



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 230**

51 Int. Cl.:

C07H 3/04 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

C07H 5/10 (2006.01)

C07H 13/08 (2006.01)

C07J 7/00 (2006.01)

C07J 15/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05017768 .2**

96 Fecha de presentación : **15.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1598054**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Métodos no terapéuticos para suprimir el apetito.**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2011

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

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

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 230 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos no terapéuticos para suprimir el apetito.

5 Esta invención hace referencia a un método no terapéutico de supresión del apetito en seres humanos o animales que comprende administrar una composición que comprende un extracto de una planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*.

10 Esta invención permite de este modo el uso de un extracto vegetal elaborado de plantas del grupo que comprende el género *Trichocaulon* y del género *Hoodia* y que tienen actividad supresora del apetito.

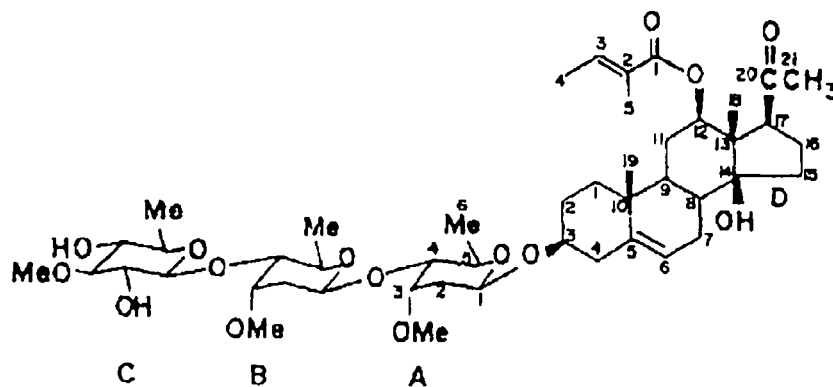
15 El extracto se puede preparar a partir de material vegetal tal como los tallos y las raíces de dichas plantas del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*. El género *Trichocaulon* y el género *Hoodia* incluyen plantas suculentas que crecen en regiones áridas como las que se encuentran en el Sur de África. En una aplicación de la invención el extracto supresor del apetito activo se obtiene a partir de la especie *Trichocaulon piliferum*. También se puede utilizar la especie *Trichocaulon officinale* para proporcionar un extracto supresor del apetito activo. En otra aplicación de la invención, el extracto supresor del apetito activo se puede obtener de la especie *Hoodia currori*, *Hoodia gordonii* o *Hoodia lugardii*. Los bioanálisis realizados por el solicitante en ratas han indicado que ciertos extractos poseen actividad supresora del apetito.

20 El material vegetal puede ser homogeneizado en presencia de un disolvente adecuado, por ejemplo, un disolvente de metanol/cloruro de metileno, por medio de un dispositivo tal como un mezclador Waring. La solución de extracción se puede separar después del material vegetal residual mediante un procedimiento de separación apropiado tal como, por ejemplo, filtración o centrifugación. El disolvente se puede separar por medio de un evaporador rotativo, preferiblemente en un baño de agua a una temperatura de 60°C. El extracto bruto separado se puede extraer adicionalmente con cloruro de metileno y agua antes de ser separado en un extracto en cloruro de metileno y un extracto en agua. Se puede separar el disolvente del extracto de cloruro de metileno mediante evaporación en un evaporador rotativo y el extracto resultante se puede purificar adicionalmente por medio de una extracción con metanol/hexano. El producto de la extracción con metanol/hexano se puede separar después para dar un extracto en metanol y un extracto en hexano. El extracto en metanol se puede evaporar para eliminar el disolvente con el fin de producir un extracto activo parcialmente purificado.

35 El extracto activo parcialmente purificado se puede disolver en metanol, y se puede fraccionar adicionalmente mediante cromatografía en columna, empleando gel de sílice como medio de adsorción y una mezcla de cloroformo/metanol al 30% como eluyente. Se puede obtener una pluralidad de fracciones diferentes, y se puede evaluar cada una, mediante procedimientos de bioanálisis adecuados, para determinar su actividad supresora del apetito.

