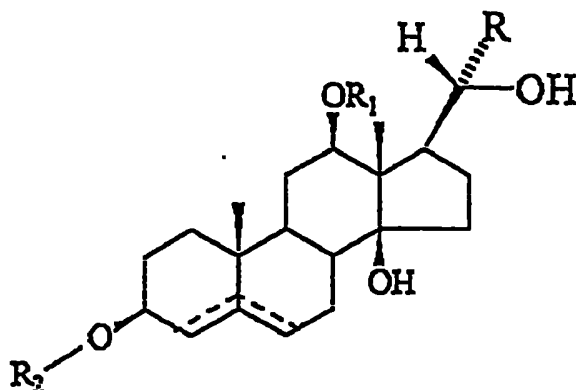
kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden

alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy
alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby
medzi C4-C5 alebo C5-C6.



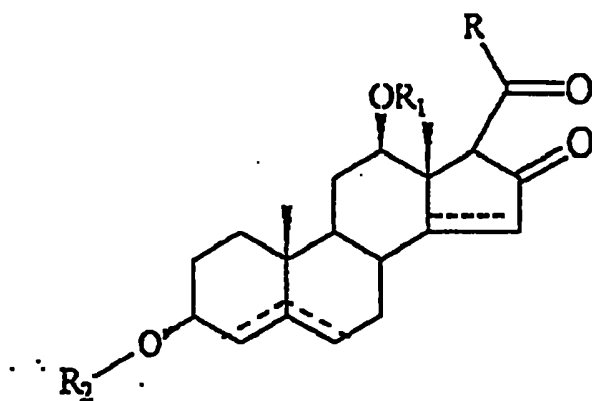
(10)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová
skupina;

R₂ = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden
alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy
alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby
medzi C4-C5 alebo C5-C6.



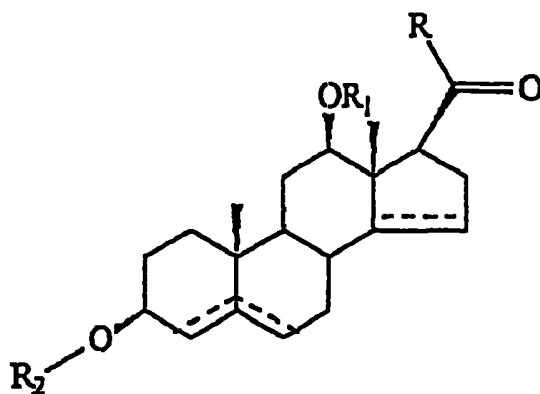
(11)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová
skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15.



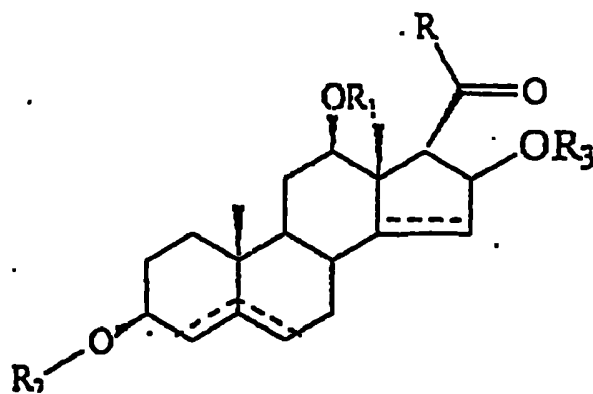
(12)

kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15.



(13)

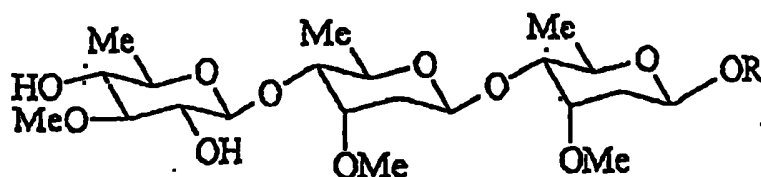
kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R₂ = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15; a

R₃ = H, alkyl, aryl, acyl alebo glukoxy.

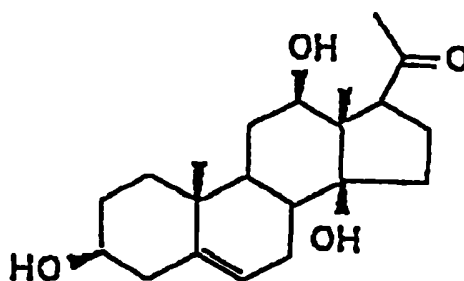


(14)

kde R = H, alkyl, aryl alebo akýkoľvek steroid majúci C14 beta hydroxylovú skupinu, C12 beta hydroxylovú skupinu a C17 acylovú skupinu, C5-C6 olefín alebo ich kombinácie.

Vynález je ďalej rozšírený na postup na syntetickú prípravu zlúčeniny majúcej aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

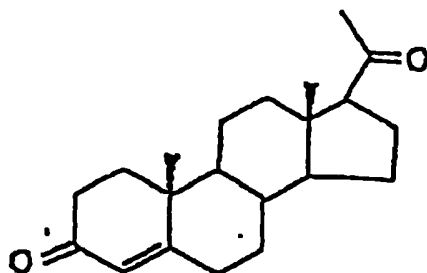
Postup používa steroid ako východiskový materiál (alebo medziprodukt alebo prekurzor), kde steroid má chemický vzorec



(15)

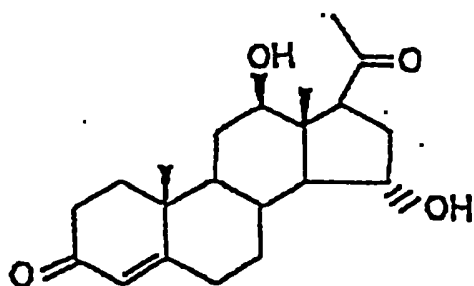
Steroid 15 sa môže pripraviť zo zlúčeniny majúcej vzorec 22, ktorý zahrnuje stupne

(i) spracovanie progesterónu majúceho vzorec



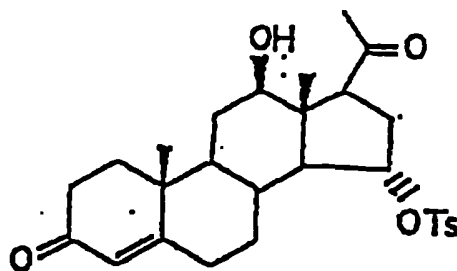
(16)

s mikroorganizmom *Calonectrica decora* za vzniku zlúčeniny 12 α ,15 α -dihydroxyprogesterónu vzorca



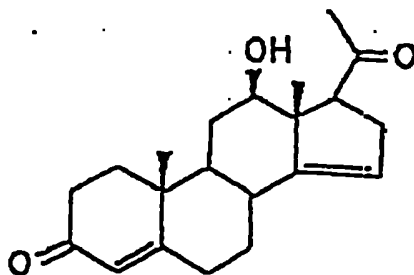
(17)

(ii) spracovanie zlúčeniny 17 tosylchloridom a pyridínom za vzniku zlúčeniny 12 α -hydroxy-15 α -(p-toluénsulfonyl)progesterón vzorca



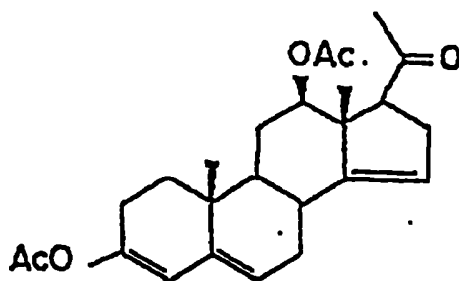
(18)

(iii) spracovanie zlúčeniny 18 s kolidínom pri teplote 150 °C za vzniku zlúčeniny 12 α -hydroxy- Δ^{14} -progesterónu vzorca



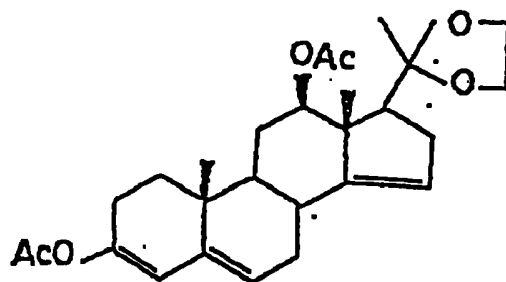
(19)

(iv) spracovanie zlúčeniny 19 s acetylchloridom a acetanhydridom pri 120 °C za vzniku zlúčeniny 3,12 α -diacetoxy-pregna-3,5,14-trien-20-ónu vzorca



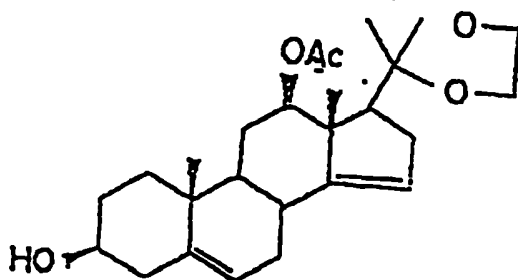
(20)

(v) spracovanie zlúčeniny 20 s etylénglykolom a katalytickým množstvom p-toluénsulfónovej kyseliny za vzniku zlúčeniny 3,12 α -diacetoxy-20,20-etyléndioxypregna-3,5,14-triénu vzorca



(21)

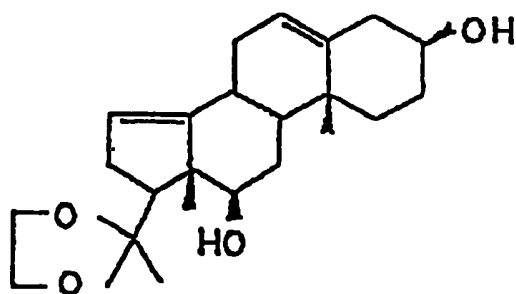
(vi) spracovanie zlúčeniny 21 s NaBH_4 za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-20, 20-etyléndioxypregna-5, 14-dién-12-acetátu vzorca



(22)

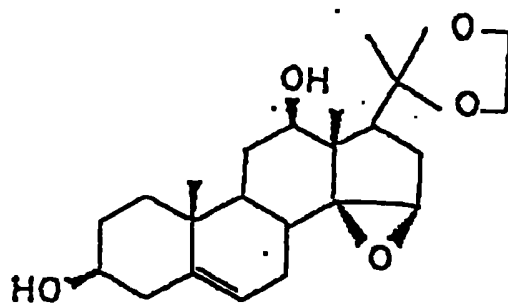
Prvý alternatívny postup prípravy steroidu 15 podľa vynálezu zahrnuje stupne:

(a) spracovanie zlúčeniny 22 s redukčným činidlom, napríklad LiAlH_4 za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-20, 20-etyléndioxy-pregna-5, 14-diénu vzorca



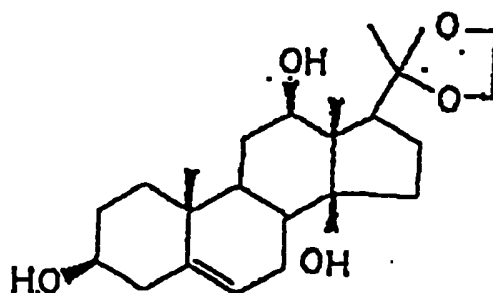
(23)

(b) spracovanie zlúčeniny 23 s N-brómacetamidom (NBA) a bázou, napríklad pyridínom, za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-14, 15-epoxy-20, 20-etyléndioxypregnen-5-énu vzorca



(24)

(c) spracovanie zlúčeniny 24 s redukčným činidlom za vzniku zlúčeniny 3a, 12a, 14a-trihydroxy-20, 20-etyléndioxypregn-5-énu vzorca



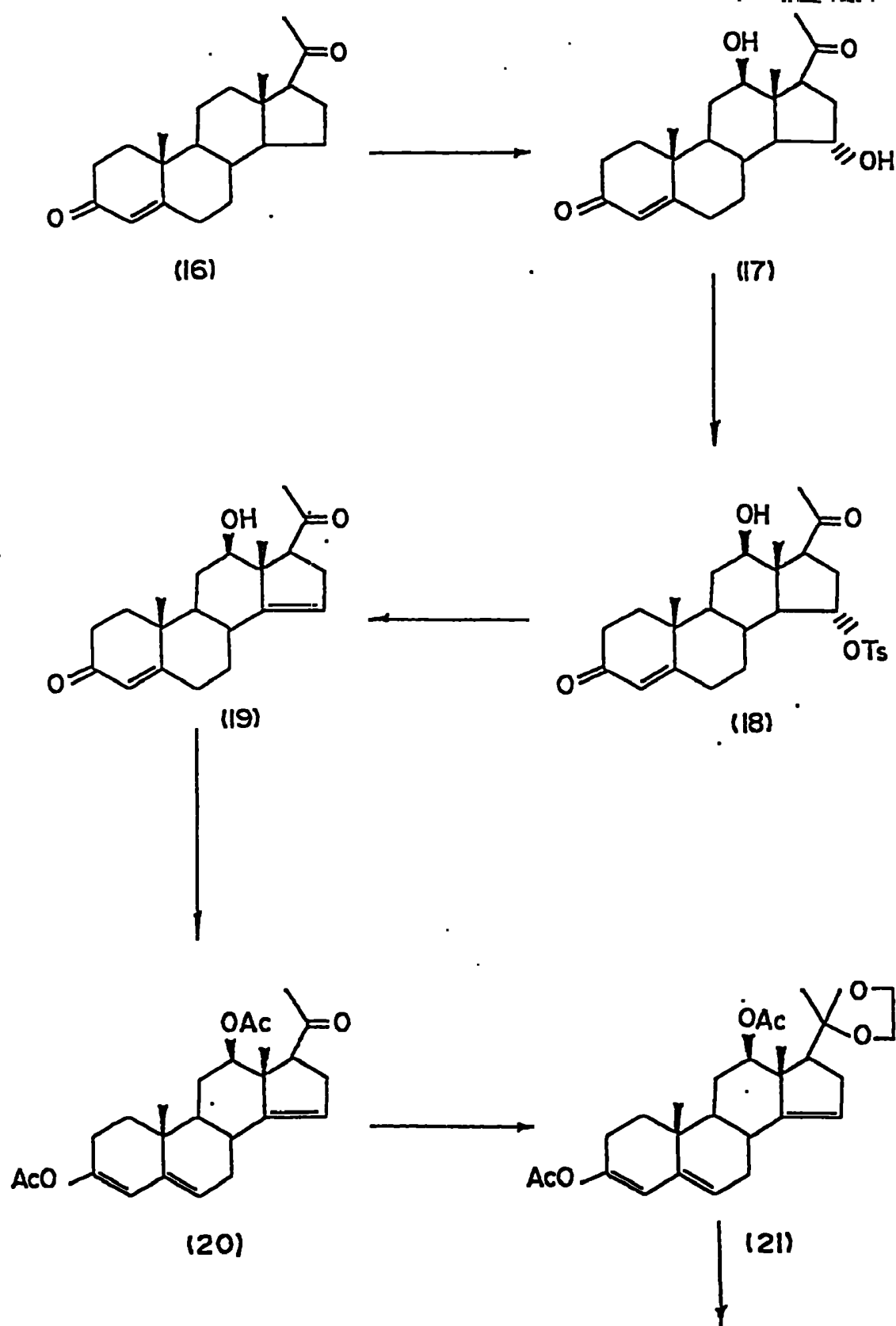
(25)

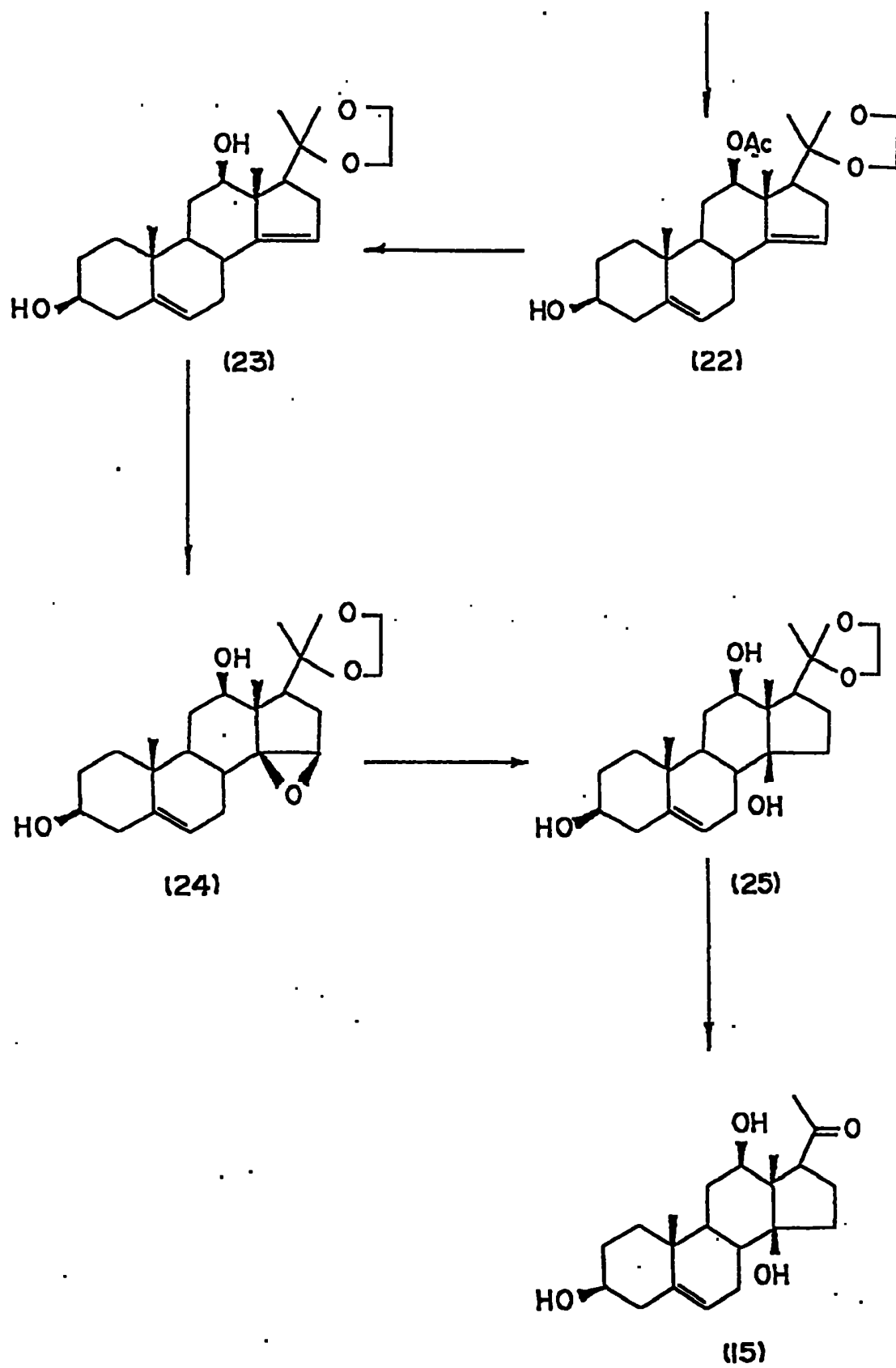
a

(d) spracovanie zlúčeniny 25 s kyselinou, napríklad kyselinou octovou, a vodou za vzniku steroidnej zlúčeniny 15, 3a, 12a, 14a-trihydroxypregn-5-énu.

Reakčná schéma A zobrazuje postup prípravy steroidného medziproduktu 15 zo zlúčeniny 22 podľa "prvého alternatívneho postupu" podľa vynálezu (a zahrnuje prípravu zlúčeniny 22 zo zlúčeniny 16 na ilustratívne ciele).

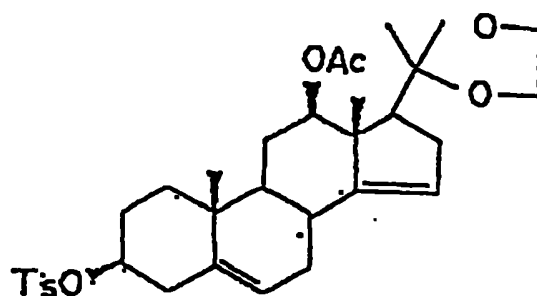
Reakčná schéma A





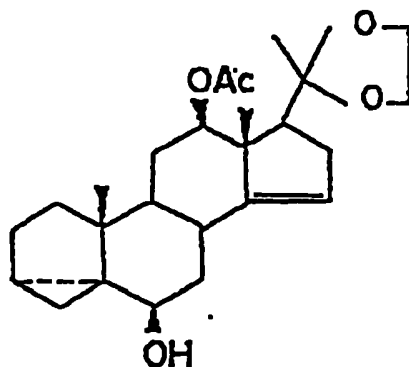
V druhom alternatívnom postupe prípravy steroidu 15 podľa vynálezu postup zahŕňa štupne:

(a) spracovanie zlúčeniny 22 (3 α ,12 α -dihydroxy-20,20-etyléndioxypregna-5,14-dién-12-acelát) s p-toluénsulfonylchloridom a bázou, napríklad pyridínom, za vzniku zlúčeniny 3 α ,12 α -dihydroxy-20,20-etyléndioxypregna-5,14-diéni-3-tosyl-12-acelátu vzorca:



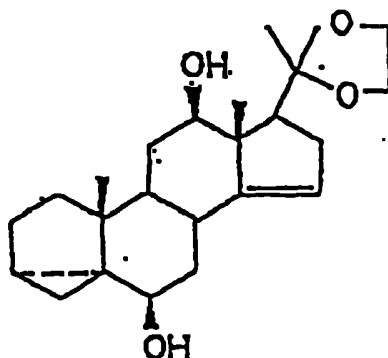
(26)

(b) spracovanie zlúčeniny 26 octanom draselným v rozpúšťadle, napríklad acetóne, za vzniku zlúčeniny 6 α ,12 α -dihydroxy-20,20-etyléndioxy-3,5 α -cyklopregnan-14-én-12-acelátu vzorca



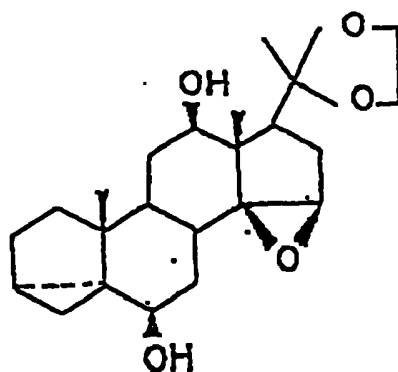
(27)

(c) spracovanie zlúčeniny 27 s redukčným činidlom, napríklad LiAlH₄, a napríklad tetrahydrofuránom, za vzniku zlúčeniny 6 α ,12 α -dihydroxy-20,20-etyléndioxy-3,5 α -cyklopregnan-14-énu vzorca



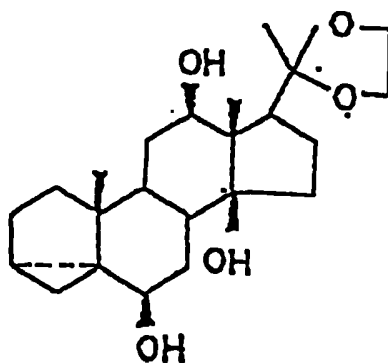
(28)

(d) spracovanie zlúčeniny 28 s N-brómacetamidom, prípadne kyselinou octovou a bázou, napríklad pyridínom, za vzniku zlúčeniny 6a, 12a-dihydroxy-20, 20-etyléndioxy-14, 15-epoxy-3, 5α-cyklopregnánu vzorca



(29)

(e) spracovanie zlúčeniny 29 s redukčným činidlom, napríklad LiAlH_4 , a napríklad tetrahydrofuránom, za vzniku zlúčeniny 6a, 12a, 14a-trihydroxy-20, 20-etyléndioxy-3, 5α-cyklopregnánu vzorca



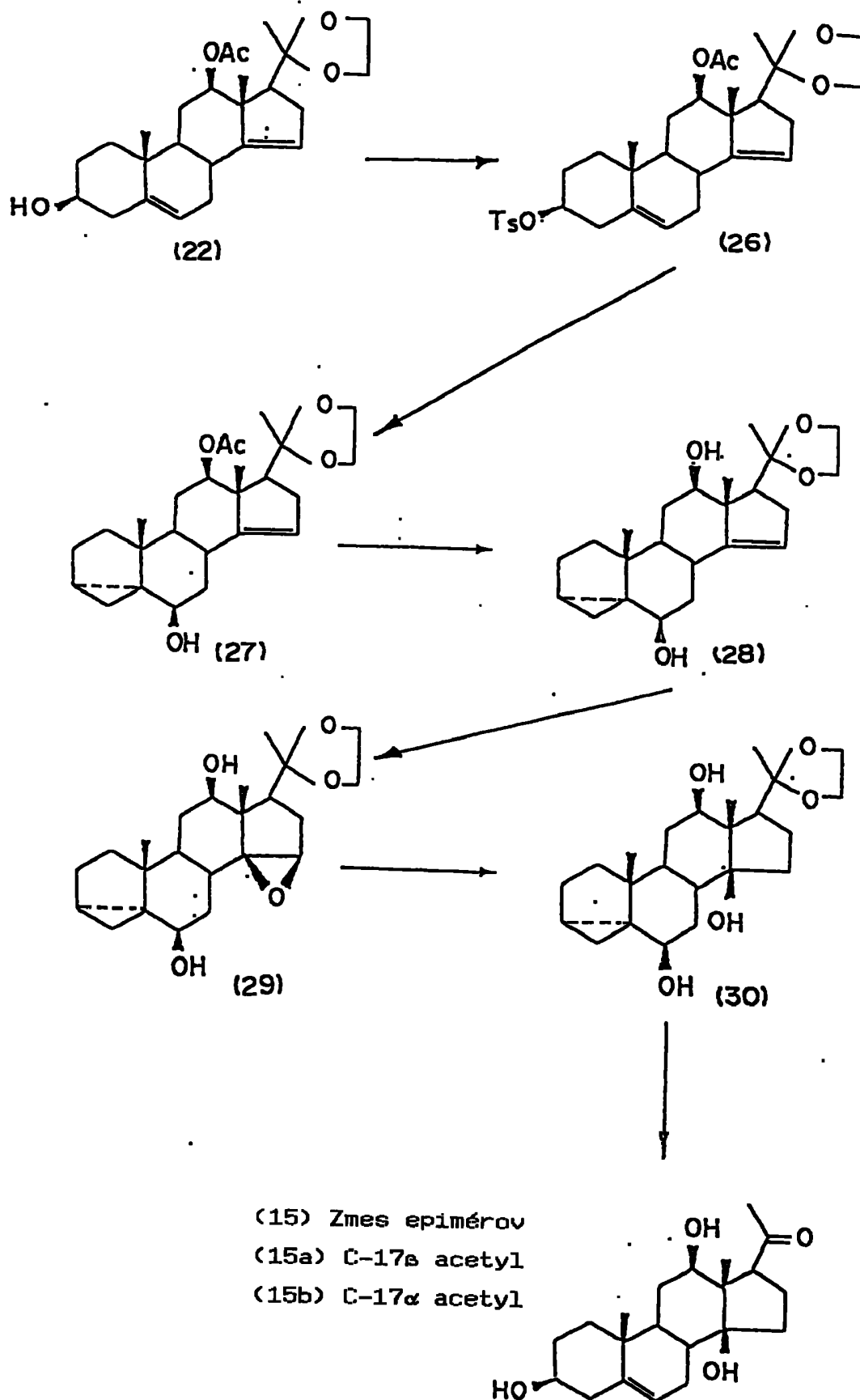
(30)

a

(f) spracovanie zlúčeniny 30 s kyselinou, napríklad kyselinou chlorovodíkovou, a rozpúšťadlom, napríklad acetónom, za vzniku zlúčeniny 15.

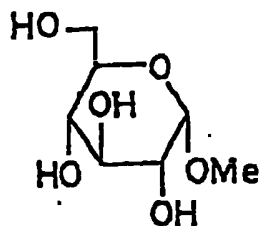
Reakčná schéma B zobrazuje postup prípravy medziproduktu 15 zo zlúčeniny 22 podľa "druhého alternatívneho postupu" podľa vynálezu.

Reakčná schéma B



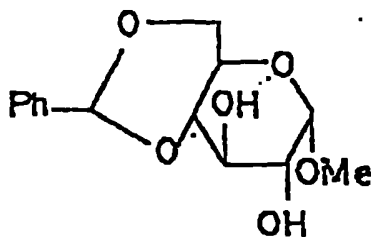
Zlúčenina 1 sa môže pripraviť syntézou z prvého karbohydrátového medziproduktu vo forme aktivovanej monosacharidov cymarozovej časti, ktorá sa môže pripraviť zo zlúčeniny majúcej vzorec 36. Zlúčenina 36 sa môže pripraviť podľa postupu, ktorý zahrnuje stupne:

(i) spracovanie α -D-metyl-glukózy majúcej vzorec



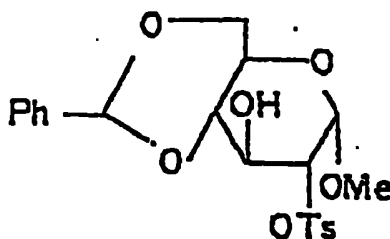
(31)

s benzaldehydom a chloridom zinočnatým za vzniku zlúčeniny metyl-4,6-benzylidén- α -D-glukopyranozidu vzorca



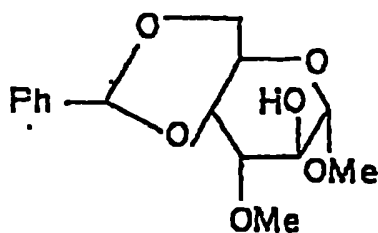
(32)

(ii) spracovanie zlúčeniny 32 s tosylchloridom a pyridínom pri teplote 0 °C za vzniku zlúčeniny metyl-4,6-O-benzylidén-2-O-tosyl- α -D-glukopyranozidu vzorca



(33)

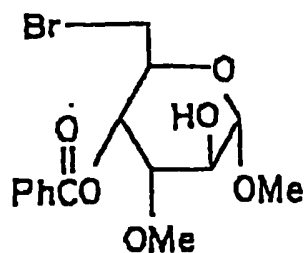
(iii) spracovanie zlúčeniny 33 s NaOMe pri teplote 100 °C za vzniku zlúčeniny metyl-4,6-O-benzylidén-3-O-metyl- α -D-metylpyranozidu vzorca



(34)

a

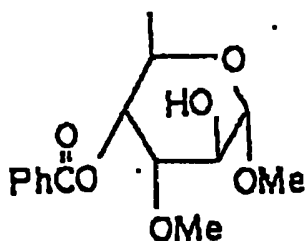
(iv) spracovanie zlúčeniny 34 s N-brómsukcínimidom (NBS) za vzniku zlúčeniny metyl-6-bróm-4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-altropyranozidu vzorca



(35)

a

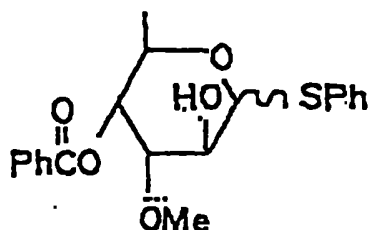
(v) spracovanie zlúčeniny 35 s NaBH₄ a NiCl₂ za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-altropyranozidu vzorca



(36)

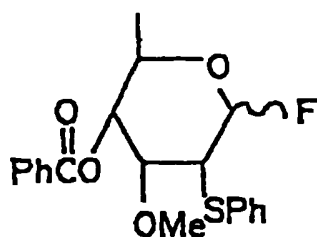
Vynález je ďalej rozšírený na spôsob prípravy karbohydrátového medziproduktu vo forme aktivovanej monosacharidovej cymarózovej časti, ktorý zahŕňa stupne

(i) spracovanie zlúčeniny 36 s PhSSiMe_3 , ZnI_2 a Bu_4^+I^- za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-fenyltioaltrozidu vzorca



(37)

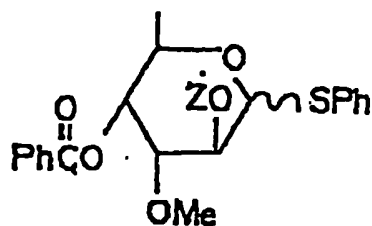
(ii) prípadne spracovanie zlúčeniny 37 s dietylaminosulfurtrifluoridom (DAST), napríklad pri 0 °C, za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-fenyltio-2,6-dideoxy- α -D-fluórcymaropyranozidu vzorca



(38)

alebo

(iii) prípadne spracovanie zlúčeniny 37 s terc.butylsilylchloridom a imidazolom v rozpúšťadle, napríklad pyridíne, za vzniku 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-terc.butylsilyl- α -D-fenyltioaltrozidu vzorca

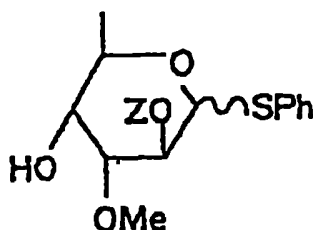


(39)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl);

a

(iv) spracovanie zlúčeniny 39 s bázou, napríklad metoxidom sodným, za vzniku 3-O-metyl-2-O-terc.butyldimetylsilyl- α -D-fenylaltrozidu vzorca

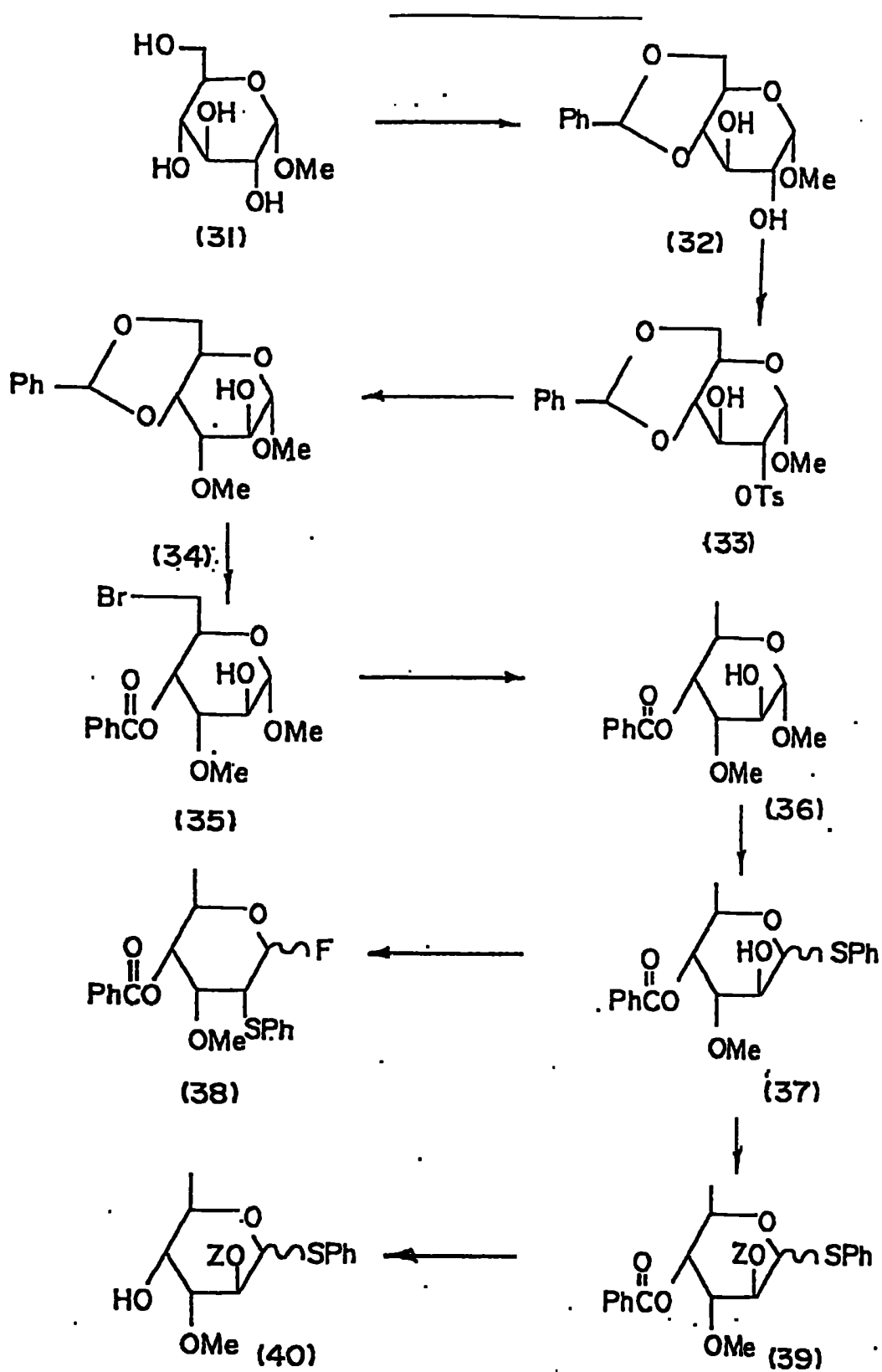


(40)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl).

