

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.03.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/123998**

(33) Země priority: **IL**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/IL99/00173**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/52932**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3625

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 J 41/00

C 07 J 9/00

A 61 K 31/575

A 61 P 9/10

(71) Přihlašovatel:

GALMED INTERNATIONAL LIMITED, Malta, MT;

(72) Původce:

Gilat Tuvia Dr., Tel-Aviv, IL;

(74) Zástupce:

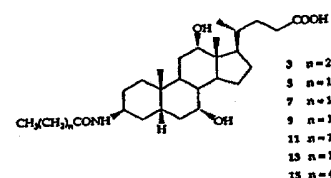
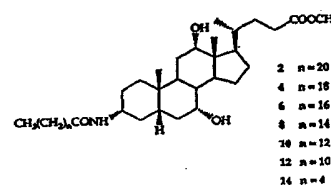
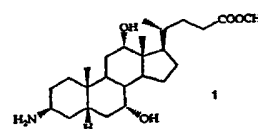
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Deriváty žlučových kyselin a derivátů žlučových
kyselin s mastnou kyselinou**

(57) Anotace:

Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou vzorce W-X-G, ve kterém je G radikál žlučové kyseliny nebo žlučové soli, W označuje jeden nebo dva radikály nasycené mastné kyseliny a X je buď přímo vazba nebo vazebný člen mezi uvedenou žlučovou kyselinou nebo žlučovou solí a mastnou kyselinou (kyselinami). Konjugace je s výhodou realizována v poloze vybrané z poloh 3, 6, 7, 12 a 24 skeletu žlučové kyseliny nebo žlučové soli. Mastnými kyselinami jsou s výhodou nasycené mastné kyseliny, které mají 14 až 22 uhlíkových atomů. Jsou určeny k použití při rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči, k prevenci jejich výskytu nebo opětovného výskytu, k použití ve zmírňování nebo prevenci arteriosklerózy a ke způsobům léčení uvedených nemocí.



Deriváty žlučových kyselin a derivátů žlučových kyselin s mastnou kyselinou

Oblast techniky

Předložený vynález se vztahuje ke konjugátům žlučové kyseliny nebo konjugátům žlučové soli s mastnou kyselinou (zde dále nazývanými BAFAC), k jejich použití k rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči, prevenci jejich výskytu nebo opětovného výskytu, k jejich použití ve zmírňování nebo prevenci arteriosklerózy a ke způsobům léčení uvedených nemocí.

Mělo by být poznamenáno, že termíny žlučové kyseliny a žlučové soli jsou podobné a jsou používány zaměnitelně.

Dosavadní stav techniky

15 % obyvatel v nejindustrializovanějších zemích má žlučové kameny. Většina žlučových kamenů jsou cholesterolové kameny, to jest jejich hlavní složkou je cholesterol. Cholesterolové žlučové kameny tak představují vážný zdravotní problém. Žluč je často přesycena cholesterolem, který má snahu krystalizovat. Zabránění krystalizaci cholesterolu ve žluči zabráni tvorbě cholesterolových žlučových kamenů nebo jejich opětovnému výskytu po procedurách jako je litotrypsie, rozpouštění nebo vynětí kamene. Doba, po kterou se zdrží nově vyloučená žluč ve žlučníku, je krátká, menší než 12 až 24 hodin. Zabránění krystalizaci cholesterolu ve žluči během této periody by zabránilo tvorbě žlučového kamene.

Bylo dokázáno, že cholesterolové žlučové kameny mohou být rozpuštěny vnitřně a jejich opětovný výskyt zamezen pomocí určitých žlučových solí, jako chenodeoxycholové kyseliny nebo ursodeoxycholové kyseliny. Terapie pomocí

žlučové soli má však nízkou účinnost, je velmi náročná na čas a byla do značné míry opuštěna. Proto jsou požadovány účinnější terapie.

Nedávná práce ukázala velkou roli, jakou hrají fosfolipidy v solubilizaci cholesterolu ve žluči. (T. Gilat et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1286, (1996), 95 až 115, Y. Ringel et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1390, (1998), 293 až 300) a *J. Hepatology* 28, (1998), 1008 až 1014.) Fosfolipidy jsou hlavní nebo jedinou složkou lipidových agregátů ve žluči, které solubilizují cholesterol. Bylo ukázáno, že postupné přidávání fosfolipidů ke žluči progresivně prodlouží dobu tvoření krystalizačních zárodků cholesterolu ve žluči (Z. Halpern et al, *Gut* 34, (1993), 110 až 115).

Bylo ukázáno, že mezi určitými fosfolipidovými molekulovými druhy existují velké rozdíly v jejich účinnosti inhibice krystalizace cholesterolu v lidských nebo modelových žlučích. Fosfolipidy se liší jeden od druhého hlavně v přítomných mastných kyselinách ve stereospecifických polohách sn-1 a/nebo sn-2 a jejich hlavních skupinách. Bylo ukázáno, že velkých prodloužení doby tvoření krystalizačních zárodků cholesterolu a velkých snížení rychlosti růstu krystalu cholesterolu a celkové hmotnosti krystalu cholesterolu se dosáhne se změnami fosfolipidových molekulárních druhů, aniž by se změnila absolutní nebo relativní množství fosfolipidů. Krystalizace cholesterolu byla značně zpožděna, když sn-2 mastná kyselina byla nasycená, když hlavní skupinou byl serin namísto cholinu atd. (Y. Ringel et al výše).

Také bylo ukázáno, že různé fosfolipidové složky samy o sobě (bez molekuly fosfolipidu jako celku), např. nasycené mastné kyseliny jako je palmitová kyselina nebo stearová kyselina nebo fosfatidylglycerol, mají silnou inhibiční aktivitu krystalizace cholesterolu.

Tak obohacení lidské žluči obecně fosfolipidy nebo konkrétními fosfolipidy nebo jejich složkami jako jsou mastné kyseliny by značně zpomalilo krystalizaci cholesterolu ve žluči a bylo by dosaženo požadovaného výsledku.

Problémem bylo, jak obohatit fosfolipidy nebo jejich složkami lidskou žluč *in vivo*. Když jsou žlučové soli podávány lidem, jsou tyto velmi účinně absorbovány, vstřebány játry a vyloučeny do žluči. Toto se také vztahuje na syntetické analogy žlučové soli. Pro tyto účely existují v těle specifické a velmi účinné transportní mechanismy. Když se tak pravidelně podává ursodeoxycholová kyselina (která je normálně přítomna v lidské žluči v malých množstvích), je tato vstřebávána a vylučována do žluči a nakonec tvoří 30 až 50 % biliárních žlučových kyselin. Avšak jak je uvedeno výše, terapie žlučovou solí pro rozpuštění cholesterolových žlučových kamenů není uspokojivá.

Fosfolipidy a jejich složky se dobře absorbují a vstřebávají játry. Vyloučení fosfolipidu do žluči je však pevně regulováno játry a pouze omezená množství a druhy fosfolipidů jsou vylučovány do žluči ve spojení s vylučováním žlučových solí a cholesterolu. V současnosti neexistuje účinný způsob kvantitativní nebo kvalitativní modulace lidských biliárních fosfolipidových přípravků do jakéhokoliv významného stupně. Když fosfolipidy z potravy dosáhnou jater, mohou být metabolizovány, vyloučeny do krve nebo uloženy v játrech. Pouze malá množství a předem určené druhy se vyloučí do žluči s minimálními možnostmi pro jejich modulaci.

Proto bylo žádoucí nalézt uspokojivý způsob transportu fosfolipidů nebo jedné z jejich složek do žluči, což by zlepšilo solubilizaci biliárního cholesterolu a zabránilo tvorbě cholesterolových žlučových kamenů nebo rozpustilo existující žlučové kameny.

Z izraelského patentního spisu č. 95668 a odpovídajících patentních spisů USA jsou známy deriváty žlučové kyseliny obecného vzorce I,

W - X - G

(I)

kde G je radikál žlučové kyseliny, W je aktivní sloučeninová skupina léku a X je buď přímo vazba nebo vazebný člen mezi uvedeným radikálem žlučové kyseliny a aktivní sloučeninou. V uvedených spisech je uveden dlouhý seznam substituentů, ale konkrétně není uvedeno, že W označuje radikál mastné kyseliny, ani nasycené mastné kyseliny, ani nenasycené mastné kyseliny, to jest uvedené spisy neuvádějí nic o BAFAC.

Navíc mezi všemi účely uvedených sloučenin nelze nalézt ani narážku na to, že jakákoliv z uvedených sloučenin může být využita ke zlepšení solubilizace biliárního cholesterolu, k prevenci tvorby cholesterolových žlučových kamenů, k rozpuštění existujících žlučových kamenů, ke zmírňování nebo prevenci arteriosklerózy.

Podstata vynálezu

V současné době bylo zjištěno, že žlučové kyseliny nebo soli, konjugované s mastnými kyselinami (nasycenými nebo nenasycenými) buď přímo nebo pomocí spojující vazby X (obě možnosti jsou pokryty termínem BAFAC), mohou sloužit jako přenašeče pro transport mastných kyselin do žluči pomocí velmi účinných enterohepatických cirkulací žlučových kyselin a solí. Také bylo ukázáno, že BAFAC jsou absorbovány ze střeva, vstřebány játry a vyloučeny do žluči. Uvedené sloučeniny BAFAC zlepšily rozpustnost cholesterolu ve žluči a značně zpomalily jeho krystalizaci. Uvedené sloučeniny BAFAC jsou proto výhodná činidla pro prevenci tvorby nebo opětovného objevení cholesterolových žlučových kamenů a pro rozpuštění cholesterolových žlučových kamenů.

Podávání BAFAC má tedy inhibiční účinek na krystalizaci cholesterolu ve vaskulárním systému. Ve fyziologickém stavu jsou pozřené žlučové kyseliny nebo soli absorbovány ve střevu, transportovány vrátnicovou žílou do jater a vylučovány cestou žluči do střeva. Recirkulují tak v enterohepatické cirkulaci, přičemž pouze jejich malá množství se dostanou do velkého oběhu krevního (cévního systému). Sloučeniny BAFAC se chovají více jako lipidy, které jsou po střevním vstřebání transportovány pomocí mízy do velkého oběhu krevního. Bylo ukázáno, že BAFAC jsou transportovány jak pomocí mízy, tak pomocí vrátnicové žíly. Oběma cestami jsou vstřebávány játry a vylučovány do žluči. Při každé enterohepatické cirkulaci jsou vylučovány do střeva, opět částečně znovuvstřebávány pomocí mízy a recirkulovány do cévního systému před vstřebáním játry. Protože denně dochází k 10 až 12 cyklům enterohepatické cirkulace, bude čistým výsledkem recirkulace BAFAC ve vaskulárním systému.

Orální podávání BAFAC v rozdělených dávkách v průběhu dne tento efekt umocní. Byl dokázán inhibiční účinek BAFAC na krystalizaci cholesterolu. Také byla dokázána jejich hodnota ve snižování a/nebo prevenci krystalizace cholesterolu ve vaskulárním systému, to jest u arteriosklerózy.

Předložený vynález tak spočívá v konjugátech žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, které mají obecný vzorec II,

W - X - G (II)

ve kterém G a X mají stejný význam jako ve vzorci I a W označuje jeden nebo dva radikály mastné kyseliny.