40 Preferiblemente la fracción que tiene actividad supresora del apetito se puede fraccionar adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice como medio de adsorción y un disolvente de cloroformo:metanol 9:1, y las subfracciones resultantes se pueden bioanalizar para determinar su actividad supresora del apetito. Una subfracción que presenta actividad supresora del apetito puede ser fraccionada y purificada adicionalmente, si se desea, convenientemente utilizando un procedimiento de cromatografía en columna con gel de sílice como medio de adsorción y un disolvente de acetato de etilo:hexano 9:1. Las fracciones purificadas resultantes se pueden evaluar de nuevo por medio de procedimientos de bioanálisis adecuados para determinar su actividad supresora del apetito.

45 El solicitante ha descubierto que al menos una de tales fracciones purificadas tiene una buena actividad supresora del apetito, y el principio activo de la fracción fue identificado mediante técnicas químicas convencionales incluyendo la resonancia magnética nuclear, y se encontró que era un compuesto con la fórmula estructural

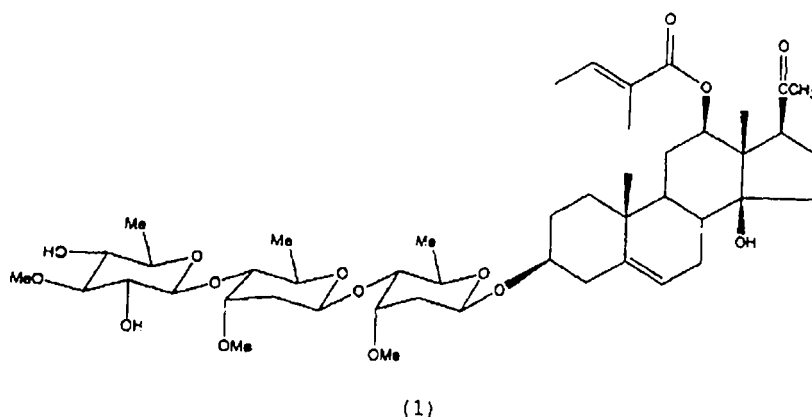


(1)

ES 2 363 230 T3

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

El Compuesto (1) es un compuesto novedoso y este trisacárido esteroideo tiene propiedades supresoras del apetito. La presente invención proporciona de este modo un método no terapéutico de supresión del apetito en un ser humano o un animal, comprendiendo el método administrar a dicho ser humano o animal una composición que comprende un extracto de una planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*, cuyo extracto contiene una cantidad eficaz de un glicósido esteroideo supresor del apetito procedente de dicha planta, donde el glicósido esteroideo tiene la fórmula



Por ejemplo, se puede suprimir el apetito de un ser humano.

El extracto se puede obtener, por ejemplo, mediante un procedimiento que incluye las etapas de tratar el material vegetal con un disolvente para extraer una fracción que tiene actividad supresora del apetito, separar la solución de extracción del resto del material vegetal, separar el disolvente de la solución de extracción y recuperar el extracto.

El extracto se puede obtener, por ejemplo, mediante un procedimiento que incluye las etapas de prensar el material vegetal para separar la savia del material vegetal sólido y recuperar dicha savia libre del material vegetal sólido para formar el extracto.

La planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia* se puede seleccionar, por ejemplo, entre las especies *Trichocaulon piliferum* y *Trihocaulon officinale* y la planta del género *Hoodia* se puede seleccionar, por ejemplo, entre las especies *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*.

La planta se puede seleccionar, por ejemplo, entre *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*. Por ejemplo, la planta se puede seleccionar, por ejemplo, entre *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*. En un ejemplo, la planta es *Hoodia gordonii*.