Reakčná schéma C zobrazuje postup prípravy aktivovanej monosacharidovej cymarózovej časti 40 zo zlúčeniny 36 podľa vynálezu (a zahrnuje prípravu zlúčeniny 36 zo zlúčeniny 31 na ilustratívne ciele).

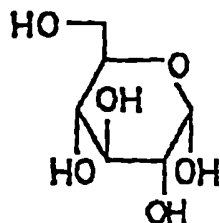
Reakčná schéma C



Z = t-butyldimetylsilyl

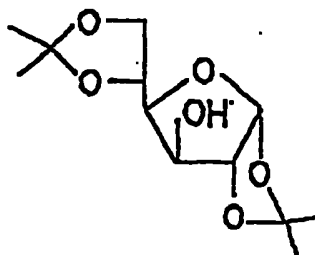
Syntéza zlúčeniny 1 môže tiež zahrňovať druhý karbohydrátový medziprodukt vo forme aktivovanej monosacharidovej thevetozovej časti, ktorá sa môže pripraviť zo zlúčeniny vzorca 47. Zlúčenina 47 sa môže pripraviť postupom, ktorý zahrnuje stupne:

(i) spracovanie α -D-glukózy vzorca



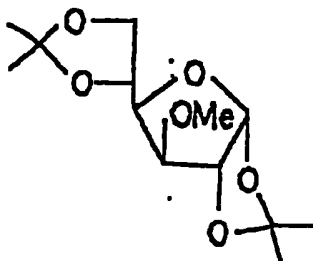
(41)

s acetónom a kyselinou sírovou za vzniku zlúčeniny 1,2:5,6-di-O-izopropylidén- α -D-glukofuranózy vzorca



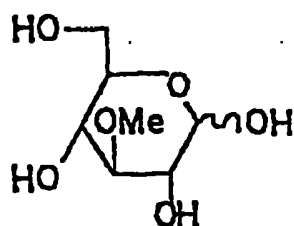
(42)

(ii) spracovanie zlúčeniny 42 s NaH a MeI za vzniku zlúčeniny 1,2:5,6-di-O-izopropylidén-3-O-metyl- α -D-glukofuranózy vzorca



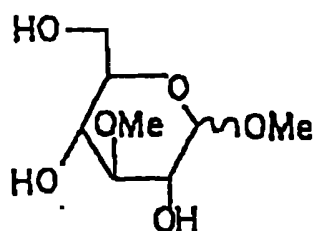
(43)

(iii) spracovanie zlúčeniny 43 s kyselinou octovou za vzniku zlúčeniny 3-O-metyl- α -D-glukopyranózy vzorca



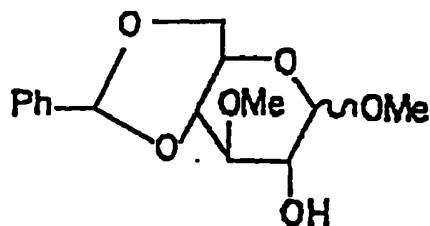
(44)

(iv) spracovanie zlúčeniny 44 s metanolom a kyselinou chlorovodíkovou za vzniku zlúčeniny metyl-3-O-metyl- α -D-glukopyranozidu vzorca



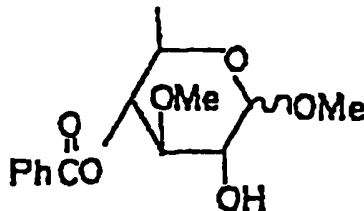
(45)

(v) spracovanie zlúčeniny 45 s benzaldehydom a chloridom zinočnatým za vzniku zlúčeniny metyl-4,6-O-benzylidén-3-O-metyl- α -D-glukopyranozidu vzorca



(46)

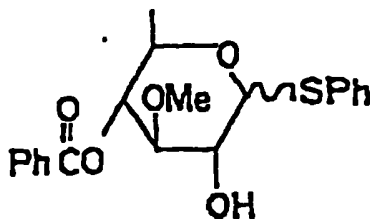
(vi) spracovanie zlúčeniny 46 s N-brómsukcínamidom, chloridom nikelnatým a roztokom borohydridu za vzniku zlúčeniny metyl-4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -glukopyranozidu vzorca



(47)

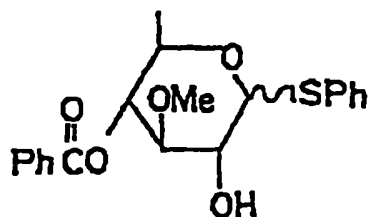
Vynález je ďalej rozšírený na spôsob prípravy aktivovanej monosacharidovej thevetozovej časti, ktorý zahrnuje stupne:

(i) spracovanie zlúčeniny 47 s fenyltiotrimetylsilánom a trimetylsilyltrifluórmétánsulfonátom za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -glukopyranozidu vzorca



(48)

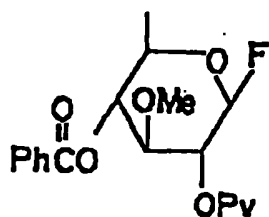
(ii) spracovanie zlúčeniny 48 s pivaloylchloridom a rozpúšťadlom, napríklad pyridínom, za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -glukopyranozidu vzorca



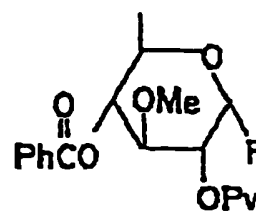
(49)

a

(iii) spracovanie zlúčeniny 49 s bromačným činidlom, napríklad N-brómsulcínimidom, a dietylaminosulfurtrioxidom za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fluór-6-deoxy- α -glukopyranozidu, ktorý sa vyskytuje ako stereoizoméry majúce vzorce



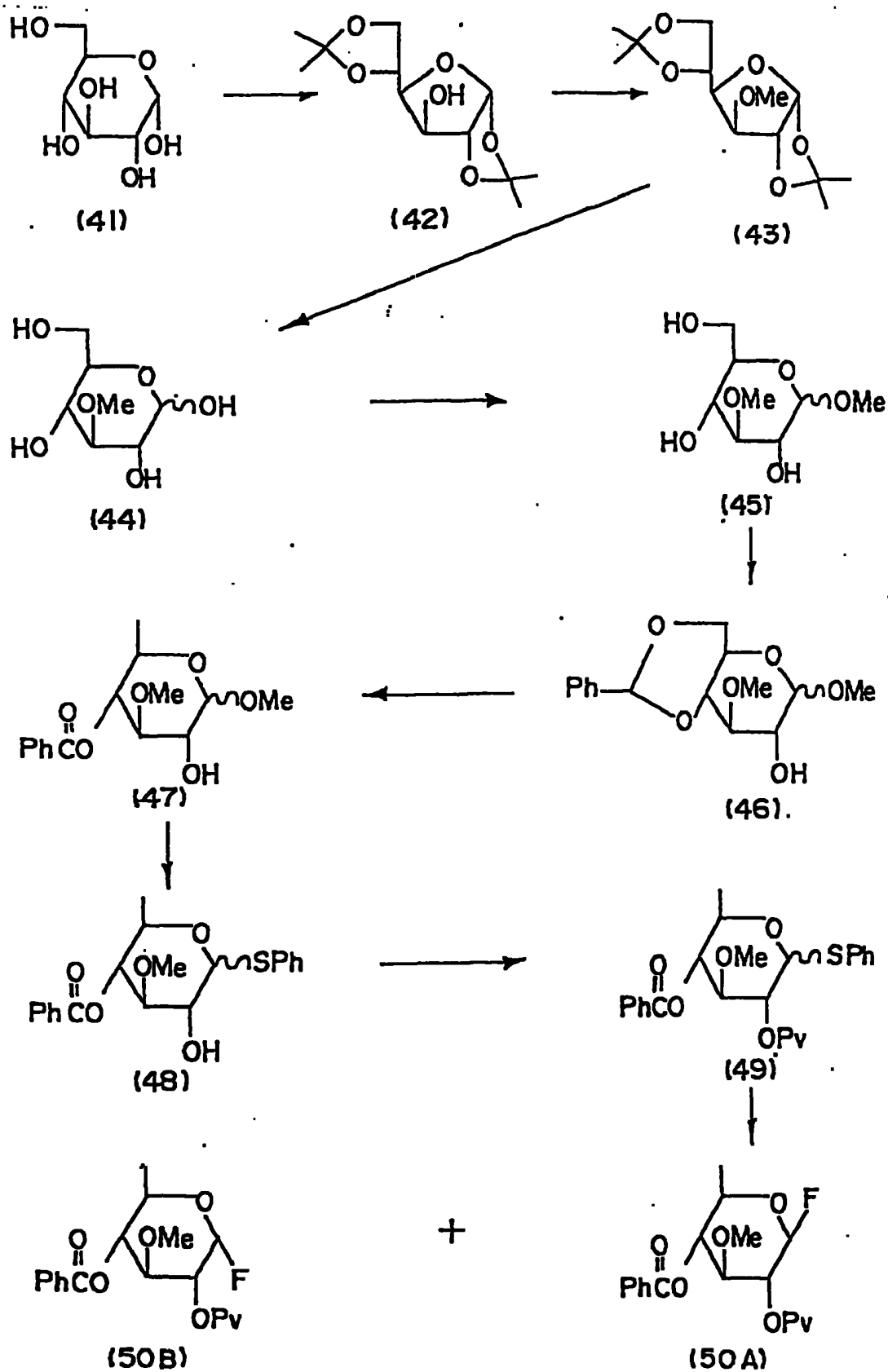
(50 A)



(50 B)

Reakčná schéma D znázorňuje postup prípravy aktivovanej monosacharidovej thevetozovej časti 50A a 50B zo zlúčeniny 48 podľa vynálezu (a zahrnuje prípravu zlúčeniny 47 zo zlúčeniny 41 na ilustratívne ciele).

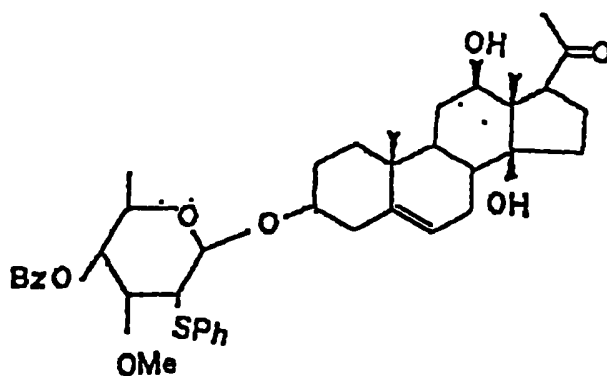
Reakčná schéma D



Podľa ďalšieho aspektu vynález poskytuje postup syntetickej prípravy zlúčeniny vzorca 1, jej analogických derivátov, ktorý zahŕňa postup syntézy vhodného steroidného medziproduktu alebo prekursora a kopuláciu požadovaného čísla vhodných monosacharidov so steroidným medziproduktom.

Vynález tiež poskytuje spôsob kopulácie monosacharidovej cymarózy so steroidným medziproduktom, ktorý zahŕňa postup:

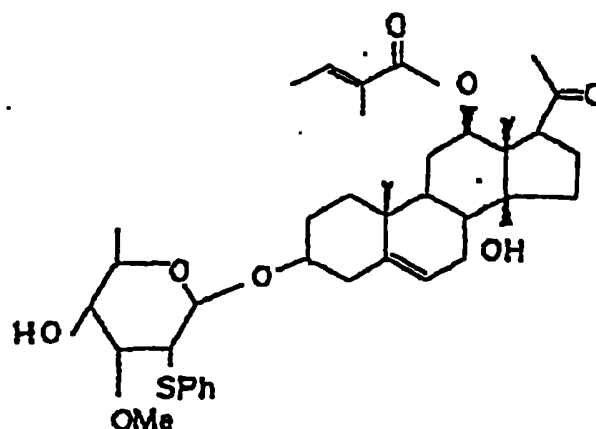
(i) reakciu cymarózovej časti vzorca 38 so steroidným medziproduktom vzorca 15, napríklad pri teplote -15°C v prítomnosti chloridu cínu v rozpúšťadle, napríklad éteri, za vzniku zlúčeniny 3-O-[4-O-benzoyl-2-fenyltio- α -D-cymaropyranozyl]-12,14- α -dihydroxypregnan-5-en-20-ónu vzorca



(51)

a

(ii) spracovanie zlúčeniny 51 s chloridom tiglovej kyseliny v pyridíne a potom s bázou, napríklad NaOMe, za vzniku zlúčeniny 3-O-[2-fenyltio- α -D-cymaropyranozyl]-12 α -tigloyl-oxy-14-hydroxy-14 β -pregn-5-en-20-ónu vzorca

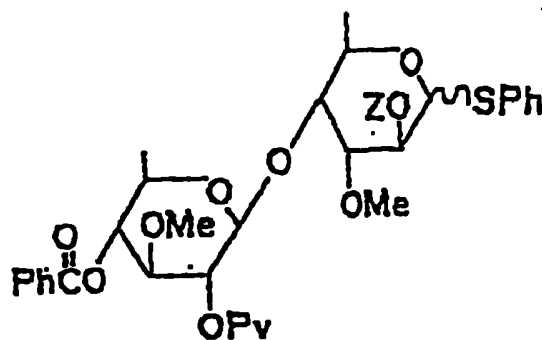


(52)

Vynález je ďalej rozšírený na spôsob, ktorý zahŕňa kopuláciu monosacharidovej cymarózovej časti na monosacharid-thevetozovú časť a kopuláciu vzniknutého disacharidu s kombinovaným steroidným produktom 52 za vzniku zlúčeniny 1.

Kopulácia monosacharidovej cymarózovej časti na monosacharidovú thevetozovú časť a kopulácia vzniknutého disacharidu na kombinovaný steroidný produkt 52 môže zahŕňať stupne:

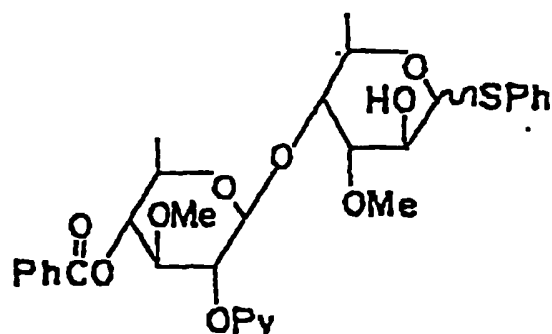
(1) kopulácia selektívne chránenej cymarózovej časti vzorca 40 a selektívne chránenej thevetozovej časti 50. A pri použití chloridu cínateho (SnCl_2) a trifluórmétánsulfonátu strieborného, napríklad pri -15°C , za vzniku zlúčeniny vzorca



(53)

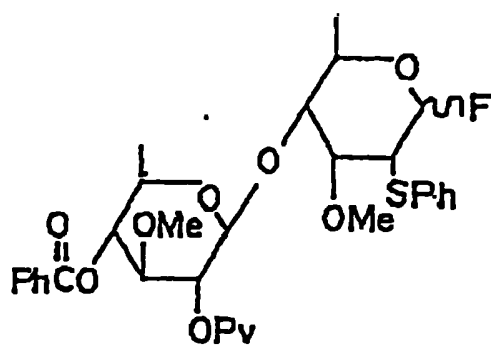
kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl)

(ii) spracovanie zlúčeniny 53 s tetrabutylamóniumfluoridom za vzniku zlúčeniny vzorca



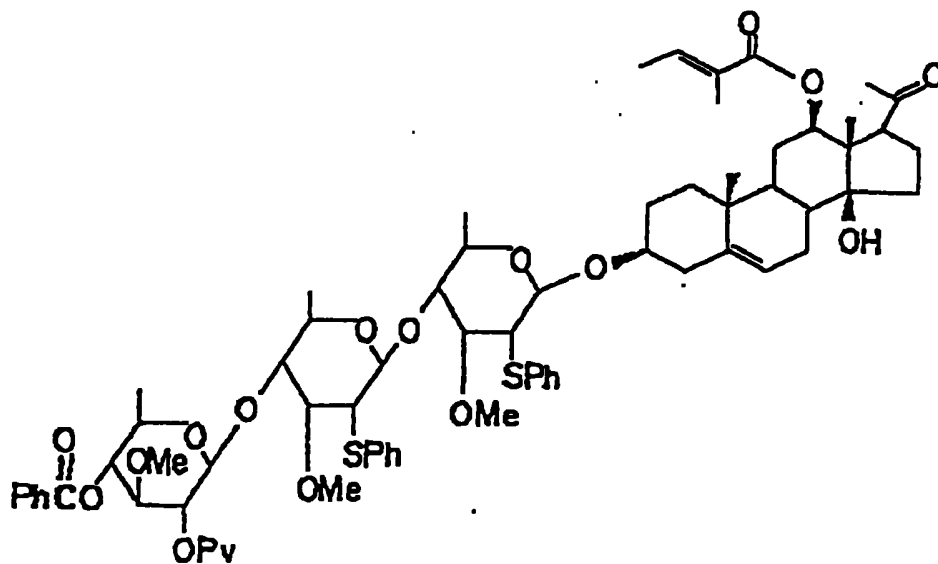
(54)

(iii) spracovanie zlúčeniny 54 s dietylamínosulfurtrifluoridom, napríklad pri 0 °C, za vzniku zlúčeniny vzorca



(55)

(iv) reakciu zlúčeniny 55 so zlúčeninou 52 za vzniku zlúčeniny vzorca



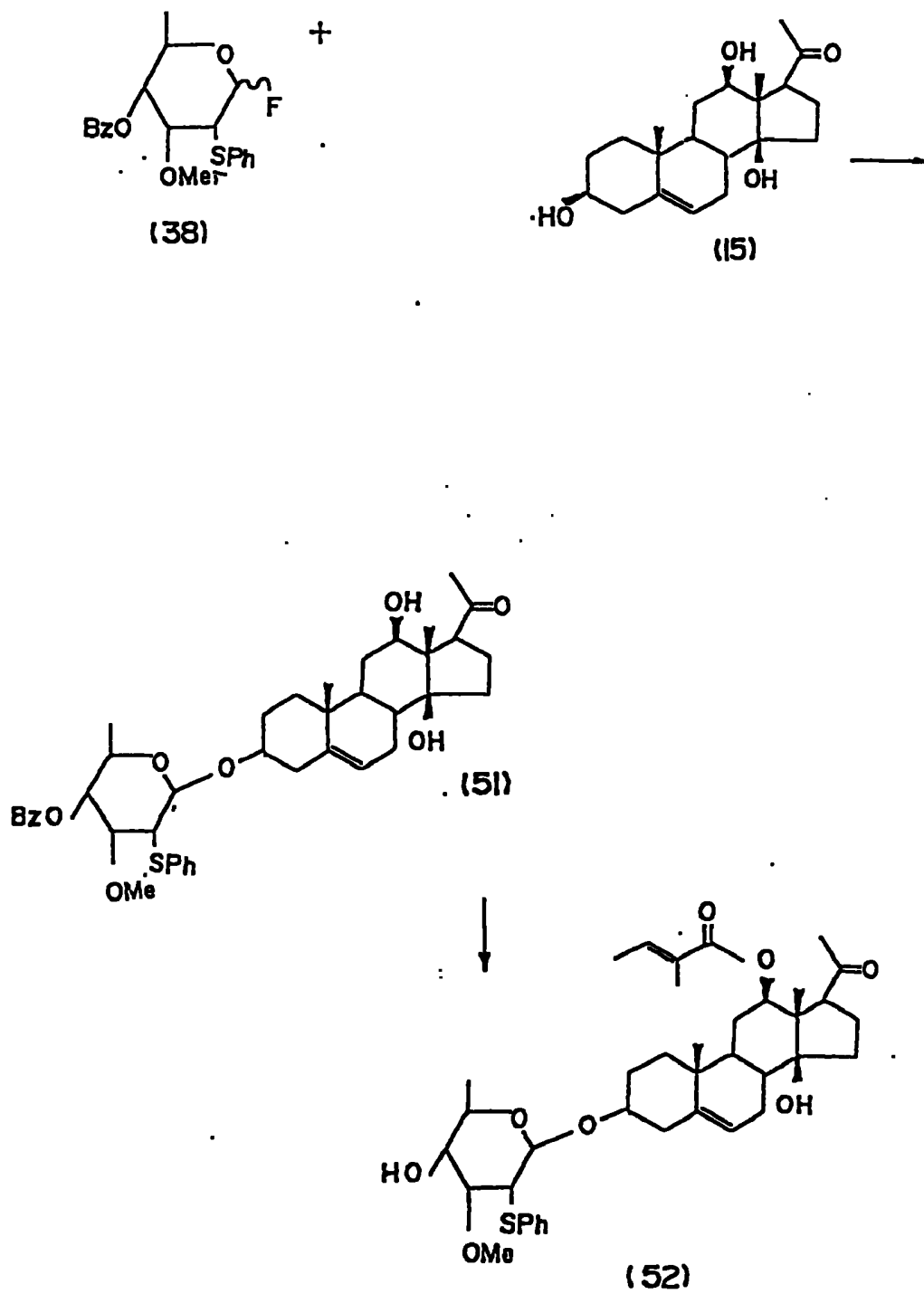
(56)

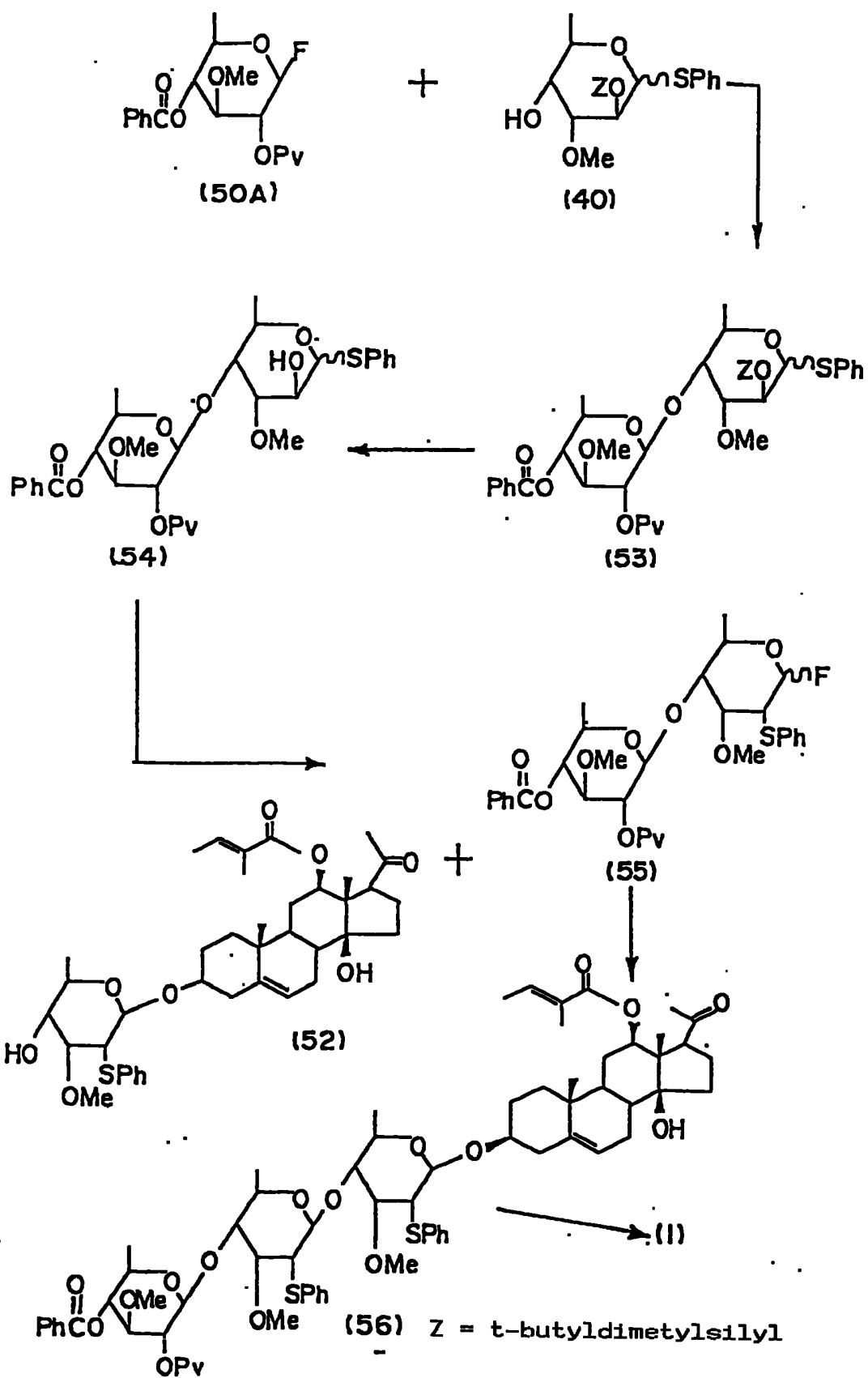
a

(V) spracovanie zlúčeniny 56 Raney-niklovou reakciou a potom s bázou, napríklad NaOMe, za vzniku zlúčeniny 1, ako je popísané vyššie.

Reakčná schéma E znázorňuje postup syntézy medziproduktov 52 a 55 a ich kopuláciu za vzniku zlúčeniny 56.

Reakčná schéma E

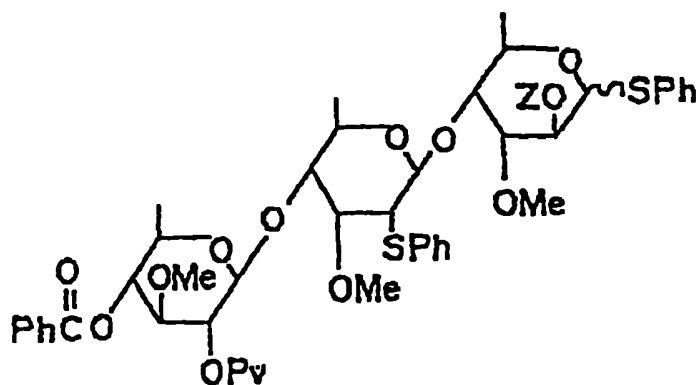




Podľa vynálezu alternatívny spôsob zahrnuje kopuláciu cymarózy a thevetozovej časti za vzniku trisacharidu a kopuláciu trisacharidu na steroidný derivát za vzniku zlúčeniny vzorca 1.

Proces vzniku trisacharidu a kopulácie vzniknutého trisacharidu na steroidný derivát môže zahŕňať stupne:

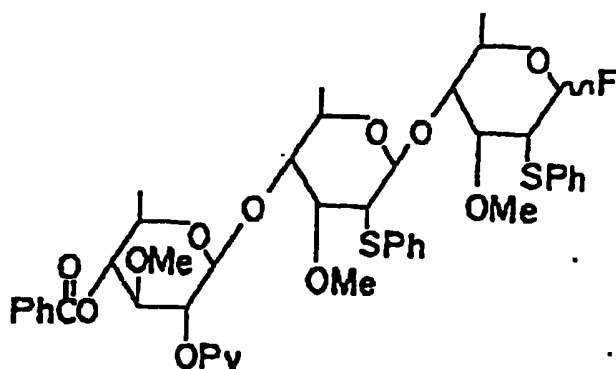
(i) kopulácia selektívne chránenej cymarózovej časti vzorca 40 a zlúčeniny 45 pri použití chloridu cínatého, AgOTf , Cp_2ZrCl_2 za vzniku zlúčeniny vzorca



(57)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl)

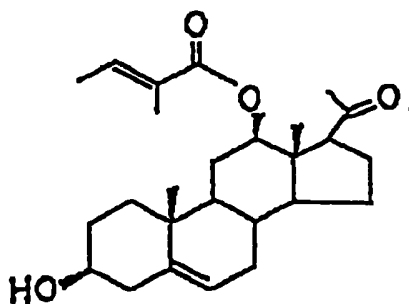
(ii) spracovanie zlúčeniny 57 s tetrabutylamóniumfluoridom a dietylaminosulfurtrifluoridom za vzniku trisacharidovej zlúčeniny vzorca



(58)

a

(iii) kopuláciu trisacharidu vzorca 58 so steroidovým medziproduktom vzorca



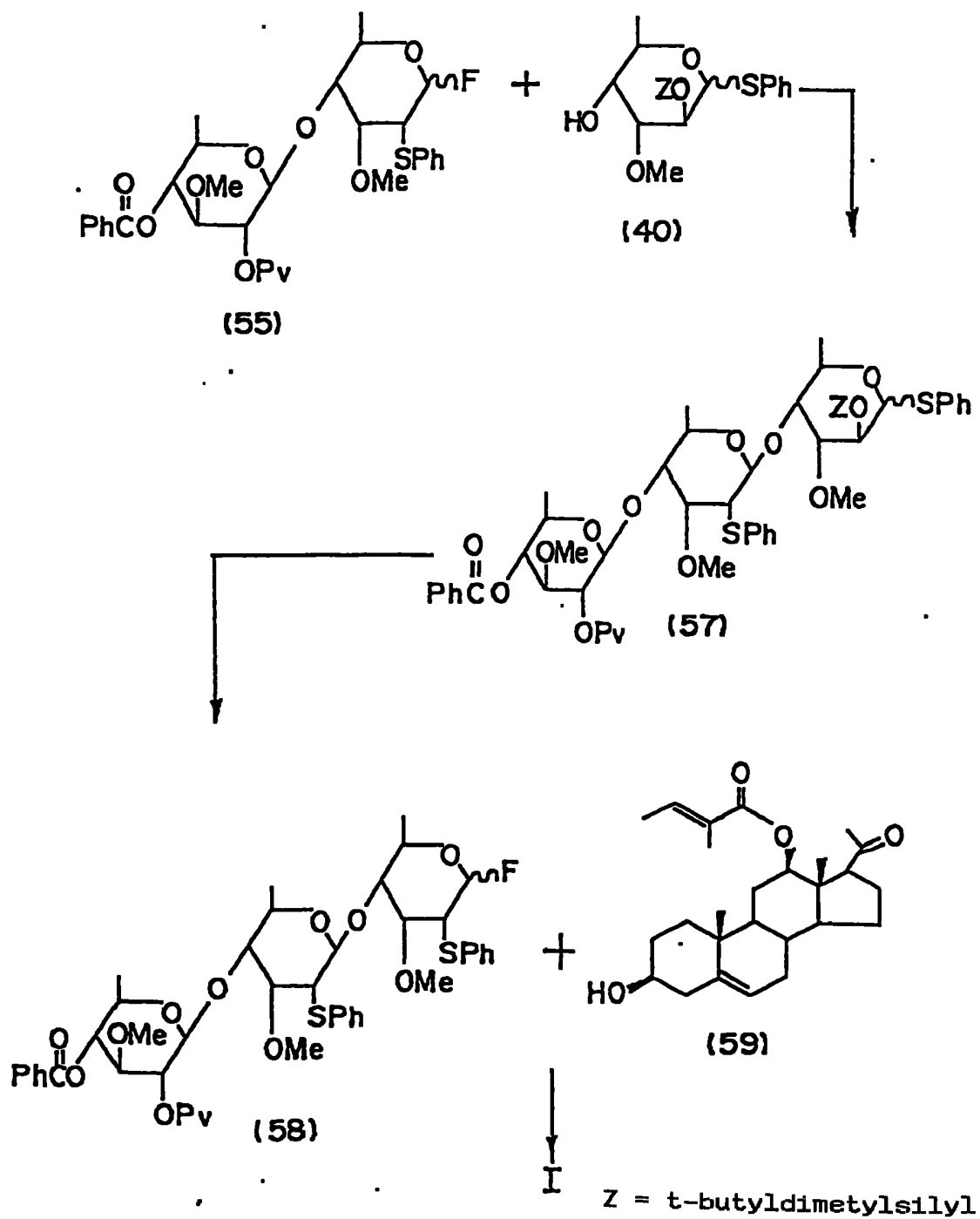
(59)

pri použití chloridu cínatého, AgOTf, Cp_2ZrCl_2 za vzniku zlúčeniny 1.