Jako vhodné žlučové kyseliny zde mohou být zmíněny například cholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, ursodeoxycholová kyselina, deoxycholová kyselina a jejich deriváty a analogy, atd. Použité žlučové kyseliny mohou být nekonjugované nebo jako ve žluči konjugované s glycinem, taurinem nebo vhodnou aminokyselinou. Tyto možnosti jsou obsaženy v definici žlučové

kyseliny a jsou tak zahrnuty v rámci předloženého vynálezu. Konjugace s radikálem mastné kyseliny je většinou realizována v poloze 3 skeletu, podle použité žlučové kyseliny. Konjugaci s radikálem mastné kyseliny je také možné provést v jiných polohách, např. polohách 6, 7, 12 a 24. Je-li žlučová kyselina konjugována s glycinem nebo taurinem, nelze uskutečnit konjugaci s radikálem mastné kyseliny do polohy 24. Konjugace mezi radikálem mastné kyseliny a žlučovou kyselinou může být v α nebo β konfiguraci.

Vazebným členem X je s výhodou skupina -NH- nebo skupina -O- nebo přímo vazba.

Zvýhodněnými mastnými kyselinami jsou nasycené mastné kyseliny, které mají výhodně 6 až 26 uhlíkových atomů, s výhodou ty, které mají 14 až 22 uhlíkových atomů. Zvýhodněnými nasycenými mastnými kyselinami jsou behenová kyselina, arachidová kyselina, stearová kyselina, palmitová kyselina a myristová kyselina.

Když W označuje dvě mastné kyseliny, jsou tyto výhodně konjugovány v polohách 3 a 7.

Předložený vynález také zahrnuje farmaceutický přípravek umožňující rozpuštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a prevenci jejich tvorby a umožňující prevenci a/nebo zmírnění arteriosklerózy a obsahující jako aktivní složku derivát žlučové kyseliny s mastnou kyselinou obecného vzorce II.

Uvedený přípravek může být ve formě tablety, kapsle, roztoku, emulze atd.

Uvedený přípravek může obsahovat doplňkové sloučeniny jako jsou nosiče, rozpouštědla, emulgátory, látky podporující vstřebávání, inhibitory cholesterolové syntézy nebo vylučování do žluči atd. Uvedený přípravek by měl s výhodou obsahovat 0,1 až 1,5 g aktivní složky.

Přípravek je vhodné požívat jednou denně, s výhodou navečer. Může být také pozřen v rozdělených dávkách během dne.

Předložený vynález také zahrnuje použití derivátu žlučové kyseliny a mastné kyseliny obecného vzorce II nebo farmaceutického přípravku obsahujícího stejnou složku pro rozpuštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a pro prevenci jejich tvorby.

Předložený vynález také zahrnuje použití derivátu žlučové kyseliny a mastné kyseliny obecného vzorce II nebo farmaceutického přípravku obsahujícího stejný derivát pro prevenci a/nebo zmírnění arteriosklerózy.

Předložený vynález také zahrnuje způsob rozpuštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a způsob prevence jejich tvorby podáváním derivátu žlučové kyseliny a mastné kyseliny obecného vzorce II nebo farmaceutického přípravku obsahujícího tentýž derivát.

Předložený vynález také zahrnuje způsob prevence a/nebo zmírnění arteriosklerózy podáváním derivátu žlučové kyseliny a mastné kyseliny obecného vzorce II nebo farmaceutického přípravku obsahujícího tentýž derivát.

Předložený vynález bude nyní popsán s odkazem na doprovázející příklady a obrázky, bez toho, aby byl na ně omezen.

V uvedených obrázcích je znázorněno:

Obr. 1 znázorňuje dobu do zaznamenání krystalu. Modelový roztok žluči. Vlivy palmitoyl-cholátu (PalC).

A - Kontrolní roztok. B, C - Náhrada 10 % a 20 % natrium-taurocholátu (NaTC) ekvimolárními množstvími PalC, v uvedeném pořadí. D - Náhrada 20 % fosfolipidů s PalC. E, F - přidavek 10mM a 20mM PalC k roztoku, v uvedeném pořadí.

Obr. 2 znázorňuje hmotnost krystalu cholesterolu. Modelový roztok žluči. Vlivy PalC. A, B, C, D, E a F - jako u obr. 1.

Obr. 3 znázorňuje rychlost růstu krystalu. Modelový roztok žluči. Vlivy PalC. A, B, C, D, E a F - jako u obr. 1.

Obr. 4 znázorňuje chromatografii na tenké vrstvě. A - PalC standardy v čistém roztoku (vlevo) a ve žluči křečků. B - Křeččí žluč kontrolních zvířat (vlevo) a žluč křečků krmených PalC.

Obr. 5A znázorňuje kroky při konjugaci cholové kyseliny (na uhlíku C3) s behenovou kyselinou (22 uhlíkových atomů), arachidovou kyselinou (20 uhlíkových atomů), stearovou kyselinou (18 uhlíkových atomů), palmitovou kyselinou (16 uhlíkových atomů), myristovou kyselinou (14 uhlíkových atomů), laurovou kyselinou (12 uhlíkových atomů) a hexanovou kyselinou (6 uhlíkových atomů).

Obr. 5B znázorňuje stupně syntézy stearoyl-cholátu konjugovaného s glycinem.

Obr. 5C znázorňuje konjugaci oleoyl-cholátu.

Obr. 5D znázorňuje konjugaci cholové kyseliny se dvěma molekulami stearové kyseliny v polohách C3 a C7 skeletu žlučové kyseliny.

Obr. 6 znázorňuje hmotnost krystalu cholesterolu. Modelový roztok žluči. Vlivy myristové kyseliny (14 uhlíkových atomů), palmitové kyseliny (16 uhlíkových atomů), stearové kyseliny (18 uhlíkových atomů) a arachidové kyseliny (20 uhlíkových atomů) konjugovaných s cholovou kyselinou (na uhlíku C3). Testovací sloučeniny nahradily 20 molárních % NaTC v kontrolním roztoku.

Obr. 7 znázorňuje dobu tvoření krystalizačních zárodků. Modelový roztok žluči. Vlivy sloučenin použitých v obr. 6.

Obr. 8 znázorňuje hmotnost krystalu cholesterolu v obohacené lidské žluči po 22 dnech inkubace. Vlivy 5mM palmitoyl(16 uhlíkových atomů)-cholátu, stearoyl(18 uhlíkových atomů)-cholátu a arachidoyl(20 uhlíkových

atomů)-cholátu přidanych ke žluči pro srovnání s kontrolní žlučí a žlučí s přidanou 5mM cholovou kyselinou.

Obr. 9 znázorňuje dobu tvoření krystalizačních zárodků, modelové žluči. Vlivy náhrady 20 molárních % NaTC ekvimolárními množstvími hexanoyl(6 uhlíkových atomů)-cholátu, lauroyl(12 uhlíkových atomů)-cholátu, stearoyl(18 uhlíkových atomů)-cholátu, arachidoyl(20 uhlíkových atomů)-cholátu a distearoyl-ursodeoxycholátu ve srovnání s modelovou žlučí a bez náhrady 20 % NaTC cholovou kyselinou.

Obr. 10 znázorňuje hladiny stearoyl(18 uhlíkových atomů)-cholátu v křečcích po 1, 2 a 3 hodinách od pozření 30 mg. Koncentrace v krvi srdce, vrátnicové krvi a žluči žlučníku.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

3 β -Behenoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-3)

a) 1,15 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) (Francouzský patent 1017756, 18. prosince 1952, Chem. Abstr. 52, 1293c) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a směs byla za míchání zreagována s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 1,13 g behenoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání bylo pokračováno přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla poté vysušena síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí

ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,8 g methylesteru 3 β -behenoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-2).

¹H NMR (CDCl₃) δ , ppm: 0,69 (s, CH₃-18), 0,88 (t, J = 1 Hz, CH₃-23), 0,95 (s, CH₃-19), 0,99 (d, J = 3 Hz, CH₃-21), 1,25, 1,14 (s, (CH₂)₂₀), 2,14 (t, J = 5 Hz, CH₃-behenyl), 3,67 (s-COOCH₃), 3,91 (d, J = 1,5 Hz, CH-7), 3,96 (s, J = 4 Hz, CH-12), 3,99 (m, CH-3), 5,60 (d, J = 4,5 Hz, -CH₂CO-).

b) 0,45 g výše uvedeného methylesteru bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu a na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,41 g čisté 3 β -behenoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-3).

Příklad 2

3 β -Arachidoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-5)

a) 1,0 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) (viz příklad 1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a směs se za míchání nechala zreagovat s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 1,0 g arachidoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla vysušena síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za

zisku 0,6 g methylesteru 3 β -arachidoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-4).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,70 (s, CH_3 -18), 0,88 (t, $J = 6$ Hz, CH_3 -23), 0,95 (s, CH_3 -19), 0,99 (d, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 1,25, 1,14 (s, $(\text{CH}_2)_{18}$), 2,14 (t, $J = 5$ Hz, CH_3 -arachidyl), 3,67 (s- COOCH_3), 3,91 (d, $J = 1,5$ Hz, CH-7), 3,96 (t, $J = 4$ Hz, CH-12), 4,4 (m, CH-3), 5,60 (d, $J = 4,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CONH}$).

b) 0,5 g methylesteru 3 β -arachidoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-4) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,7 g čisté 3 β -arachidoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-5).

Příklad 3

3 β -Stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-7)

Způsob 1

a) 1,15 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) (viz příklad 1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 1,13 g stearoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla vysušena

síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,68 g methylesteru 3 β -stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-6).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,69 (s, CH_3 -18), 0,88 (t, $J = 1$ Hz, CH_3 -23), 0,95 (s, CH_3 -19), 0,99 (t, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 1,25, 1,44 (s, $(\text{CH}_2)_{16}$), 2,14 (t, $J = 5$ Hz, CH_3 -stearyl), 3,67 (s- COOCH_3), 3,91 (d, $J = 1,5$ Hz, CH-7), 3,99 (m, CH-3), 4,4 (m, CH-3), 5,60 (d, $J = 4,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CONH}$).

b) 0,45 g methylesteru 3 β -stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-6) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,41 g 3 β -stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-7). Teplota tání 63 až 65 °C.

Způsob 2

2,5 g 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (připravené podle Kramer et al, J. of Lipid Research 24, 910 (1983)) bylo rozpuštěno v acetonitrilu a přidáno k míchanému roztoku 1,2 g stearové kyseliny a 3,6 g N-hydroxysukcinamidu v témže rozpouštědle. Po 8 hodinách byla sraženina zfiltrována, promyta rozpouštědlem a odpařena do sucha. Odparek byl přidán k roztoku 1,2 g stearové kyseliny v 10 ml N-methylmorfolinu a N,N'-dimethylformamidu (1 : 3). Po udržování při laboratorní teplotě přes noc byl roztok zředěn vodou, extrahován ethylacetátem za zisku 0,6 g kyseliny (Obr. 5A-7), identické kyselině podle způsobu 1.

Způsob 3

Roztok 6 g stearylchloridu byl po kapkách přidán k míchanému roztoku 1,6 g aminu (Obr. 5B-18) v toluenu při 0 °C a směs byla při téže teplotě ponechána 1 hodinu. Výsledný roztok byl zahříván po další hodinu při 50 °C, okyselen 3M chlorovodíkovou kyselinou a poté zfiltrován. Pevná látka byla promyta vodou a vysušena při 45 °C za zisku kyseliny (Obr. 5A-7), identické s kyselinou popsanou výše.