El extracto de dicha planta puede ser, por ejemplo, un extracto en el que se han separado esencialmente todas las impurezas no activas.

El procedimiento puede incluir, por ejemplo, la etapa de concentrar el agente activo del material extraído mediante extracción adicional con un disolvente.

El disolvente de la etapa o las etapas de extracción con disolvente del procedimiento puede ser, por ejemplo, uno o más de cloruro de metileno, agua, metanol, hexano, acetato de etilo o sus mezclas.

El procedimiento puede incluir, por ejemplo, la etapa de concentrar el agente activo del material extraído mediante separación cromatográfica. La separación cromatográfica puede emplear, por ejemplo, uno o más de cloroformo, metanol, acetato de etilo, hexano o sus mezclas como eluyente. El procedimiento puede incluir, por ejemplo, llevar a cabo la separación cromatográfica en una columna, recoger el producto eluido de las fracciones procedentes de la columna, evaluar las fracciones para determinar su actividad supresora del apetito, y seleccionar al menos una fracción que contiene el agente supresor del apetito.

En el procedimiento para obtener dicho extracto, el extracto puede ser procesado, por ejemplo, para formar un polvo de flujo libre. Por ejemplo, el extracto se puede secar para eliminar la humedad, p. ej., mediante secado de rocío, liofilización o secado a vacío, para formar un polvo de flujo libre.

ES 2 363 230 T3

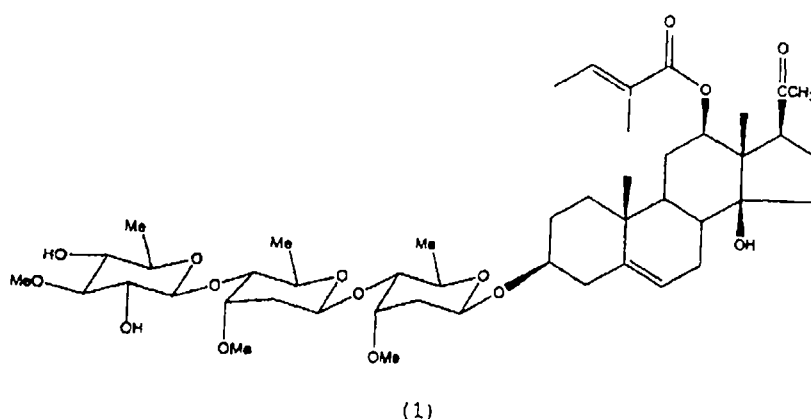
El agente supresor del apetito de fórmula (1) se puede obtener, por ejemplo, en forma de un compuesto aislado (sustancia química natural) a partir de dicha planta, esto es una planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia*, por ejemplo una planta de la especie *Trichocaulon piliferum* o *Trichocaulon officinale* o de la especie *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* o *Hoodia lugardii*.

El compuesto de fórmula (1) se puede aislar y/o purificar, por ejemplo, a partir de dicha planta, por ejemplo una planta de la especie *Trichocaulon piliferum* o *Trichocaulon officinale* o de la especie *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* o *Hoodia lugardii*.

El compuesto de fórmula (1) se puede aislar y/o purificar, por ejemplo, a partir de un extracto derivado de dicha planta, por ejemplo una planta de la especie *Trichocaulon piliferum* o *Trichocaulon officinale* o de la especie *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* o *Hoodia lugardii*.

La composición puede ser, por ejemplo, un comestible o una bebida.

El agente supresor del apetito puede ser por ejemplo una sustancia química natural aislada de fórmula:



La composición o formulación supresora del apetito puede consistir en el agente supresor del apetito mezclado con un excipiente, diluyente o portador farmacéutico. Se pueden añadir otros aditivos adecuados, incluyendo un estabilizador y otros ingredientes semejantes según se desee.

Se hace posible de este modo un método para suprimir el apetito administrando a un ser humano o un animal una dosificación eficaz de una composición como se ha descrito antes.