Steroidný medziprodukt 59 sa môže pripraviť spracovaním steroidu 15 s chloridom tiglovej kyseliny.

Reakčná schéma F znázorňuje postup na syntézu trisacharidu 58 a syntézu zlúčeniny 1 kopuláciou trisacharidu 58 so steroidným medziproduktom 59.

Reakční schéma F



Medziprodukty 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 37, 38, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57 a 58 popísané vyššie sú nové zlúčeniny a vynález je rozšírený na tieto zlúčeniny ako také.

Zlúčenina 1 3-O-[- α -D-thevetopyranozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-cymaropyranozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-cymaropyranozyl]-12 α -O-tigloyloxy-14-hydroxy-14 α -pregn-5-en-20-ón a jeho rôzne analógy a deriváty majú aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

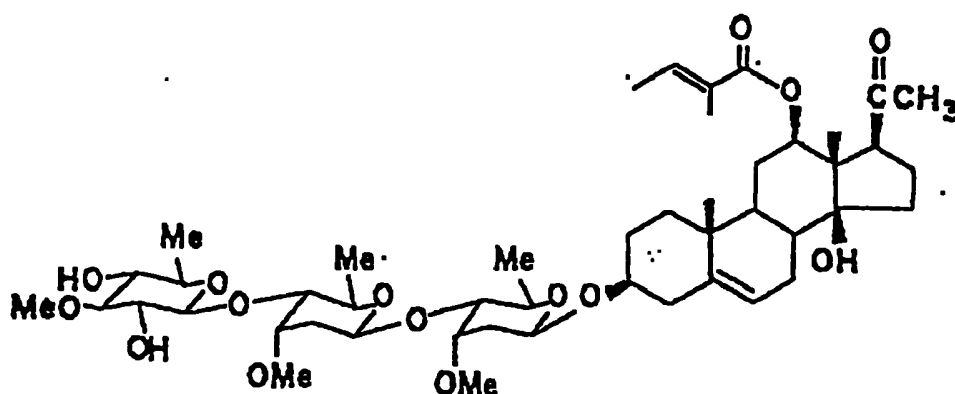
Vynález je ďalej rozšírený na kompozíciu alebo formuláciu, majúcu aktivitu znižujúcu chuť do jedla, kde aktívna zložka je extrakt získaný z rastlín rodu *Trichocaulon* a rodu *Hoodia*.

Aktívna zložka môže byť zlúčenina všeobecného vzorca 1, extrahovaná z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia* alebo jej derivát. Rastliny môže byť druhu *Trichocaulon officinale* alebo *Trichocaulon piliferum* alebo z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*.

Vynález je ďalej rozšírený na kompozíciu alebo formuláciu majúcu aktivitu znižujúcu chuť do jedla, kde aktívna zložka je synteticky pripravená zlúčenina všeobecného vzorca 1 alebo jej derivát alebo jej analóg, ako je popísané vyššie s odkazom na zlúčeninu 2 až 14.

Podľa ďalšieho aspektu vynález poskytuje spôsob zníženia chuti k jedlu tak, že sa podá človekovi alebo zvieratu vhodná dávka činidla znižujúceho chuť do jedla, zahrnujúca extrakt z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia*. Extrakt môže byť včlenený do kompozície alebo formulácie, ktoré zahrnujú tiež farmaceuticky prijateľné ďalšie zložky.

Činidlo znižujúce chuť do jedla môže byť izolovaná prírodná alebo syntetická chemická zlúčenina vzorca:



(1)

alebo jej deriváty alebo analógy, ako je uvedené vyššie.

Kompozícia alebo formulácia znižujúca chuť do jedla sa môže skladať z činidla znižujúceho chuť do jedla zmiešaného s farmaceuticky prijateľným excipientom, riedidlom alebo nosičom. Môžu sa pridať tiež ďalšie vhodné aditíva, zahrnujúce stabilizátor a ostatné zložky.

Vynález je rozšírený na použitie zlúčeniny 1 alebo jej derivátov alebo analógov pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

Vynález je ďalej rozšírený na zlúčeninu 1 alebo jej deriváty alebo analógy, ako to bolo popísané vyššie, s cieľom použitia ako liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

Je takisto zahrnutý spôsob zníženia chuti k jedlu podaním účinnej dávky kompozície, ako je popísaná vyššie, človekovi alebo zvieratu.

Je tu popísaný spôsob extrakcie steroidného glykozidu majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla z rastlinného materiálu získaného z rastliny *Trichocaulon* alebo *Hoodia genus*. Tak je

vynález rozšírený na extrakt získaný z rastlinného materiálu rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia* a obsahujúci čistý steroidný glykozid vzorca 1.

Vynález je tiež rozšírený na potraviny alebo nápoje obsahujúce účinné množstvo steroidného glykozidu vzorca 1 alebo jeho derivátov alebo analógov, ako je to popísané vyššie, ktoré majú pri požití účinok znižujúci chuť do jedla.

Molekulové genetické štúdie viedli k značnému zvýšeniu pochopenia regulácie chuti, presýtenosti a telesnej hmotnosti. Tieto štúdie odhalili mnoho centrálnych regulačných ciest, sprostredkovaných mnohými neuropeptidmi. Udržanie normálnej telesnej hmotnosti je dosiahnuté zložitou rovnováhou medzi príjmom energie, príjmom potravy a výdajom energie. Energetická homeostáza je subjektom k širokému rozsahu vplyvov, hlavne kontrolovaných mozgom. Rozdielne signály zahrnujú také parametre, ako je zmysel čuch a chuť a gastrointestinálne signály, ako je rozšírenie gastrointestinálneho traktu, chemické signály pre gastrickú mukózu a metabolity prenášané krvou, ako napríklad mastné kyseliny a glukóza.

Centrálny neuropeptid "Y" (NPY), ktorý je negatívne regulovaný leptínom, bol označený ako jeden z pozitívnych regulátorov prijímania potravy. Bolo dokázané, že expresia endogénneho antagonistu k melanokortínovým receptorom je základom obezity v zvláštnom modeli (myš ob/ob). V skutočnosti nedostatok MC4 melanokortínového receptora úplne replikuje syndróm obezity. Ďalší sprostredkovatelia, o ktorých sa uvádza, že majú úlohu v energetickej rovnováhe, zahrnujú bombesín, galonén a glukagónu podobný peptid-1.

Bez toho, aby sme sa viazali na teóriu, prihlasovateľ sa domnieva, že zlúčenina 1 a jej analógy, ako sú popísané vyššie, pôsobia ako agonista receptora melanokortínu 4. Účinok tohoto pôsobenia spočíva v regulácii NPY ale tiež v zvýšení cholecystokinínu. Účinok cholecystokinínu okrem iného inhibuje

gastrické vyprázdnenie.

Podľa toho je vynález rozšírený na kompozíciu, majúcu aktivitu znižujúcu chuť do jedla, zahrnujúcu agonistu receptora melanokortínu 4.

Agonista môže byť extrakt alebo zlúčenina, ako je popísaná vyššie, predovšetkým zlúčenina vzorca 1. Kompozícia môže byť zmiešaná s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom a prípadne môže byť pripravená v jednotkovej dávkovej forme.

Vynález je ďalej rozšírený na použitie agonistu receptora melanokortínu 4 pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla, na agonistu melanokortínu 4 na použitie ako liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla, na spôsob zníženia chuti k jedlu tak, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka zahrnujúca agonistu melanokortínu 4, ako je popísané vyššie, a na použitie agonistu receptora melanokortínu 4 na zníženie chuti a/alebo na boj proti obezite u ľudí alebo zvierat.

Vynález a jeho účinnosť bude ďalej popísaná nasledujúcimi príkladmi a výkresmi, ktoré však majú len informatívny charakter a v žiadnom prípade neobmedzujú rozsah vynálezu.

Vo výkresoch:

Obrázok 1 znázorňuje blokovú schému všeobecnej metódy extrakcie prvého surového extraktu znižujúceho chuť do jedla a čistenie extraktu znižujúceho chuť do jedla z rastlinného materiálu rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia*;

Obrázok 2 znázorňuje grafickú reprezentáciu biologickej skúšky uskutočnenú na potkanoch pri použití čiastočne čisteného metanolového extraktu *Trichocaulon piliiferum*;

Obrázky 3 a 4 spoločne znázorňujú schematickú reprezentáciu výhodnej realizácie postupu podľa vynálezu na prípravu extraktu z

rastlinného materiálu rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia*; a

Obrázky 5 a 6 znázorňujú grafickú reprezentáciu percentnej zmeny telesnej hmotnosti potkanov pre rôzne skupiny v dňoch -7 až 7 a v dňoch 0 až 7 pri opakovanej dávkovej štúdií pri použití šľavového extraktu a materiálu získaného sušením rozprašovaním šľavového extraktu rastlinného materiálu druhu *Hoodia gordonii*.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1

Všeobecný spôsob extrakcie prvého surnvého extraktu znižujúceho chuť do jedla a čistenie extraktu znižujúceho chuť do jedla z rastlinného materiálu rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia* je ilustrovaný spôsobom zobrazeným v blokovej schéme obrázku 1.

Príklad 2

Biologické skúšky uskutočnené na potkanoch pri použití čiastočne metanolového extraktu získaného spôsobom ilustrovaným v príklade 1 ukázali, že extrakt v skutočnosti vykazuje aktivitu znižujúcu chuť od jedla. Aktivita znižujúca chuť do jedla aktívneho extraktu môže byť ilustrovaná typickým príkladom účinku metanolového extraktu *Trichocaulon piliiferum* na potkanoch spôsobom grafickej reprezentácie na obrázku 2.

Z obrázku 2 bude zrejmé, že testovaná skupina potkanov, ktorá obdržala dávku extraktu 5. deň, vykazovala podstatne menšiu spotrebu potravy ďalšie dva dni, zatiaľ čo kontrolná skupina nevykazovala porovnateľné menší príjem potravy. Príjem potravy sa v prípade testovanej skupiny vrátil na normál, v skutočnosti sa zvýšil od 8. dňa.

Príklad 3

Výhodná realizácia postupu podľa vynálezu na prípravu extraktu majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla je ilustrované schematicky na príklade v obrázkoch 3 a 4, kde dva obrázky spoločne ukazujú úplný postup. Odborník však môže použiť rôzne ďalšie postupy.

Podľa obrázku 3 rastlinný materiál rodu *Trichocaulon* alebo *Hoodia* je plnený do miešača, napríklad Waringovho miešača, pomocou dopravníka 1, s rozpúšťadlom vo forme roztoku metylénchlorid/metanol, privádzaným potrubím 2. Homogenizovaný produkt je privádzaný potrubím 4 do separačného stupňa 5, ktorým je napríklad filter alebo odstredivka, a zvyšný rastlinný materiál je odvádzaný potrubím 27.

Zmes rozpúšťadla a extraktu sa privádza potrubím 6 do odparovacieho stupňa, kde sa odstráni rozpúšťadlo, napríklad rotačnou odparkou. Sušený surový extrakt sa vedie potrubím 8 do ďalšieho extrakčného stupňa 9 za pridania roztoku zmesi metylénchloridu a vody, privádzaného potrubím 29 s cieľom ďalšej extrakcie a potom do separačného stupňa 13, potrubím 11, kde sa odstráni vodná frakcia cez potrubie 31. Rozpustená extraktová frakcia sa privedie cez potrubie 15 do sušiaceho stupňa, kde sa odparí rozpúšťadlo, napríklad rotačnou odparkou.

Podľa obrázku 4, sušený extrakt sa vedie cez potrubie 10 do extrakčného stupňa 12. Roztok metanolu a hexánu sa tiež vedie cez potrubie 14 do extrakčného stupňa 12 s cieľom ďalšieho čistenia a extrakcie sušeného extraktu. Zmes extraktu, metanolu a hexánu sa vedie cez potrubie 16 do separačného stupňa 18, hexánová frakcia sa odstráni cez potrubie 20 a zmes metanolu a extraktu sa potom vedie cez potrubie 22 do sušiaceho stupňa 24. V sušiacom stupni 24 sa odstráni rozpúšťadlo, napríklad odparovaním na rotačnej odparke.

Sušený, čiastočne čistený aktívny extrakt sa vedie cez

potrubie 26 a za pridania metanolu cez potrubie 28 do roztokového stupňa rozpustená frakcia sa vedie cez potrubie 36 do chromatografickej kolóny 38.

V kolóne 38 sa metanolová rozpustná frakcia ďalej frakcionuje pri použití silikagélu a rozpúšťadla chloroform/30% metanol, na rôzne frakcie, schematicky označené I až IV. Podľa aktuálneho postupu frakcionácie uskutočňovaného prihlasovateľom, frakcionačným postupom sa dosiahli nasledujúce hmotnosti jednotlivých frakcií: I (3,9 g); II (2,6 g); III (2,1 g); IV (1,1 g) a V (2,0 g). Tieto frakcie sú individuálne hodnotené vhodnými biologickými skúškami (v stupni sa neuvádzajú) a frakcie identifikované ako frakcie I a II vykazujúce značnú aktivitu znižujúcu chuť do jedla, sú vedené cez potrubie 40 a 42 do kolón 44 a 46, kde sú ďalej frakcionované a čistené stĺpcovou chromatografiou, opäť pri použití silikagélu a systému chloroform:metanol 9:1.

Subfrakcie II(A) - (C) získané z kolóny 44 nevykazujú pri biologických skúškach znateľnú aktivitu znižujúcu chuť do jedla a môžu byť recyklované pre ďalšie chromatografické spracovanie.

Subfrakcie I(A) - (L) získané z kolóny 46 sú tiež hodnotené (skúška nie je uvedená) a v prípade subfrakcie I(C) bola zistená značná aktivita znižujúca chuť do jedla.

Subfrakcia I(C) sa vedie potrubím 48 do kolóny 50 s cieľom ďalšej frakcionácie a ďalšieho čistenia pri použití silikagélu a rozpúšťadla etylacetátu a hexánu v pomere 9:1. Z výsledných čistených frakcií bola po biologickej skúške zistená v prípade frakcie I(C) (ii) značná aktivita znižujúca chuť do jedla.

Čistený produkt je identifikovaný spektroskopiou jadrovej magnetickej rezonancie (ako sa uvádza v tabuľkách 1 a 2 ďalej) a ide o zlúčeninu 1.

Tabuľka 1: ^1H (300,13 MHz) dáta NMR pre zlúčeninu 1 (CDCl_3)

Zlúčenina 1

Atóm vodíka	J(HH)/Hz	δ_{H} /p.p.m.
Aglykón-3	-	3,522 m
6	-	5,381 m
12	11,5, 4,1	4,607 dd
17	9,3, 9,3	3,157 dd
18	-	1,029 s
19	-	0,951 s
21	-	2,164 s
3 $^{\bullet}$	7,1, 1,5	6,888 qq
4 $^{\bullet}$	7,1, 1,2	1,806 dq
5 $^{\bullet}$	1,6, 1,2	1,853 dq
Cym-1'	9,4, 2,1	4,816 dd
2' $^{\text{aq}}$	13,8, 3,7, 2,1	2,055 ddd
2' $^{\text{ax}}$	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
5'	6,3, 9,4	3,821 dd
6'	6,3	1,279 d ^a
3'-OMe	-	3,408 s ^d
1''	9,4, 2,1	4,730 dd
2''	13,8, 3,7, 2,1	2,108 ddd
2'' $^{\text{aq}}$	13,8, 9,4, 2,6	1,601 ddd
3'' $^{\text{ax}}$	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
6''	6,3	1,243 d ^b
3''-OMe	-	3,392 s ^e
Thev-1'''	7,7	4,273 d
2'''	7,7, 8,0	3,469 dd
3'''	8,0, 2,9	3,099 dd
4'''	9,3, 2,9	3,179 dd
5'''	6,3, 9,3	3,351 dd
6'''	6,3	1,183 d ^c
3'''-OMe	-	3,622 s

a, b, c v každom stĺpci môže byť zameniteľné

d, e v každom stĺpci môže byť zameniteľné

* týka sa atómov tigloátovej skupiny

Tabuľka 2: Relevantné ^{13}C (75,25 MHz) n.m.r. dáta pre zlúčeninu 1
v CDCl_3

Aglykónová časť		Cukrová časť	
Uhlík	$\delta_{\text{C/p.p.m.}}$	Uhlík	$\delta_{\text{C/p.p.m.}}$

1	37,04 T	cym- 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	Thev- 1'''	104,28 D
16	24,31 T	2'''	74,62 D
17	57,18 D	3'''	85,30 D
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		

* týka sa atómov tigloátovej skupiny

Zlúčenina 1

IR dáta: 3440 cm^{-1} (OH), 2910 cm^{-1} (CH), 1700 cm^{-1} (C=O)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 12,67^\circ$ (c = 3, CHCl_3)

teplota topenia $147\text{--}152^\circ\text{C}$.

Príklady 4 až 13 ilustrujú syntetické postupy, zatiaľ čo medziproduktové zlúčeniny a steroid 15 sa môžu pripraviť podľa "prvého alternatívneho postupu".

Príklad 4

12 α ,15 α -Dihydroxyprogesterón 17

Kultúry *Calonectria decora* (ATCC 14767) sa pripravujú očkovaním kultúrneho média zahrnujúceho sacharózu (90 g), K₂HPO₄ (30 g), Czapekov koncentrát (300 ml), nápoj z namočenej kukurice (300 ml) a destilovanú vodu (30 l) (150 x 500 ml nádoby). Po 5 dňoch pretrepávania pri 26 °C sa do nádob pridá progesterón 16 (150 g) v suspenzii Tween 80 (0,1% roztok, 1,5 l). Kultúry sa inkubujú ďalších 5 dní a spracujú sa odstredením, dekantáciou, extrakciou média s chloroformom a odparením sa získa dihydroxyprogesterón 17 (17,5 g, 45 %).

¹H NMR (CDCl₃): 5,71 (1H, s, H-4); 4,12-4,22 (1H, m, H-15); 4,43 (1H, br, s, OH); 3,46-3,53 (1H, dd, J = 4,6 Hz, H-12); 2,16 (3H, s, H-21); 1,18 (3H, s, H-19); 0,74 (3H, s, H-18)

Príklad 5

12 α -Hydroxy-15 α -(p-toluénsulfonyl)progesterón (18)

Dihydroxyprogesterón 17 (75 g, 0,22 mol) sa rozpustí v suchom pyridíne (300 ml) a ochladí sa na 0 °C. Potom sa po kvapkách pridá pri 0 °C k reakčnej zmesi p-toluénsulfonylchlorid (46 g, 0,24 mol) v suchom pyridíne (200 ml). Reakčná zmes sa mieša cez noc pri teplote 0 °C a ochladí sa pridaním H₂O (500 ml). Vodná vrstva sa extrahuje etylacetátom (1 l) a organický extrakt sa premyje kyselinou chlorovodíkovou (6M, 3 x 1 l), vodným nasýteným hydrogenuhličitanom sodný (500 ml), vodným chloridom sodným (500 ml) a vodou (500 ml). Organická vrstva sa suší, filtruje a odparením sa získa p-toluénsulfónovaný progesterón 18 (98 g, 92 %) ako viskózný tmavožltý olej.

^1H NMR (CDCl_3): 7,7 (2H, d, $J = 14\text{Hz}$, H-2,6); 7,34 (2H, d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-3,5); 5,67 (1H, s, H-4); 4,86–4,93 (1H, m, 1H-15); 3,45–3,50 (1H, dd, $J = 4,6\text{ Hz}$, 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)

Príklad 6

12 α -Hydroxy- Δ^{14} -progesterón 19

Roztok tosylovaného progesterónu 18 (98 g, 0,19 mol) v 2,4,6-trimetylkolidíne (500 ml) sa zahrieva pri spätnom toku pri 150 °C počas 3 hodín. Reakčná zmes sa ochladí a vleje sa do vody (500 ml). Vodná vrstva sa extrahuje etylacetátom (1 l) a organická vrstva sa premyje kyselinou chlorovodíkovou (6M 3 x 1 l), vodným nasýteným hydrogenuhličitanom sodným (500 ml), vodným nasýteným roztokom chloridu sodného (500 ml) a vodou. Po sušení (MgSO_4) sa filtruje, etylacetát sa odparí a surová zmes sa čistí chromatografiou na silikagéle, eluovaním zmesou acetónu a chloroformu (1:10) a získa sa Δ^{14} -progesterón 19 (50 g, 78 %) ako tmavý červený olej.

^1H NMR (CDCl_3): 5,73 (1H, s, H-4), 5,28 (1H, dd, $J = 2,2\text{ Hz}$, H-15), 4,41 (1H, br, s, OH), 3,49–3,52 (1H, dd, $J = 4,3\text{ Hz}$, H-12), 2,80–2,84 (1H, dd, $J = 9,2\text{ Hz}$, H-17), 2,14 (3H, s, H-21), 1,19 (3H, s, H-19), 0,89 (3H, s, H-18)

Príklad 7

3,12 α -Diacetoxypregna-3,5,14-trien-20-ón 20

Roztok Δ^{14} -progesterónu 19 (50 g, 0,15 mol) v acetylchloride (1,5 l) a acetanhydride (750 ml) sa zahrieva pri spätnom toku 2 hodiny. Reakčná zmes sa vleje do suchého etylacetátu (1 l) a pridá sa vodný nasýtený hydrogenuhličitan sodný, dokiaľ roztok šumí. Etylacetátová vrstva sa oddelí od vrstvy hydrogenuhličitanu sodného a premýva sa ďalšou časťou

vodného hydrogenuhličitanu sodného (3 x 700 ml) a potom nasýteným chloridom sodným (700 ml) a napokon vodou (700 ml). Organická vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparením sa získa 3,12 β -diacetoxypregna-3,5,14-trien-20-ón 20 (60 g, 93 %) ako oranžový olej.

^1H NMR (CDCl_3): 5,68 (1H, s, H-14), 5,44 (1H, m, H-6), 5,31 (1H, dd, $J = 2,2\text{Hz}$, H-15), 4,82-4,86 (1H, dd, $J = 4,5\text{Hz}$, H-12), 3,10-3,18 (1H, t, $J = 9,5\text{Hz}$, 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)

Príklad 8

3,12 β -Diacetoxy-20,20-etyléndioxypregna-3,5,14-trien 21

Diacetoxylová zlúčenina 20 (60 g, 0,14 mol) sa rozpustí v benzéne (1 l) a etylénglykole (60 ml) a pridá sa p-toluénsulfónová kyselina (1 g). (Benzén sa pred tým zahrieva pri spätnom toku v Dean-Starkovom zachytávači). Zmes sa zahrieva pri spätnom toku pri miešaní a azeotropicky sa odstraňuje voda 16 hodín. K ochladenému roztoku sa pridá vodný nasýtený roztok hydrogenuhličitanu sodného (500 ml). Roztok sa premyje soľankou (500 ml) a vodou (500 ml) a suší sa (MgSO_4). Rozpúšťadlo sa odparí a surová zmes sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle, eluuje sa zmesou etylacetátu a hexánu (2:8) a získa sa etyléndioxypregna-3,5,14-trien 21 (35 g, 53 %).

^1H NMR (CDCl_3): 5,68 (1H, s, H-4), 5,45 (1H, m, H-6), 5,31 (1H, dd, $J = 2,2\text{Hz}$, H-15), 4,73-4,85 (1H, dd, $J = 4,4\text{Hz}$, H-12), 3,78-3,98 (4H, m, etyléndioxy), 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)

Príklad 9

3 α ,12 β -Dihydroxy-20,20-etyléndioxypregna-5,14-dién-12-acetát 22

Dienolát 21 (35 g, 0,077 mol) sa suspenduje v etanole (500 ml) a pri 0 °C sa pridá borohydrid sodný (2,8 g, 0,074 mol). Zmes sa nechá ohriať na teplotu miestnosti a mieša sa cez noc. Väčšina rozpúšťadla sa odstráni vo vákuu a zmes sa zriedi vodou (500 ml) a extrahuje sa s etylacetátom (500 ml). Nasleduje chromatografia na silikagéle zmesou acetónu a chloroformu (1:10) a získa sa 3 β -alkohol 22 (25 g, 80 %).

¹H NMR (CDCl₃): 5,41 (1H, m, H-6), 5,28 (1H, dd, J = 2,2Hz, H-15), 4,72-4,81 (1H, dd, J = 4,4Hz, H-12), 3,82-4,02 (4H, m, etyléndioxy), 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)

Príklad 10

3 α ,12 α -Dihydroxy-20,20-etyléndioxypregna-5,14-dién 23

3 α -alkohol 22 (25 g, 60,2 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (300 ml) sa pridá po kvapkách k suspenzii lítiumalumíniumhydridu (2,7 g, 72,2 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (500 ml). Reakčná zmes sa mieša pri teplote miestnosti 24 hodín a pridá sa opatrne voda (2,7 ml) a zmes sa mieša ďalších 10 minút. Potom sa pridá hydroxid sodný (15% roztok 2,7 ml) a suspenzia sa mieša. Po 10 minútach sa pridá voda (8,1 ml) a suspenzia sa mieša 10 minút, filtruje sa, suší (MgSO₄) a rozpúšťadlo sa odparí a získa sa 3 α ,12 α -dihydroxypregnadién 23 (20 g, 90 %).

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

¹³C NMR (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 a 63,6 (etyléndioxy), 58,8 (C-17), 19,0 (C-19), 11,9 (C-18)

3a, 12a-Dihydroxy-14, 15-epoxy-20, 20-etyléndioxypregn-5-én

3a, 12a-Dihydroxy-5, 6-epoxy-20, 20-etyléndioxypregn-14-én

N-Brómacetamid (211 mg, 1,5 mmol) sa pridá pri 0 °C k miešanému roztoku 5,4-diénu 23 (500 mg, 1,34 mmol) v acetóne (100 ml), kyseline octovej (2,5 ml) a vode (5 ml). Po 15 minútach sa k reakčnej zmesi pridá siričitán sodný :5% roztok, 50 ml). Acetón sa odparí a vodná vrstva sa extrahuje dichlórmetánom (3 x 50 ml). Organická vrstva sa suší (MgSO₄), filtruje a odparí. K produktu sa pridá pyridín (1 ml) a zmes sa mieša 0,5 hodiny. Potom sa pridá k reakčnej zmesi dichlórmetán (100 ml) a dichlórmetán sa premyje kyselinou citrónovou (5% roztok, 3 x 100 ml), nasýteným roztokom hydrogenuhlíčitánu sodného (50 ml) a vodou (50 ml). Organická vrstva sa suší (MgSO₄), filtruje a odparením sa získa zmes 14,15- a 5,6-epoxidov (360 mg, 69 %) ako biela pe-
na. Zmes epoxidov sa nemôže oddeliť stípcovou chromatografiou.

Príklad 11

3a, 12a-Dihydroxy-14, 15-epoxy-20, 20-etyléndioxypregn-5-én 24

Zmes 14,15- a 5,6-epoxidov (14,4 g, 37,0 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (200 ml) sa pridá k suspenzii lítiumalumíniumhydridu (1,69 g, 44,4 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (300 ml). Reakčná zmes sa mieša pri teplote miestnosti 24 hodín a potom sa spracuje, ako je popísané vyššie, pridaním vody (1,69 ml) a hydroxidu sodného (15% roztok, 1,69 ml). Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa surový produkt čistí stípcovou chromatografiou na silikagéle pri použití zmesi metanolu a chloroformu 1:9 ako rozpúšťadla a získa sa nezreagovaný 14,15-epoxy-20,20-etyléndioxypregn-5-én 24 (300 mg, 2,1 %).

¹H NMR (CDCl₃): 5,31 (1H, m, H-6), 3,82-3,98 (4H, m, etyléndioxy), 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).

^{13}C NMR (CDCl_3): 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)

Príklad 12

3a, 12a, 14a-Trihydroxy-20, 20-etyléndioxypregn-5-én 25

14,15-epoxid 24 (300 mg, 0,77 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (10 ml) sa pridá k suspenzii lítiumalumínium-hydridu (300 mg, 7,89 mmol) v tetrahydrofuráne a reakčná zmes sa zahrieva pri spätnom toku 48 hodín. Po pridaní vody (3 ml), hydroxidu sodného (15% roztok, 0,3 ml) a filtrácii, ako je popísané vyššie, sa zmes čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle pri použití zmesi metanolu a chloroformu (1:9) ako rozpúšťadla a získa sa trihydroxypregnén 25 (250 mg, 83 %).

^1H NMR (CDCl_3): 5,38 (1H, m, H-6), 3,98 (4H, m, etyléndioxy), 3,43-3,53 (1H, m, H-3), 3,25-3,32 (1H, dd, $J = 4,1\text{Hz}$, H-12), 1,32 (3H, s, H-21), 1,01 (3H, s, H-19), 0,98 (3H, s, H-18)

^{13}C NMR (CDCl_3): 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)

Príklad 13

3a, 12a, 14a-Trihydroxypregn-5-én 15

Etyléndioxypregnén 25 (250 mg, 0,64 mmol) sa rozpustí v kyseline octovej (13,4 ml) a vode a po vymrazení sa získa trihydroxysteroid 15 (200 mg, 89 %), s teplotou topenia 228 °C až 235 °C, $M^+ 348$, $[\alpha]^{20} + 35^\circ$ (lit. $[\alpha]^{20} + 29^\circ$).

^1H NMR (CDCl_3): 5,39 (1H, m, H-6), 3,56-3,62 (1H, t, $J = 8,1\text{ Hz}$,

H-17), 3,42-3,51 (1H, m., H-3), 3,28-3,29 (1H, dd, $J = 4,3\text{ Hz}$, H-12), 2,23 (3H, s, H-21), 1,01 (3H, s, H-19), 0,90 (3H, s, H-18)

^{13}C NMR (CDCl_3): 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)

Príklady 14 až 19 ilustrujú syntetické postupy, kde sa medziproduktové zlúčeniny a steroid 15 môžu pripraviť podľa "druhého alternatívneho postupu".

Príklad 14

20,20-Etyléndioxy-3 α -toluén-p-sulfonyloxypregna-5,14-dién-12 α -ol acetát 26

Zmes p-toluénsulfonylchloridu (650 mg, 3,4 mmol) v pyridíne (10 ml) sa pridá po kvapkách pri teplote 0 °C k zmesi 20,20-etyléndioxypregna-5,14-dién-3 α ,12 α -diol 12-acetátu 22 (1,3 g, 3,1 mmol) v pyridíne (15 ml). Reakčná zmes sa nechá stáť pri teplote miestnosti 24 hodín a potom sa pridá k reakčnej zmesi voda. Roztok sa extrahuje etylacetátom (2 x 50 ml), etylacetátová vrstva sa premyje kyselinou citrónovou (5 x 50 ml), nasýteným roztokom hydrogenuhličitanu sodného (100 ml), nasýteným roztokom chloridu sodného (100 ml) a vodou (100 ml). Etylacetátová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje sa a po odparení a čistení bleskovou chromatografiou pri použití zmesi hexánu a etylacetátu (8:2, objem./objem.) ako eluantu sa získa α -O-tosylsteroid 26 (1,5 g, 84 %), ako žltý olej (zistené M 570,271, $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{S}$ vyžaduje: M 570,273).

δ_{H} 1,021 (3H, s, 19-H), 1,131 (3H, s, 18-H), 1,282 (3H, s, 21-H), 2,021 (acetátOCH₃), 2,431 (3H, s, Ar-CH₃), 3,883 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,750 (1H, dd, ^3J 10,8 Hz, 5,2 Hz, 11-H), 4,890 (1H, m, 30H), 5,281 (1H, dd ^3J 4,2 Hz, 2,1 Hz, 15-H), 5,388 (1H, m,

6-H), 7,341 (2H, d, ^3J 8,2 Hz, ArH), 7,746 (2H, d, ^3J 8,2 Hz, ArH).

δ_c 13,439Q (C-18), 19,002Q (C-19), 21,612Q (Ar-metyl)*, 21,671Q (C-21)*, 24,175Q (metylacetát), 63,401T (etyléndioxy), 63,498T (etyléndioxy), 71,531S (C-13), 80,912D (C-12), 82,531D (C-3), 111,363S (C-20), 120,881D (C-15), 121,461 (C-6), 123,715-133,917 (aromatický), 139,903S (C-4), 151,722S (C-5), 170,819S (karbonylester)

Príklad 15

20,20-Etyléndioxy-3 α ,5-cyklo-5 α -pregn-4-én-6 α ,12 α -diol-12-acetát 27

Roztok 3 α -toluén-p-sulfonyloxypregn-5,14-diénu 26 (1,2 g, 2,1 mmol) a octanu draselného (2,2 g, 22,4 mmol) vo vode (250 ml) a acetónu (500 ml) sa zahrieva pri spätnom toku na 60 °C počas 16 hodín. Acetón sa odparí a voda sa extrahuje etylacetátom (200 ml). Etylacetát sa suší (MgSO₄), filtruje a odparí. Bleskovou chromatografickou separáciou zmesi pri použití zmesi chloroformu a acetónu (9:1 objem./objem.), ako eluenta, sa získa 3 α ,5-cykloderivát 27 (530 mg, 61 %), ako žltý olej (zistené M 461,262, C₂₅H₃₆O₅ vyžaduje: M 416,263).