Příklad 4

3 β -Palmitoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-9)

Způsob 1

a) 1,0 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) (viz příklad 1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 0,8 g palmitoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla poté vysušena síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,5 g methylesteru 3 β -palmitoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-8).
¹H NMR (CDCl₃) δ , ppm: 0,66 (s, CH₃-11), 0,88 (t, J = 1 Hz, CH₃-23), 0,91 (s, CH₃-19), 0,96 (d, J = 3,5 Hz, CH₃-21), 1,22, 1,14 (s, (CH₂)₁₄), 2,13 (t, J = 5 Hz, CH₃-palmityl), 3,67 (s-COOCH₃), 3,82 (d, J = 1,5 Hz, CH-7), 3,96 (s, J = 3,9 Hz, CH-12), 4,09 (m, CH-3), 5,63 (d, J = 4,5 Hz, -CH₂CONH).

b) 0,45 g výše uvedeného methylesteru bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,4 g čisté 3 β -palmitoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-9).

Způsob 2

2,5 g 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5B-18) (připravené podle Kramer et al, J. of Lipid Research 24, 910 (1983)) bylo rozpuštěno v acetonitrilu a přidáno k míchanému roztoku 1,2 g palmitové kyseliny a 3,6 g N-hydroxysukcinamidu v témže rozpouštědle. Po 8 hodinách byla sraženina zfiltrována, promyta rozpouštědlem a odpařena do sucha. Odparek byl přidán k roztoku 1,2 g palmitové kyseliny v 10 ml N-methylmorfolinu a N,N'-dimethylformamidu (1 : 3). Po udržování při laboratorní teplotě přes noc byl roztok zředěn vodou, extrahován ethylacetátem za zisku 0,6 g kyseliny (Obr. 5A-9), identické kyselině podle způsobu 1.

Příklad 5

3 β -Myristoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-11)

a) 0,5 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (1) (viz příklad 1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 0,4 g myristoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována

methylenchloridem, organická frakce byla poté vysušena síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,4 g methylesteru 3 β -myristoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-10).

¹H NMR (CDCl₃) δ , ppm: 0,69 (s, CH₃-18), 0,88 (t, J = 1 Hz, CH₃-23), 0,95 (s, CH₃-19), 0,99 (d, J = 3 Hz, CH₃-21), 1,25 (s, (CH₂)₁₂), 2,14 (t, J = 5 Hz, CH₃-myristyl), 3,67 (s-COOCH₃), 3,91 (d, J = 1,5 Hz, CH-7), 3,99 (d, J = 4 Hz, CH-12), 4,4 (m, CH-3), 5,60 (d, J = 4,5 Hz, -CH₂CONH).

b) 0,45 g methylesteru 3 β -myristoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-10) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,26 g čisté kyseliny (Obr. 5A-11).

Příklad 6

3 β -Lauroylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-13)

a) 0,6 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 0,6 g lauroylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla vysušena síranem sodným, odpařena

do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,5 g methylesteru 3 β -lauroylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-12).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,67 (s, CH_3 -18), 0,89 (t, $J = 1$ Hz, CH_3 -23), 0,94 (s, CH_3 -19), 0,99 (d, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 1,25 (s, $(\text{CH}_2)_{10}$), 2,14 (t, $J = 5$ Hz, CH_3 -lauryl), 3,67 (s- COOCH_3), 3,91 (d, $J = 1,5$ Hz, CH-7), 3,99 (t, $J = 3,95$ Hz, CH-12), 4,4 (m, CH-3), 5,60 (d, $J = 4,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CONH}$).

b) 0,45 g methylesteru 3 β -lauroylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-12) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,41 g čisté kyseliny (Obr. 5A-13), teplota tání 82 až 88 °C.

Příklad 7

3 β -Hexanoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5A-15)

a) 1,0 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) (viz příklad 1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 15 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 1,2 g hexanoylchloridu v 10 ml dimethylformamidu a v míchání se pokračovalo přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována methylenchloridem, organická frakce byla vysušena síranem sodným, odpařena do sucha a zchromatografována přes silikagel směsí

ethylacetátu a hexanu (6 : 4 a 8 : 2) za zisku 0,7 g methylesteru 3 β -hexanoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-14).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,69 (s, CH_3 -18), 0,88 (t, $J = 1$ Hz, CH_3 -23), 0,95 (s, CH_3 -19), 0,99 (t, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 1,25 (s, $(\text{CH}_2)_4$), 2,14 (t, $J = 5$ Hz, CH_3 -hexyl), 3,67 (s- COOCH_3), 3,91 (d, $J = 1,5$ Hz, CH-7), 3,99 (t, $J = 4$ Hz, CH-12), 4,4 (m, CH-3), 5,60 (d, $J = 4,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CONH}$).

b) 0,5 g methylesteru 3 β -hexanoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-14) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl methanol oddestilován, bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována ethylacetátem. Vodná frakce byla poté okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za vzniku bílé sraženiny, která byla promyta vodou za zisku 0,4 g čisté kyseliny (Obr. 5A-15).

Příklad 8

N-(Karboxymethyl)-3 β -stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amid (Obr. 5B-17)

a) 0,5 g 3 β -stearoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-7) bylo rozpuštěno ve 25 ml vysušeného 1,4-dioxanu a ochlazeno na -10°C . Míchaný roztok byl zreagován s 0,5 ml triethylaminu, poté s 0,085 ml chlorethylformiátem a při stejné teplotě bylo mícháno 15 minut. Roztok byl ponechán dosáhnout laboratorní teploty, zreagován s 0,1 ml triethylaminu a se 14 g hydrochloridu ethylglycinu a roztok byl ponechán reagovat přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována ethylacetátem a promyta vodou.

Extrakt byl odpařen do sucha a zchromatografován na silikagelu směsí ethylacetátu a hexanu (60 : 40), čistým ethylacetátem a poté směsí ethylacetátu a methanolu

(9 : 1) za zisku 0,27 g produktu (Obr. 5B-16).

b) 0,27 g výše uvedené sloučeniny bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu a na směs se působilo 2 ml 1M hydroxidu sodného. Po 24 hodinách byl methanol odpařen do sucha, odparek rozpuštěn ve vodě a extrahován ethylacetátem. Vodná frakce byla okyselena 1M HCl. Získaná sraženina byla promyta vodou a vysušena za zisku 0,24 g vysušeného materiálu (Obr. 5B-17).

Příklad 9

3 β -Oleoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (Obr. 5C-20)

a) 1,6 g methylesteru 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5A-1) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného dimethylformamidu a za míchání zreagováno s 3 ml triethylaminu. K výslednému roztoku bylo po kapkách přidáno 1,38 g oleoylchloridu v 10 ml vysušeného dimethylformamidu a výsledný roztok byl ponechán při laboratorní teplotě přes noc. Reakční směs byla nalita do vody, extrahována ethylacetátem, organická frakce byla přečištěna promytím zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, hydrogenuhličitanem sodným a poté vodou. Odpaření do sucha za sníženého tlaku dalo vznik 3,1 g, které byly zchromatografovány přes silikagel pomocí směsi ethylacetát/hexan (4 : 6 a 10 : 8) za zisku 1,8 g methylesteru (Obr. 5C-19).

b) Na roztok 1,2 g methylesteru ve 20 ml methanolu se působilo při laboratorní teplotě roztokem 5 ml 1M hydroxidu sodného a směs byla udržována při laboratorní teplotě 48 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 20 ml vody a třikrát extrahován 25 ml ethylacetátu. Vodný extrakt byl okyselen roztokem kyseliny chlorovodíkové za zisku sraženiny, která byla zfiltrována. Tato sraženina byla zchromatografována na silikagelu směsí ethylacetát : hexan : octová kyselina (10 : 4 : 0,3) za zisku 0,3 g 3β -oleoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholan-24-ové kyseliny (Obr. 5C-20).

Příklad 10

$3\beta,7\alpha$ -distearoylamino- 5β -ursodeoxycholan-24-ová kyselina (Obr. 5D-26)

a) 20 g ursodeoxycholan-24-ové kyseliny bylo rozpuštěno ve 200 ml absolutního methanolu, zreagováno s 1 ml koncentrované kyseliny sírové a míchalo se 24 hodin. Většina rozpouštědla byla oddestilována a zbytek byl vlit do vody a extrahován methylenchloridem. Organický extrakt byl promyt roztokem hydrogenuhličitanu sodného a chloridu sodného a odpařen do sucha za zisku 19,5 g methylesteru $3\alpha,7\beta$ -dihydroxy- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-21).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ , ppm: 0,66 (s, CH_3 -18), 0,90 (t, $J = 1$ Hz, CH_3 -23), 0,93 (s, CH_3 -19), 0,94 (d, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 3,58 (m, CH-3, CH-7), 3,65 (s- COOCH_3).

b) 4,06 g methylesteru (Obr. 5D-21) bylo rozpuštěno ve 30 ml vysušeného pyridinu a ochlazeno na 0°C . Reakční směs byla míchána a po kapkách k ní byl během 15 minut přidán roztok 1,49 g methansulfonylchloridu v 5 ml pyridinu. Po 3 hodinách stání při téže teplotě byla reakční směs nalita do vody s ledem a

poté extrahována ethylacetátem. Organická fáze byla promyta roztokem kyseliny chlorovodíkové, hydrogenuhlíčitanu sodného a chloridu sodného, zfiltrována a odpařena za sníženého tlaku. Odparek, který se skládal ze 4 sloučenin, byl zchromatografován přes kolonu s kysličníkem křemičitým elučním činidlem směsi ethylacetátu a hexanu. 5,3 g méně polární sloučeniny byl žádaný methylester $3\alpha,7\beta$ -dimethansulfonyl- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-22).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,65 (s, CH_3 -18), 0,90 (d, $J = 4$ Hz, CH_3 -23), 0,97 (s, CH_3 -19), 1,2 (t, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 2,97 (s, CH_3SO_2), 2,98 (s, CH_3SO_2), 3,64 (s, CH_3SO_2), 4,09 (q, $J = 12$ Hz, H-7), 4,62 (m, H-7).

c) 5,65 g dimethansulfonylderivátu bylo rozpuštěno v 50 ml vysušeného DMF, zreagováno s vysušeným azidem sodným a zahříváno 2 hodiny při 130°C . Reakční směs byla ochlazená, vlita do ledové vody a extrahována ethylacetátem. Extrakt byl poté promyt roztokem octanu sodného a chloridu sodného, zfiltrován a odpařen do sucha za zisku 4,6 g methylesteru $3\beta,7\alpha$ -diazido- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-23).

d) 4,5 g diazidosloučeniny (Obr. 5D-23) bylo rozpuštěno ve 120 ml methanolu, ke kterému se přidalo 150 mg 5% paládía na uhlíku a hydrogenovalo se 4 dny za atmosférického tlaku. Hydrogenace se opakovala s dalšími 150 mg 5% paládía na uhlíku. Hydrogenovaná směs byla zfiltrována a odpařena za sníženého tlaku za zisku 3 g methylesteru $3\beta,7\alpha$ -diamino- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-24).

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,65 (s, CH_3 -18), 0,92 (d, $J = 4$ Hz, CH_3 -23), 0,96 (s, CH_3 -19), 1,2 (t, $J = 3$ Hz, CH_3 -21), 3,68 (s, COOCH_3), 3,72, 3,95 (m, 2H-7,3).

e) 1,47 g methylesteru $3\beta,7\alpha$ -diamino- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-24) bylo rozpuštěno v 50 ml vysušené směsi DMSO a DMF (1 : 1), zreagováno s 2 ml triethylaminu a 30 mg dimethylaminopyridinu a 5,1 g anhydridu stearové kyseliny. Reakční směs byla zahřáta na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, míchána 18 hodin, vlita do ledové vody a třikrát extrahována ethylacetátem. Organická fáze byla promyta roztokem kyseliny chlorovodíkové, hydrogenuhlíčitanu sodného a chloridu sodného. Po odpaření organického rozpouštědla bylo získáno 2,05 g olejovitého odparku. Separací na silikagelu pomocí elučního činidla ethylacetát : hexan (1 : 4) bylo získáno množství frakcí, z nichž jedna byla podle jejího MS a ^1H NMR spektra 80 mg žádaného methylesteru $3\beta,7\alpha$ -distearoylamino- 5β -ursodeoxycholan-24-ové kyseliny (Obr. 5D-25).