La invención posibilita de este modo el uso de un extracto obtenido a partir de material vegetal del género *Trichocaulon* o *Hoodia* y que contiene un glicósido esteroideo sustancialmente puro de fórmula (1).

La invención también hace posible el uso de un comestible o una bebida que contienen una cantidad eficaz del glicósido esteroideo de fórmula (1) para que tenga el efecto de suprimir el apetito cuando sean ingeridos.

Los estudios de genética molecular han conducido a un aumento considerable de la comprensión de la regulación del apetito, la saciedad y el peso corporal. Estos estudios han revelado numerosas rutas reguladoras centrales, mediadas por numerosos neuropéptidos. El mantenimiento de un peso corporal normal se logra por medio de un intrincado equilibrio entre la ingesta de energía, el consumo de alimento, y el gasto energético. La homeostasis de la energía está sujeta a una amplia gama de influencias, controladas en último lugar por el cerebro. Las diferentes señales incluyen asuntos como el sentido del olfato y del gusto y las señales gastrointestinales tales como la distensión del tracto gastrointestinal, las señales químicas a la mucosa gástrica y los metabolitos portados por la sangre tales como los ácidos grasos y la glucosa.

Principalmente, el neuropéptido "Y" (NPY) que está regulado negativamente por la leptina, ha sido establecido como uno de los reguladores positivos del comportamiento alimentario. También se ha demostrado que la expresión del antagonista endógeno para los receptores de la melanocortina se encuentra en la base de la obesidad en un modelo concreto (el ratón ob/ob). En efecto la deficiencia en receptor de melanocortina MC4 duplica completamente el síndrome de obesidad. Otros mediadores que se ha demostrado que tienen papeles en el equilibrio energético incluyen la bombesina, la galonina y el péptido 1 de tipo glucagón.

La invención y su eficacia se describirán con más detalle a continuación, en los dibujos.

ES 2 363 230 T3

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo de un método general de extracción de un primer extracto supresor del apetito bruto y un extracto supresor del apetito purificado procedentes de material vegetal del género *Trichocaulon* o *Hoodia*;

5 La Figura 2 muestra una representación gráfica de un bioanálisis llevado a cabo en ratas utilizando un extracto en metanol parcialmente purificado de *Trichocaulon piliferum*.

Las Figuras 3 y 4 muestran una representación esquemática de un procedimiento para producir un extracto de material vegetal del género *Trichocaulon* o *Hoodia*, y

10 Las Figuras 5 y 6 muestran una representación gráfica del porcentaje de cambio de masa corporal de ratas para diferentes grupos -7 a 7 días y 0 a 7 días respectivamente en un estudio de dosis repetidas utilizando un extracto de savia y extracto de savia sometido a secado de rocío de material vegetal de la especie *Hoodia gordonii*.

15 Ejemplo 1

Se ilustra el método general de extracción de un primer extracto supresor del apetito bruto y un extracto supresor del apetito purificado procedentes de material vegetal del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia* por medio del diagrama de flujo de la Figura 1.

Ejemplo 2

25 Los bioanálisis llevados a cabo en ratas utilizando un extracto en metanol parcialmente purificado obtenido de la manera ilustrada en el Ejemplo 1, indicaron que el extracto muestra de hecho actividad supresora del apetito. La actividad supresora del apetito del extracto activo se puede ilustrar por medio de un ejemplo típico del efecto del extracto en metanol de *Trichocaulon piliferum* en ratas, por medio de la representación gráfica de la Figura 2.

30 Resultará evidente a partir de la Figura 2 que el grupo de ensayo de ratas a las que se ha administrado una dosis del extracto el día 5 presentaba una ingesta de alimento sustancialmente disminuida a lo largo de los dos días siguientes, mientras el grupo de control no reveló una reducción comparable de la ingesta de alimento. La ingesta de alimento del grupo de ensayo volvió a la normalidad, y de hecho aumentó, del día 8 en adelante.