δ_H 0,288 (1H, dd, ^3J 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H_a), 0,477 (1H, dd, ^3J 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, acetát-CH₃), 3,02 (1H, dd, ^3J 2,8 Hz, 6-H), 3,784-3,947 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,721 (1H, dd, ^3J 8,5 Hz, 5,6 Hz, 12-H), 5,232 (1H, dd ^3J 3,9 Hz, 1,9 Hz, 15-H).

δ_c 11,678T (C-4), 12,298Q (C-18), 19,971Q (C-19), 23,623Q (C-21), 24,153Q (metylacetát), 63,700T (etyléndioxy), 63,788T (etyléndioxy), 73,591D (C-6), 80,551D (C-12), 111,126S (C-20), 118,778D (C-15), 152,959S (C-14), 170,991S (karbonylester)

Príklad 16

20, 20-Etyléndioxy-3 α , 5-cyklo-5 α -pregn-14-én-6 β , 12 β -diol 28

Roztok 3 α , 5-cykloderivátu 27 (500 mg, 1,2 mmol) v tetrahydrofuráne (20 ml) sa pridá po kvapkách k suspenzii lítiumalumíniumhydridu (50 mg, 1,3 mmol) v tetrahydrofuráne (10 ml). Reakčná zmes sa mieša 4 hodiny a potom sa ochladí pridaním vody (50 μ l). Po 30 minútach sa pridá hydroxid sodný (15% roztok, 50 μ l) a miešanie pokračuje ďalších 30 minút. Pridá sa voda (150 μ l) a reakčná zmes sa filtruje. Tetrahydrofurán sa suší (MgSO₄), filtruje a odparí a čistením bleskovou chromatografiou pri použití chloroformu a acetónu (8:2 objem./objem.), ako eluantu, sa získa diol 28 (370 mg, 83 %), ako olej (zistené M 374,250, C₂₃H₃₄O₄ vyžaduje M 374,252).

δ_H 0,298 (1H, dd, ^3J 8,1, Hz, 4,9 Hz, 4-H₂), 0,510 (1H, dd, ^3J 4,4 Hz, 4,4 Hz, 4-H₃), 0,985 (3H, s, 19-H), 1,055 (3H, s, 18-H), 1,325 (3H, s, 21-H), 3,318 (1H, dd ^3J 3,0 Hz, 3,0 Hz, 6-H), 3,363 (1H, dd, ^3J 11,4 Hz, 4,2 Hz, 12-H), 4,019 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,622 (1H, s, OH), 5,255 (1H, dd, ^3J 3,9 Hz, 1,9 Hz, 15-H)

δ_C 11,681T (C-4), 12,243 (C-18), 19,844Q (C-19), 23,604Q (C-21), 63,620T (etyléndioxy), 63,733T (etyléndioxy), 73,569D (C-6), 77,478D (C-12), 111,125S (C-2), 118,702D (C-15), 152,912S (C-14)

Príklad 17

20, 20-Etyléndioxy-14, 15 β -epoxy-3 α , 5-cyklo-5 α , 14 β -pregnan-6 β , 12 β -diol 29

N-brómacetamid (150 mg, 1,1 mmol) sa pridá pri 0 °C k roztoku 20, 20-etyléndioxy-3 α , 5-cyklo-5 α -pregn-14-én-6 β , 12 β -diolu 28 (340 mg, 0,91 mmol) v acetóne (20 ml), vode (0,25 ml). Po 15 minútach sa pridá k reakčnej zmesi siričitán sodný (5% roztok, 20 ml). Acetón sa odparí pri zníženom tlaku a zvyšný roztok sa

extrahuje s dichlórmetánom (3 x 30 ml). Dichlórmetánová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí na koncentrovaný objem (50 ml). K zmesi sa pridá pyridín (0,5 ml) a zmes sa mieša ďalšiu hodinu a potom sa dichlórmetánová vrstva premyje roztokom kyseliny citrónovej (5%, 3 x 30 ml), nasýteným roztokom hydrogenuhličitanu sodného (30 ml) a vodou (30 ml). Dichlórmetánová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí a čistením bleskovou stĺpcovou chromatografiou pri použití zmesi chloroformu a metanolu (9,5:0,5 objem./objem.), ako eluantu, sa získa epoxid 29 (180 mg, 51 %), ako pena (zistené M 390,245, $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_2$ vyžaduje: M 390,247).

δ_{H} 0,287 (1H, dd, ^3J , 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4- H_a), 0,501 (1H, dd, ^3J , 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, ^3J , 3,1 Hz, 3,1 Hz, 6-H), 3,355 (1H, dd, ^3J , 11,2 Hz, 4,1 Hz, 12-H), 3,491 (1H, s, 15-H), 4,001 (4H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,901 (1H, s, H)

δ_{C} 11,688T (C-4), 11,973Q (C-18), 19,515U (C-19), 23,519Q (C-21), 59,910D (C-15), 63,601T (etyléndioxy), 63,713T (etyléndioxy), 72,501S (C-14), 73,571D (C-6), 77,471D (C-12), 111,685S (C-20)

Príklad 18

20,20-Etyléndioxy-6 α ,12 α ,14-trihydroxy-3 α ,5-cyklo-5 α ,14 α -pregnan
30

Roztok epoxidu 29 (170 mg, 0,44 mmol) v tetrahydrofuráne (10 ml) sa pridá k suspenzii lítiumalumíniumhydridu (20 mg, 0,53 mmol) v tetrahydrofuráne (5 ml). Reakčná zmes sa zahrieva pri spätnom toku 2 hodiny a pridá sa voda (20 μl) a miešanie pokračuje 0,5 hodiny. Pridá sa roztok hydroxidu sodného (15%, 20 μl) a miešanie pokračuje ďalšiu polhodinu. Pridá sa ďalšie množstvo vody (60 μl) a suspenzia sa mieša 1 hodinu. Po filtrácii sa suspenzia suší (MgSO_4), filtruje a tetrahydrofurán sa odparí. Bleskovým chromatografickým rozdelením vzniknutej zmesi eluovaním zmesou chloroformu a metanolu (9:1 objem./objem.) sa získa vyžadovaný triol 30 (90 mg, 53 %), ako číry olej. (Zistené M

392,261, $C_{23}H_{38}O_5$ vyžaduje: M 392,263).

δ_H 0,287 (1H, dd, ^3J 8,1 Hz, 4,9 Hz, 4-H₂), 0,510 (1H, dd ^3J 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, ^3J 3,0 Hz, 3,0 Hz, 6-H), 3,321 (1H, dd, ^3J 11,1 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,561 (1H, s, OH), 4,084 (4H, m, OCH₂CH₂O), 4,761 (1H, s, OH)

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

Príklad 19

3 α ,12 α ,14-Trihydroxy-14 β -pregn-5-en-20-ón 15

Zmes triolu 30 (80 mg, 0,20 mmol) v acetóne (20 ml) a kyseliny chlorovodíkovej (1M, 10 ml) sa zahrieva pri spätnom toku pri 60 °C počas 2 hodín. Reakčná zmes sa oddelí a pridá sa nasýtený roztok hydrogenuhličitanu sodného (20 ml). Acetón sa odparí a vodná vrstva sa extrahuje s chloroformom (3 x 20 ml), chloroformová vrstva sa suší (MgSO₄), filtruje a odparí a získajú sa epimérne trihydroxysteroidy (15a, 15b) (42 mg, 61%). Separácia epimérnej zmesi 15a, 15b (15 mg) sa uskutoční chromatografickou separáciou pri použití zmesi chloroformu a metanolu (9:1 objem./objem.), ako eluenta, sa získa čistý 17 α -epimér (15a) (10 mg), s teplotou topenia 224 až 229 °C (acetón), (lit. 226–223 °C), (zistené M 348,234, C 72,32, H 9,21 % $C_{21}H_{32}O_4$ vyžaduje C, 72,38, H 9,26 %, M 348,236) a 17 α -epimér 15b (3 mg), s teplotou topenia 183–191 °C (acetón, (lit. 814 až 196 °C).

3 α ,12 α ,14-Trihydroxy-14 β -pregn-5-en-20-ón 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, ^3J 11,2 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,464 (1H, s, OH), 3,5140 (1H, m, 3-H), 3,598 (1H, dd, ^3J 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), 27,443 (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)

3a, 12a, 14-Trihydroxy-14a-pregn-5-en-20-ón 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, ^3J 9,4 Hz, 9,4 Hz, 17-H), 3,492 (1H, m, 3-H), 3,629 (1H, dd, ^3J 11,1 Hz, 3,9 Hz, 12-H), 3,712 (1H, s, OH), 4,325 (1H, s, OH), 5,383 (1H, m, 5-H)

Príklady 20 až 28 ilustrujú postupy, pomocou ktorých sa môžu pripraviť medziproduktové zlúčeniny s cieľom prípravy monosacharidu 40.

Príklad 20

Metyl-4,6-O-benzylidén- α -D-glukopyranozid 32

Zmes metyl- α -D-glukopyranozidu (30 g, 0,15 mol), benzaldehydu (70 ml) a chloridu zinočnatého (20 g) sa mieša pri teplote miestnosti 24 hodín. Reakčný produkt sa vleje do vody a miešanie pokračuje 15 minút. Biela zrazenina sa filtruje a premyje sa dietyléterom. Pevná látka sa mieša s roztokom metasiričitanu sodného (10% roztok) počas 15 minút, filtruje sa a premyje sa vodou. Pevný materiál sa kryštalizuje z chloroformu a éteru a získa sa benzylidénový produkt 32 (31 g, 72 %).

Príklad 21

Metyl-4,6-O-benzylidén-2-O-tosyl- α -D-glukopyranozid 33

p-Toluénsulfonylchlorid (25 g, 1,2 ekv.) v pyridíne (100 ml)

sa pridá po kvapkách pri teplote 0 °C k roztoku benzylidénglukózy 32 (31 g, 0,12 mol) v pyridíne (100 ml). Reakčná zmes a mieša pri teplote miestnosti 48 hodín a potom sa pridá k reakčnej zmesi ľad. Vzniknutý biely pevný materiál sa premyje vodou a rekryštalizuje sa z horúceho etanolu a získa sa tosylovaná glukóza 33 (28 g, 60 %).

Príklad 22

Metyl-4,6-O-benzylidén-3-O-metyl- α -D-altropyranozid 34

Tosylát 33 (28 g, 64 mmol) sa zahrieva v roztoku sodíka (7 g) v metanole (150 ml) na teplotu 110 °C počas 48 hodín v autokláve. Reakčná nádobka sa ochladí a k reakčnej zmesi sa pridá pevný oxid uhličitý. Po filtrácii sa metanol odparí a pevný materiál sa prevedie od vody. Vodná vrstva sa extrahuje chloroformom (3x). Chloroform sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Surová zmes sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou chloroformu a acetónu (9:1) a získa sa altrozid 34 (10 g, 52 %).

Príklad 23

Metyl-6-bróm-4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-altropyranozid 35

Benzylidénaltrozid 34 (10 g, 33 mmol) sa pridá k roztoku N-brómsukcínimidu (7,6 g) a uhličitanu bárnateho (20 g) v chloride uhličitom a reakčná zmes sa zahrieva pri spätnom toku na 75 °C počas 3 hodín. Reakčná zmes sa filtruje a tetrachlóruhličitová vrstva sa premyje vodou. Organická vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparením sa získa 6-bróm-altrozid 35 (9 g, 69 %).

Príklad 24

Metyl-4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-altropyranozid 36

Borohydrid sodný (18 g) vo vode (30 ml) sa pridá po kvapkách pri teplote 0 °C k roztoku brómaltrozidu 35 (9 g, 23 mmol) a chloridu nikelnatému (18 g) v etanole (300 ml). Reakčná zmes sa zahrieva pri teplote spätného toku na 75 °C počas 1 hodiny a potom sa filtruje. Etanol sa odparí a zvyšná vodná vrstva sa extrahuje chloroformom (3x). Chloroform sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí a získa sa 6-deoxyaltrozid 36 (5 g, 72 %).

Príklad 25

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-fenyltioaltropyranozid 37

Fenyltiotrimetylsilán (5 ml) a trimetylsilyltrifluórmétán-sulfonát (2 ml) sa pridajú pri 0 °C k roztoku 6-deoxyaltrozidu 36 (5 g, 17 mmol) v dichlórmetáne (200 ml). Reakčná zmes sa mieša pri teplote miestnosti 6 hodín. Potom sa pridá k reakčnej zmesi nasýtený hydrogenuhličitan sodný. Dichlórmetánová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Surová zmes sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou chloroformu a acetónu (9:1) a získa sa α -fenyltioaltrozid 37 (4 g, 63 %).

Príklad 26

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-2-fenyltio-2,6-dideoxy- α -D-fluorocymaropyranozid 38

Dietylamínosulfurtrifluorid (0,65 g) sa pridá rýchlo pri 0 °C k roztoku α -fenyltioaltrozidu 37 (0,5 g, 1,33 mmol) v dichlórmetáne. Reakčná zmes sa mieša 0,5 hodiny pri 0 °C a potom sa pridá nasýtený hydrogenuhličitan sodný. Dichlórmetán sa oddelí od vodnej vrstvy, suší sa (MgSO_4), filtruje sa a odparí a získa sa α -fluorocymaróza 38 (450 mg, 90 %).

Príklad 27

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-2-O-terc.butylldimetylsilyl- α -D-fenyltioaltrozid 39

6-Deoxyaltrozid 37 (5 g) sa silyluje použitím terc.butyl-dimetylsilylchloridu (3 g) a imidazolu (3 g) v pyridíne (50 ml). Reakcia sa spracuje extrakciou s etylacetátom, premyje sa etylacetátom s kyselinou chlorovodíkovou (6 N), potom hydrogenuhlíčitán sodným a napokon vodou. Etylacetátová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje sa a odparí a získa sa silylovaný benzoylfenyltioaltrozid 39 (80 %).

Príklad 28

3-O-metyl-2-O-terc.butylldimetylsilyl- α -D-fenyltioaltrozid 40

Silylovaný benzoylfenyltioaltrozid 39 (6 g) sa spracuje metoxidom sodným (100 ml) počas 4 hodín. Metanol sa odparí a k reakčnej zmesi sa pridá voda. Vodná vrstva sa okyslí (pH 5, AcOH) a extrahuje sa etylacetátom. Etylacetátová vrstva sa premyje vodou, suší sa (MgSO_4), filtruje a odparí a získa sa silylovaný metylfenyltioaltrozid 40 (75 %).

Príklady 29 až 37 ilustrujú postupy, pomocou ktorých sa môžu pripraviť medziproduktové zlúčeniny s cieľom prípravy druhého monosacharidu 50.

Príklad 29

1,2:5,6-Di-O-izopropylidén-4- α -D-glukofuranóza 42

Kyselina sírová (40 ml) sa pridá po kvapkách pri 0 °C k roztoku α -D-glukózy 41 (50 mg, 0,28 mol) v acetóne (1 l). Reakčná zmes sa mieša 24 hodín a potom sa neutralizuje pri použití hydroxidu sodného (6 M). Acetón sa odparí a vodná vrstva sa extrahuje s chloroformom (2x). Chloroform sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Kryštalizáciou z cyklohexánu sa získa diizopropylidén-glukóza 42 (41 g, 57 %).

Príklad 30

1,2:5,6-Di-O-izopropylidén-3-O-metyl-4- α -D-glukofuranóza 43

α -D-glukofuranóza 42 (41 g, 0,16 mol) v tetrahydrofuráne (300 ml) sa pridá po kvapkách k suspenzii hydridu sodného (5 g) v tetrahydrofuráne (200 ml). Po 0,5 hodine sa pridá k reakčnej zmesi metyljodid (25 g) v tetrahydrofuráne (100 ml) a reakčná zmes sa mieša 24 hodín. K reakčnej zmesi sa pridá voda a zmes sa extrahuje éterom (3x). Éterová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí sa a získa sa metylchránená glukóza 43 (38 g, 83 %).

Príklad 31

3-O-Metyl- α -D-glukopyranozid 44

Metyldiizopropylidénová zlúčenina 43 (38 g, 0,14 mol) sa rozpustí v kyseline octovej (50%, 700 ml) a roztok sa zahrieva pri spätnom toku 18 hodín. Po ochladení sa odparí kyselina octová. Surový produkt sa čistí stĺpcovou chromatografiou eluovaním zmesou chloroformu, metanolu, acetónu a vody (70:27:2:1) a získa sa 3-O-metyl- α -D-glukopyranozid 44 (13 g, 50 %).

Príklad 32

Metyl-3-O-metyl- α -D-glukopyranozid 45

3-O-metyl- α -D-glukopyranozid 44 (10 g) sa rozpustí v metanole (50 ml) a koncentrovanej kyseline chlorovodíkovej (1 ml) a zahrieva sa pri spätnom toku cez noc. Pridá sa pevný NaHCO_3 a reakčná zmes sa filtruje. Metanol sa odparí a získa sa 1,3-di-O-metyl- α -D-glukopyranozid 45 (95 %).

Príklad 33

Metyl-4,6-O-benzylidén-3-O-metyl- α -D-glukopyranozid 46

Glukopyranozid 45 (8 g) sa mieša pri teplote miestnosti v roztoku benzaldehydu (20 ml) a chloridu zinočnatého (5 g). Po 24 hodinách sa pridá ľad a vodná vrstva sa extrahuje chloroformom. Chloroformová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje sa a odparí. Benzaldehyd sa odstráni vákuovou destiláciou a produkt sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou acetónu a chloroformu (0,5:9,5) a získa sa benzylidén- α -glukopyranozid 46 (60 %).

Príklad 34

Metyl-4-O-benzoyl-O-metyl-6-deoxy- α -glukopyranozid 47

Benzylidénová zlúčenina 46 (5 g) sa zahrieva pri spätnom toku pri 80 °C v zmesi N-brómsukcínimidu (3,7 g) a uhličitanu bárnateho (4 g) v chloride uhličitom. Po 4 hodinách sa reakčná zmes filtruje a chlorid uhličitý sa premyje vodou, suší sa (MgSO_4), filtruje a odparením sa získa brómszlúčenina (70 %).

Brómszlúčenina (4,3 g) sa rozpustí pri 0 °C v roztoku etanolu (300 ml) a chloridu nikelnatého (8,6 g). K tomuto roztoku sa pridá po kvapkách počas 15 minút borohydrid sodný (8,6 g) vo vode (50 ml). Reakčná zmes sa zahrieva pri spätnom toku pri 100 °C počas 45 minút, ochladí sa, filtruje a odparí. Pridá sa chloroform a chloroformová vrstva sa premyje vodou, suší sa (MgSO_4), filtruje a odparí a získa sa 6-deoxycukor 47 (70 %).

Príklad 35

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -glukopyranozid 48

6-Deoxyglukopyranozid 47 (3 g) sa rozpustí v dichlórmetáne (50 ml). K tomuto roztoku sa pridá fenyltiotrimetylsilán (2 g) a trimetylsilyltrifluórmetánsulfonát (0,2 ml). Roztok sa mieša pri teplote miestnosti cez noc a potom sa pridá nasýtený hydrogenuhličitan sodný. Dichlórmetánová vrstva sa suší (MgSO_4),

filtruje sa a odparí. Produkt sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou etylacetátu a hexánu (2:8) a získa sa zlúčenina 48 (60 %).

Príklad 36

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -gluko-pyranozid 49

K roztoku glukopyranozidu 48 (2 g) v pyridíne (20 ml) sa pridá pivaloylchlorid (2 ml). Roztok sa mieša pri teplote miestnosti cez noc a potom sa pridá voda. Vodná vrstva sa extrahuje etylacetátom a organická vrstva sa premyje HCl (6 N). Organická vrstva sa suší ($MgSO_4$), filtruje a odparením sa získa pivaloylester 49 (80 %).

Príklad 37

4-O-Benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fluór-6-deoxy- β -gluko-pyranozid 50

N-Brómsukcínimid (1,2 g) a dimetylamínosulfurtrifluorid (1,2 g) sa pridajú pri 0 °C k roztoku pivaloylesteru 49 (2 g) v dichlórmetáne (100 ml). Po 1 hodine sa pridá nasýtený hydrogenuhličitán sodný. Dichlórmetánová vrstva sa suší ($MgSO_4$), filtruje a odparí. β -Fluórpyranozid 50 sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou etylacetátu a hexánu (2:8) (výťažok 45 %).

Príklad 38 ilustruje postup, pomocou ktorého sa môže pripraviť 3-O-[4-O-benzoyl-2-fenyltio- β -D-cymaropyranosyl]-12,14 β -dihydroxypregnan-5-en-20-ón (51).

Príklad 38

3-O-[4-O-benzoyl-2-fenyltio- β -D-cymaropyranosyl]-12,14 β -dihydroxypregn-5-en-20-ón 51

Chlorid cínatý (190 mg, 1 mmol) sa pridá pri teplote -15°C k roztoku 3,12,14a-trihydroxypregnan-5-en-20-ónu 15 (100 mg, 0,28 mmol) a fluórcymaropyranozidu 38 (210 mg, 0,56 mmol) v suchom dietyléteri a 4A molekulových sít. Reakčná zmes sa udržiava pri -15°C počas 3 dní. K reakčnej zmesi sa pridá nasýtený hydrogenuhličitan sodný. Éterová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Produkt sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou chloroformu a metanolu (9,5:0,5) a získa sa glykozid 51 (30 mg, 15 %).

Príklady 39 až 41 ilustrujú syntetické postupy, pomocou ktorých sa môžu kopulovať cymarózové a thevetozové časti.

Príklad 39

Thevetozo-cymarózový disacharid 53

Roztok thevetózy 50 A (1,5 g), cymarózy 40 (1,3 g) a molekulových sít 4A v dichlórmetáne sa mieša pri teplote miestnosti počas 1 hodiny. Reakčná zmes sa ochladí na -15°C a pridá sa chlorid cínatý (0,8 g) a trifluórmétánsulfonát strieborný (1,1 g). Zmes sa mieša pri -15°C počas 16 hodín a pridá sa trietylamín (0,5 ml). Reakčný produkt sa filtruje a dichlórmetán sa odparí. Disacharid sa čistí stĺpcovou chromatografiou na silikagéle eluovaním zmesou etylacetátu a hexánu (2:8), výťažok 15 %.

Príklad 40

Thevetozo-cymarózový disacharid 54

K roztoku disacharidu 53 (200 mg) v tetrahydrofuráne (20 ml) sa pridá tetrabutylamóniumfluorid (0,4 ml). Zmes sa mieša pri teplote miestnosti 1 hodinu a pridá sa nasýtený hydrogenuhličitan sodný. Reakčná zmes sa extrahuje etylacetátom a etylacetátová vrstva sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Disacharid 54 sa čistí

stĺpcovou chromatografiou na silikagéle zmesou acetónu a chloroformu (0,5:9,5), výťažok 60 %.

Príklad 41

Thevetozo-cymarózový disacharid 55

K roztoku disacharidu 54 (80 mg) v dichlórmetáne (10 ml) sa pridá pri 0 °C dietylaminosulfurtrifluorid (80 µl). Zmes sa mieša pri 0 °C počas 0,5 hodiny a pridá sa nasýtený hydrogenuhličitan sodný a viac dichlórmetánu. Dichlórmetán sa suší (MgSO_4), filtruje a odparí. Čistením stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (etylacetát:hexán = 1:9) sa získa disacharid 55 v 65% výťažku.

Príklad 42

Výsledky nasledujúcich biologických skúšok na zníženie chuti do jedla sú uvedené ďalej, pozri.

- a) Irwinov test;
- b) Test na akútnu toxicitu; a
- c) Test na anorektickú orálnu dávku.

a) Irwinov test

Úlohou tohoto testu bolo hodnotenie činidla znižujúceho chuť do jedla podľa vynálezu, získaného z rastlinného extraktu, ako je popísané vyššie podľa Irwinovho testu sledujúceho trankvilizačné a sedatívne účinky.

Experimentálny postup

Činidlo znižujúce chuť do jedla sa extrahuje z rastlinného materiálu podľa metódy popísanej vyššie a podá sa dvom zo štyroch skupín zvierat, pričom každá skupina obsahuje tri zvieratá: jedna skupina sa neošetruje, jednej skupine sa podá dimetylsulfoxid

(DMSO), jednej skupine sa podá skúšobná vzorka v dávke 50 mg/kg a jednej skupine sa podá skúšobná vzorka v dávke 300 mg/kg. Ošetrovanie sa uskutočňuje intraperitoneálnou injekciou a pozorovanie sa uskutočňuje v špecifických intervaloch do piatich hodín po podaní. Pri interpretácii výsledkov sa sledujú len tie symptómy, ktoré sú iné ako boli pozorované u zvierat ošetrovaných DMSO.

Výsledky

Je zrejmé, že rozpúšťadlo, DMSO, má značný účinok na zvieratá, predovšetkým na mechanizmus regulujúci teplotu. Telesná teplota všetkých zvierat ošetrovaných rozpúšťadlom, samotným alebo rozpúšťadlom s testovanou vzorkou, vykazovala značný pokles.

Zvieratá v skupine, ktorá bola ošetrovaná nižšou dávkou testovanej zlúčeniny, sa prejavovali zníženým rozptýlením v klietke a zníženou pohybovou aktivitou, ako vo všetkých ostatných skupinách, vrátane kontrolnej skupiny. Apatia bola pozorovaná na rovnakej úrovni ako v prípade skupiny ošetrovanej DMSO. Znížené dýchanie bolo pozorované 15 až 60 minút po ošetrovaní. Ptóza (pokles očných viečok) bol tiež pozorovaný vo väčšom stupni než v prípade skupiny ošetrovanej DMSO. Reakcia na ušnici bola pozitívna, rovnako ako aj odpoveď na prst, a ukazovala bojovitosť. Telesná teplota poklesla po ošetrovaní na 32,7 °C.

Zvieratá v skupine, ktorá boli ošetrované vysokou dávkou testovanej zlúčeniny, sa prejavovali začiatočným znížením rozptýlenia v klietke a zníženou pohybovou aktivitou, ale pred smrťou, ku ktorej došlo 1 hodinu po ošetrovaní, sa prejavovali zvýšeným rozptýlením a zvýšenou aktivitou. Po 30 minútach po ošetrovaní došlo k vážnym klinickým symetrickým kŕčom. Dýchanie sa na začiatku znížilo, ale zvýšilo sa pred smrťou. Reakcia na ušnici bola oneskorená, odpoveď na prst bola pozitívna a ukazovala bojovitosť, ako bolo pozorovaná v prípade zvierat ošetrovaných nízkou dávkou. Telesná teplota poklesla po ošetrovaní na 30,7 °C. Bola pozorovaná zvýšená pozičná aktivita a takisto znížený tonus. Bola pozorovaná abnormálna rotácia končatiny, sila

zovretia sa znížila, žiadna bolestivá odpoveď a došlo k strate vzpriamovacieho reflexu.

Diskusia

Pri porovnaní s kontrolnou vzorkou a DMSO ošetrovanými zvieratami, zvieratá, ktoré boli ošetrované len nízkou dávkou (50 mg/kg) vykazujú znížené dýchanie a zvýšený stupeň ptózy. Zvieratá, ktorá obdržali vysokú dávku (300 mg/kg) testovanej vzorky reagovali veľmi intenzívne a táto reakcia sa prejavila kŕčmi a smrťou. Všetky ostatné pozorovania uskutočnené na týchto zvieratách sa pripisujú zvieratám, ktoré boli v kŕčoch a umierali. Signály naznačujúce ukludňujúce a sedatívne pôsobenie, ako značne znížené rozptýlenie v klietkach, zníženú pohyblivosť a apatiu v prípade testovaných skupín, ktoré by sa mohli pripísať testovanej vzorke, neboli pozorované.

Na záver sa môže uviesť, že testovaný vzorka je smrteľná pre myši v dávke 300 mg/kg a spôsobuje znížené dýchanie pre myši pri dávke 50 mg/kg, ak sa podá intraperitoneálne s DMSO ako rozpúšťadlom.

b) Test na akútnu toxicitu

Úlohou tohoto testu bolo získanie informácií o toxicite vzorky.

Experimentálny postup

Rastlinný extrakt pripravený podľa vynálezu, ako je popísané vyššie, a spôsobujúci zníženie chuti do jedla sa čistí a jedna testovaná vzorka sa skúša pri zvýšenej dávke orálnym ošetrovaním myší. Pri skúške sa použili dve zvieratá v skupine, s tou výnimkou, že pri najvyššej dávke sa ošetrilo len jedno zviera. Zvieratá boli skúmané na dobrý zdravotný stav a ich telesné hmotnosti boli stanovené ten deň, kedy prebehlo ošetrovanie.

Podané dávky ležali v rozsahu 100 mg/kg až 3028,5 mg/kg. Dávky boli stanovené a zmiešali sa so zemiakovým škrobom tak, že každé zviera dostalo celkovú dávku vo výške 0,2 ml. Zviera č. 13 dostalo 0,25 ml. Zemiakový škrob sa pripravil zmiešaním 20 g škrobu s malým množstvom studenej vody a pridala sa vriaca voda tak, aby objem bol 1 liter. Pred dávkovaním sa suspenzia nechala ochladiť na teplotu miestnosti.

Zvieratá v 1. a 2. skupine sa ošetrili rovnaký deň. Zvieratá boli pozorované 24 hodín a ak sa neobjavili žiadne príznaky toxicity, ošetrila sa ďalšia skupina. Rovnaký postup pokračoval, dokiaľ sa neošetrili všetky zvieratá. Týmto spôsobom sa dosiahlo, že zvieratá neboli nevyhnutne ošetrené, ak akútna toxická dávka bola dosiahnutá v predchádzajúcej skupine.

Zvieratá boli pozorované na klinické príznaky toxicity ihneď (1 až 2 hodiny) po ošetrovaní a potom denne. Telesná hmotnosť sa merala raz týždenne a takisto sa merala pre každé zviera celková spotreba potravy a vody.

Žijúce zvieratá boli eutanazované intraperitoneálnou injekciou pentobarbitónu sodného (komerčne dostupný pod obchodným menom Euthanaze, Centaur[®]) 14. deň pokusu. Potom sa uskutočnilo posmrtné vyšetrenie týchto zvierat, rovnako ako aj v prípade zvierat, ktoré zomreli počas pokusu. Zozbierali sa vzorky pre histopatológiu.

Výsledky

Skupina 1 (kontrolná skupina)

Počas 14-dennej periódy pozorovania neboli pozorované žiadne klinické príznaky toxicity. Spotreba potravy a vody bola v normále. Zmeny v telesnej hmotnosti boli takisto v normále. Žiadne histopatologické zmeny neboli zistené vo vzorkách pečene.

Skupina 2 (100 mg/kg)

Počas periódy pozorovania neboli pozorované žiadne klinické príznaky toxicity. Spotreba potravy a vody bola normálna, zmeny v telesnej hmotnosti boli takisto normálne. Žiadna mikroskopická patológia nebola pozorovaná a žiadne histopatologické alebo makrofologické zmeny neboli zistené vo vzorke pečene.

Skupina 3 (200 mg/kg)

Zvieratá v tejto skupine nevykazovali žiadne klinické symptómy toxicity počas experimentu. Spotreba vody a potravy bola normálna, rovnako ako aj zmeny v telesnej hmotnosti. Nebola pozorovaná žiadna makroskopická patológia, ale pečeň vykazovala pri vyšetrení histopatologické zmeny. Zakalené zdurení hepatocytov bolo jemné v prípade zvieraťa č. 6, ale mierne v prípade zvieraťa č. 5. Mierne hydropická degenerácia sa tiež vyskytuje v hepatocytoch zvieraťa č. 5.

Skupina 4 (400 mg/kg)

Počas pozorovania neboli zistené žiadne klinické príznaky toxicity a žiadna makroskopická patológia nebola zistená pri posmrtnom vyšetrení. Na histológiu bolo zistené mierne zakalené zdurení a jemné hydropické zmeny hepatocytov.

Príjem vody a potravy a zvýšenie telesnej hmotnosti v prípade zvieraťa č. 7 bolo normálne. Zviera č. 8 spotrebovalo takmer dvojnásobok celkového množstva potravy ako zviera č. 7 (144,6 g resp. 73,9 g), ale zvýšenie v telesnej hmotnosti bolo len o 0,81 g v porovnaní s 2,7 g.

Skupina 5 (800 mg/kg)

Jedno zviera (zviera č. 10) zomrelo tri hodiny po dávkovaní, bez toho, aby vykázalo nejaké špecifické príznaky. Ďalšie zviera (zviera č. 9) prežilo celú periódu pozorovania bez príznakov toxicity. Spotreba vody v prípade zvieraťa, ktoré prežilo, bola

normálna (42,42 ml), zatiaľ čo spotreba potravy bola vysoká (134,2 g). Telesná hmotnosť sa zvýšila o 2,85 g, čo predstavovalo najvyššie zvýšenie zo zvierat, ktoré sa zúčastnili pokusu.

Posmrtné vyšetrenie zvieraťa č. 10, ktoré zomrelo krátko po podaní, ukázalo na prekrvené pľúca. Žiadne cudzia telesná reakcia, ktorá by indikovala inhaláciu testovaného materiálu nebola zistená. Žiadna patológia nebola pozorovaná v prípade zvieraťa č. 9. Jemná cytoplazmatická vakuolizácia (hydropická degenerácia) sa nevyskytovala v prípade zvieraťa č. 10, ale mierna v prípade zvieraťa č. 9. Žľazový cytoplazmatický vzhľad pečene bol klasifikovaný v prípade oboch zvierat ako mierny.

Skupina 6 (1600 mg/kg)

Žiadne z prítomných zvierat nevykazovalo akékoľvek príznaky toxicity počas trvania pokusu. Pri posmrtnom vyšetrení nebola pozorovaná žiadna makroskopická patológia, ale mierne degeneratívne zmeny na pečeni boli pri histopatologickom vyšetrení pozorované v prípade zvieraťa č. 11. Zviera č. 12 vykázalo mierne zakalené zdureníe a mierne hydropické zmeny hepatocytov. Spotreba potravy a vody bola normálna, takisto zvýšenie telesnej hmotnosti.