MS FAB: MH^+ 937 (molekulová hmotnost 936)

^1H NMR (CDCl_3) δ , ppm: 0,66 (s, CH_3 -18), 0,86 (d, $J = 4\text{ Hz}$, CH_3 -23), 0,96 (s, CH_3 -19), 1,2 (t, $J = 3\text{ Hz}$, CH_3 -21), 1,26 (s, $(\text{CH}_2)_{16}$), 3,64 (s, COOCH_3), 3,05 (d, $J = 7\text{ Hz}$, H-7), 5,75 (m, H-3).

f) 78 mg methylesteru (Obr. 5D-25) bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu, ke směsi se přidaly 2 ml 1M hydroxidu sodného a směs se ponechala 48 hodin při laboratorní teplotě. Methanol byl za sníženého tlaku odpařen, odparek byl rozpuštěn ve 25 ml vody, zfiltrován a poté okyselen zředěnou kyselinou chlorovodíkovou za zisku sraženiny, kterou byla $3\beta,7\alpha$ -distearoylamino- 5β -ursodeoxycholan-24-ová kyselina (Obr. 5D-26y).

Příklad 11

Reagencie a způsoby

Cholesterol (Sigma, St. Louis, Mo.) byl dvakrát rekrystalizován z horkého ethanolu, natrium-taurocholát (NaTC, Sigma, St. Louis, Mo.) byl dvakrát rekrystalizován z ethanolu a etheru (J.L. Pope, J. Lipid Res. 8, (1967) 146 až 147), lecithin z vaječného žloutku (EYL) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al.) byl užit bez dalšího přečištění. Všechny v této studii používané lipidy byly podle TLC standardů čisté. Syntetický konjugát žlučové kyseliny použitý v příkladech 12 až 14 byla palmitoylamino-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina (PalC) (Vyrobená jak je popsáno v příkladu 4).

1. Příprava žlučí

A. Modelová žluč

Směsi EYL, cholesterolu a NaTC byly rozpuštěny v CHCl₃/CH₃OH (2 : 1, V/V), vysušeny pod dusíkem za laboratorní teploty, lyofilizovány přes noc a udržovány do použití při -20 °C pod argonem. Modelové roztoky žluči byly připraveny suspendováním vysušených lipidů ve 150mM NaCl, 1,5mM Na₂EDTA, 50mM Tris-HCl o pH 8,0 a inkubací suspenze 1 hodinu při 55 °C. Solubilizované modelové žluči byly po dobu trvání pokusu inkubovány v zatavených lahvičkách pod argonem při 37 °C. Alikvotní části z těchto modelových vzorků byly kontrolovány denně.

Všechny modelové vzorky byly připraveny třikrát a byly udržovány při stejných podmínkách během celé experimentální doby.

Složení modelové žluči bylo následující.

15mM cholesterol, 30mM EYL, 150mM NaTC

Pro přípravu kontrolního roztoku bylo použito 100 % EYL. Ostatní zkoumané modelové žlučové roztoky byly připraveny přidáním nebo náhradou (10 až 20 %) EYL nebo NaTC syntetickým konjugátem žlučové kyseliny (PalC).

B. Přirozená lidská žluč ze žlučníku

Přirozená lidská žluč ze žlučníku byla získána od pacientů s cholesterolovými žlučovými kameny chirurgickým odnětím žlučníku. Aby se urychlila krystalizace, byla žluč sebraná od několika pacientů před použitím v experimentech obohacena cholesterolem inkubací s vysušeným cholesterolem nebo smícháním s koncentrovanou modelovou žlučí.

2. Vyhodnocení tvorby a růstu cholesterolového krystalu

2.1 Test na zaznamenání krystalizační doby (COT)

COT (také zvaná doba tvoření krystalizačních zárodků) byla určena podle Holan et al, v *Gastroenterology* 77, (1979) 611 až 617. Alikvotní části každé modelové žluči byly kontrolovány denně mikroskopií v polarizovaném světle. COT byla definována jako počáteční doba detekce alespoň tří krystalů monohydrátu cholesterolu na pole mikroskopu při 100násobném zvětšení.

2.2 Zkouška rychlosti růstu krystalu (CGR)

Růst krystalu byl sledován spektrofotometricky pomocí čtečky pro mikromističky (SPECTRA-STL, Rakousko) (G.J. Somjen et al, *J. Lipid Res.* 38, (1977) 1048 až 1052). Alikvotní části (50 μ l) roztoků lipidů byly v mikromističkových otvorech intenzivně míchány a protřepávány s ekvivalentními objemy natrium-taurodeoxycholátu (200mM). Po 60 minutách při laboratorní teplotě byly mikromističky opět protřepány a při 405 nm byla změřena absorbance v každém otvoru. Každý modelový vzorek byl připraven třikrát a pro měření byl vzorkován duplicitně.

Data byla shromážděna a analyzována pomocí IBM kompatibilního osobního počítače a byla vypočtena optická hustota (OD) zprůměrovaná ze tří příprav. Pro každý roztok byl vynesena graf popisující průměrné změny OD.

Směrnice v nejstrmější oblasti křivky byla určena pomocí lineární regrese z alespoň tří měření a byla označena jako CGR. Pro každý modelový vzorek byly vypočteny rozdíly v CGR a OD mezi dnem 0 a dnem 14.

2.3 Měření hmotnosti krystalu

V posledním dnu experimentu (den 14) byly v každém vzorku provedeny chemické analýzy na cholesterol, jak bylo popsáno v předchozím textu (G.J. Somjen, viz výše). Vzorky z mikrootvorů byly shromážděny, centrifugovány 5 minut přístrojem Airfuge (Beckman) při 70 000 otáčkách za minutu. Oddělená stanovení byla provedena s celkovým vzorkem (před centrifugací), stejně jako s roztokem supernatantu. Množství cholesterolu v usazených peletkách bylo vypočteno odečtením množství v roztocích supernatantu od množství celkového. Krystalický charakter peletek byl potvrzen mikroskopií v polarizovaném světle. Hmotnost krystalu byla také měřena spektrofotometricky jako rozdíl v OD mezi inkubačním dnem 0 a dnem 14.

3. Analýza dat

Všechny lipidové disperze byly připraveny třikrát a ode všech vzorků byly měřeny duplicitně alikvotní části. Byly vypočteny střední hodnoty OD a standardní chyby. Rychlosti růstu krystalů byly vypočteny z lineární regresní analýzy křivek růstu krystalů, jak bylo vysvětleno výše. Srovnání mezi různými modelovými roztoky bylo provedeno jednofaktorovou analýzou rozptylu.

Příklad 12

Vlivy konjugátu žlučové soli a mastné kyseliny, připraveného v příkladu 4 (PalC, dále zvaného testovací sloučenina), na kinetiku krystalizace cholesterolu v modelových a lidských žlučích.

Byly provedeny experimenty s nahrazováním a přidáváním. Byly získány následující výsledky.

A. Modelová žluč

a) V modelovém žlučovém roztoku (složení - 150mM natrium-taurocholát, 15mM cholesterol, 30mM vaječný lecithin, celkem lipidů 10,3 g/dl), když bylo 20 % natrium-taurocholátu nahrazeno testovací sloučeninou (PalC), doba vytvoření krystalizačních zárodků se prodloužila o 167 %, rychlost růstu cholesterolového krystalu byla snížena o 67 % a celková hmotnost krystalu cholesterolu po 14 dnech inkubace byla snížena o 53 %.

b) Když byla testovací sloučenina přidána k celému modelovému žlučovému roztoku (v koncentraci 20 % ze žlučových solí), byly účinky následující.

Doba vytvoření krystalizačních zárodků se prodloužila o 200 %, rychlost růstu cholesterolového krystalu byla snížena o 59 % a celková hmotnost krystalu cholesterolu po 14 dnech inkubace byla snížena o 51 %.

B. Přirozená lidská žluč

Když byla testovací sloučenina (v 10mM koncentraci) inkubována se sebranou přirozenou lidskou žlučí ze žlučníku pacientů s cholesterolovými žlučovými kameny, byly výsledky následující.

V přirozené lidské žluči, ze které byly předběžnou centrifugací po 2 hodiny odstraněny cholesterolové krystaly, byly nové cholesterolové krystaly pozorovány od inkubačního (při 37 °C) dne 2. Počty krystalů se progresívně zvýšily a dosáhly maxima více než 150 krystalů na mikroskopické pole ve dni

14. V téže žluči inkubované s 10mM testovací sloučeninou nebyly zaznamenány žádné cholesterolové krystaly po celou inkubační periodu 21 dnů.

Příklad 13

Studie tvorby krystalizačních zárodků cholesterolových krystalů v modelových žlučích byly provedeny následujícím způsobem.

K modelové žluči byl přidán PalC v následujících poměrech (molární %)

Nahrazením NaTC z 10 %, z 20 % (B, C),

nahrazením PC z 20 % (D) a

přidáním 10 %, 20 % z celkového NaTC (E, F)

Výsledky experimentů z příkladů 12 a 13 jsou následujícím způsobem shromážděny v doprovodných obrázcích 1 až 3 (ve všech obrázcích 1 až 3 představuje A kontrolní modelovou žluč bez PalC).

Obr. 1 popisuje dobu do zaznamenání krystalu = dobu tvorby krystalizačních zárodků. Výsledky jsou uvedeny jako průměry ze tří stanovení. Doba do zaznamenání krystalu se prodloužila o 167 % v případě C a o 200 % v případě F.

Obr. 2 popisuje hmotnost krystalu cholesterolu. Hmotnost krystalu cholesterolu ve dni 14 byla snížena o 17 % v případě B a o 53 % v případě C. V případě F byla snížena o 51 %.

Obr. 3 popisuje rychlost růstu krystalu. Rychlost růstu krystalu byla snížena o 70 % v případě B a o 59 % v případě F.

Tato experimentální data potvrdila, že konjugáty žlučových solí a mastných kyselin zabraňují nebo zpomalují krystalizaci cholesterolu v modelových a lidských žlučích.

Příklad 14

A. Zvířata

Samci křečků 6 až 7 týdnů staří, vážící 79 až 83 g, byli drženi v zařízení pro zvířata s libovolným přístupem k vodě a žrádlu.

Testovacím křečkům bylo *per os* podáváno speciální injekční stříkačkou 10 až 15 mg/zvíře/den PalC rozpuštěného v 1 ml fyziologického roztoku. Kontrolním zvířatům byl podáván ekvivalentní objem samotného fyziologického roztoku. Obě skupiny se chovaly normálně po celou dobu tohoto nakládání s nimi. Druhý den, po 4 hodinách od aplikace PalC ve fyziologickém roztoku do jednotlivých zvířat, byla zvířata usmrcena předávkováním chloroformovými parami. Břišní dutiny byly otevřeny, žlučovody byly podvázány, žlučníky vyříznuty a dvakrát promyty ve fyziologickém roztoku. Poté byly umístěny na vršek kónických plastových zkumavek a rozříznuty. Žluč se shromáždila na dně zkumavek.

Byly zkoumány 2 série živočichů.

I. 5 kontrolních a 5 testovacích zvířat, každé dostávající 10 mg PalC/den,

II. 3 kontrolní a 9 testovacích zvířat, každé dostávající 15 mg PalC/den.

B. Biochemické postupy

Žlučové vzorky byly 5 minut centrifugovány (centrifuga Eppendorf) při 2000 otáčkách za minutu. Mrtvá tkáň byla odstraněna a supernatant byl extrahován podle postupu Folch (chloroform : methanol, 2 : 1). Po rozdělení s vodou byla fáze lipidů analyzována tenkovrstvou chromatografií na silikagelových (60) tenkých vrstvách (Merck). Elučním činidlem byla směs dichlormethan : methanol : octová kyselina (100 : 5 : 1, V/V/V). Vzorky byly porovnány se správným standardem, referenční čelo (R_f) 0,2 po vyvinutí s parami I_2 .

C. Výsledky

V sériích I bylo získáno 140 μ l kontrolní a 100 μ l testové žluči. V sériích II bylo získáno 95 μ l kontrolní a 240 μ l testové žluči. Kontrolní žluči a testové žluči každé série byly každá zvlášť sebrány dohromady. Analýza TLC (zobrazená na obr. 4) extrahovaných lipidů ukázala přítomnost PalC ve žluči testovacích zvířat. To dokazuje, že spolknutý PalC je absorbován a vylučován do žluči.

Obr. 4 popisuje TLC porovnání experimentů provedených v příkladu 14.

A. popisuje standardy PalC

v čistém roztoku (vlevo) a ve žluči (vpravo),

B. popisuje žluči křečků

z kontrolních křečků (vlevo) a z křečků krmených PalC' (vpravo). V tomto sloupci je vidět pás PalC.

Obrázky 5A, 5B, obrázky 5C a 5D udávají vzorce sloučenin popsanych v uvedeném pořadí v příkladech 1 až 10.

Příklad 15

Způsoby

Modelový žlučový roztok měl následující složení.

15mM cholesterol, 30mM EYL, 150 mM NaTC. Roztok byl připraven, jak bylo popsáno v příkladu 11. V testových roztocích bylo 20 molárních % NaTC nahrazeno ekvimolárním množstvím každého konkrétního testovaného konjugátu mastná kyselina/žlučová kyselina. Na obrázcích 6 a 7 jsou v uvedeném pořadí uvedeny výsledky získané s konjugáty nasycených mastných kyselin s řetězcem o délce C_{14} , C_{16} , C_{18} a C_{20} , které jsou konjugované s cholovou kyselinou v poloze C3.

Obr. 3 ukazuje vliv těchto konjugátů na hmotnost krystalu cholesterolu po 14 dnech inkubace kontrolních a testových roztoků. Všechny výše uvedené konjugáty ve srovnání s kontrolním roztokem snižovaly konečnou hmotnost krystalu. Konjugát s C_{18} ji snižoval na 14 % kontrolní hmotnosti, konjugát C_{20} ji snižoval na 38 %.

Konjugát s C_{22} , testovaný v jiném experimentu, vykazoval podobnou aktivitu jako konjugát s C_{20} .

Obr. 7 zobrazuje dobu tvorby krystalizačních zárodků (dobu do zaznamenání krystalu) různých testových roztoků ve srovnání s kontrolním roztokem. Výsledkem náhrady 20 % žlučové soli (NaTC) konkrétními konjugáty bylo prodloužení doby tvorby krystalizačních zárodků s konjugáty s C_{16} , C_{18} a C_{20} . Konjugát s C_{14} neprodloužil dobu tvorby krystalizačních zárodků. Konjugát s C_{20} prodloužil dobu tvorby krystalizačních zárodků o více než 360 %.

Příklad 16

Při operacích získaná žluč z lidského žlučníku byla sebrána dohromady a byla obohacena koncentrovaným roztokem lipidu, aby se podpořila krystalizace cholesterolu. Konečná koncentrace přidaných lipidů ve žluči byla 60mM NaTC, 18,4mM EYL a 9,2mM cholesterol. Obohacená žluč byla ultracentrifugována 1 hodinu při 50 000 otáčkách za minutu, aby se odstranily cholesterolové krystaly a poté byla rozdělena do pěti lékovek. Prvá lékovka obsahovala pouze obohacenou žluč (kontrolní vzorek). K ostatním 4 lékovkám byly přidány následující roztoky (v 5mM koncentraci) - cholová kyselina, C_{16} (palmitoyl)-cholát, C_{18} (stearoyl)-cholát a C_{20} (arachidoyl)-cholát. Po 22 dnech inkubace při 37 °C byly všechny žluči centrifugovány vzduchovou odstředivkou 5 minut při 70 000 otáčkách za minutu. Sediment byl odebrán a chemicky byl změřen jeho

obsah cholesterolu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 8 jako μ moly cholesterolu v sedimentované hmotnosti krystalu. Je zřejmé, že všechny tři konjugáty žlučová sůl/mastná kyselina velmi výrazně snížily krystalizaci cholesterolu ve srovnání s kontrolní žlučí s nebo bez cholové kyseliny.

Příklad 17

Podle popsaného způsobu příkladu 11 byl se stejným lipidovým složením připraven modelový roztok žluči, který sloužil jako kontrolní vzorek. Ve všech dalších vzorcích bylo 20 molárních % NaTC nahrazeno ekvimolárními množstvími cholové kyseliny, C_6 - cholátu, C_{12} - cholátu, C_{18} - cholátu, C_{20} - cholátu (všechny tyto nasycené mastné kyseliny byly konjugovány v poloze C3 skeletu cholátu) a distearoylursodeoxycholátu (s radikály stearové kyseliny konjugovanými ve stejných podílech v polohách C3 a C7 skeletu žlučové kyseliny).

Všechny vzorky byly inkubovány při 37 °C stejným způsobem, jak je popsáno v příkladu 11 a doba tvorby krystalizačních zárodků byla určena periodickými mikroskopickými pozorováními na světle. Výsledky jsou uvedeny na obr. 9. Výsledky prokázaly, že 1) všechny testované konjugáty (BAFAC) zpomalovaly krystalizaci cholesterolu ve srovnání s kontrolní modelovou žlučí a ekvimolárními množstvími cholové kyseliny, 2) BAFAC s delšími řetězci mastné kyseliny byly účinnější, než ty s kratšími řetězci, 3) konjugát s 2 mastnými kyselinami (distearoylursodeoxycholát) byl obzvláště účinný.

Příklad 18

Vstřebávání a transport stearylcholátu (C_{18} -cholátu)

Samicím křečků o hmotnosti 80 až 100 g byla nitrožaludečně podána jednotlivá dávka 30 mg C_{18} -cholátu. Jednotlivá zvířata byla usmrcena po 1, 2 a 3 hodinách po podání. Vzorkovány byly krev ze srdce, vrátnicová krev a žluč ze žlučníku. Paralelně byly studovány dvě skupiny zvířat (A a B). Úrovně stearylcholátu byly měřeny pomocí HPLC přístroje (Kontron, Švýcarsko) s UV detekcí při 206 nm.

Výsledky jsou uvedeny na obr. 10.

Ve skupině A byly hodnoty po 1, 2 a 3 hodinách v srdeční krvi v uvedeném pořadí $99\mu\text{M}$, $7\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, zatímco hodnoty ve vrátnicové krvi byly v uvedeném pořadí $68\mu\text{M}$, $99\mu\text{M}$ a $133\mu\text{M}$. Úrovně C_{18} -cholátu ve žluči žlučníku byly po 2 a 3 hodinách v uvedeném pořadí $540\mu\text{M}$ a $270\mu\text{M}$. Výsledky ve skupině B byly podobné.

Data ukazují, že 1) C_{18} -(stearyl)cholát je absorbován ze střeva, 2) je transportován jak velkým oběhem krevním (prostřednictvím mízy), tak vrátnicovou žílou, 3) je aktivně vylučován do žluči a je v ní koncentrován.

Příklad 19

Stejným způsobem popsaným v příkladu 11 byl připraven modelový žlučový roztok. Měl stejné lipidové složení a sloužil jako kontrolní vzorek.

Do testových roztoků byly přidány v 20mM koncentracích cholová kyselina, stearyl($C_{18} : 0$)-cholát a oleoyl($C_{18} : 1$)-cholát. Všechny vzorky byly 100 hodin inkubovány při 37°C . Rozdíl mezi optickou hustotou mezi 100 hodinami a 0 hodin (jak je popsáno v příkladu 11) byl použit pro měření celkové hmotnosti krystalu po 100 hodinách. Ve srovnání s kontrolním roztokem (100 %), byla hmotnost krystalu s cholovou kyselinou 114 %, se stearyl-cholátem 62 % a s oleoyl-cholátem 55 %.

Tyto výsledky dokazují, že BAFAC jak s nasycenou, tak s nenasycenou (olejovou) kyselinou snižují krystalizaci cholesterolu ve srovnání s kontrolní žlučí a s ekvimolárními množstvími choleové kyseliny.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, vyznačující se tím, že mají obecný vzorec II,
$$W - X - G \quad (II)$$
ve kterém je G radikál žlučové kyseliny nebo žlučové soli, W označuje jeden nebo dva radikály mastné kyseliny a X je buď přímo vazba nebo vazebný člen mezi uvedeným radikálem žlučové kyseliny nebo žlučové soli a mastnou kyselinou (kyselinami).
2. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle nároku 1, vyznačující se tím, že žlučové kyseliny se vyberou z cholové kyseliny, chenodeoxycholové kyseliny, ursodeoxycholové kyseliny, deoxycholové kyseliny a jejich derivátů a jejich analogů.
3. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že žlučová kyselina je konjugována s glycinem, taurinem nebo vhodnou aminokyselinou.
4. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že konjugace s radikálem mastné kyseliny je v poloze 3 skeletu žlučové kyseliny.
5. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že konjugace s radikálem mastné kyseliny je v poloze vybrané z poloh 6, 7, 12 a 24 skeletu žlučové kyseliny.

6. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že konjugace mezi radikálem mastné kyseliny a žlučovou kyselinou má konfiguraci α nebo β .
7. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazebný člen se vybere ze skupin -NH- nebo -O- nebo přímo vazby.
8. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mastné kyseliny jsou nasycené mastné kyseliny s 6 až 26 uhlíkovými atomy.
9. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nasycené mastné kyseliny mají 14 až 22 uhlíkových atomů.
10. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle nároku 8 nebo nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nasycená mastná kyselina se vybere z behenové kyseliny, arachidové kyseliny, stearové kyseliny, palmitové kyseliny a myristové kyseliny.
11. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to 3β -behenoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5-cholan-24-ová kyselina.
12. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to 3β -arachidoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5-cholan-24-ová kyselina.

13. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to 3β -stearoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5-cholan-24-ová kyselina.

14. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to 3β -palmitoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5-cholan-24-ová kyselina.

15. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to 3β -myristoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5-cholan-24-ová kyselina.

16. Konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to N-(karboxymethyl- 3β -stearoylamino- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy-5 β -cholan-24-amid.

17. Konjugáty žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 a 6 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že W označuje dvě mastné kyseliny, které jsou konjugovány v polohách 3 a 7 žlučového skeletu.

18. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že umožňuje rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a zabraňuje jejich vzniku a umožňuje prevenci a/nebo zmírnění arteriosklerózy a obsahuje jako

aktivní složku derivát žlučové kyseliny nebo žlučové soli a mastné kyseliny obecného vzorce II podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17.

19. Farmaceutický přípravek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeho forma se vybere z tablety, kapsle, roztoku a emulze.