Skupina 7 (3028,5 mg/kg)

Touto dávkou bolo ošetrované len jedno zviera. V prípade tohoto zvieraťa neboli zistené žiadne príznaky toxicity počas pokusu a takisto nebola pozorovaná žiadna makroskopická patológia. Pri histopatologickom vyšetrení bolo zistené mierne zakalené zdureníe a hydropná degenerácia hepatocytov. Zviera vykazovali počas pozorovania stratu telesnej hmotnosti (-0,82 g), ale spotreba potravy a vody bola normálna.

Diskusia

Vzhľadom na to, že sa použilo v každej skupine len veľmi

malé množstvo zvierat, je ťažké robiť akékoľvek závery. Skutočnosť, že zomrelo pri pokuse len jedno zviera pri nízkej dávke bez akýchkoľvek symptómov môže indikovať, že k smrti nedošlo v súvislosti s testovanou vzorkou, ale v dôsledku stresu počas a/alebo po ošetrovaní. Žiadne zviera vo vyššej dávkovej skupine nezomrelo alebo nevykázalo akékoľvek príznaky toxicity, čo opäť podporuje túto domnienku.

Zvýšená potreba potravy pozorovaná v prípade zvieraťa č. 8 by mohla byť prisudzovaná nadmernému rozliatiu potravy, ako vyplýva z malého zvýšenia telesnej hmotnosti. Je potrebné zobrať do úvahy, že všetky zvieratá v experimente boli ošetrované len raz a že je nepravdepodobné, že činidlo znižujúce chuť do jedla bude mať značný vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo telesnú hmotnosť počas 14-dennej periódy, čo je prípad tejto skúšky.

Z histopatologického vyšetrenia vzorky pečene je zrejmé, že patologické zmeny sú závislé od dávky; zvieratá, ktoré dostali vyššiu dávku vykazujú väčšie zmeny. Pozorovaná patológia nemala metabolickú povahu, ale pravdepodobne bola spôsobená testovanou vzorkou. Zmeny mali len degeneratívny charakter a preto boli vratné. Neboli pozorované žiadne ireverzibilné hepatocelulárne zmeny.

Môžeme zhrnúť, že zomrelo len jedno zviera pri nižšej dávke (800 mg/kg), ale jeho smrť nebola pravdepodobne spôsobená testovanou vzorkou. Žiadne ďalšie zviera v ktorejkoľvek dávkovej skupine nevykazovalo akékoľvek príznaky počas 14-denného pozorovania po ošetrovaní alebo nezomrelo na následky ošetrovania. Jedna orálna dávka testovanej vzorky zaviedla reverzibilné hepatocelulárne zmeny závislé od dávky.

c) Anorektický test na orálnu dávku

Úlohou tohoto testu bolo určenie aktivity rastlinného extraktu pripraveného podľa vynálezu a minimálnej účinnej dávky a v rovnakom čase preskúmanie akýchkoľvek vedľajších účinkov, ak

o je znížené dýchanie, ako bolo pozorované v Irwinovom teste vyššie.

Experimentálny postup

Zvieratá boli rozdelené do skupín náhodným spôsobom. Každá ošetrovaná skupina bola zložená z troch zvierat, v kontrolnej skupine bolo 6 zvierat. Testovaná vzorka bola dávkovaná mladým samičkám potkana s telesnou hmotnosťou 100 až 150 g pri aklimatizácii počas troch po sebe idúcich dní. Zvieratá boli s cieľom jednoduchšej identifikácie označené kovovými krúžkami a kože bola označená KMnO_4 . Zvieratá boli umiestené individuálne v štandardných polykarbonátových klietkach a voda a práškové komerčné pelety pre živočíchy boli dostupné podľa vôle. Spotreba vody a potravín boli merané a počítané každý deň. S cieľom minimálnej účinnej dávky testovanej vzorky sa testovalo päť dávok. Ošetrovanie bolo orálne testovanou vzorkou suspendovanou v zemiakovom škrobe.

Testovanou substanciou bola zlúčenina I, vo forme bieleho granulového prášku pripravená z extraktu z rastlinného materiálu podľa vynálezu a odmerané množstvo testovanej vzorky sa zmiešalo s pripraveným zemiakovým škrobom a dávkovalo sa. Zmiešanie so zemiakovým škrobom sa uskutočnilo každý deň, tesne pred dávkovaním. Pred prípravou dávkového objemu pre každé zviera sa suspenzia dôkladne zmiešala pri použití Vortex-u.

Bol testovaný rozsah piatich dávok s kontrolnou skupinou, ktorá dostala len nosičovú substanciu. Dávky boli vybrané na základe účinkov zistených v prípade vyššie popísaného Irwinovho testu a boli takéto:

- Skupina 1: 0,00 mg/kg (kontrolná skupina)
- Skupina 2: 6,25 mg/kg
- Skupina 3: 12,50 mg/kg
- Skupina 4: 25,00 mg/kg
- Skupina 5: 37,50 mg/kg

Skupina 6: 50,00 mg/kg

Výsledky

Ošetrovanie neovplyvnilo zdravotný stav zvierat počas študovanej periódy. Zvieratá ošetrované testovanou vzorkou vo všetkých dávkových skupinách vykázali podstatne zníženú priemernú telesnú hmotnosť získanú počas celej študovanej periódy a zvieratá v troch z piatich ošetrovaných skupín skutočne stratili telesnú hmotnosť.

Priemerná spotreba potravín sa v prípade všetkých ošetrovaných skupín počas periódy znížila. Zvieratá vo vyšších dávkových skupinách mali zvýšenú spotrebu vody.

Rýchlosť dýchania žiadneho zvieratá v ktorejkoľvek dávkovej skupine nebola ovplyvnená.

Zvieratá vo všetkých dávkových skupinách mali pri posmrtnom vyšetrení drobné pečene, ale žiadna makroskopická patológia nebola pozorovaná.

Diskusia

Dáta zozbierané počas aklimatizačnej periódy potvrdili, že všetky zvieratá zahrnuté do pokusu boli zdravé a telesná hmotnosť bola medzi jednotlivými zvieratami porovnateľná.

Zníženie a v niektorých prípadoch dokonca strata telesnej hmotnosti v kombinácii so zníženým príjmom potravy je silne príznačná so znížením chuti do jedla.

Zníženie príjmu potravy a poznaná znížená telesná hmotnosť boli zistené dokonca aj v najnižšej dávkovej skupine (6,25 mg/kg). Aktuálna strata telesnej hmotnosti bola zistená v skupine s dávkou 12,50 mg/kg.

Je dôležité uviesť, že všetky ošetrované skupiny mali zvýšenú spotrebu vody a zníženú spotrebu potravy (obrázok 2). To by mohlo byť v dôsledku diuretického účinku testovanej vzorky alebo stimulácie tretieho centra v mozgu.

Pozitívnym aspektom je skutočnosť, že nedošlo k zníženiu dýchania, ako bolo pozorované, pri teste akútnej toxicity, uvedenom vyššie, intraperitoneálnou cestou. To by mohlo byť v dôsledku zníženej absorpcie z gastrointestinálneho traktu s následnou zníženou biologickou dostupnosťou. Biologická dostupnosť pri orálnom dávkovaní však bola dostatočná na to, aby testovaná vzorka bola účinná. Slabé zníženie rýchlosti dýchania 1 hodinu po ošetrení vo väčšine skupín by mohlo byť pripísané naplneniu žalúdka dávkovaným objemom a následnou pasivitou zvierat.

Drobná pečeň pozorovaná v ošetrovaných skupinách by mohla byť spôsobená následkom zmien metabolizmu v závislosti od zníženého príjmu potravy, čo spôsobilo zvýšený metabolizmus tukov a preťaženie pečene. Ak tento predpoklad platí, tieto zmeny môžu byť považované za prechodné, ktoré prestanú časom po dosiahnutí stabilného stavu alebo po prerušení pokusu. Možný účinok na pečeň vyžaduje ďalší výskum.

Keďže hola táto štúdia pojatá primárne ako skúšobný test, boli použité malé skupiny testovaných zvierat. To robí štatistické vyhodnotenie dát obťažným, predovšetkým ak jednotlivé zvieratá reagujú úplne odlišne. Avšak dáta indikujú, že testované vzorky pôsobia ako činidlá znižujúce chuť do jedla, dokonca aj v najnižších dávkach (6,25 mg/kg). V rámci testu nedošlo k žiadnym klinickým príznakom zníženia dýchania.

Príklad 43

Zozbierané rastliny *Hoodia* získané buď prírody alebo kultivačným programom sú najprv uchované pri teplote 4 °C maximálne 48 hodín. Rastliny sa omyjú pod vodovodným kohútikom a

narežú sa na rezy cca 1 cm. Rezy sa spoja a lisujú na hydraulickom lise pri tlaku 303 MPa minimálne 0,5 hodiny. Počas lisovania sa oddelene zozbiera šťava z rastlín. Šťava sa uchováva pri -18 °C do ďalšieho spracovania.

Šťava sa suší rozstrekovaním pri vhodných podmienkach a získa sa tekúci prášok. Obsah vlhkosti v prášku je výhodne menší ako 5 % po sušení rozprašovaním a ak je to potrebné, ďalej sa suší vo vákuovej peci alebo pri použití sušiarne s fluidným lôžkom.

Ako šťava, tak aj materiál sušený rozprašovaním sú účinné ako činidlá znižujúce chuť do jedla v biologických skúškach na potkanoch.

Experiment

50 kg rastlín *Hoodia gordonii* sa omyje pod vodovodným kohútikom a nareže sa na rezy cca 1 cm. Rezy sa spoja a lisujú na hydraulickom lise pri tlaku 303 MPa minimálne 0,5 hodiny. Šťava sa zozbiera a jej zistená hmotnosť je v prípade použitia prírodných rastlín *Hoodia gordonii* 10 kg a v prípade použitia rastlín *Hoodia gordonii* z kultivačného programu 20 kg. Šťava (500 g) sa suší rozprašovaním pri nasledujúcich podmienkach:

Rýchlosť prúdu:	2,85 ml/min
Vstupná teplota:	110 °C
Výstupná teplota:	70 °C
Teplota komory:	78 °C

Prášok získaný rozprašovaním bol voľne tekúci prášok (22 g) s obsahom vlhkosti 6,9 %.

Prášok sušený rozprašovaním sa analyzoval na koncentráciu aktívnej zložky použitím techník HPLC. Zistilo sa, že koncentrácia aktívnej zložky je 13 g/kg prášku získaného sušením rozprašovaním.

Metóda HPLC analýzy

Eluant:	Acetonitril:voda (7:3), izokratický
Kolóna:	Reverzná fáza C-18
Absorbancia:	225 nm
Prietoková rýchlosť:	1 ml/min
Injekčný objem:	10 µl

Metóda

Prášok získaný sušením rozprašovaním sa rozpustí vo vode (0,5 ml) a acetonitrile (0,5 ml). 10 µl tohoto roztoku sa injektuje do HPLC a stanoví sa koncentrácia aktívnej zlúčeniny pri použití krivky, ktorá sa pripraví z čistej zlúčeniny 1.

Príklad 44

Výsledky štúdie navrhnutej na stanovenie možných anorektických účinkov zlúčeniny 1 na potkanov sú uvedené ďalej. V nasledujúcom sú uvedené testované vzorky ako čistá šľava (vzorka 1), vzorka získaná sušením rozprašovaním šľavy (vzorka 2) a aktívna časť (vzorka 3). Vzorky 1 a 2 sú šľava a látka získaná sušením rozprašovaním, ako je popísané v príklade 43 vyššie. Vzorka 3 je zlúčenina extrahovaná rozpúšťadlom ($\geq 95\%$ čistota).

Potkany Wistar sa ošetrili jednou orálnou dávkou pri použití vzoriek 1 až 3. Dvom ďalším kontrolným skupinám sa dalo vehikulum (destilovaná voda alebo DMSO). Ako referenčný štandard sa podal orálne fenfluramín (7,5 mg/kg).

Vzorka 1 (čistá šľava), podávaná orálne, produkovala od dávky závislú redukciu spotreby potravy, ktorá bola, v porovnaní s kontrolou, kde dávkovalo vehikulum, štatisticky podstatná pri dávkach 1600 mg/kg a vyšších. Sprievodné zníženie telesnej hmotnosti (alebo rýchlosti rastu) sa takisto zaznamenávali. Ten

deň, kedy sa dávkovalo, sa zaznamenala štatisticky podstatná spotreba vody 3 hodiny po dávkovaní (6400 mg/kg a 10000 mg/kg) a 6 hodín po dávkovaní. Medzi 24 a 48 hodinou po dávke došlo k štatisticky významnému zníženiu spotreby vody pri dávkach 3200 mg/kg a vyšších.

Vzorka 2 (látka získaná rozprašovaním šťavy) podaná orálne v množstve 76 mg/kg takisto produkovala, pri porovnaní so zvieratami ošetrovanými vehikulom, štatisticky významné zníženie v spotrebe potravy a telesnej hmotnosti. Žiadne štatisticky významné účinky na spotrebu vody neboli zaznamenané.

Vzorka 3 (aktívna časť) produkovala štatisticky významné zníženie spotreby potravy pri orálnej dávke 5.0 mg/kg. Žiadne štatisticky významné účinky na telesnú hmotnosť neboli aktívnou časťou dosiahnuté, aj keď skúmanie dát odhalilo slabé oneskorenie rastu v porovnaní s kontrolnými zvieratami ošetrovanými vehikulom. Takisto nebolo zaznamenané žiadne štatisticky významné účinky na spotrebu vody.

Referenčný štandard, fenfluramín (7.5 mg/kg) produkoval štatisticky významné zníženie potravy po 6 a 24 hodinách od dávky v porovnaní s kontrolou ošetrovanou vehikulom. Žiadne štatisticky významné účinky na spotrebu vody alebo telesnú hmotnosť neboli zaznamenané.

Neboli zaznamenané žiadne účinky na pečeň spôsobené ošetrovaním.

Testovaná substancia

Identita	Vzorka 1 (čistá šťava)	Vzorka 2 (látka získaná sušením rozprašovaním šťavy)	Vzorka 3 (aktívna časť)
Vzhľad	Hnedá kvapalina	Prášok	Biely prášok
Podmienky skladovania	-20 °C v tme	Teplota miestnosti v tme	4 °C v tme
Čistota	Čistá šťava	Čistá látka získaná sušením rozprašovaním šťavy	≥ 95%
Vehikulum	Destilovaná voda	Destilovaná voda	Dimetylsulf- oxid

Experimentálny postup

Pre štúdiu sa použilo 55 potkanov Wistar

Telesná hmotnosť, spotreba vody (hmotnosť zásobníka na potravu) a spotreba vody (hmotnosť nádoby) sa zapisujú denne rovnaký čas každý deň od začiatku do konca štúdie.

Prvý deň dostali potkany jednu orálnu dávku podľa nasledujúcej tabuľky:

Skupina	n	Orálne ošetrovanie	Dávka (mg/kg)
1	5	Vehikulum (destilovaná voda)	-
2	4	Vzorka 1 (čistá šťava)	800
3	5	Vzorka 1 (čistá šťava)	1600
4	5	Vzorka 1 (čistá šťava)	3200
5	5	Vzorka 1 (čistá šťava)	6400
6	5	Vzorka 1 (čistá šťava)	10000
7	5	Vzorka 2 (látka získaná sušením rozprašovaním šťavy)	38
8	5	Vzorka 2 (látka získaná sušením rozprašovaním šťavy)	76
9	5	Vzorka 3 (aktívna časť)	2,5
10	5	Vzorka 3 (aktívna časť)	5,0
11	3	Fenfluramín	7,5
12	3	Vehikulum (DMSO)	-

Skupinám 1 až 8 bola podaná dávka pri použití konštantného dávkového objemu 10 ml/kg a skupinám 9 až 12 bola podaná dávka pri použití dávkového objemu 1 ml/kg.

Prvý deň bola meraná spotreba potravy a vody tiež 1., 3. a 6. hodinu po dávkovaní.

Po uskutočnenom meraní 8. deň sa zvieratá usmrtili zadusením oxidom uhličitým a pečeň sa vyrezala a vložila sa pred histológiou do 10% pufrového formalínu. Boli pripravené rezy pečene zaliate do vosku s hrúbkou 4 až 5 μm a ofarbené hematoxylínom a eozínom. Ďalšie rezy boli narezané na kryostate na 12 μm a ofarbené na prítomnosť tukov olejovou červenou O (ORO).

Analýza dát

Merala sa spotreba potravy a vody po skončení dávkovaní a

hmotnosť v každom časovom bode pre ošetrované zvieratá P57 sa porovnávala s podobne ošetrovanou kontrolnou skupinou, kedy bolo použité vehikulum, pri použití analýzy rozdielov a nasledoval Williamsov test na porovnanie s kontrolou.

Dáta pre zvieratá ošetrované fenfluramínom sa porovnávali s dátami pre kontrolnú skupinu ošetrovanú vehikulom pri použití Studentovho testu.

Výsledky

Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách.

Vzorka 1 (čistá šťava) podaná orálne, produkovala značné, od dávky závislé denné zníženie potravy. Doba trvania a amplitúda týchto znížení v spotrebe potravy boli závislé od dávky. 24 hodín po dávke produkovala vzorka 1 (čistá šťava) štatisticky podstatné zníženie spotreby potravy, v porovnaní s kontrolou, kde bolo na ošetrovanie použité vehikulum, pri dávkach 1600 mg/kg a vyšších. Najvyššia dávka vzorky 1 (šťava) (10000 mg/kg) produkovala štatisticky podstatné zníženie spotreby potravy do 5 dní po dávke.

Vzorka 2 (látka získaná sušením rozprašovaním šťavy) a vzorka 3 (aktívna časť) produkovali značné a štatisticky podstatné zníženie spotreby potravy pri orálnej dávke 76 a 5,0 mg/kg. V oboch prípadoch trval účinok 48 hodín po dávke.

Referenčný štandard, fenfluramín (7,5 mg/kg p.o.) produkoval štatisticky podstatné zníženie potravy, v porovnaní s kontrolnou skupinou, kedy bolo na ošetrovanie použité vehikulum, 6 a 24 hodín po dávke (skupina 12).

Vzorka 2 (látka získaná sušením rozprašovaním šťavy) a vzorka 3 (aktívna časť) neprodukovali značné, od dávky závislé, účinky na spotrebu vody. Ten deň, kedy sa dávkovalo, produkovala čistá šťava štatisticky podstatné zvýšenie spotreby vody 3 hodiny

po dávke (6400 a 10000 mg/kg) a 6 hodín po dávke (10000 mg/kg). Avšak dva dni po dávke bolo zaznamenané štatisticky podstatné zníženie spotreby vody u zvierat, ktorým bola podaná vzorka 1 (šťava) pri dávke 3200, 6400 a 10000 mg/kg. Tieto zníženia nie sú samozrejme závislé od dávky a dochádzalo k nim medzi 1. a 2. dňom po dávke. Biologická podstata týchto účinkov je nejasná.

Vzorka 1 (čistá šťava) produkovala od dávky závislé, štatisticky podstatné účinky na telesnú hmotnosť pri porovnaní s kontrolnou skupinou, kedy bolo použité na ošetrovanie vehikulum (skupina 1). Pri orálnej dávke 3200 mg/kg a vyššej, produkovala vzorka 1 (čistá šťava), v porovnaní s kontrolou, kedy bolo použité na ošetrovanie zvierat vehikulum, štatisticky podstatné zníženie telesnej hmotnosti alebo zníženie rýchlosti rastu. Tieto účinky boli štatisticky podstatné od 48 hodín po dávke do konca štúdie.

Vzorka 2 (látko získaná sušením rozprašovaním šťavy) podaná orálne v množstve 76 mg/kg tiež produkovala podstatné zníženie rastu zvierat, v porovnaní s kontrolnou skupinou (skupina 1), kedy bolo použité na ošetrovanie vehikulum. Tieto účinky boli štatisticky podstatné medzi 3. (48 hodín po dávke) a 5. dňom vrátane.

Vzorka 3 (aktívna časť), aj keď oneskorovala rast zvierat pri najvyššej dávke (5,0 mg/kg) v porovnaní s kontrolnou skupinou, kedy bolo na ošetrovanie použité vehikulum (skupina 12), tento účinok nebol štatisticky podstatný.

Fenfluramín (7,5 mg/kg) neprodukoval, v porovnaní s kontrolou (skupina 12), kedy bolo na ošetrovanie použité vehikulum, štatisticky podstatné účinky na oneskorenie spotreby vody alebo telesnej hmotnosti.

Pokiaľ ide o vplyv na pečeň, neboli zistené žiadne účinky spôsobené ošetrovaním.

Tabuľka 1a

Účinky orálneho podania na spotrebu potravy potkana (pred dávkou, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Priemerná spotreba potravy v skupine (g ± sd) medzi dňami				
			- 6 - - 5	- 5 - - 4	- 4 - - 3	- 3 - - 2	- 2 - - 1
1	Vehikulum (voda)	-	27,8 ±1,54	24,2 ±1,83	27,6 ±3,67	28,3 ±3,50	29,4 ±2,68
2	Vzorka 1 šťava	800	28,3 ±1,43	24,9 ±0,82	27,7 ±0,76	28,4 ±1,51	30,1 ±0,27
3	Vzorka 1 šťava	1600	29,0 ±1,39	25,0 ±2,16	27,4 ±1,96	28,8 ±0,61	29,5 ±1,55
4	Vzorka 1 šťava	3200	27,2 ±2,33	25,1 ±2,46	26,0 ±2,52	28,5 ±2,29	27,6 ±1,15
5	Vzorka 1 šťava	6400	28,7 ±1,64	25,3 ±1,73	27,3 ±1,45	29,2 ±1,09	30,3 ±0,90
6	Vzorka 1 šťava	10000	28,5 ±2,38	23,7 ±2,73	26,0 ±2,31	27,0 ±3,50	28,7 ±2,26
7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	38	28,1 ±1,24	23,9 ±1,79	24,5 ±2,30	27,6 ±1,61	28,5 ±1,07
8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	76	28,7 ±0,91	26,5 ±1,55	27,1 ±1,01	28,7 ±1,99	28,9 ±1,37
9	Vzorka 3 aktívna časť	2,5	28,8 ±1,49	26,4 ±3,12	29,0 ±1,99	29,4 ±1,76	29,5 ±2,81
10	Vzorka 3 aktívna časť	5,0	28,3 ±2,1	25,8 ±1,86	28,1 ±2,65	28,0 ±2,65	28,5 ±3,03
11	Fenfuramin	7,5	29,1 ±0,66	25,3 ±4,03	27,0 ±1,53	30,8 ±0,54	29,7 ±2,84
12	Vehikulum (DMSO)	-	27,9 ±1,8	26,7 ±2,11	28,7 ±1,99	28,1 ±4,06	30,5 ±2,54

sd Štandardná deviacia

Tabuľka 1b

Účinky orálneho podania na spotrebu potravy poškada (po dávke, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Priemerná spotreba potravy v skupine (g ± sd) medzi dňami							
			1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 6	6 - 7	7 - 8	
1	Vehikulum (voda)	-	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	Vzorka 1 šlava	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	Vzorka 1 šlava	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 ± 1,81	
4	Vzorka 1 šlava	3200	20,1 ^{**} ± 1,39	19,0 ^{**} ± 1,08	22,8 ^{**} ± 1,77	28,0 ± 3,14	31,4 ± 2,82	32,3 ± 2,91	33,0 ± 3,01	
5	Vzorka 1 šlava	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	Vzorka 1 šlava	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	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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	Vzorka 3 aktívna časť	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	Vzorka 3 aktívna časť	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	Fenfuramin	7,5	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	Vehikulum (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 štandardná deviácia

Skupina 2 - 8 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 1: $p_1 < 0,05$, $p_7 < 0,01$ Skupina 9 - 11 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 12: $p < 0,05$, $p < 0,01$

Tabuľka 2a

Účinky orálneho podania na spotrebu potravy potkana (po dávke, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	D Dávka (mg/kg)	Priemerná spotreba potravy v skupine (g ± sd) medzi dňami				
			- 6 - - 5	- 5 - - 4	- 4 - - 3	- 3 - - 2	- 2 - - 1
1	Veikulum (DMSO)	-	40,9 ±4,61	34,8 ±4,15	37,6 ±5,63	33,5 ±7,42	32,2 ±6,32
2	Vzorka 1 šťava	800	38,6 ±1,96	37,1 ±9,74	36,4 ±4,81	28,1 ±1,83	30,4 ±4,75
3	Vzorka 1 šťava	1600	43,4 ±10,53	35,9 ±3,84	38,4 ±4,56	31,1 ±4,47	36,5 ±6,39
4	Vzorka 1 šťava	3200	40,1 ±6,58	33,3 ±3,01	37,3 ±4,46	31,3 ±3,48	31,7 ±3,18
5	Vzorka 1 šťava	6400	43,8 ±8,57	36,3 ±9,02	35,4 ±8,18	34,0 ±6,62	35,1 ±5,72
6	Vzorka 1 šťava	10000	37,4 ±6,34	32,7 ±3,35	33,2 ±4,86	29,0 ±5,11	32,2 ±3,27
7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	38	40,0 ±1,36	35,8 ±4,92	34,7 ±3,20	30,2 ±1,88	31,4 ±2,98
8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	76	38,6 ±1,98	37,0 ±1,96	48,8 ±21,5	31,6 ±4,56	39,0 ±17,27
9	Vzorka 3 aktívna časť	2,5	42,0 ±6,70	37,0 ±6,05	34,1 ±3,16	28,0 ±2,58	31,6 ±3,12
10	Vzorka 3 aktívna časť	5,0	40,9 ±1,48	34,2 ±3,00	32,7 ±1,26	28,2 ±1,65	33,1 ±4,82
11	Fenfluramin	7,5	47,0 ±6,3	35,5 ±7,49	34,7 ±3,73	30,9 ±2,12	31,6 ±2,80
12	Veikulum (voda)	-	43,3 ±6,67	34,5 ±4,97	35,2 ±4,34	28,3 ±4,64	31,4 ±6,44

sd - štandardná deviacia

Tabuľka 2b

Účinky orálneho podania na spotrebu potravy potkava (po dávke, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Príjemná spotreba potravy v skupine (g ± sd) medzi dňami							
			1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 6	6 - 7	7 - 8	
1	Vehikulum (voda)	-	34,9 ± 5,45	36,9 ± 6,08	38,0 ± 7,69	37,2 ± 6,18	37,7 ± 5,54	35,3 ± 2,86	36,5 ± 5,85	
2	Vzorka 1 šľava	800	30,9 ± 3,77	34,4 ± 8,12	30,2 ± 13,71	35,9 ± 13,51	39,5 ± 11,20	20,8 ± 1,22	31,8 ± 5,58	
3	Vzorka 1 šľava	1600	29,2 ± 1,66	31,7 ± 5,35	41,3 ± 11,21	34,8 ± 4,10	40,1 ± 12,27	37,8 ± 1,28	36,9 ± 9,28	
4	Vzorka 1 šľava	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	42,0 ± 13,88	
5	Vzorka 1 šľava	6400	33,4 ± 12,04	27,4 ± 6,13	32,6 ± 10,67	35,4 ± 10,78	45,2 ± 8,72	36,2 ± 6,72	35,9 ± 9,58	
6	Vzorka 1 šľava	10000	31,7 ± 12,74	28,5 ± 6,85	32,4 ± 8,87	36,6 ± 6,50	40,7 ± 11,51	38,0 ± 6,66	37,5 ± 6,21	
7	V Vzorka 2 sušenie R rozprašovaním	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	V Vzorka 2 sušenie R rozprašovaním	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	Vzorka 3 aktívna časť	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	Vzorka 3 aktívna časť	5,0	33,9 ± 2,40	31,5 ± 6,12	35,1 ± 3,82	37,7 ± 5,99	39,5 ± 7,78	37,4 ± 11,07	37,8 ± 6,42	
11	Fenfuramin	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	Vehikulum (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 štandardná deviacia

Skupina 2 - 8 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 1: $p < 0,05$
Skupina 9 - 11 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 12 (nevýznamná)

Tabuľka 3a

Účinky orálneho podania na telesnú hmotnosť vytkana (po dávke, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Príjemná telesná hmotnosť v skupine (g ± sd) v dňoch				
			-5	-4	-3	-2	-1
1	Vehikulum (voda)	-	130,9 ± 5,58	150,7 ± 5,37	157,3 ± 5,29	168,1 ± 6,20	177,5 ± 6,70
2	Vzorka 1 šlava	800	131,6 ± 4,34	150,1 ± 4,84	158,5 ± 4,35	169,6 ± 4,99	177,7 ± 4,10
3	Vzorka 1 šlava	1600	130,1 ± 4,3	148,6 ± 6,59	156,7 ± 6,38	167,5 ± 6,04	176,6 ± 6,37
4	Vzorka 1 šlava	3200	130,8 ± 6,19	147,7 ± 7,56	154,4 ± 8,00	165,2 ± 8,43	175,8 ± 9,10
5	Vzorka 1 šlava	6400	132,6 ± 7,01	151,3 ± 7,23	158,4 ± 8,50	169,0 ± 8,79	178,1 ± 7,75
6	Vzorka 1 šlava	10000	132,3 ± 6,75	151,8 ± 9,08	157,3 ± 9,37	167,1 ± 10,41	175,4 ± 10,90
7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	38	131,7 ± 8,28	149,0 ± 5,85	156,2 ± 5,81	166,7 ± 5,54	175,6 ± 8,42
8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	76	130,0 ± 6,99	148,1 ± 6,00	155,9 ± 6,59	166,0 ± 6,87	176,1 ± 6,55
9	Vzorka 3 aktívna časť	2,5	132,6 ± 7,63	148,9 ± 8,51	157,3 ± 8,91	169,8 ± 8,96	179,4 ± 8,71
10	Vzorka 3 aktívna časť	5,0	133,5 ± 8,45	150,5 ± 9,55	158,8 ± 8,48	171,0 ± 7,72	179,0 ± 9,20
11	Fenfluramin	7,5	133,2 ± 8,21	152,7 ± 9,09	160,0 ± 9,82	170,0 ± 9,15	182,8 ± 10,21
12	Vehikulum (DMSO)	-	129,1 ± 3,17	147,3 ± 4,37	155,0 ± 6,29	166,0 ± 5,91	174,8 ± 8,26

sd štandardná deviacia

Tabuľka 3b

Účinky orálneho podania na telesnú hmotnosť potkana (po dávke, denne)

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Priemerná telesná hmotnosť v skupine (g ± sd) v dňoch							
			Preddávka (1)	2	3	4	5	6	7	8
1	Veikikum (voda)	-	185,4 ± 7,77	192,6 ± 7,10	202,0 ± 10,17	211,2 ± 7,98	220,2 ± 10,36	227,2 ± 10,26	235,8 ± 11,82	242,8 ± 11,97
2	Vzorka 1 šťava	800	186,0 ± 4,90	187,0 ± 4,55	198,5 ± 4,20	206,8 ± 5,01	214,8 ± 4,65	222,0 ± 4,99	231,5 ± 3,70	240,0 ± 3,05
3	Vzorka 1 šťava	1600	185,0 ± 6,67	186,0 ± 8,20	193,2 ± 6,42	204,0 ± 6,40	212,4 ± 5,01	223,0 ± 6,33	232,6 ± 7,70	240,4 ± 6,06
4	Vzorka 1 šťava	3200	181,8 ± 9,18	184,6 ± 8,00	186,2 ± 6,07	189,8 ± 9,99	199,2 ± 9,34	210,6 ± 10,21	219,0 ± 11,29	228,4 ± 12,18
5	Vzorka 1 šťava	6400	186,8 ± 7,96	185,6 ± 6,39	183,8 ± 6,07	185,2 ± 9,10	191,2 ± 7,09	201,0 ± 6,09	213,0 ± 6,90	222,0 ± 7,94
6	Vzorka 1 šťava	10000	182,8 ± 12,22	181,4 ± 14,06	179,8 ± 15,85	180,6 ± 13,05	185,6 ± 11,28	192,2 ± 10,99	203,4 ± 11,60	212,4 ± 11,35
7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	30	183,4 ± 8,11	185,8 ± 9,23	195,8 ± 7,79	205,6 ± 9,79	214,4 ± 8,61	222,6 ± 9,34	231,4 ± 10,82	239,8 ± 11,40
8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	70	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	Vzorka 3 aktívna časť	2,5	188,2 ± 9,42	191,2 ± 11,15	200,0 ± 11,25	209,6 ± 12,28	219,6 ± 12,95	229,4 ± 13,09	238,4 ± 14,50	247,0 ± 14,35
10	Vzorka 3 aktívna časť	5,0	186,4 ± 10,02	192,0 ± 9,93	192,4 ± 9,04	201,0 ± 11,27	209,4 ± 12,70	219,8 ± 11,06	228,2 ± 12,20	236,0 ± 13,95
11	Fenfluramin	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	Veikikum (DMSO)	-	183,3 ± 8,33	190,3 ± 10,26	199,0 ± 10,82	207,7 ± 12,66	215,7 ± 14,06	222,3 ± 14,04	230,7 ± 16,95	239,0 ± 17,35

sd: štandardná deviacia

Skupina 2 - 8 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 1: $p_1 < 0,05$, $p_1 < 0,01$

Skupina 9 - 11 bola porovnávaná s vehikulom skupiny 12 (nevýznamná)

Histologická správa

Histologické vyšetrenie bolo obmedzené na pečeň. Žiadne, ošetrovaním spôsobené, zmeny neboli zistené v prípade vzorky 1 (kvapalina), vzorky 2 (šťava získaná sušením rozprašovaním), vzorky 3 (aktívna časť), fenfluramínovej alebo DMSO kontrolnej skupiny.

Nálezy mali podobný výskyt v kontrolných aj ošetrovaných skupinách.