20. Farmaceutický přípravek podle z nároku 18 nebo nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje doplňkovou sloučeninu vybranou z nosiče, rozpouštědla, emulgátoru, látky podporující vstřebávání a inhibitoru cholesterolové syntézy nebo jeho vylučování do žluči.

21. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0,1 až 1,5 g aktivní složky:

22. Použití konjugátu žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17 nebo farmaceutického přípravku podle kteréhokoliv z nároků 18 až 21 pro rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a pro prevenci jejich vzniku.

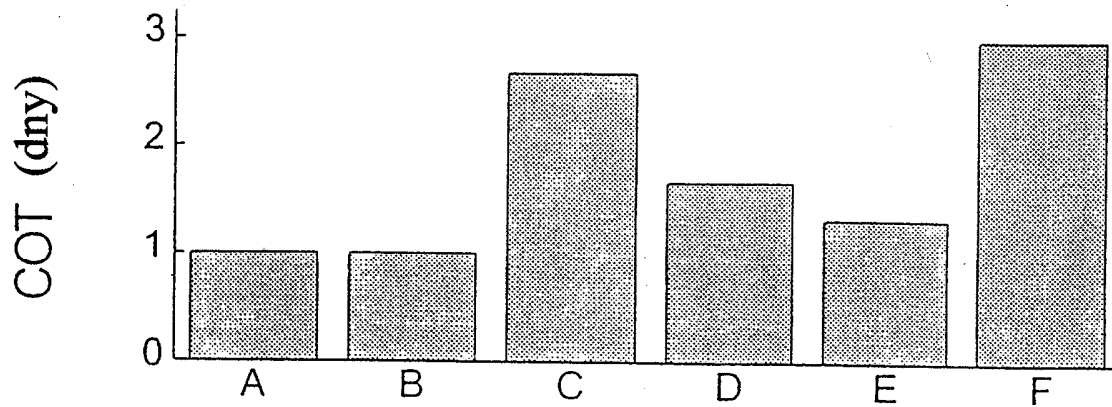
23. Použití konjugátu žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17 nebo farmaceutického přípravku podle kteréhokoliv z nároků 18 až 21 pro prevenci a/nebo zmírnění arteriosklerózy.

24. Způsob rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů ve žluči a prevence jejich tvorby, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává konjugát žlučové kyseliny nebo žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17 nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 18 až 21.

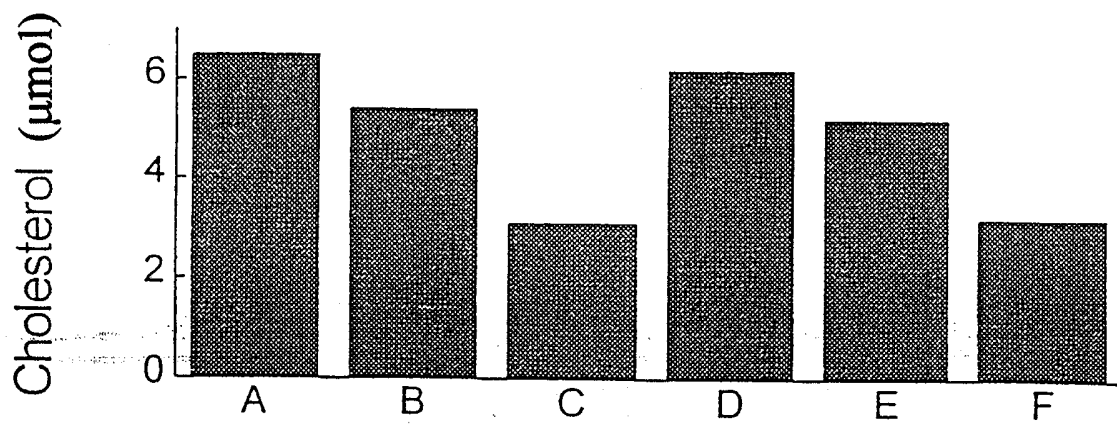
25. Způsob prevence a/nebo zmírnění arteriosklerózy,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává konjugát žlučové kyseliny nebo
žlučové soli s mastnou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17 nebo
farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 18 až 21.

1/10

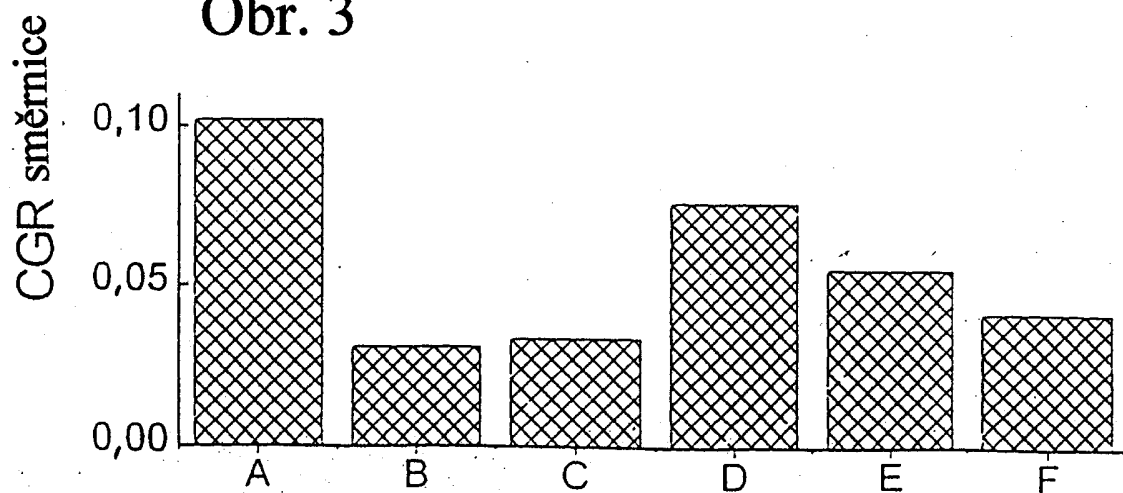
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



vzorek žluči

05.11.00

70 2000-3625

2/10

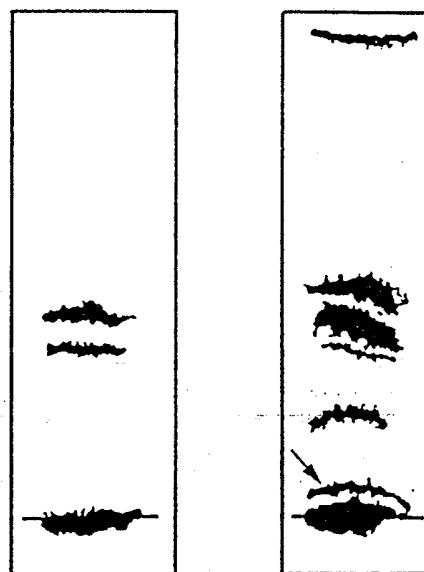
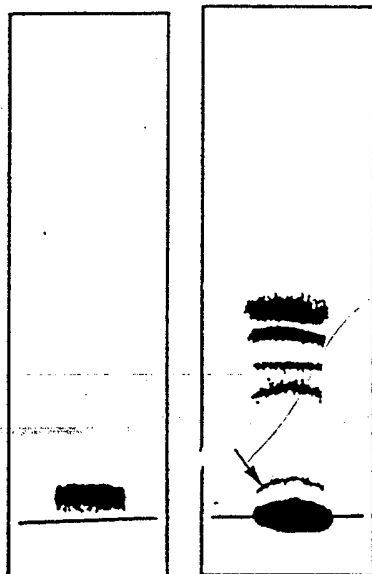
PalC

Žluč křečka

čistý

ve žluči

kontrolní krmeno PalC



Obr. 4A

Obr. 4B

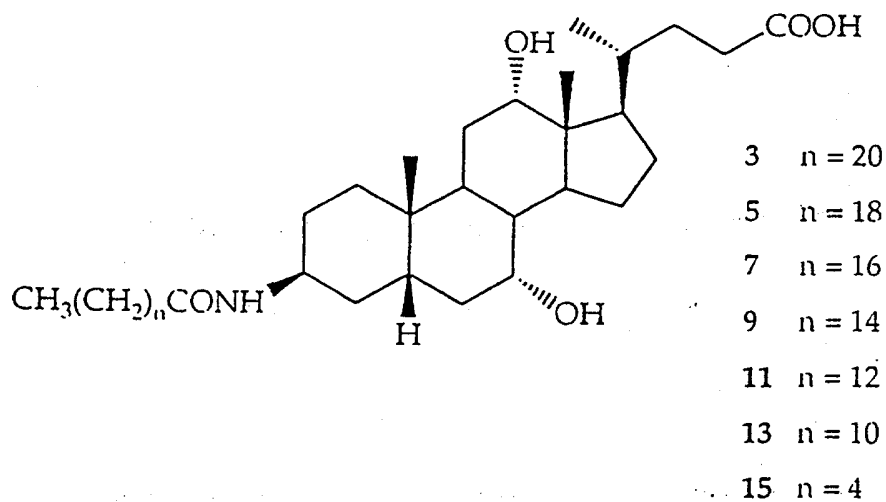
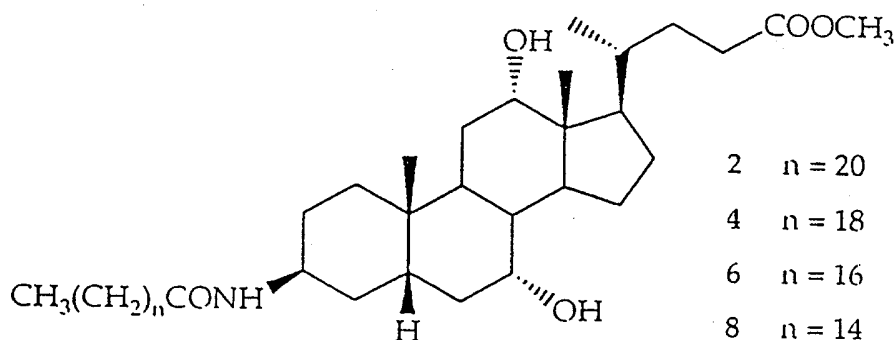
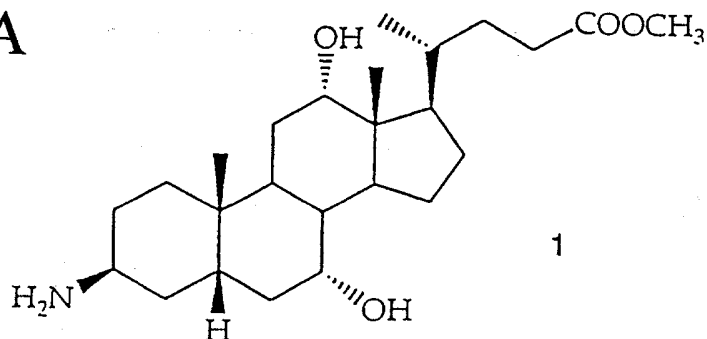
P. M. 2000