Tabuľka

Súhrn výskytov mikroskopických patologických zmien

	Sku- pina 1 0 mg/kg	Sku- pina 2 800 mg/kg	Sku- pina 3 1600 mg/kg	Sku- pina 4 3200 mg/kg	Sku- pina 5 6400 mg/kg	Sku- pina 6 10000 mg/kg
Pohlavie: samci						
Samci v štúdiu	5	4	5	5	5	5
Celkovo samcov	5	4	5	5	5	5
Pečeň						
Skúmaná	5	4	5	5	5	5
Žiadne abnormality	0	0	1	2	3	3
Zápalové ložiská parenchy- málnych buniek (celkovo)	0	1	0	0	0	3
Minim.	0	1	0	0	0	1
Hepatocytová hypertrofia - - centrilobulárna (celk.)	0	0	0	0	0	1
Minim.	0	0	0	0	0	0
Extramedulárna hemopoéza (celková)	2	0	0	0	0	0
Minim.	2	0	0	0	0	0
Hepatocytová nekróza - fokálna (celková)	1	0	0	0	0	0
Minim.	1	0	0	0	0	0
Portálna lymfoidná infil- trácia (celková)	3	4	4	3	2	2
Minim.	3	4	4	3	2	2
Eozinofilné hepatocyty - fokál. (celk.)	1	0	0	0	0	0
Minim.	1	0	0	0	0	0
Portálna fibróza (celk.)	0	0	1	0	0	0
Minim.	0	0	1	0	0	0
Pečeň (škrvna)						
Skúmaná	5	4	5	5	5	5
Žiadne abnormality	2	3	2	4	3	3
Hepatocytový tuk - centri- lobulárny (celk.)	3	1	2	1	2	2
Minim.	3	1	2	1	2	2
Hepatocytový tuk - peripor- tálny (celk.)	0	0	1	0	0	0
Minim.	0	0	1	0	0	0

Tabuľka
(pokračovanie)

	Sku- pina 7 38 mg/kg	Sku- pina 8 76 mg/kg	Sku- pina 9 2,5 mg/kg	Sku- pina 10 5 mg/kg	Sku- pina 11 7,5 mg/kg	Sku- pina 12 0 mg/kg
Pohlavie: samci						
Samci v štúdiu	5	4	5	5	5	5
Celkovo samcov	5	4	5	5	5	5
Pečeň						
Skúmaná	5	5	5	5	3	3
Žiadne abnormality	2	2	0	1	0	2
Zápalové ložiská parenchy- málnych buniek (celkovo)	0	0	0	0	0	1
Minim.	0	0	0	0	0	1
Hepatocytová hypertrofia - - centrilobulára (celková)	0	0	1	0	0	0
Minim.	0	0	1	0	0	0
Portálna lymfoidná infil- trácia (celková)	3	3	5	4	3	1
Minim.	3	3	5	4	3	1
Portálna fibróza (celk.)	0	0	1	0	0	0
Minim.	0	0	1	0	0	0
Pečeň (škvŕna)						
Skúmaná	5	5	5	5	3	3
Žiadne abnormality	5	3	3	3	2	2
Hepatocytový tuk - centri- lobulárny (celk.)	0	2	2	2	1	1
Minim.	0	2	2	2	1	1

Príklad 45

Ďalšia biologická skúška, pri ktorej sa používali rovnaké skúšobné vzorky ako je popísané v príklade 44, je popísaná ďalej. Zvieratá v tejto štúdií dostávali obmedzenú potravu, to znamená, že zvieratá dostávali potravu medzi 12. a 15. hod. denne. To sa odlišuje od všetkých biologických skúšok uskutočňovaných až doteraz, kde bola potrava potkanom dostupná podľa potreby. Zvieratá boli aklimatizované počas sedemdennej periódy (dni -7 až -1), dávkovanie bolo uskutočnené 0 až 6 deň o 9.00 hod. orálnou žalúdočnou sondou. Perióda na zotavenie prebiehala 7. až 13. deň. Dávkové skupiny sú popísané v tabuľke 1 ďalej. Je potrebné poznamenať, že skutočná kontrolná skupina je skupina 9. Skupina 5 je kontrolná skupina, ktorá obdržala rovnaké množstvo potravy ako skupina 4. Úlohou tejto skúšky bolo vyhodnotenie účinku obmedzenej potravy na životy zvierat.

Výsledky

Výsledky získané počas štúdie ukázali, že aklimatizačná perióda je veľmi krátka. Potkany sa krmili predovšetkým počas noci a náhla zmena na obmedzený prístup k potrave počas dennej doby viedla k nízkej dennej perióde. Denný príjem potravy sa zvýšil vo väčšine skupín ku koncu aklimatizačnej periódy, kedy začalo dávkovanie testovanou zlúčeninou. Výsledkom bolo, že účinok testovaných materiálov nemal podstatný účinok na príjem potravy potkanmi počas dávkovania.

Stredná telesná hmota pre rôzne skupiny pre dni -7. až -1. a dni 0. až 6. je uvedená v tabuľke D1 a v tabuľke D2. Účinok rôznych dávok šľavy a látky získanej sušením rozprašovaním je uvedený v sprievodných grafoch ako % zmeny telesnej hmotnosti 0. až 7. deň (obrázok 5) a % zmeny telesnej hmotnosti -7. až 7. deň (obrázok 6). Strata telesnej hmotnosti je závislá od dávky, predovšetkým pri vyšších dávkach.

Histopatologické skúmanie pečene nevykazalo podstatnú

patológiu v skupinách, ktoré dostávali testované zlúčeninu.

Potrava

Spotreba potravy bola meraná denne počas aklimatizácie a počas štúdie. Potrava bola k dispozícii počas 3 hodín denne, perióda začala 12.00 a končila 15.00. Zvyšný čas sa zvieratá postili. Zvieratá v 5. skupine dostali odmerané množstvo potravy 1. deň, ktoré bolo ekvivalentné priemernej spotrebe potravy ako v prípade skupiny 4 0. deň. Tento regulovaný model kŕmenia pre 5. skupinu, ako bolo stanovené z priemernej spotreby 4. skupiny z predchádzajúceho dňa, pokračoval 1. až 7. deň.

Voda

Voda bola poskytovaná v štandardnom zásobníku. Voda (Magalies Water Board Tap Water, vhodná pre potrebu ľudí), bola dostupná podľa potreby. Spotreba vody bola meraná raz denne, rovnaký čas každý deň, po stanovení spotreby potravy.

Aklimalizácia

Zvieratá sa aklimatizovali sedem dní pred začiatkom štúdie, pričom počas teploty doby bola stanovená spotreba potravy a vody. Telesná hmotnosť bola stanovená na dennej báze počas teploty doby.

Návrh štúdie a postup

Tabuľka 1
Návrh štúdie

skupina	skúška	čísla	dávka	skúšaná látka
1	6u	001-006	100 mg/kg	mrazená šťava
2	6u	007-012	400 mg/kg	mrazená šťava
3	6u	013-018	1600 mg/kg	mrazená šťava
4	6u	019-024	3200 mg/kg	mrazená šťava
5	6u	025-030	kontrola	Elga Option 4 Čistená voda
6	6u	031-036	2,2 mg/kg	sušenie rozprašovaním šťavy
7	6u	037-042	8,8 mg/kg	sušenie rozprašovaním šťavy
8	6u	043-048	35 mg/kg	sušenie rozprašovaním šťavy
9	6u	049-054	kontrola	Elga Option 4 Čistená voda

Cesta podania

Testovaná látka sa podávala na dennej báze 7 dní, pri použití intragastrickej sondy. Zvieratá nedostávali potravu 18 hodín pred podaním zlúčeniny (začiatok o 9.00).

Doba trvania ošetrovania

Zvieratá boli ošetrované sedem za sebou idúcich dní (deň 0. až 6.). Tri zvieratá z každej skupiny boli usmrtené 24 hodín po poslednej dávke (deň 7.). Zvyšné tri zvieratá boli usmrtené deň 7. po poslednej dávke (deň 13.). Tento postup sa uskutočnil pre všetky skupiny, okrem skupiny 5, kde boli zvieratá usmrtené 24 hodín po poslednom kontrolovanom kŕmení (deň 8.). Zvyšné tri zvieratá boli usmrtené 7 dní po poslednej dávke (deň 13.).

Telesná hmotnosť

Telesná hmotnosť bola stanovená denne, približne rovnaký čas každý deň počas trvania štúdie, vrátane aklimatizačnej periódy.

Eutanázia

Tri zvieratá z každej skupiny boli usmrtené 24 hodín po poslednej dávke (deň 7.).

Zvyšné tri zvieratá boli usmrtené deň 7. po poslednom ošetrovaní. Tento postup nasledoval pre všetky skupiny, okrem skupiny 5, kde boli tri zvieratá usmrtené 24 hodín po poslednom kontrolovanom kŕmení (deň 8.) a zvyšné tri zvieratá boli usmrtené deň 7. po poslednom ošetrovaní (deň 13.). Zvieratá boli eutanázované pri konci periódy štúdie plynným CO₂.

Oftalmoskopické skúmanie

Oftalmoskopické skúmanie, pri použití oftalmoskopu, sa uskutočnilo pre všetky zvieratá vo všetkých skupinách pred prvým podaním testovanej látky a po skončení ošetrovania.

Makroskopická patológia

Plné skúmanie každého mŕtveho zvierata sa uskutočňovalo pri konci periódy štúdie.

Histopatológia

Histopatologické vyšetrenie sa uskutočňovalo na pečeni každého zvierata.

Tabuľka D.1
Stredná telesná hmotnosť/skupina/žýzeň

Skupina	Orálne ošetrenie	Dávka (mg/kg)	Priemerná telesná hmotnosť v skupine (g) a štandardná deviacia								
			den -7	den -6	den -5	den -4	den -3	den -2	den -1		
O1	Vzorka 1 šľava	100	203,38 ±95,39	197,13 ±90,63	192,75 ±89,49	180,62 ±86,75	184,95 ±84,80	182,48 ±83,47	182,25 ±82,67		
O2	Vzorka 1 šľava	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		
O3	Vzorka 1 šľava	1 600	149,25 ±54,80	142,87 ±51,89	136,05 ±52,17	132,37 ±49,64	131,50 ±49,50	129,67 ±48,89	131,12 ±48,22		
O4	Vzorka 1 šľava	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 ±74,58		
O5	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	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		
O6	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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		
O7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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		
O8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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		
O9	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	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		

Tabuľka D.2
Stredná telesná hmotnosť/skupina/výždeň (pokračovanie)

Skupina	Orálna očistenie	Dávka (mg/kg)	Priemerná telesná hmotnosť v skupine (g) a štandardná deviacia						
			den 0	den 1	den 2	den 3	den 4	den 5	den 6
O1	Vzorka 1 šťava	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
O2	Vzorka 1 šťava	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
O3	Vzorka 1 šťava	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
O4	Vzorka 1 šťava	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
O5	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	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
O6	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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
O7	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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
O8	Vzorka 2 sušenie rozprašovaním	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
O9	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	151,02 ±55,45	148,55 ±53,77	148,10 ±52,67	149,70 ±52,05	152,58 ±50,37	155,82 ±49,91	157,85 ±49,70

Tabuľka D.3
Stredná telesná hmotnosť/skupina/žŕden (pokračovanie)

Skupina	Ordinácia ošetrenia	Dávka (mg/kg)	Priemerná telesná hmotnosť v skupine (g) a štandardná deviacia									
			den 7	den 8	den 9	den 10	den 11	den 12	den 13			
O1	Vzorka 1 šŕava i) (GHA 135A)	100	185,38 ± 72,84	234,73 ± 62,44	236,73 ± 62,39	234,07 ± 62,09	236,33 ± 62,31	239,07 ± 60,24	238,43 ± 59,85			
O2	Vzorka 1 šŕava i) i) (GHA 135A)	400	178,83 ± 58,24	225,63 ± 13,05	277,13 ± 14,18	227,10 ± 14,03	229,43 ± 18,97	234,93 ± 18,35	236,20 ± 15,97			
O3	Vzorka 1 šŕava i) (GHA 135A)	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			
O4	Vzorka 1 šŕava (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			
O5	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	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			
O6	Vzorka 2 súdenie rozprašovaním GH1 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			
O7	Vzorka 2 súdenie rozprašovaním GH1 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			
O8	Vzorka 2 súdenie rozprašovaním GH1 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			
O9	Elga Option 4 čistená voda (kontrola)	-	165,50 ± 49,27	193,73 ± 22,37	196,87 ± 21,86	198,07 ± 21,02	199,83 ± 20,21	204,93 ± 18,65	207,13 ± 18,22			

Tabuľka 1: Histologické hodnotenie pečene samcov potkana
Vzorka 1

Skupina 1: 100 mg/kg Vzorka 1			Skupina 2: 400 mg/kg Vzorka 1		
	zvie- Hepatické ra č. lézie			zvie- Hepatické ra č. lézie	
7. deň	01	NPL		07	FHS1+
	02	NPL		08	NPL C1+
	03	NPL C1+		09	NPL
13. deň	04	NPL MLC	13. deň	10	DHS1+
	05	FHS1+		11	NPL
	06	NPL		12	DHS1+
Skupina 3: 1600 mg/kg Vzorka 1			Skupina 4: 3200 mg/kg Vzorka 1		
	zvie- Hepatické ra č. lézie			zvie- Hepatické ra č. lézie	
7. deň	13	NPL		19	NPL
	14	NPL		20	NPL
	15	NPL		21	NPL
13. deň	15	NPL	13. deň	22	DHS1+
	16	DHS1+		23	FHS1+
	17	NPL		24	NPL

Skupina 5: Kontrola: Čistená voda Elga Option 4: obmedzená spotreba potravy

 Skupina 5: Kontrola: Čistená voda Elga Option 4

zvie- Hepatické
 ra č. lézie

7. deň	25	NPL MLC
	26	NPL
	27	NPL
13. deň	28	DHS1+
	29	DHS1+
	30	NPL

legenda:

C = Prekrvenie
 DHS = Difúzny hydropický bunkový opuch
 FHS = Fokálny hydropický bunkový opuch
 NPL = Žiadne parenchymálne lézie
 MLC = Minimálna lymfocytická manžeta

1+ = jemné
 2+ = mierne
 3+ = vážne

Tabuľka 2: Histologické hodnotenie pečene samcov potkana
Vzorka 2

Skupina 6: 2,2 mg/kg Vzorka 2			Skupina 7: 8,8 mg/kg Vzorka 2		
	zvie- Hepatické ra č. lézie			zvie- Hepatické ra č. lézie	
7. deň	31	NPL		37	NPL
	32	NPL MLC		38	NPL
	33	FHS1+		39	NPL C1+
13. deň	34	NPL	13. deň	40	DIIS1+
	35	DIIS1+		41	NPL
	36	NPL		42	MLC DIIS1+
Skupina 8: 35 mg/kg Vzorka 2					
	zvie- Hepatické ra č. lézie				
7. deň	43	NPL			
	44	NPL			
	45	NPL			
13. deň	46	NPL			
	47	NPL C1+			
	48	MLC FHS1+			

Skupina 9: Kontrola: Čistená voda Elga Option 4

Skupina 9: Kontrola: Čistená voda Elga Option 4

zvie- Hepatické
ra č. lézie

7. deň	49	NPL
	50	NPL
	51	FHS1+
13. deň	52	DHS1+
	53	NPL
	54	FHS1+

legenda:

C = Prekrvenie
DHS = Difúzny hydropický bunkový opuch
FHS = Fokálny hydropický bunkový opuch
NPL = Žiadne parenchymálne lézie
MLC = Minimálna lymfocytická manžeta

1+ = jemné
2+ = mierne
3+ = vážne

Žiadne špecifické lézie neboli zaznamenané na pečeni z experimentálnych potkanov, ktoré dostali zmrznutú šľavu, takisto látku získanú suchým rozprašovaním šľavy, ktoré by mohli byť prisudzované vyššie uvedeným chemickým látkam. Hydropický bunkový opuch, zaznamenaný ako v prípade kontrolných, tak aj experimentálnych potkanov, môže indikovať metabolický bunkový opuch a anoxické zmeny. V prípade niektorých zvierat boli zistené minimálne ložiska lymfotických perivaskulárnych zmien, čo je s najväčšou pravdepodobnosťou náhodné pozorovanie. U niektorých potkanov bola zistená mierna kongescia v hepatických sinusoidách. Dôležitou črtou vynálezu ukázanou výsledkami tejto štúdie je skutočnosť, že nedošlo k vývoji žiadnej tolerancie ku ktorejkoľvek zo vzoriek. Táto skutočnosť môže poskytovať značný prospech, predovšetkým vzhľadom na použitie zlúčenín a kompozícií podľa vynálezu pri liečení obezity.

Zlúčeniny a kompozície podľa vynálezu boli predovšetkým popísané vzhľadom na ich vlastnosti ako činidiel znižujúcich chuť do jedla. Je potrebné uviesť, že výraz "činidlo znižujúce chuť do jedla" sa tu používa na určenie aktivity, ktorá vedie k obmedzenej chuti a/alebo k zvýšeniu pocitu sýtosti a tak vedie k zníženiu celkovej kalorickej spotreby potravy, čo pôsobí proti obezite. Vynález sa ďalej rozširuje na spôsob ošetrovania, prevencie alebo boja proti obezite u človeka alebo zvierata, ktorý zahrnuje podanie človekovi alebo zvieraťu množstvo zlúčeniny vzorca 2, ktoré lieči a je účinné pri prevencii alebo boji proti obezite. Výhodná realizácia tohoto aspektu využíva kompozíciu alebo extrakt obsahujúci zlúčeninu vzorca 1.

Výraz "zvierat", ako sa tu používa, zahrnuje, nie však s obmedzením, druh zvierata, napríklad domáce skrotené zvieratá; neobmedzujúce príklady takýchto zvierat zahrnujú hovädzí dobytok, ovce, fretky, ošípané, slony, kone, hydinu, ryby, králiky, kozy, psy a mačky.

Zlúčenina vzorca 2, výhodne vzorca 1, alebo kompozícia definovaná v ktoromkoľvek z nárokov 9 a 25 až 31

vyššie, ako anorektické činidlo, alebo činidlo užité pri liečení alebo prevencii obezity u človeka sa výhodne podáva uvedenému človekovi v množstve približne od 0,01 mg/kg/deň do približne 10 mg/kg/deň. Výhodná dávka leží v rozmedzí 0,05 mg/kg/deň až 0,5 mg/kg/deň. Ak sa použije prášok získaný sušením rozprašovaním alebo extrakt podľa vynálezu, výhodná dávka leží v rozmedzí 0,1 mg/kg/deň až 20 mg/kg/deň; mimoriadne výhodná je dávka 0,5 mg/kg/deň až 5 mg/kg/deň.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy extraktu rastliny rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, pričom extrakt zahrnuje čínidlá' znižujúce chuť do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že postup zahrnuje stupne spracovania zozbieraného rastlinného materiálu rozpúšťadlom s cieľom extrakcie frakcií majúcich aktivitu znižujúcu chuť do jedla, separácie extrakčného roztoku od zvyšku rastlinného materiálu, odstránenia rozpúšťadla z extrakčného roztoku a získania extraktu.

2. Spôsob prípravy, ako je nárokovaný v nároku 1, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že rastlina rodu *Trichocaulon* je vybraná z druhu *Trichocaulon piliferum* a *Trichocaulon officinale* a rastlina rodu *Hoodia* je vybraná z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* a *Hoodia lugardii*.

3. Spôsob, ako je nárokový v nároku 1 alebo nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že stupeň zahrnuje koncentráciu aktívneho čínidla v extrahovanom materiáli ďalšou extrakciou rozpúšťadlom.

4. Spôsob, ako je nárokovaný v nároku 1, nároku 2 alebo nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rozpúšťadlo v rozpúšťadlom extrakčnom stupni alebo stupňoch je jedno alebo viac rozpúšťadiel vybraných zo súboru, ktorý zahrnuje metylénchlorid, vodu, metanol, hexán, etylacetát alebo ich zmesi.

5. Spôsob, ako je nárokovaný v ktoromkoľvek z nárokov 1 až 4 vrátane, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupeň koncentrácie aktívneho čínidla v extrahovanom materiáli chromatografickou separáciou.

6. Spôsob, ako je nárokovaný v nároku 5, v y z n a č u j ú - c i s a t ý m, že chromatografický separácia zahrnuje jeden

alebo viac rozpúšťadiel vybraných zo súboru, ktorý zahrnuje chloroform, metanol, etylacetát, hexán alebo ich zmesi ako eluant.

7. Spôsob, ako je nárokovaný v nároku 5 alebo nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa uskutoční chromatografická separácia na kolóne, zozbieranie eluátu vo frakciách z kolóny, hodnotenie frakcií s cieľom stanovenia aktivity činidla znižujúcej chuť do jedla a výber aspoň jednej frakcie obsahujúcej činidlo znižujúce chuť do jedla.

8. Spôsob, ako je nárokovaný v ktoromkoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že extrakt sa spracuje na formu voľne tečúceho prášku.

9. Extrakt, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje činidlo znižujúce chuť do jedla, ktorý sa produkuje podľa postupu nárokovaného v ktoromkoľvek z predchádzajúcich nárokov.

10. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje extrakt nárokovaný v nároku 9.

11. Kompozícia ako je nárokovaná v nároku 10, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom.

12. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 10 alebo 11, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

13. Použitie extraktu, ako je nárokovaný v nároku 9, pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

14. Extrakt, ako je nárokovaný v nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že liečivo má aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

15. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa človekovi alebo zvieratu podá účinná dávka kompozície, ako je nárokovaná v nároku 10, nároku 11 alebo nároku 12.

16. Spôsob prípravy extraktu rastliny rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, pričom extrakt zahrnuje činidlo znižujúce chuť do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že postup zahrnuje stupne lisovania zozbieraného rastlinného materiálu s cieľom oddelenia šťavy z pevného rastlinného materiálu a získania šťavy, naobsahujúcej pevný rastlinný materiál, za vzniku extraktu.

17. Spôsob, ako je nárokovaný v nároku 16, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa extrakt suší na formu voľne tečúceho prášku.

18. Extrakt zahrnujúci činidlo znižujúce chuť do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 16 alebo nároku 17.

19. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje extrakt, ako je nárokovaný v nároku 18.

20. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 19, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom.

21. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 19 alebo nároku 20, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

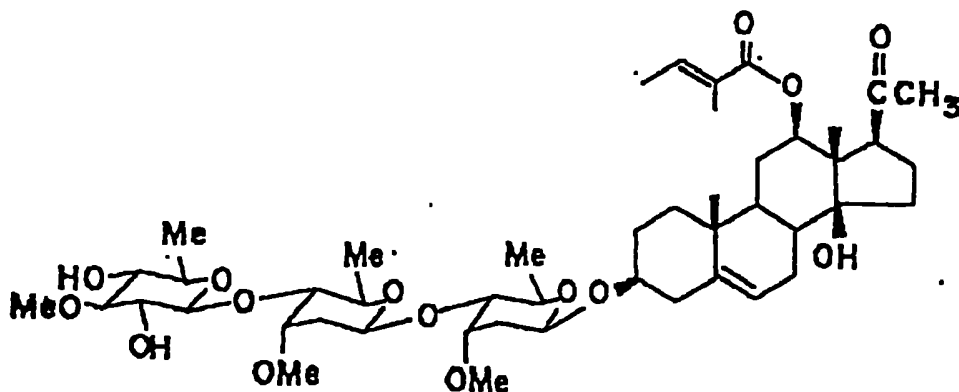
22. Použitie extraktu, ako je nárokovaný v nároku 19, pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

23. Extrakt, ako je nárokovaný v nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 16 alebo nároku 17.

j ú c i s a t ý m, že sa použije ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

24. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka kompozície, ako je nárokováná v nároku 19, nároku 20 alebo nároku 21.

25. Extrakt, ktorý je možné získať z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje činidlo znižujúce chuť do jedla majúce vzorec



(1)

26. Extrakt, ako je nárokový v nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rastlina rodu *Trichocaulon* je vybraná z druhu *Trichocaulon piliferum* a *Trichocaulon officinale* a rastlina rodu *Hoodia* je vybraná z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* a *Hoodia lugardii*.

27. Extrakt, ako je nárokový v nároku 26, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa všetky neaktívne nečistoty odstraňujú.

28. Extrakt, ako je nárokový v ktoromkoľvek z nárokov 25 až 27 vrátane, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa spracuje

na voľne tečúci prášok.

29. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje extrakt, ako je nárokováný v ktoromkoľvek z nárokov 25 až 28 vrátane.

30. Kompozícia, ako je nárokováná v nároku 29, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipien-
tom, riedidlom alebo nosičom.

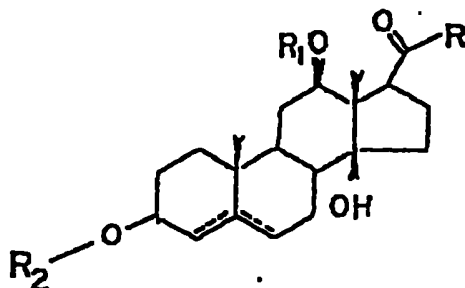
31. Kompozícia, ako je nárokováná v nároku 29 alebo v nároku 30, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednot-
kovej dávkovej forme.

32. Použitie extraktu, ako je nárokováný v ktoromkoľvek z nárokov 25 až 28 vrátane, pre prípravu liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

33. Extrakt, ako je nárokováný v nárokoch 25 až 28 vrátane, na použitie ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

34. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka kompozície, ako je nárokováná v nároku 29, nároku 30 alebo nároku 31.

35. Zlúčenina všeobecného vzorca



(2)

kde

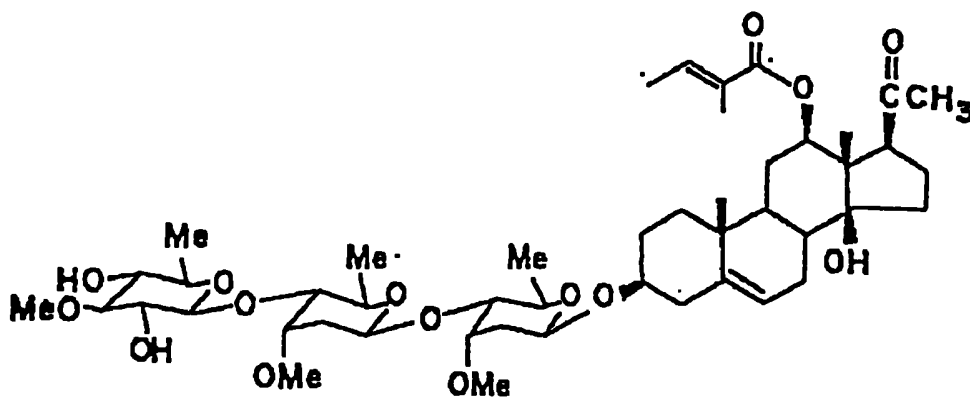
R je alkyl;

R₁ je H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R₂ je H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

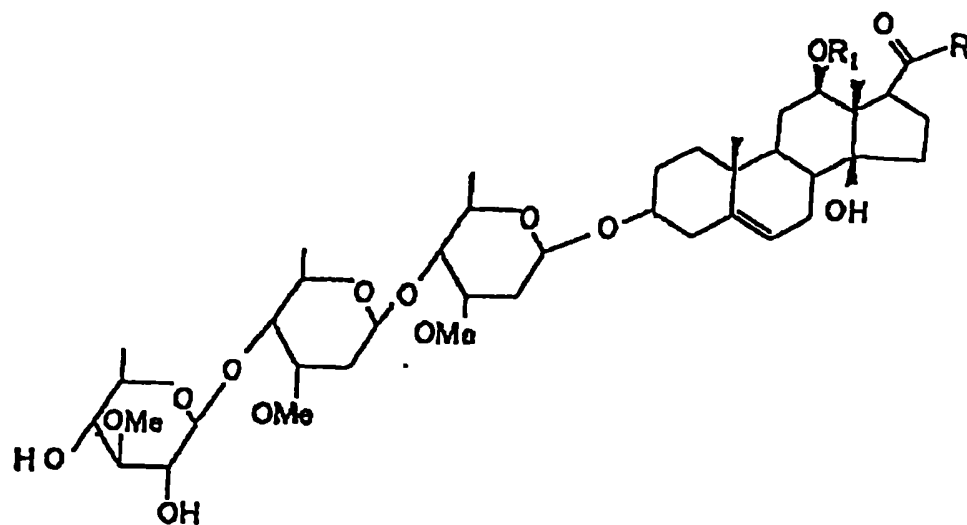
a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5 alebo C5-C6.

36. Zlúčenina, ako je nárokovaná v nároku 35, kde je väzba medzi C5-C6, R = metyl, R₁ = tigloyl, R₂ = 3-O[- β -D-thevetopyranozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranozyl] a kde zlúčenina má všeobecný vzorec



(1)

37. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec

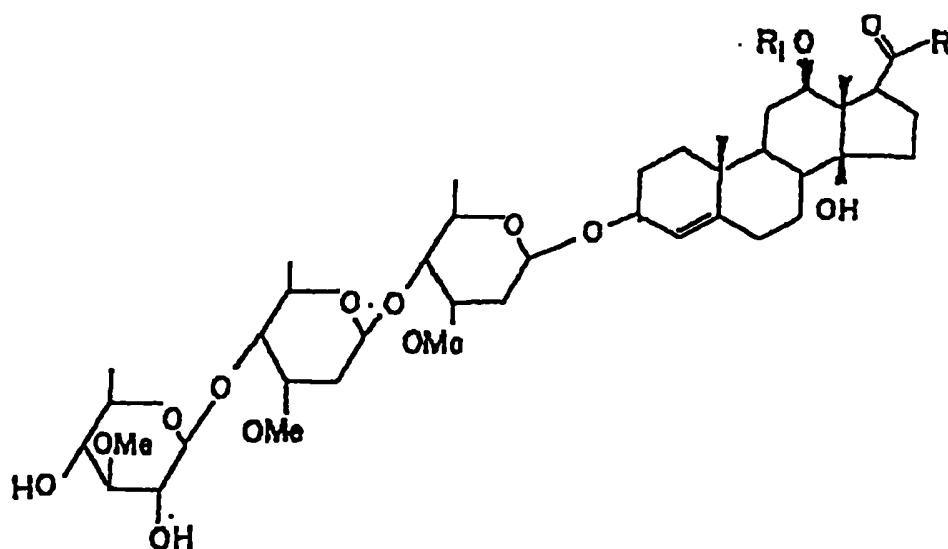


(3)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.

38. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec

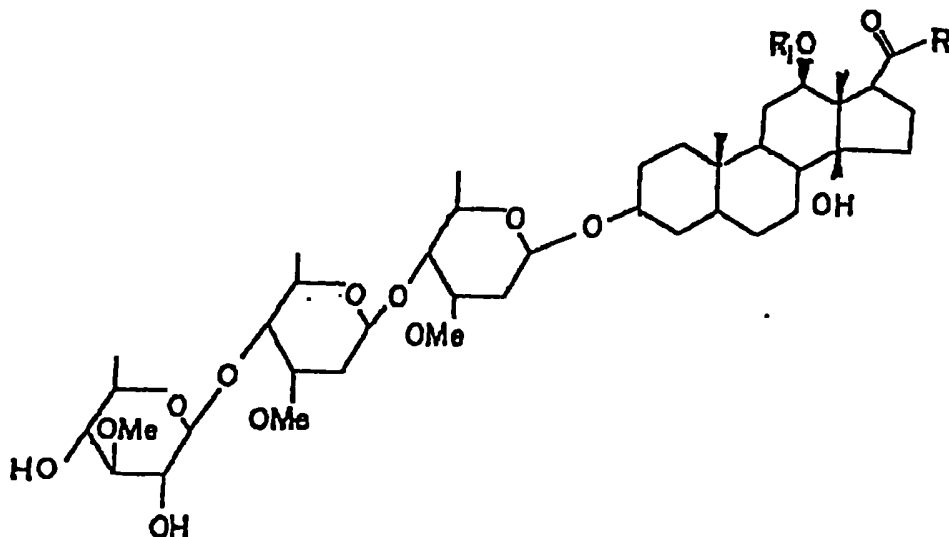


(4)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.

39. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec

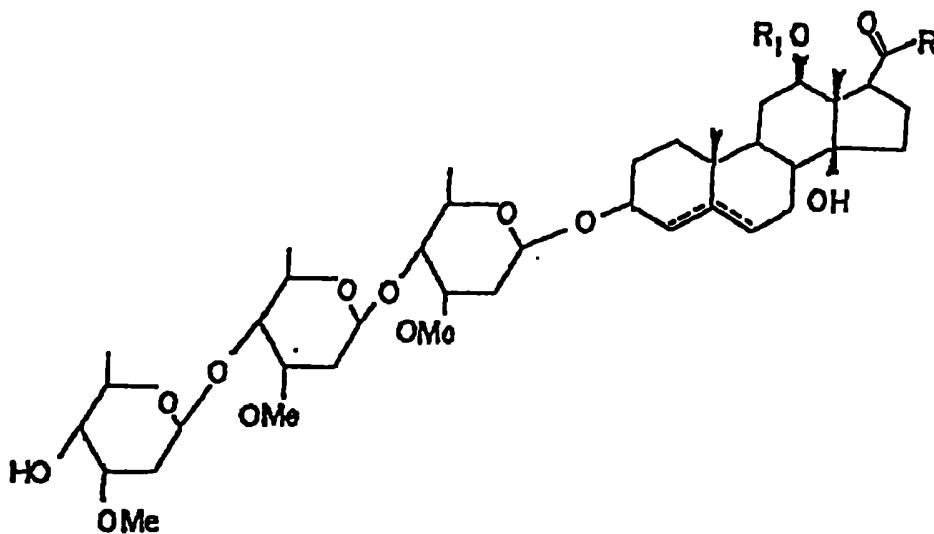


(5)

kde R = alkyl; a

R₁ = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.

40. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec

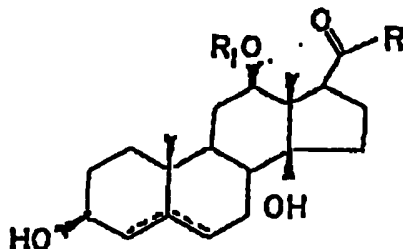


(6)

kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.

41. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec

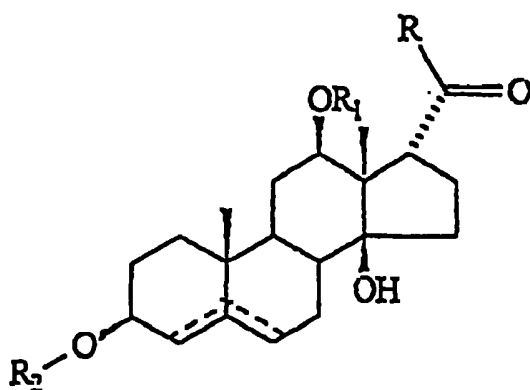


(7)

kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo akákoľvek iná organická esterová skupina.

42. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(8)

kde R = alkyl; a

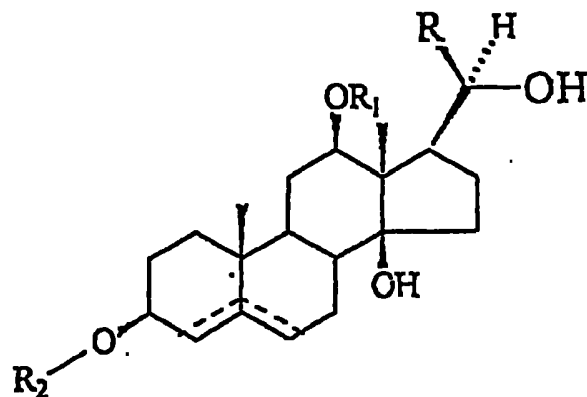
R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby

medzi C4-C5 alebo C5-C6.

43. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(9)

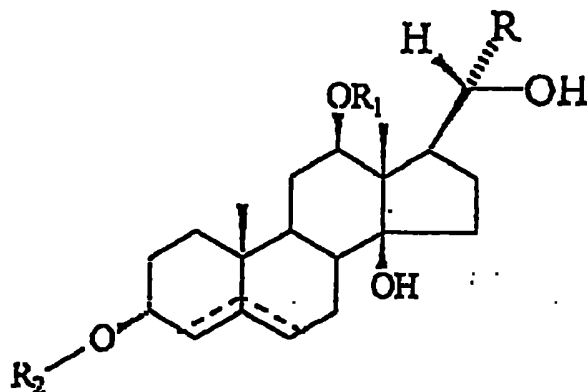
kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5 alebo C5-C6.

44. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(10)

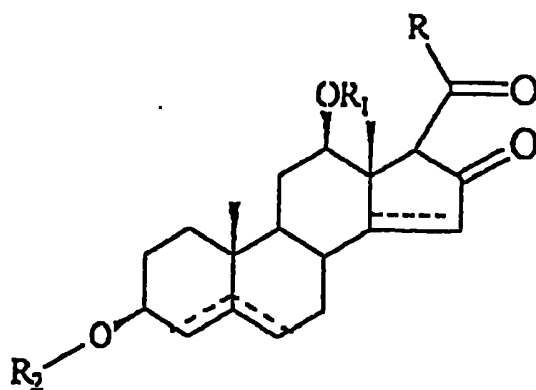
kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5 alebo C5-C6.

45. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(11)

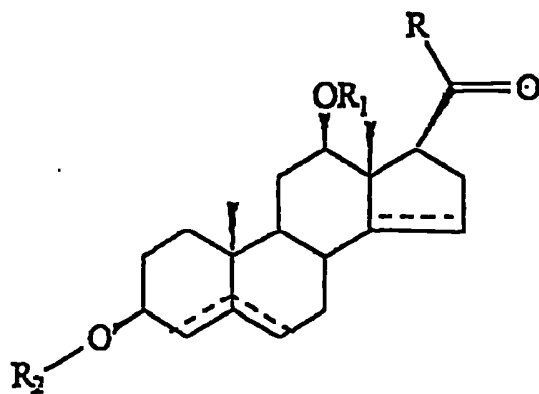
kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15.

46. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(12)

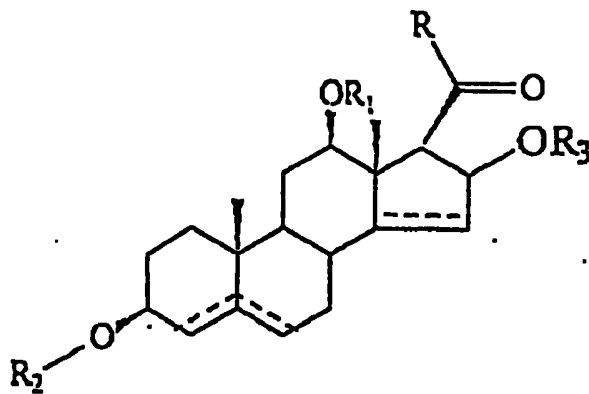
kde R = alkyl; a

R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15.

47. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(13)

kde R = alkyl; a

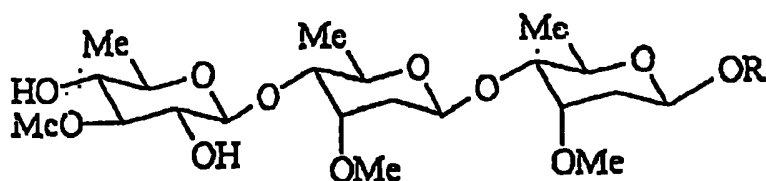
R_1 = H, alkyl, tigloyl, benzoyl alebo iná organická esterová skupina;

R_2 = H alebo jeden alebo viac 6-deoxysacharidov alebo jeden alebo viac 2,6-dideoxysacharidov, alebo molekuly glukózy alebo ich kombinácie;

a kde prerušovaná čiara znamená prípadne prítomnosť ďalšej väzby medzi C4-C5, C5-C6 alebo C14-C15; a

R_3 = H, alkyl, aryl, acyl alebo glukoxy.

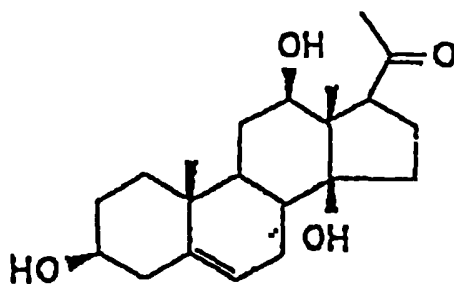
48. Zlúčenina majúca všeobecný vzorec



(14)

kde R = H, alkyl, aryl alebo akýkoľvek steroid majúci C14 beta hydroxylovú skupinu, C12 beta hydroxylovú skupinu a C17 acylovú skupinu, C5-C6 olefín alebo ich kombinácie.

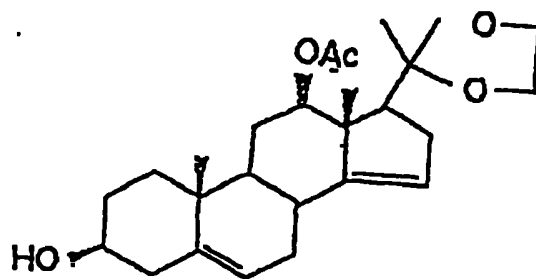
49. Spôsob prípravy steroidného medziproduktu vzorca



(15)

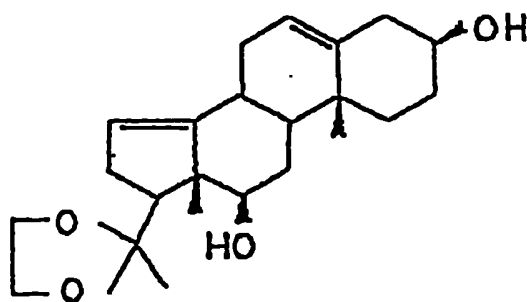
v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

(a) spracovanie zlúčeniny



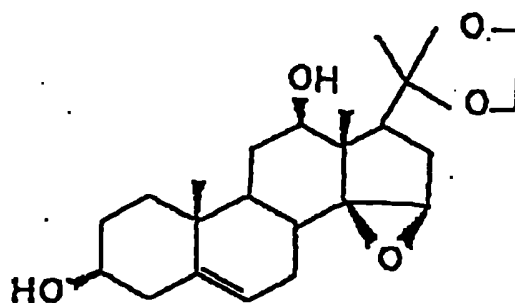
(22)

s redukčným činidlom za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-20, 20-
-etyléndioxypregna-5, 14-diénu so vzorcom



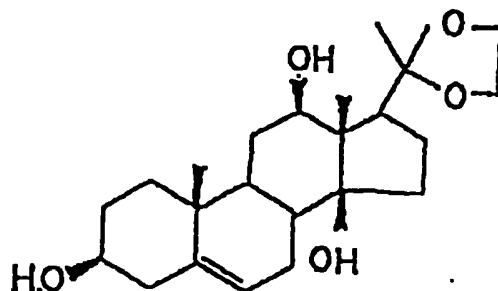
(23)

(b) spracovanie zlúčeniny 23 s N-brómacetamidom (NBA) a
bázou za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-14, 15-epoxy-20, 20-
-etyléndioxypregnen-5-énu vzorca



(24)

(c) spracovanie zlúčeniny 24 s redukčným činidlom za vzniku zlúčeniny 3a, 12a, 14a-trihydroxy-20, 20-etyléndioxypregn-5-énu vzorca



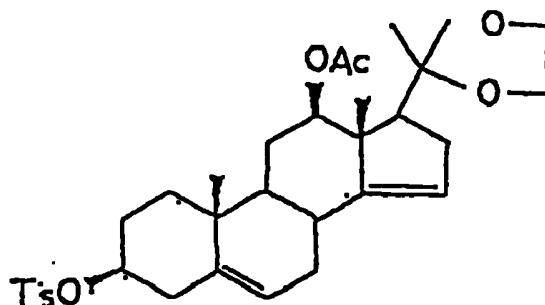
(25)

a

(d) spracovanie zlúčeniny 25 s kyselinou a vodou za vzniku zlúčeniny 15.

50. Spôsob prípravy zlúčeniny 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne

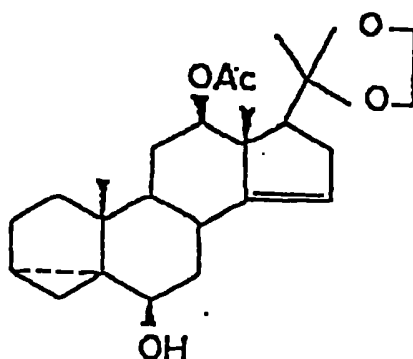
(a) spracovanie zlúčeniny 22 s p-toluénsulfonylchloridom a bázou za vzniku zlúčeniny 3a, 12a-dihydroxy-20, 20-etyléndioxypregna-5, 14-dién-3-tosyl-12-acetátu vzorca



(26)

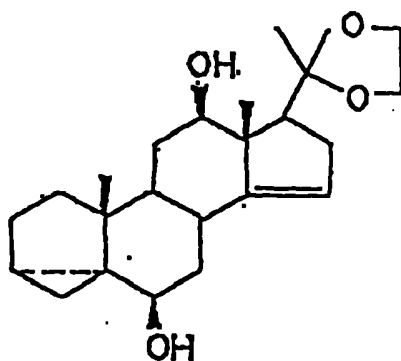
(b) spracovanie zlúčeniny 26 octanom draselným v rozpúšťadle za vzniku zlúčeniny 6a, 12a-dihydroxy-20, 20-etylén-

dioxy-3, 5 α -cyklopregnan-14-én-12-acetátu vzorca



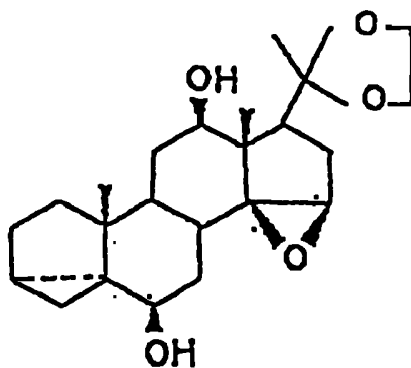
(27)

(c) spracovanie zlúčeniny 27 s redukčným činidlom za vzniku zlúčeniny 6 β , 12 α -dihydroxy-20, 20-etyléndioxy-3, 5 α -cyklopregnan-14-énu vzorca



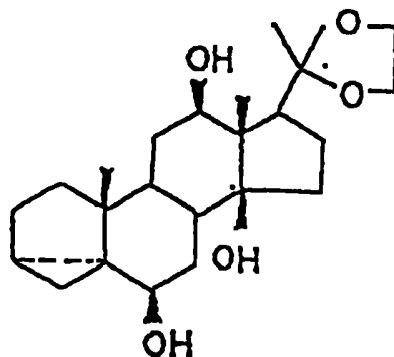
(28)

(d) spracovanie zlúčeniny 28 s N-brómacetamidom a bázou za vzniku zlúčeniny 6 β , 12 α -dihydroxy-20, 20-etyléndioxy-14, 15-epoxy-3, 5 α -cyklopregnán vzorca



(29)

(e) spracovanie zlúčeniny 29 s redukčným činidlom za vzniku zlúčeniny 6a, 12a, 14a-trihydroxy-20, 20-etyléndioxy-3, 5 α -cyklopregnán vzorca



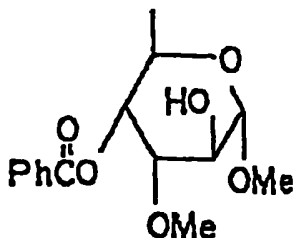
(30)

a

(f) spracovanie zlúčeniny 30 s kyselinou a rozpúšťadlom za vzniku zlúčeniny 15.

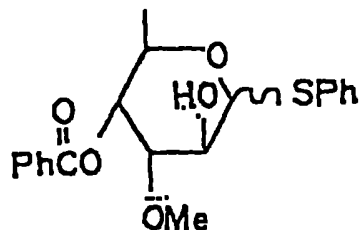
51. Spôsob prípravy sacharidového medziproduktu vo forme monosacharidcymarózovej časti, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

(i) spracovanie zlúčeniny majúcej vzorec



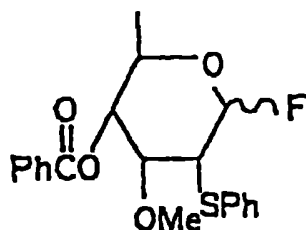
(36)

s PhSSiMe_3 , ZnI_2 a Bu^+I^- za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-6-deoxy- α -D-fenyltioaltrozidu vzorca



(37)

(ii) prípadne spracovanie zlúčeniny 37 s dietylaminosulfurtrifluoridom (DAST) za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-fenyltio-2,6-dideoxy- α -D-fluórcymaropyranozidu vzorca

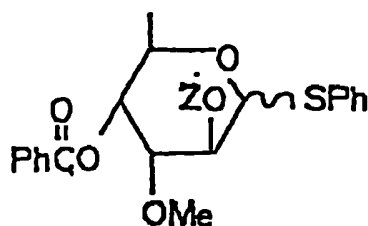


(38)

alebo

(iii) prípadne spracovanie zlúčeniny 37 s terc.butyldimetylsilylchloridom a imidazolom v rozpúšťadle za vzniku 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-terc.butyldimetylsilyl- α -D-fenyltioaltrozidu

vzorca

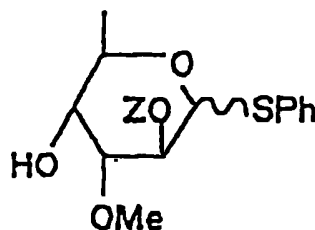


(39)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl);

a

(iv) spracovanie zlúčeniny 39 s bázou za vzniku monosacharidu 3-O-metyl-2-O-terc.butyldimetylsilyl- α -D-fenyl-altrozidu vzorca

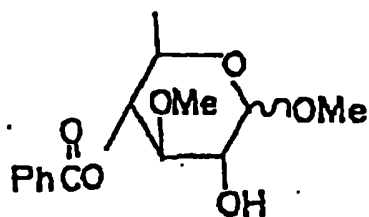


(40)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl).

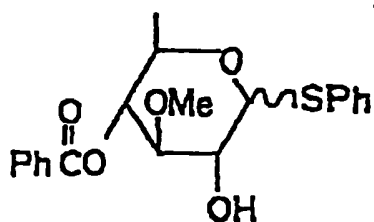
52. Spôsob prípravy sacharidového medziproduktu vo forme aktivovanej thevetozovej časti, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

(1) spracovanie zlúčeniny



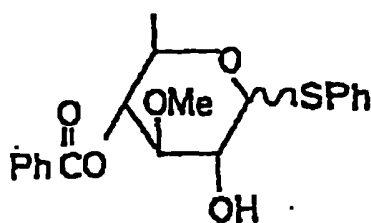
(47)

s fenyltiotrimetylsilánom a trimetylsilyltrifluórmétánsulfonátom za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -glukopyranozidu vzorca



(48)

(ii) spracovanie zlúčeniny 48 s pivaloylchloridom a rozpúšťadlom za vzniku zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fenyltio-6-deoxy- α -glukopyranozidu vzorca

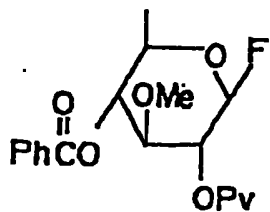


(49)

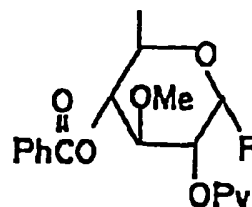
a

(iii) spracovanie zlúčeniny 49 s bromačným činidlom a dietylaminosulfurtrioxidom za vzniku monosacharidovej

zlúčeniny 4-O-benzoyl-3-O-metyl-2-O-pivaloyl-1-fluór-6-deoxy- α -glukopyranozidu, ktorý sa vyskytuje ako stereoizoméry majúce vzorce



(50 A)



(50 B)

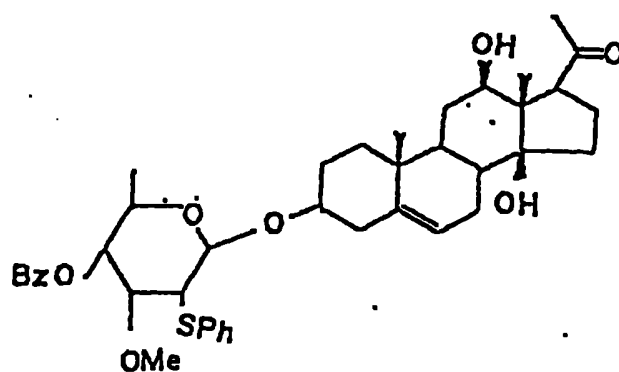
53. Steroidný medziprodukt vzorca 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 49 alebo v nároku 50.

54. Sacharidový medziprodukt vzorca 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 51.

55. Sacharidový medziprodukt vzorca 50 A alebo vzorca 50 B, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 52.

56. Spôsob kopulácie monosacharidovej cymarózy na steroidný medziprodukt, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

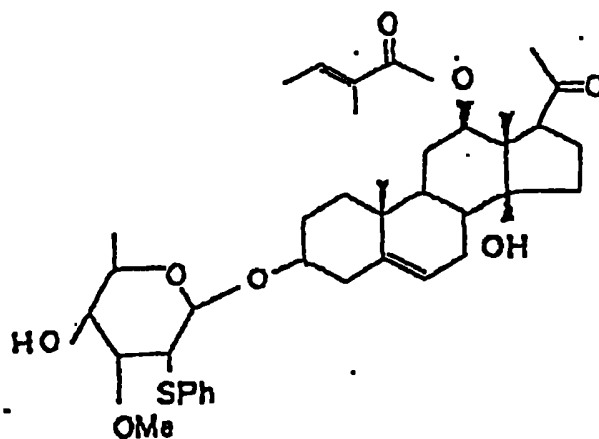
(1) reakciu cymarózovej časti vzorca 38 so steroidným medziproduktom vzorca 15, ako je nárokované v nároku 53 v prítomnosti chloridu cínatého v rozpúšťadle za vzniku zlúčeniny 3-O-[4-O-benzoyl-2-fenyltio- α -D-cymaropyranozyl]-12,14- α -dihydroxypregnan-5-en-20-ónu vzorca



(51)

a

(ii) spracovanie zlúčeniny 51 s chloridom tiglovej kyseliny v pyridíne a potom s bázou za vzniku zlúčeniny 3-O-[4-O-benzoyl-2-fenyltio- α -D-cymaropyranozyl]-12 α -tigloyl-14 α -hydroxy-pregnan-5-en-20-ónu vzorca



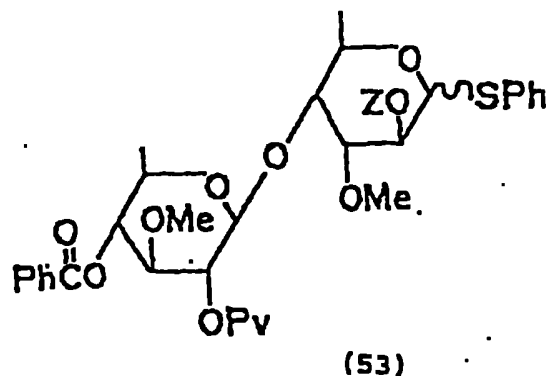
(52)

57. Zlúčenina vzorca 52, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví postupom, ako je nárokovaný v nároku 56.

58. Spôsob kopulácie monosacharidovej cymarózovej časti na monosacharidthevetozovú časť a kopulácie vzniknutého disacharidu

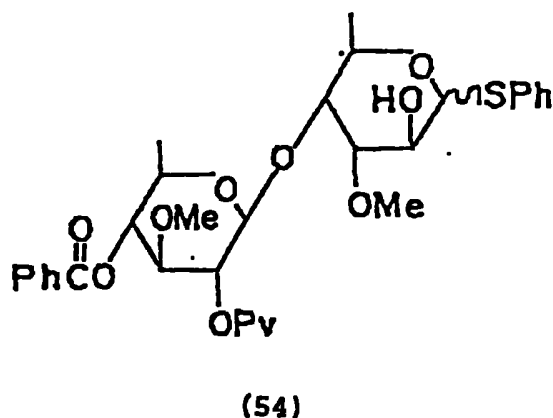
na zlúčeninu vzorca 52, ako je nárokované v nároku 57, v y z -
n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

(i) kopulácia selektívne chránenej cymarózovej časti vzorca 40, ako je nárokované v nároku 54, a monosacharidovej thevetozovej časti vzorca 50, ako je nárokované v nároku 55 pri použití chloridu cínatého (SnCl_2) a trifluórmetánsulfonátu strieborného za vzniku zlúčeniny vzorca

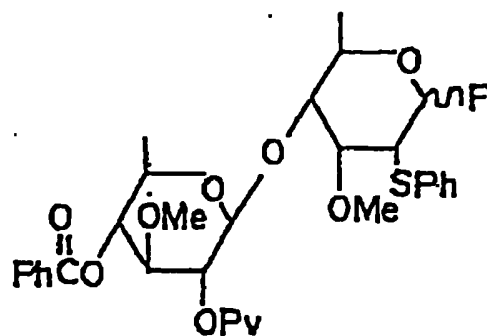


kde Z = TBDMS (= terc.butyl dimethylsilyl)

(ii) spracovanie zlúčeniny 53 s tetrabutylamóniumfluoridom za vzniku zlúčeniny vzorca

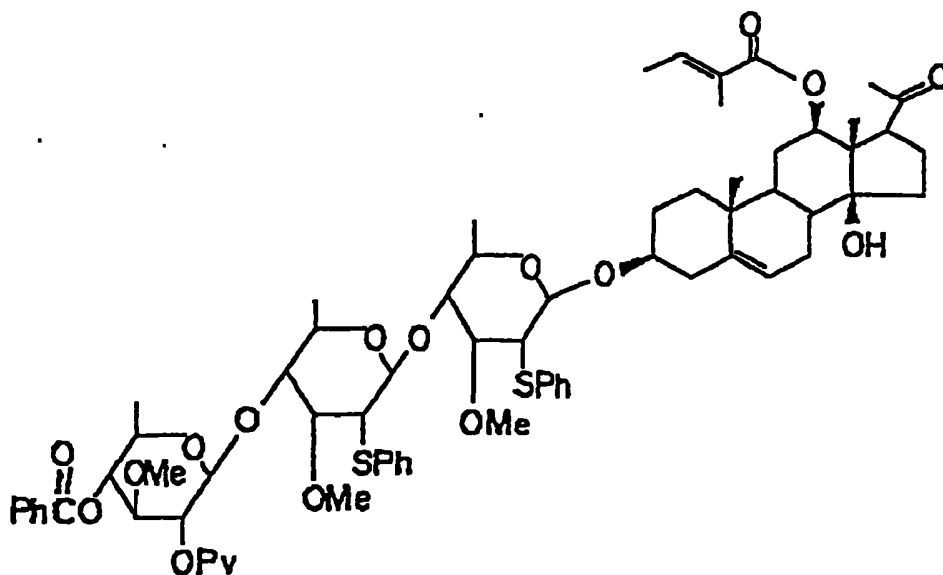


(iii) spracovanie zlúčeniny 54 s dietylaminosulfur-trifluoridom za vzniku zlúčeniny vzorca



(55)

(iv) reakciu zlúčeniny 55 so zlúčeninou 52, ako je nárokové v nároku 57, za vzniku zlúčeniny vzorca



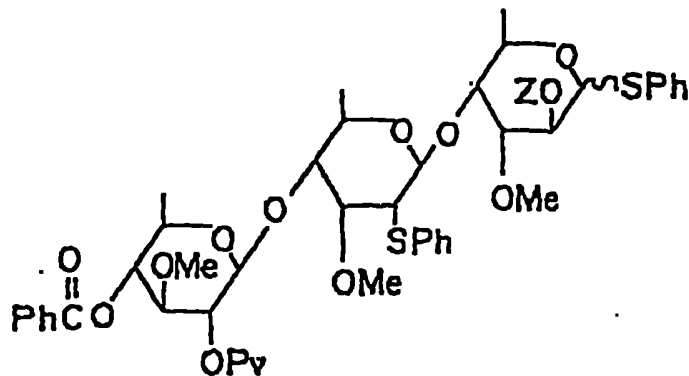
(56)

a

(v) spracovanie zlúčeniny 56 Raney-niklovou reakciou a potom s bázou za vzniku zlúčeniny 1, ako je nárokové v nároku 36.

59. Spôsob prípravy trisacharidu a kopulácie vzniknutého trisacharidu na steroidný medziprodukt, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupne:

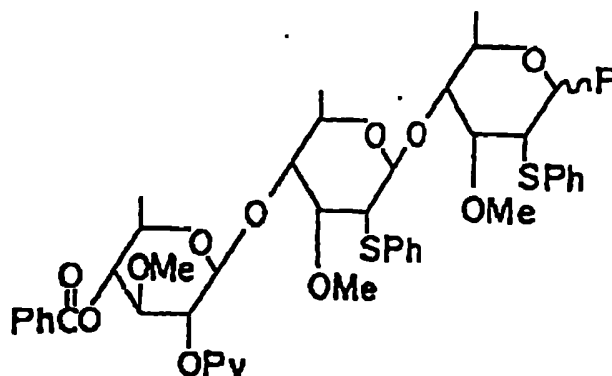
(i) kopulácia selektívne chránenej cymarózovej časti vzorca 40, ako je nárokované v nároku 55, a zlúčeniny 45 pri použití chloridu cínatého, AgOTf , Cp_2ZrCl_2 za vzniku zlúčeniny vzorca



(57)

kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl)

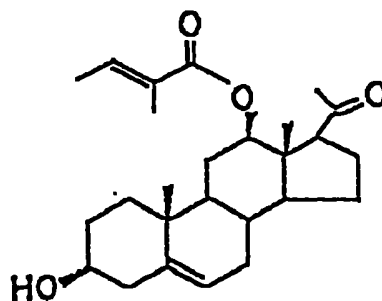
(ii) spracovanie zlúčeniny 57 s tetrabutylamóniumfluoridom a dietylaminosulfurtrifluoridom za vzniku trisacharidovej zlúčeniny vzorca



(58)

a

(iii) kopuláciu trisacharidu vzorca 58 so steroidovým medziproduktom vzorca



(59)

pri použití chloridu cínatého, AgOTf , Cp_2ZrCl_2 za vzniku zlúčeniny 1, ako je nárokové v nároku 36.

60. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje zlúčeninu, ako je nároková v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane.

61. Kompozícia, ako je nároková v nároku 60, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že zlúčeninou je zlúčenina vzorca 1, ako je nároková v nároku 36.

62. Kompozícia, ako je nároková v nároku 60 alebo nároku 61, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom.

63. Kompozícia, ako je nároková v nároku 60, nároku 61 alebo nároku 62, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

64. Použitie zlúčeniny, ako je nároková v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane, pri príprave liečiva majúceho aktivitu

znižujúcu chuť do jedla.

65. Použitie, ako je nárokované v nároku 64, zlúčeniny vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

66. Zlúčenina, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane, na použitie ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

67. Zlúčenina, ako je nárokováná v nároku 66, ktorá je zlúčeninou vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

68. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka kompozície, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 60 až 63 vrátane.

69. Potravina alebo nápoj, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že zahrnujú účinné množstvo zlúčeniny, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane, ktoré majú pri požití účinok znižujúci chuť do jedla.

70. Potravina alebo nápoj, ako sú nárokované v nároku 69, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že zlúčenina je zlúčeninou vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

71. Použitie zlúčeniny vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36, izolovanej z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo z rodu *Hoodia* pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

72. Použitie podľa nároku 71, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že zlúčenina je izolovaná z druhu *Trichocaulon piliferum* alebo *Trichocaulon officinale* alebo z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*.

73. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje zlúčeninu vzorca 1

izolovanú z rodu *Trichocaulon* alebo z rodu *Hoodia*.

74. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 73, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že zlúčenina sa izoluje a/alebo čistí z rastliny druhu *Trichocaulon piliferum* alebo *Trichocaulon officinale* alebo z druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*.

75. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 73, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že zlúčenina sa izoluje a/alebo čistí z extraktu odvodeného od rastliny druhu *Trichocaulon piliferum* alebo *Trichocaulon officinale* alebo od rastliny druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*.

76. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 73, nároku 74 alebo nároku 75, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom.

77. Kompozícia, ako je nárokovaná v nároku 76, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

78. Zlúčenina vzorca 1, ako je nárokovaná v nároku 35, izolovaná z rastliny rodu *Trichocaulon* alebo rodu *Hoodia*, na použitie ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

79. Zlúčenina, ako je nárokovaná v nároku 78, v y z n a - č u j ú c a s a t ý m, že sa zlúčenina izoluje z rastliny druhu *Trichocaulon piliferum* alebo *Trichocaulon officinale* alebo z rastliny druhu *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* alebo *Hoodia lugardii*.

80. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka kompozície, ako je nárokovaná v ktoromkoľvek z nárokov 73 až 77 vrátane.

81. Kompozícia majúca aktivitu znižujúcu chuť do jedla, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje agonistu receptora melanokortínu 4.

82. Kompozícia, ako je nárokováná v nároku 81, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že agonistom je extrakt, ako je nárokováný v nároku 9, nároku 18 alebo nároku 25, alebo zlúčenina, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane.

83. Kompozícia, ako je nárokováná v nároku 81 alebo nároku 82, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zlúčeninou je zlúčenina vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

84. Kompozícia, ako je nárokováná v nároku 81, nároku 82 alebo nároku 83, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa zmieša s farmaceutickým excipientom, riedidlom alebo nosičom.

85. Kompozícia, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 81 až 84 vrátane, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa pripraví v jednotkovej dávkovej forme.

86. Použitie agonistu receptora melanokortínu 4 pri príprave liečiva majúceho aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

87. Použitie, ako je nárokováná v nároku 86, extraktu, ako je nárokové v nároku 9, nároku 18 alebo nároku 25, alebo zlúčeniny, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane.

88. Použitie, ako je nárokováná v nároku 87, zlúčeniny vzorca 1, ako je nárokové v nároku 36.

89. Agonista receptora melanokortínu 4 na použitie ako liečivo majúce aktivitu znižujúcu chuť do jedla.

90. Agonista receptora melanokortínu 4, ako je nárokový v nároku 89, ktorý je extrakt, ako je nárokový v nároku 9, nároku

18 alebo nároku 25, alebo zlúčenina, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane.

91. Agonista receptora melanokortínu 4, ako je nárokový v nároku 90, ktorý je zlúčenina vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

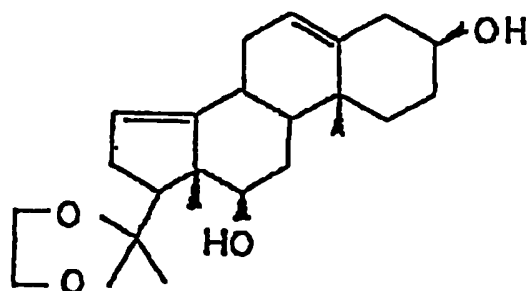
92. Spôsob zníženia chuti do jedla, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá človekovi alebo zvieratu účinná dávka kompozície, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 81 až 85 vrátane.

93. Použitie agonistu receptora s cieľom zníženie chuti do jedla a/alebo boja proti obezite u človeka alebo zvierata.

94. Použitie, ako je nárokové v nároku 93, extraktu, ako je nárokový v nároku 9, v nároku 18 alebo nároku 25, alebo zlúčeniny, ako je nárokováná v ktoromkoľvek z nárokov 35 až 48 vrátane.

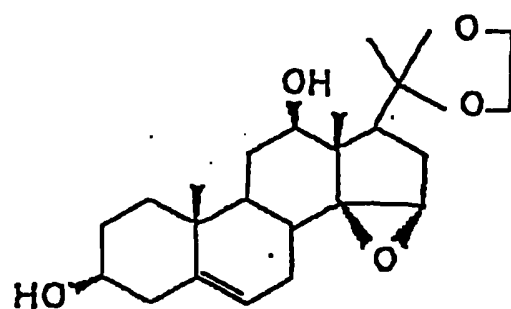
95. Použitie, ako je nárokové v nároku 94, zlúčeniny vzorca 1, ako je nárokováná v nároku 36.

96. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



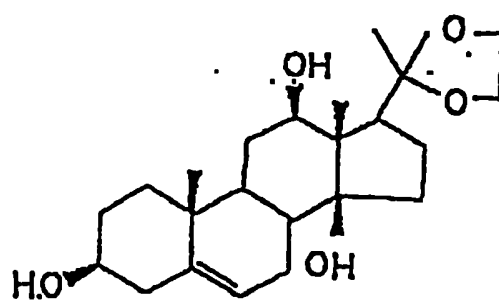
(23)

97. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



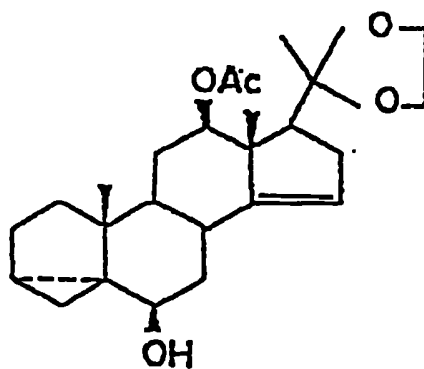
(24)

98. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



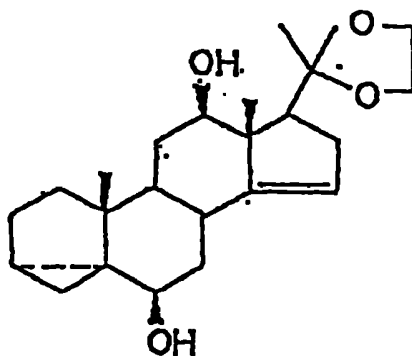
(25)

99. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



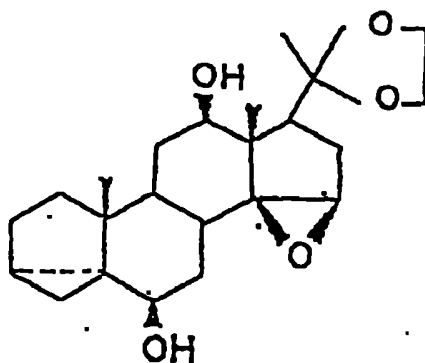
(27)

100. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



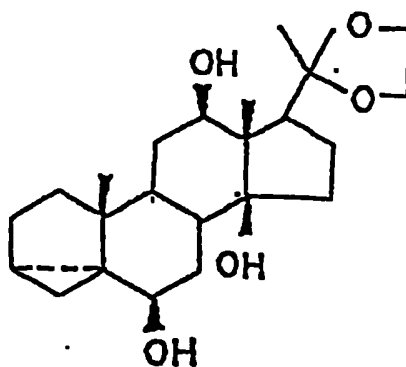
(28)

101. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



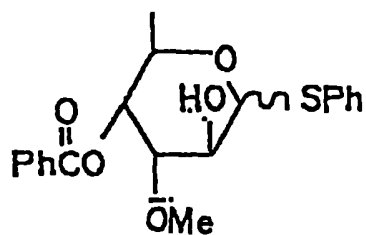
(29)

102. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



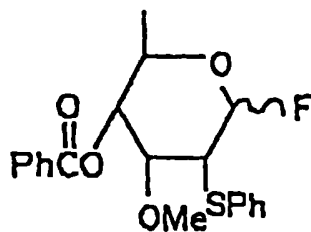
(30)

103. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



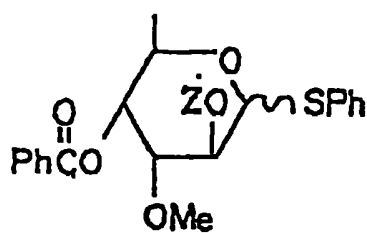
(37)

104. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



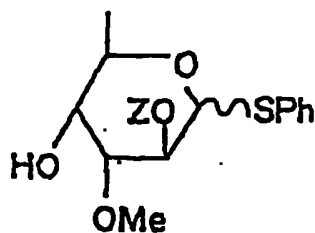
(38)

105. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



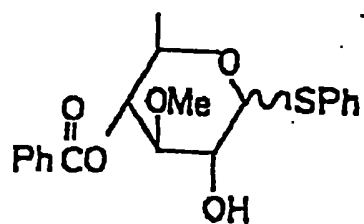
(39)

106. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



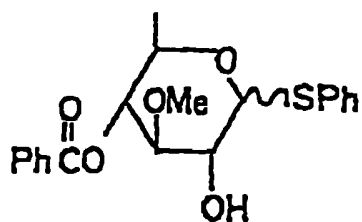
(40)

107. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



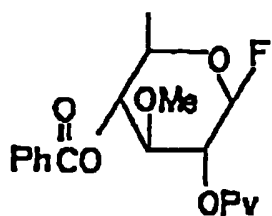
(48)

108. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec

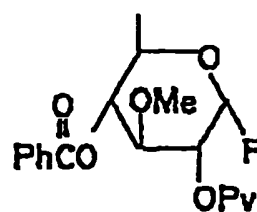


(49)

109. Zlúčenina vyskytujúca sa ako stereoizomér majúci štruktúrny vzorec

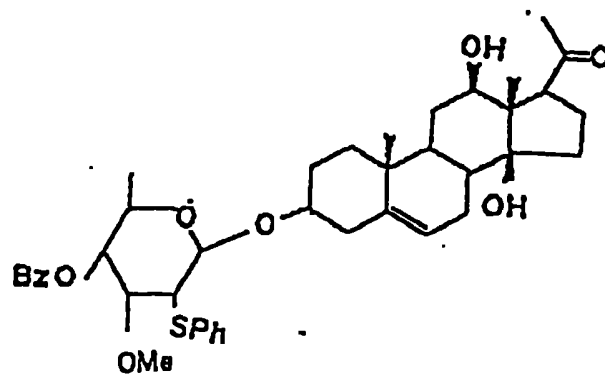


(50 A)



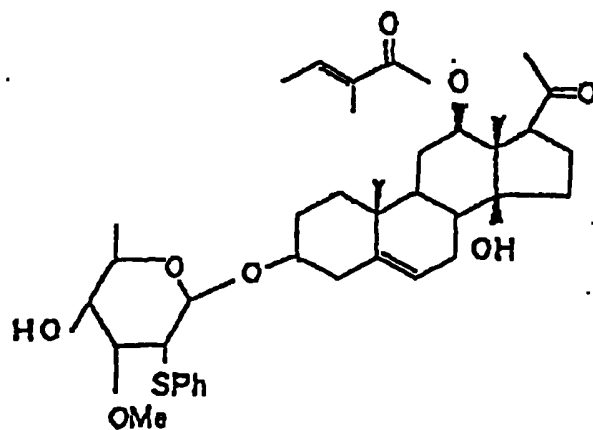
(50 B)

110. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



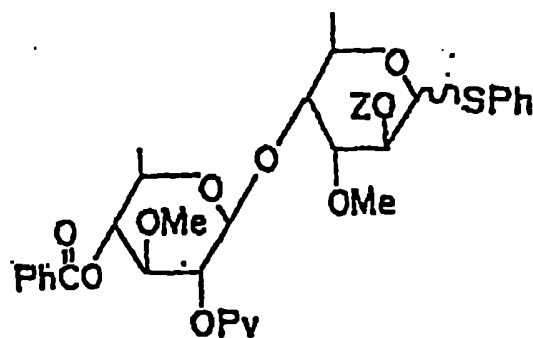
(51)

111. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



(52)

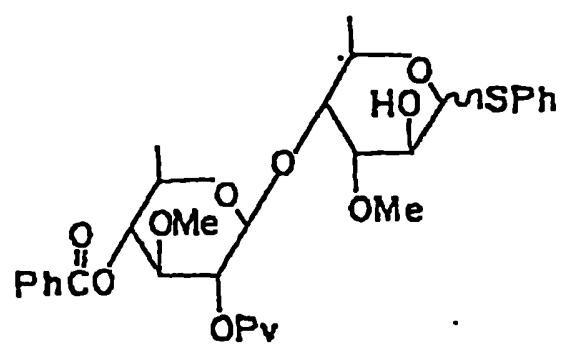
112. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



(53)

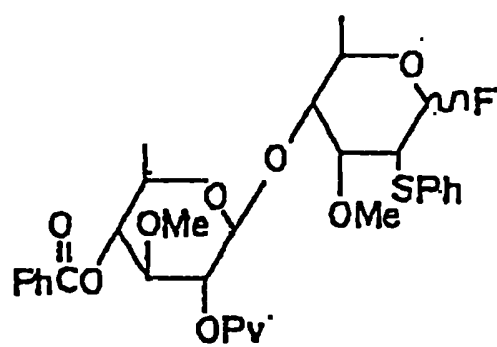
kde Z = TBDMS (= terc.butyldimetylsilyl).

113. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



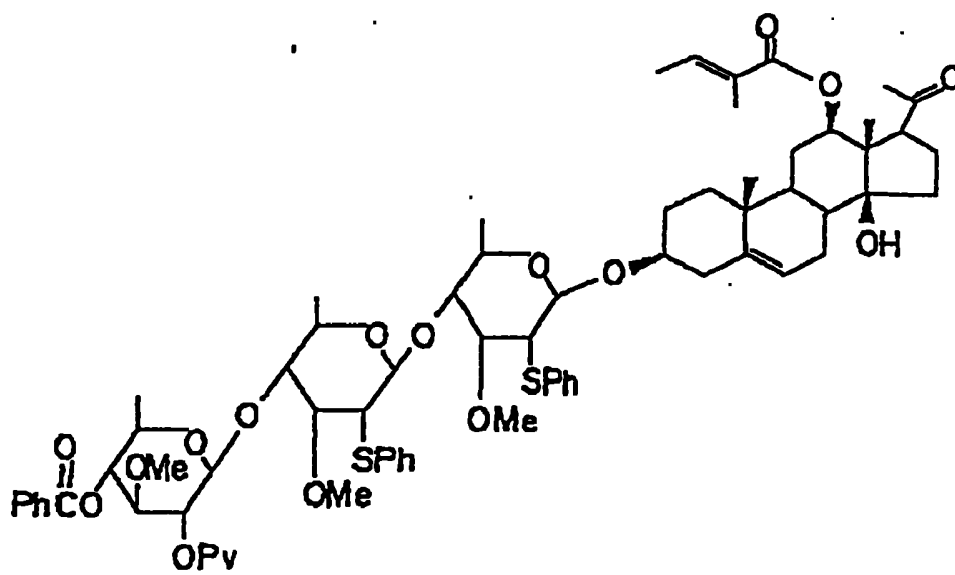
(54)

114. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



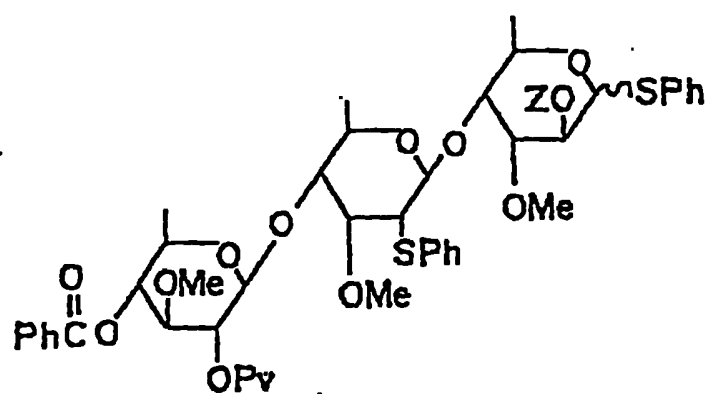
(55)

115. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



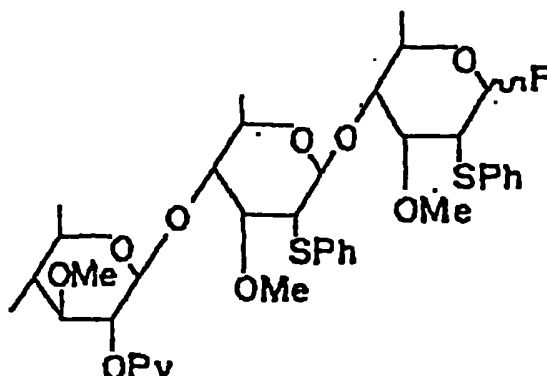
(56)

116. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



(57)

117. Zlúčenina majúca štruktúrny vzorec



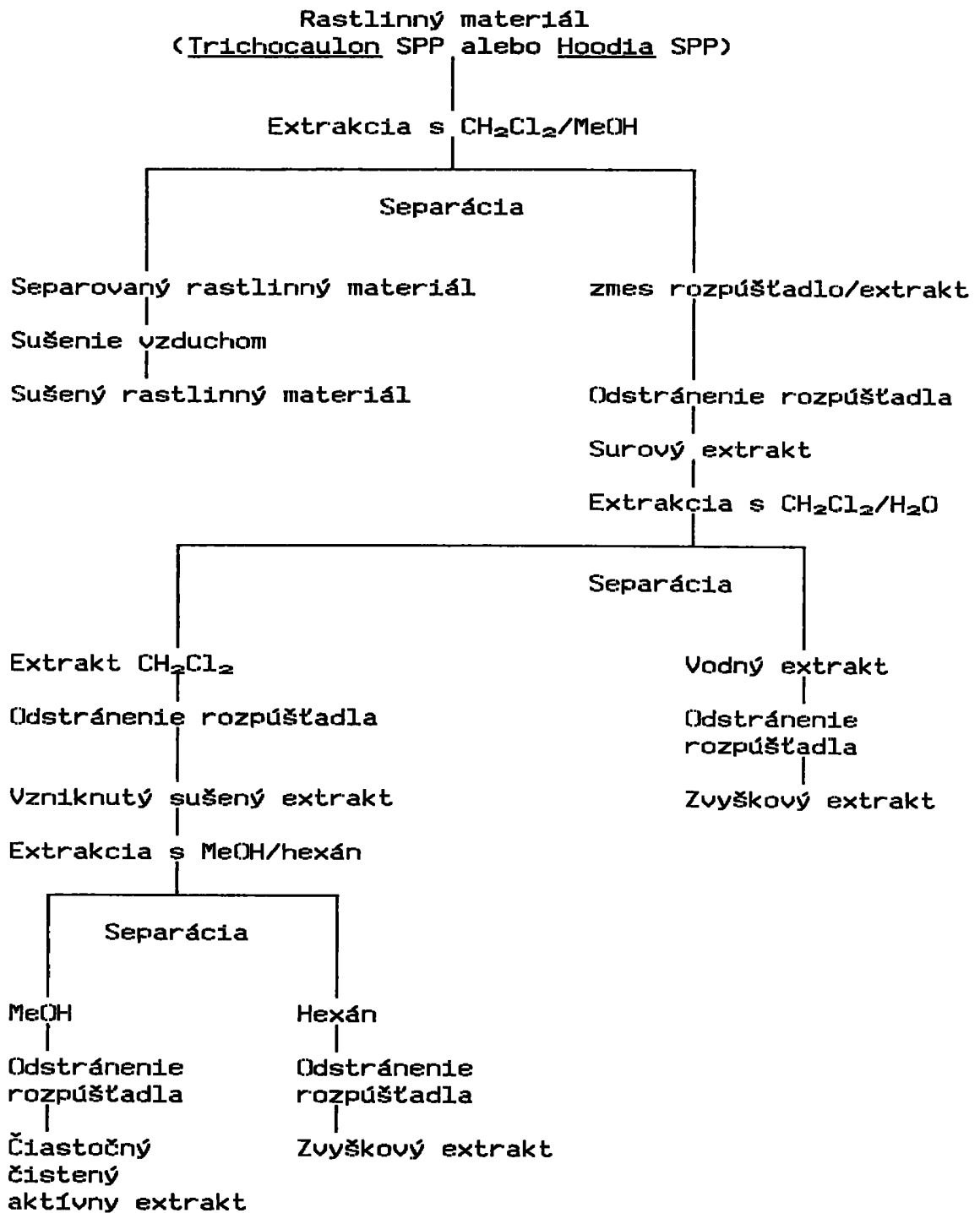
(58)

118. Spôsob boja proti obezite u človeka alebo zvieraťa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje podanie uvedenému človekovi alebo zvieraťu potrebného množstva extraktu, ako je nárokováný v ktoromkoľvek z nárokov 9, 25, 26, 27 alebo 28.

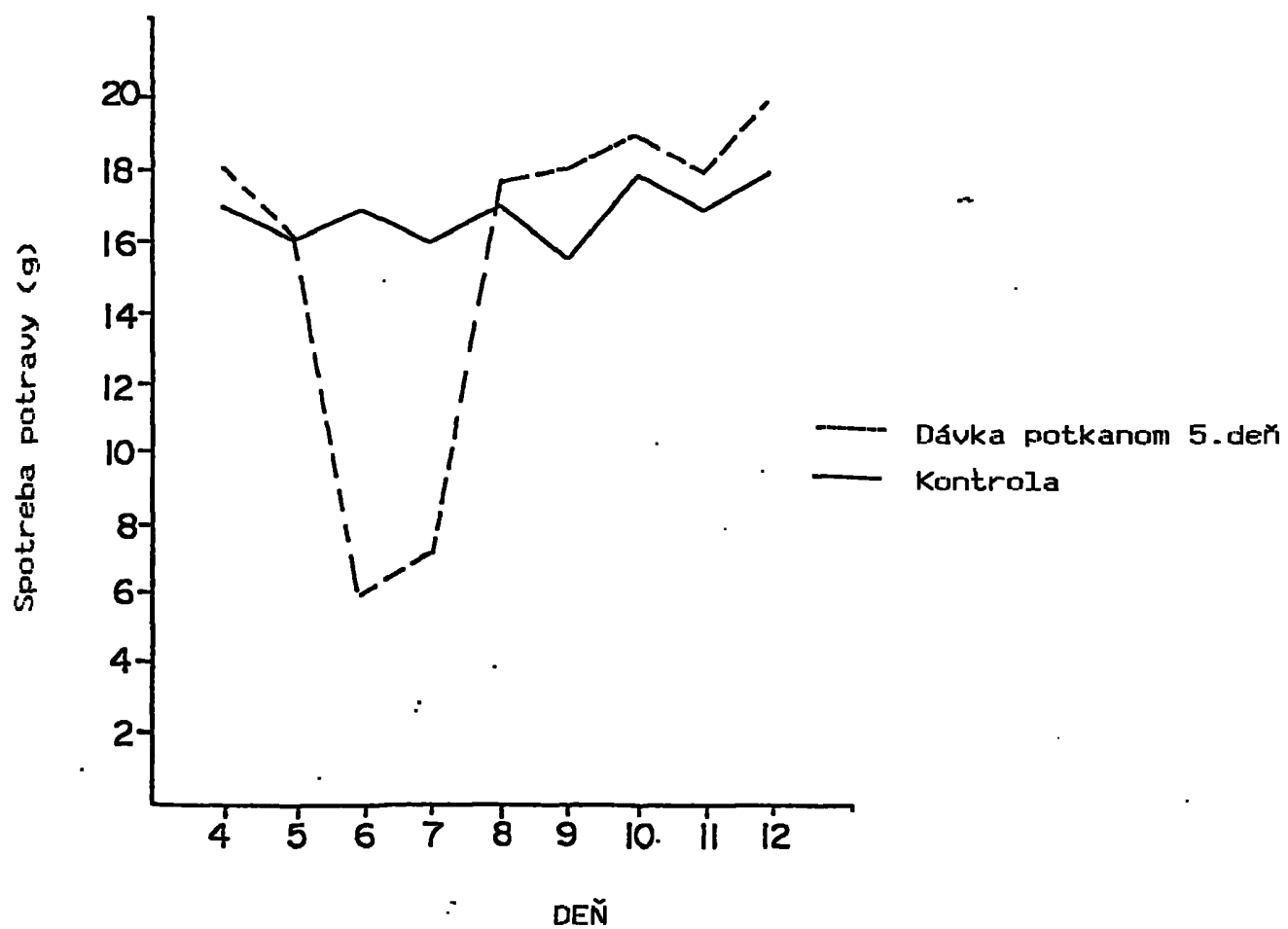
119. Spôsob boja proti obezite u človeka alebo zvieraťa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje podanie uvedenému človekovi alebo zvieraťu potrebného množstva kompozície, ako je nárokováná v nároku 10.

120. Spôsob boja proti obezite u človeka alebo zvieraťa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje podanie uvedenému človekovi alebo zvieraťu potrebného množstva zlúčeniny, ako je nárokováná v nároku 35 alebo 36.

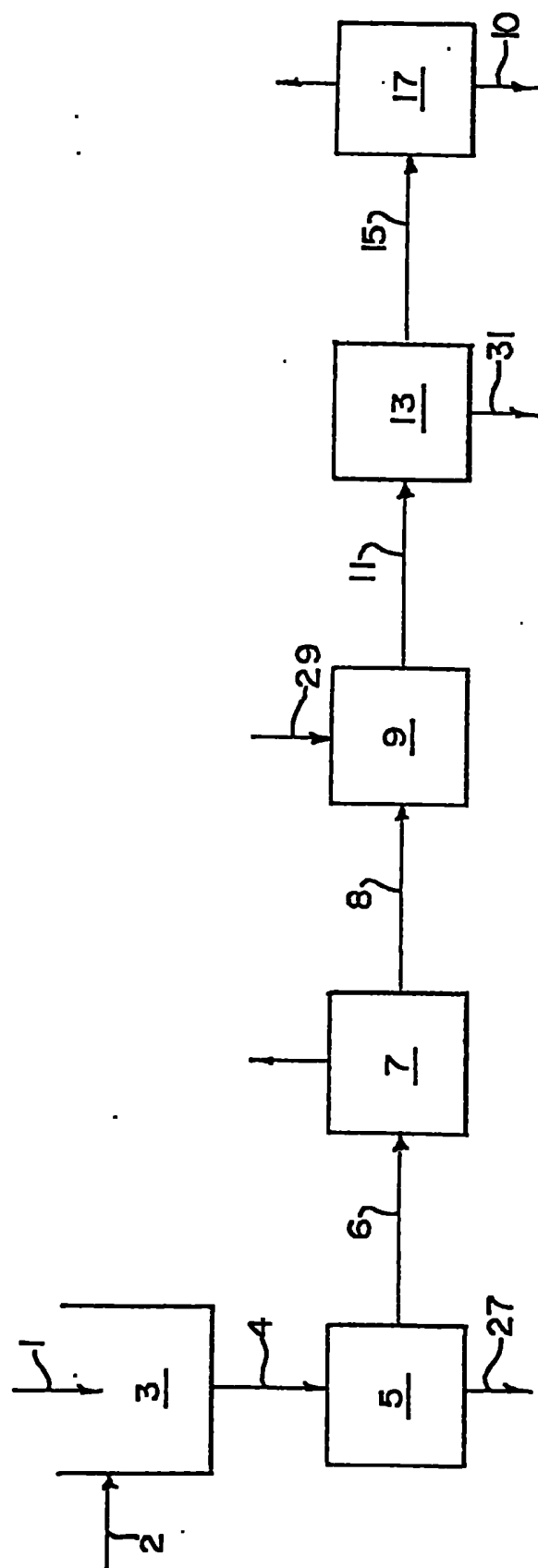
121. Štruktúra vzorca 3-O- β -D-theverozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranozyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranozid-12 β -O-tigloyl-14-hydroxy-14 β -pregn-5-en-20-ón.



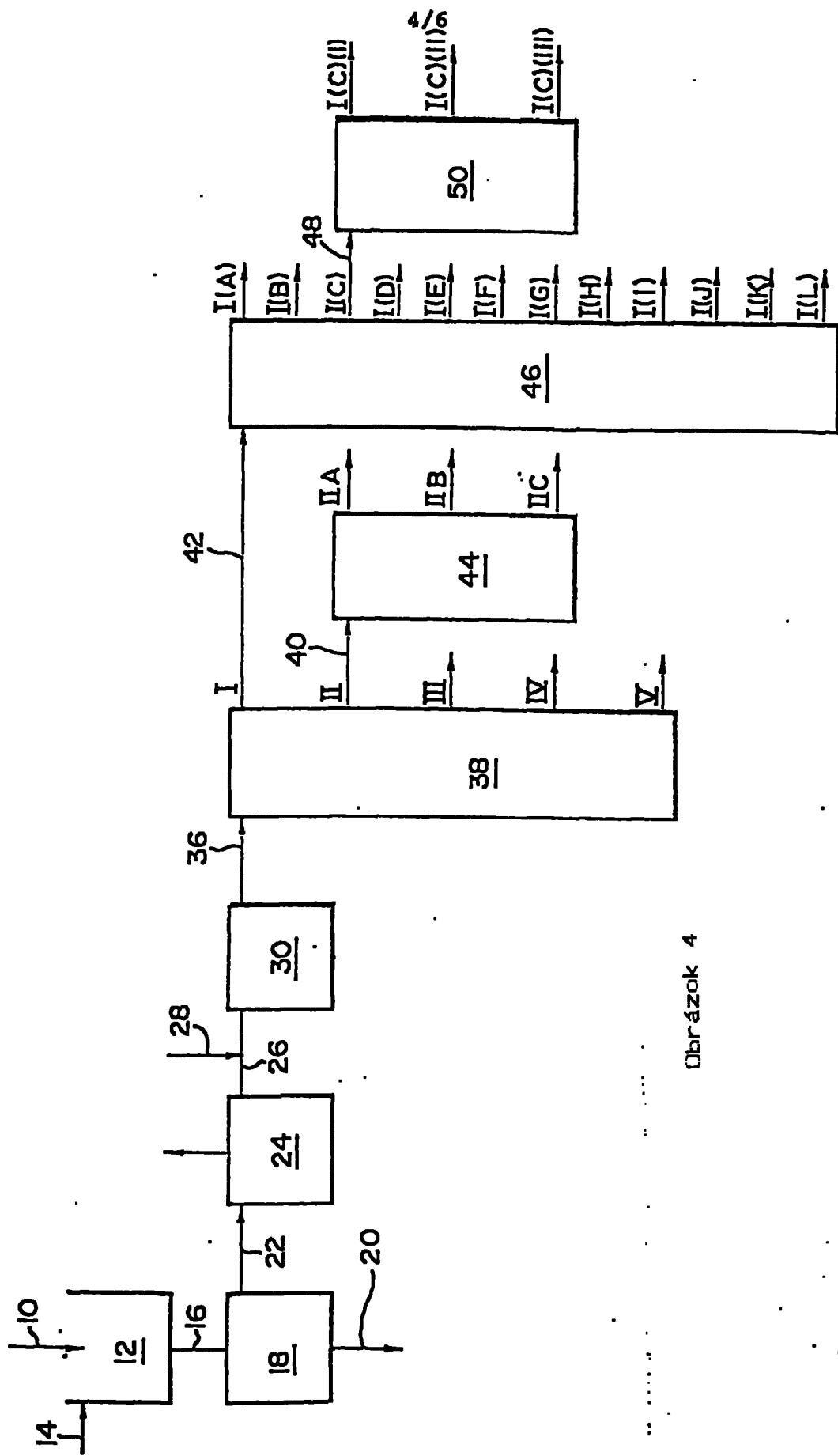
Obrázok 1



Obrázok 2

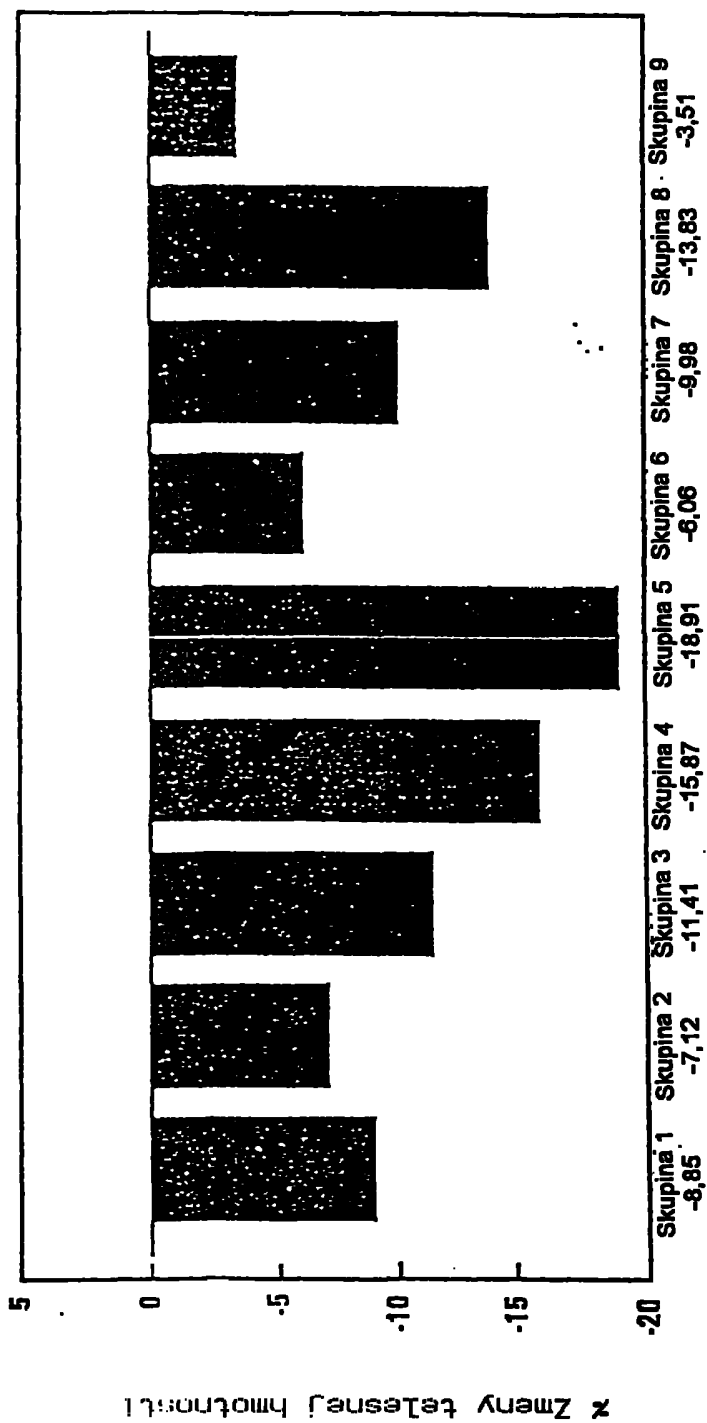


Obrazok 3



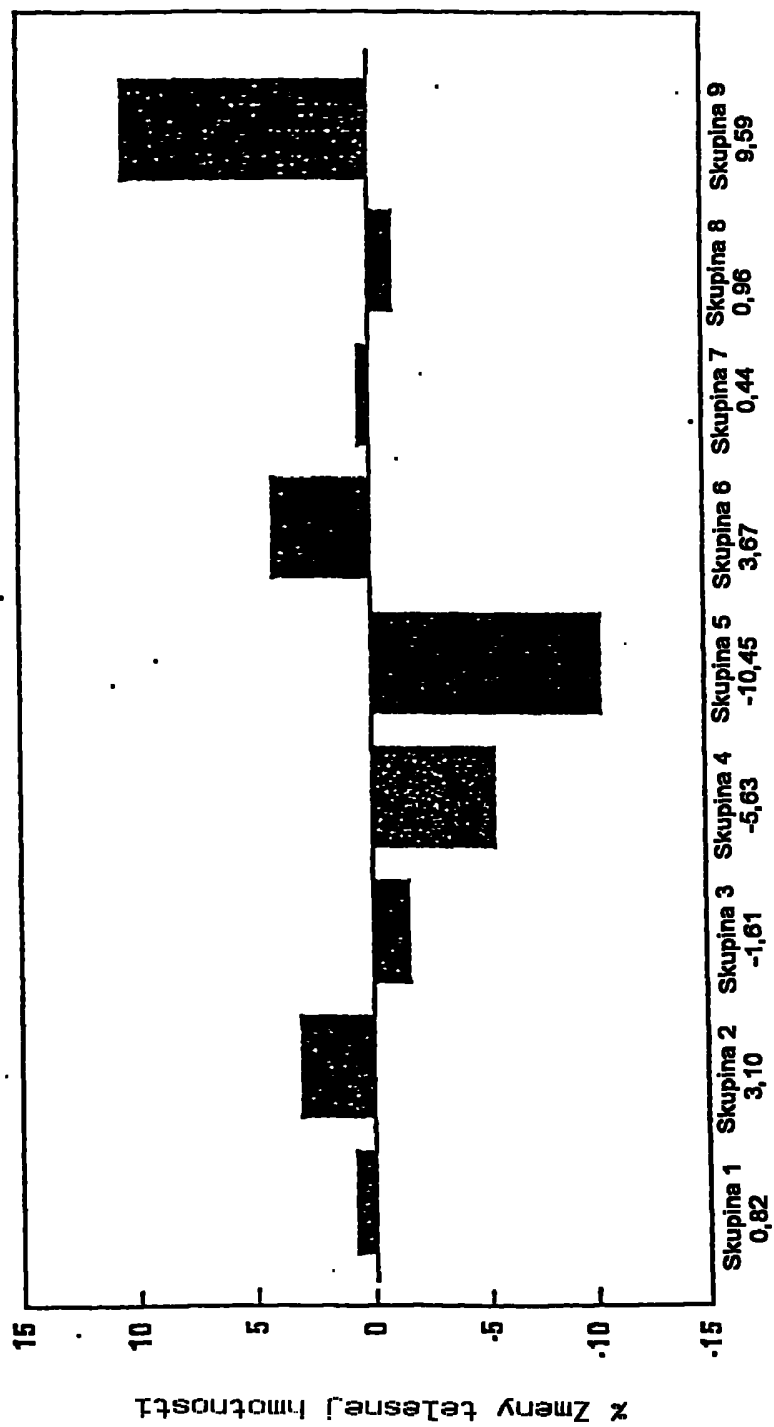
Obrazok 4

% Zmeny telesnej hmotnosti -7. až 7. deň



Obrázok 5

% Zmeny telesnej hmotnosti 0. až 7. deň



Obrázok 6