05.11.00

7V 2000-3625

3/10

Obr. 5A

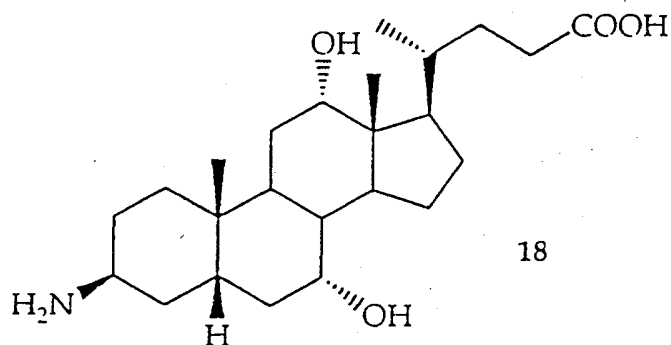
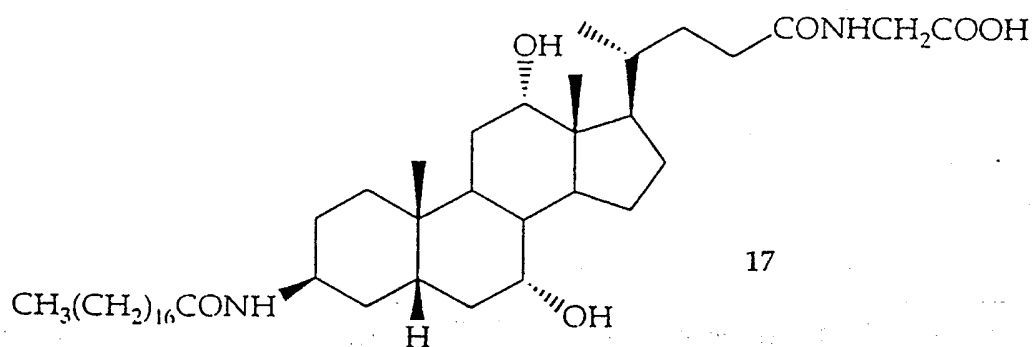
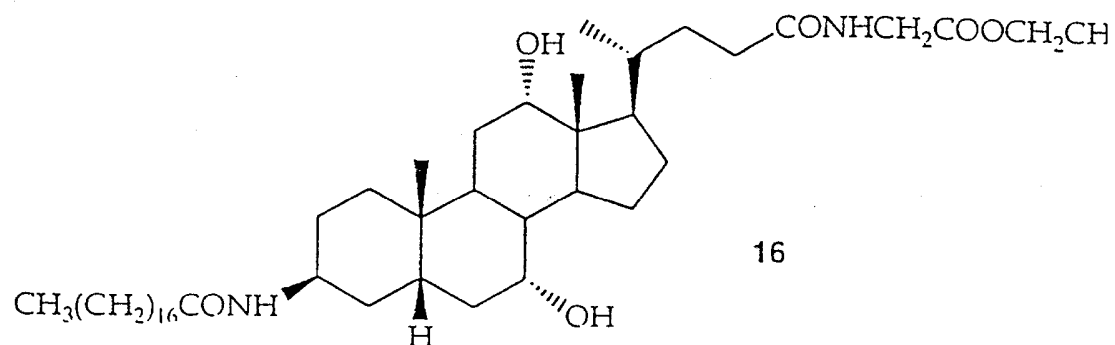
S. M. 2000 *[signature]*

05.11.00

FV 2000-3625

4/10

Obr. 5B



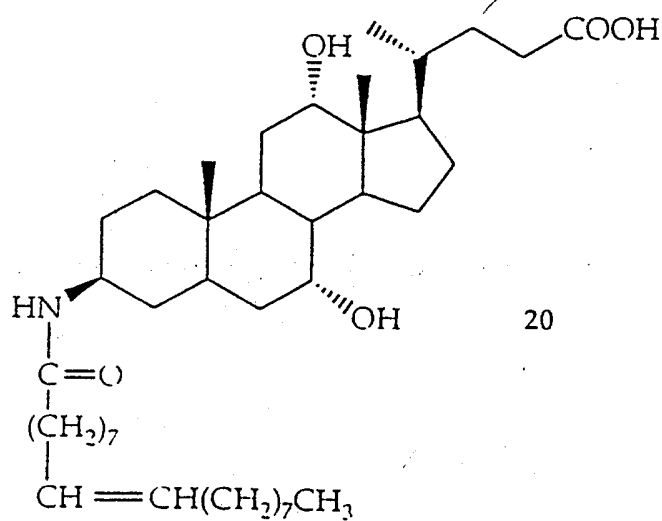
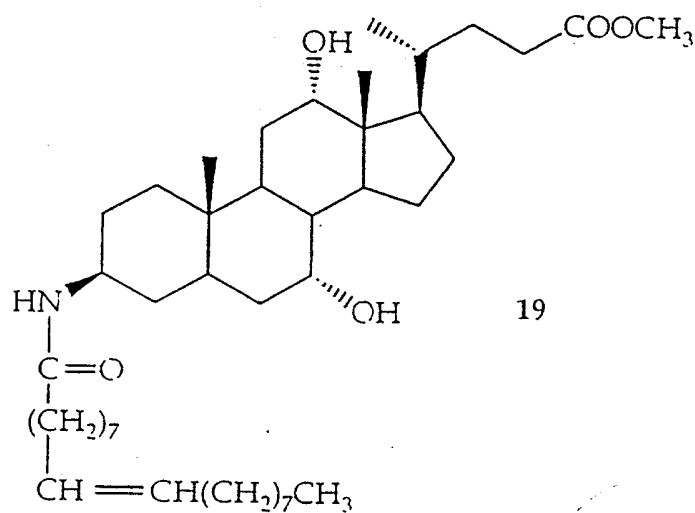
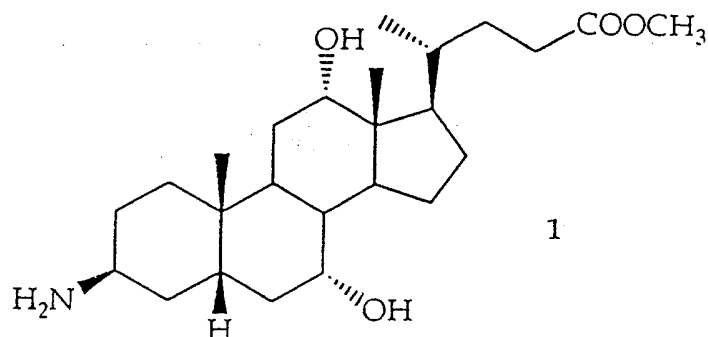
S.M. 2000

05.11.00

7/11 2000 -3625

5/10

Obr. 5C



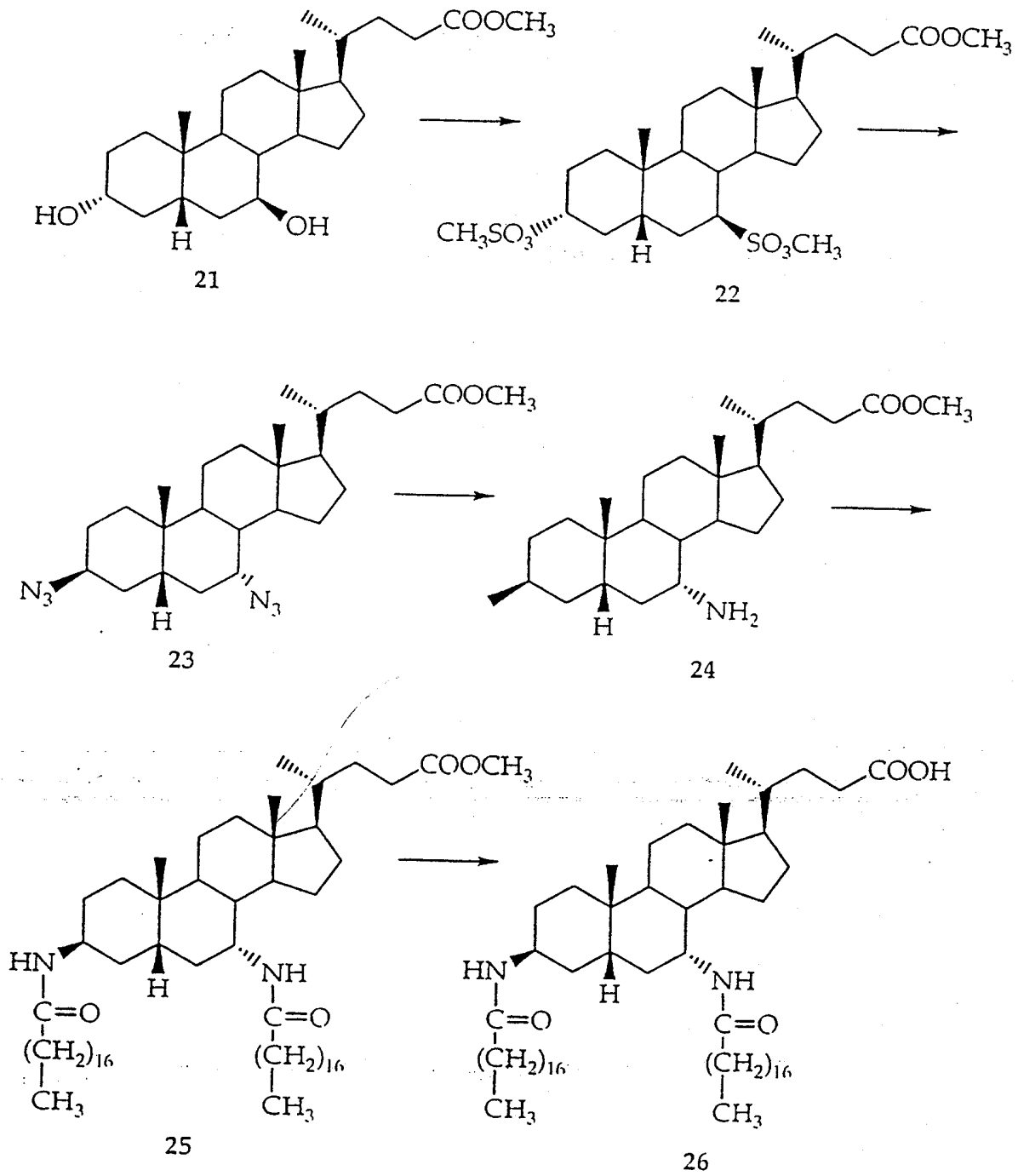
F. 11. 2000

08.11.00

7U 2000-3625

6/10

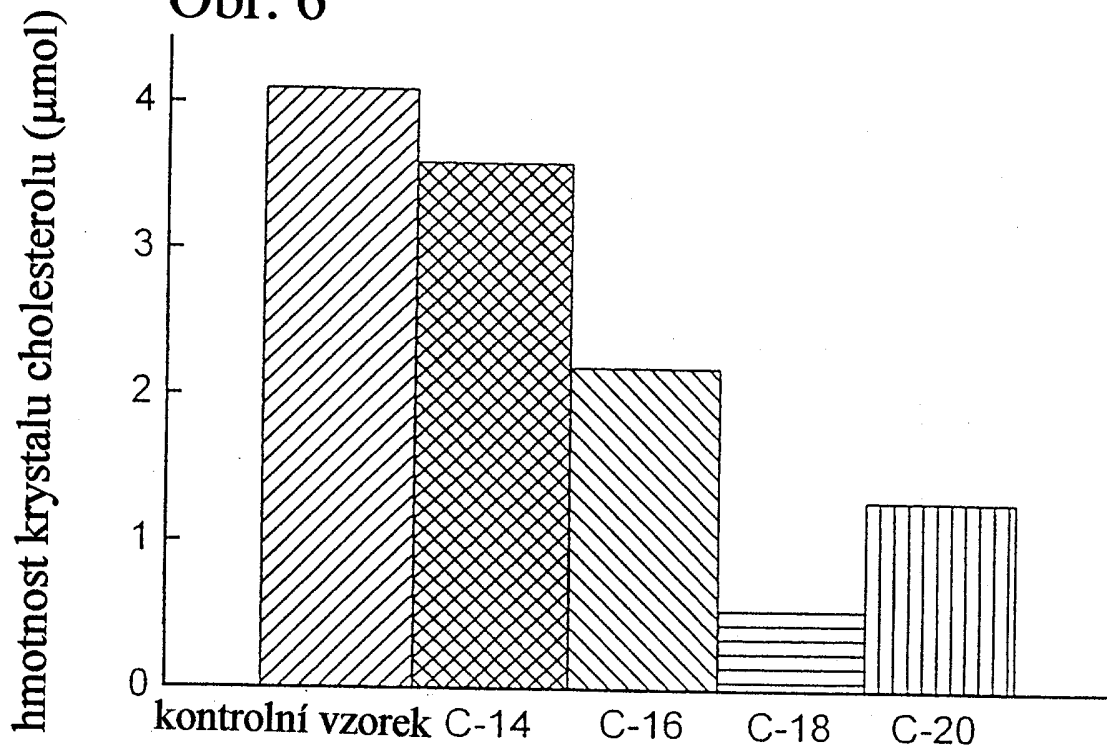
Obr. 5D



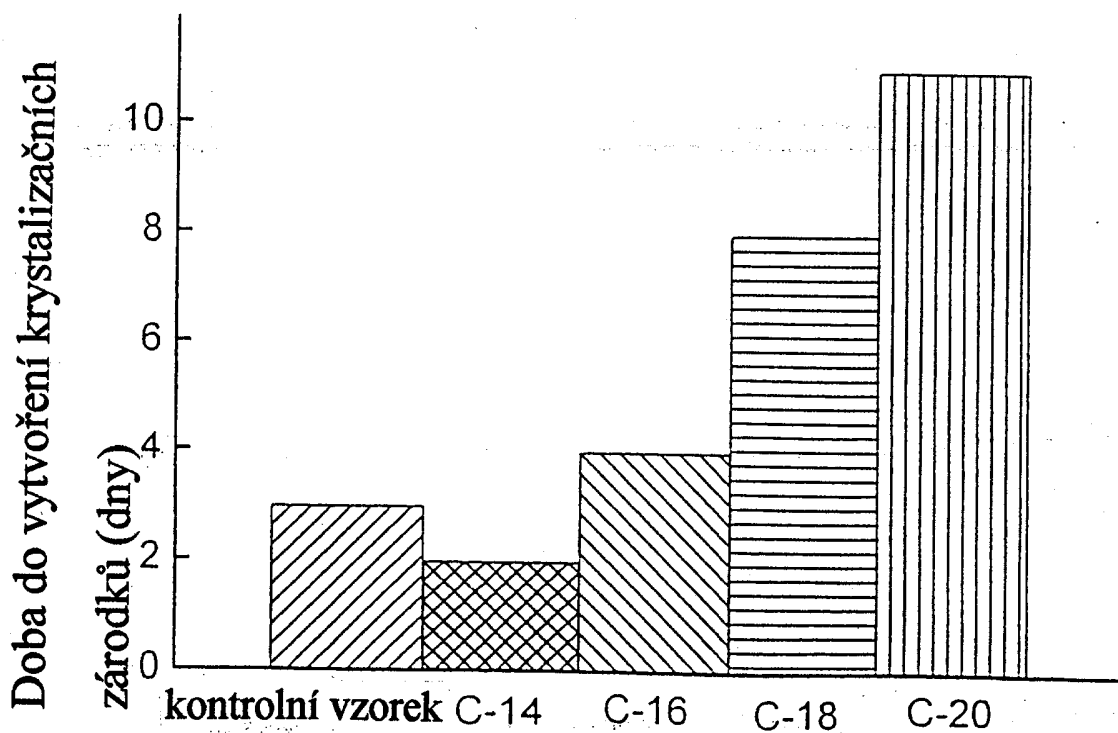
S. M. 2000

7/10

Obr. 6



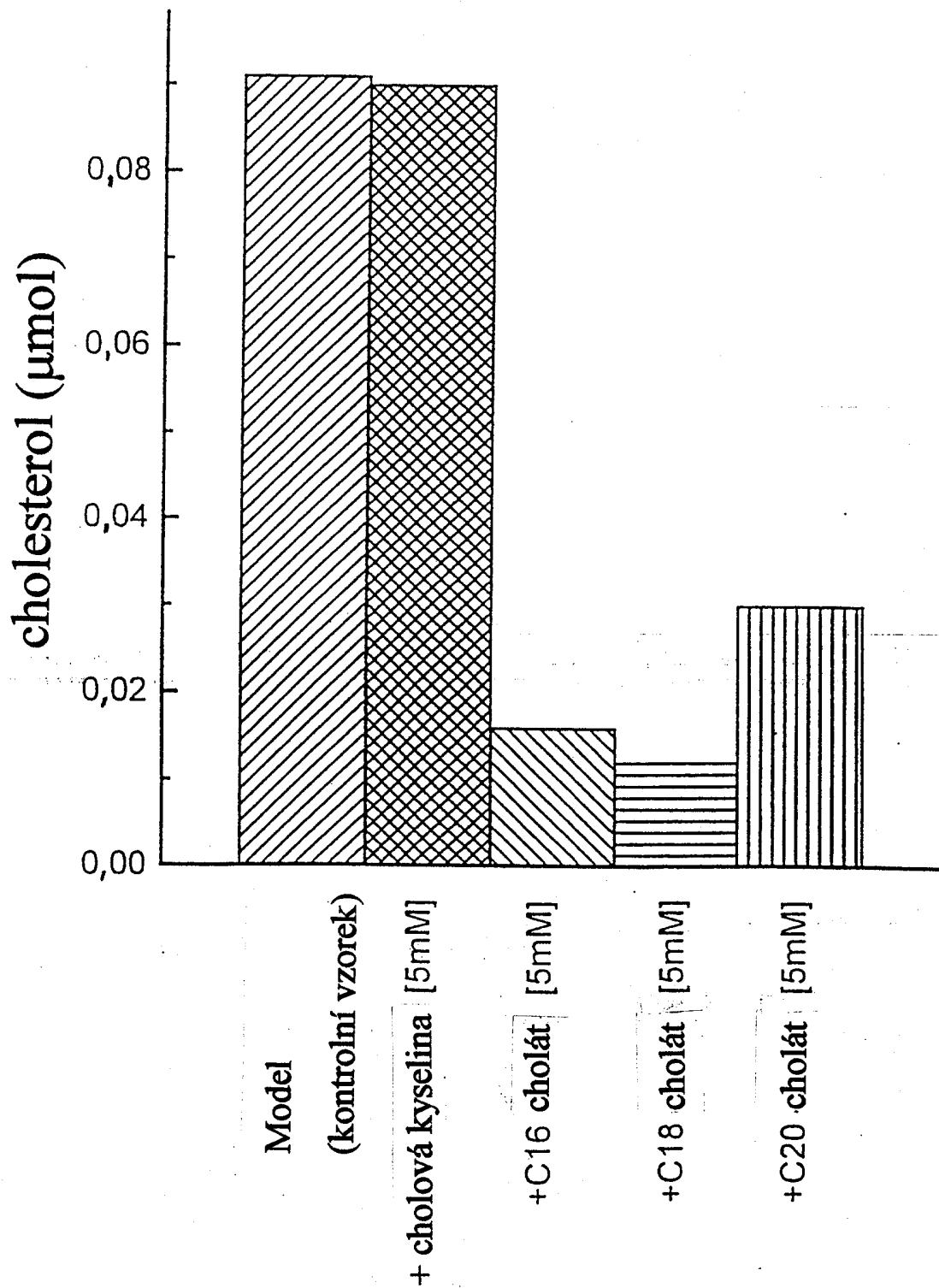
Obr. 7



Délka řetězce konjugovaných mastných kyselin

8/10

Obr. 8

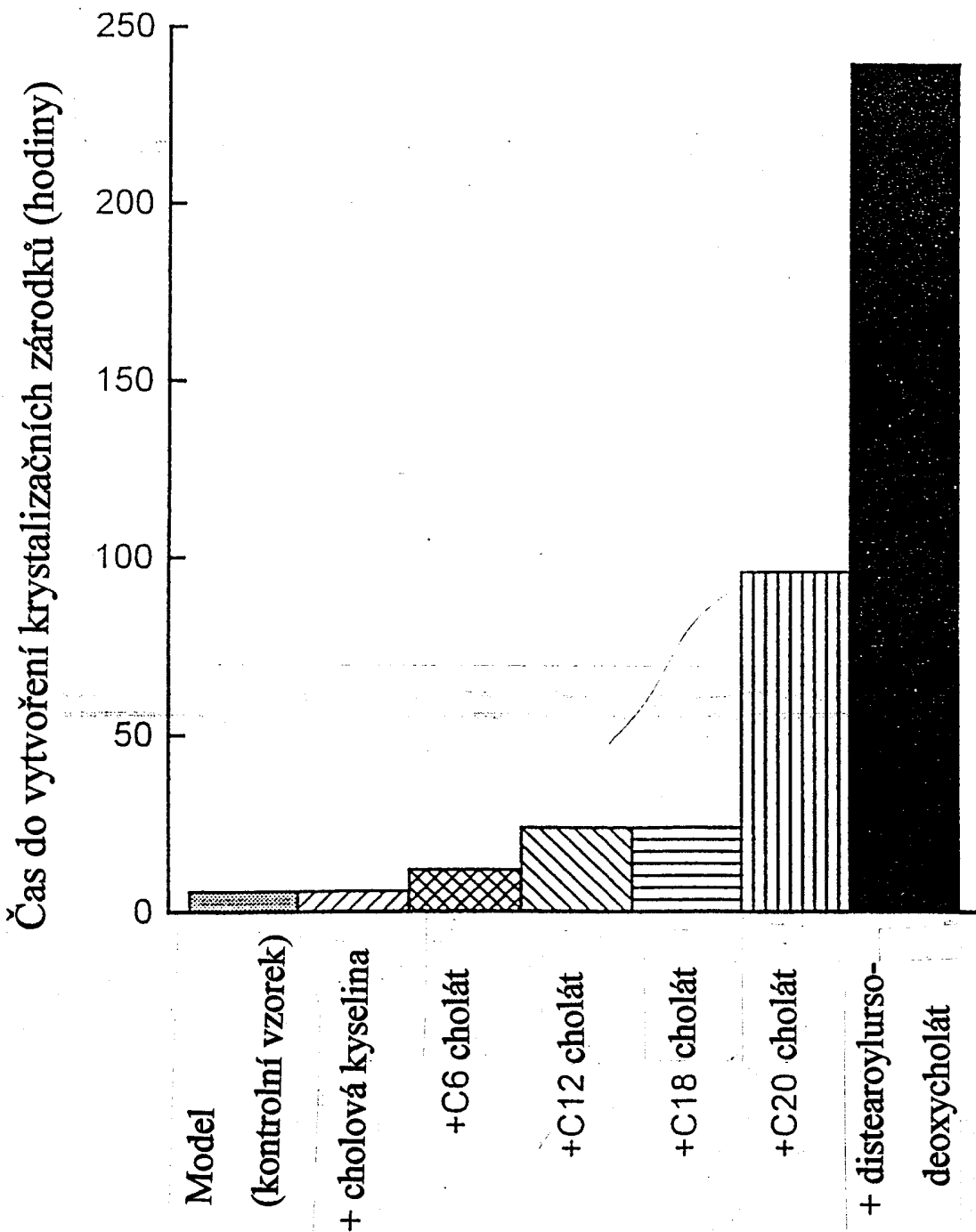


08.11.00

70 2000 - 3625

9/10

Obr. 9



P. M. 2000

05.11.00

70 2000 - 26 25

10/10