Ejemplo 3

40 Se ilustra esquemáticamente un procedimiento para producir un extracto que tiene actividad supresora del apetito por medio del ejemplo de las Figuras 3 y 4, cuyas dos Figuras juntas ilustran el proceso completo. Sin embargo, se pueden utilizar otros procedimientos diferentes, como comprenderán los expertos en la técnica.

45 Referente a la Figura 3, el material vegetal del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia* es introducido en una mezcladora 3, p. ej., una mezcladora Waring, por medio de una línea de alimentación 1, con un disolvente en forma de una solución de cloruro de metileno/metanol introducida por medio de la línea de alimentación 2. El producto homogeneizado se introduce por medio de la línea 4 en una fase de separación 5, p. ej. en forma de un filtro o centrífuga, y el material vegetal residual se separa por medio de la línea 27.

50 La mezcla de disolvente/extracto se introduce por medio de la línea 6 en una fase de evaporación 7, donde el disolvente se elimina, por ejemplo, por medio de un evaporador rotativo. El extracto bruto seco se introduce por medio de la línea 8 en una fase de extracción adicional 9 con la adición de una solución de cloruro de metileno/agua introducida por medio de la línea de alimentación 29 para una extracción adicional, y después en una fase de separación 13 por medio de la línea 11, donde la fracción acuosa se elimina por medio de la línea 31. La fracción con el extracto disuelto se introduce por medio de la línea 15 en una fase de secado 17 donde el disolvente se evapora, por ejemplo, por medio de un evaporador rotativo.

55 Referente a la Figura 4, el extracto seco se introduce por medio de la línea 10 en una fase de extracción 12. También se introduce una solución de metanol/hexano por medio de la línea 14 en una fase de extracción 12 para la purificación y extracción adicionales del extracto seco. La mezcla de extracto/metanol/hexano se introduce por medio de la línea 16 en una fase de separación 18, la fracción de hexano se elimina por medio de la línea 20, y la mezcla de metanol/extracto se introduce después por medio de la línea 22 en una fase de secado 24. En la fase de secado 24, el disolvente se elimina, p. ej. mediante evaporación en un evaporador rotativo.

60 El extracto activo parcialmente purificado, seco se introduce por medio de la línea 26 y con la adición de metanol por medio de la línea 28 en una fase en solución 30, y la fracción disuelta se introduce por medio de la línea 36 en una columna de cromatografía 38.

ES 2 363 230 T3

En la columna 38 la fracción soluble en metanol se fracciona adicionalmente, utilizando gel de sílice y un disolvente de cloroformo/metanol al 30%, en diferentes fracciones indicadas esquemáticamente como fracciones I a V. De acuerdo con el procedimiento de fraccionamiento real llevado a cabo por el Solicitante, el procedimiento de fraccionamiento dio los siguientes pesos de las fracciones: I (3,9 g); II (2,6 g); III (2,1 g); IV (1,1 g) y V (2,0 g). Estas fracciones se evalúan individualmente por medio de un procedimiento de bioanálisis adecuado (en una etapa no mostrada) y aquellas fracciones identificadas como fracciones I y II, que presentan una marcada actividad supresora del apetito, se introducen por medio de las líneas de alimentación 40 y 42 en las columnas 44 y 46, respectivamente, donde se fraccionan adicionalmente y se purifican mediante cromatografía en columna, utilizando de nuevo gel de sílice y un sistema de cloroformo:metanol 9:1.

Las sub-fracciones II (A) - (C) obtenidas de la columna 44 no presentan, cuando se someten a ensayo, una actividad supresora del apetito sobresaliente, y se pueden reciclar para una cromatografía adicional.

Las sub-fracciones I (A) - (L) obtenidas de la columna 46 también se evalúan (por medio de una etapa de análisis no mostrada), y se descubre que la sub-fracción I (C) tiene una marcada actividad supresora del apetito.

La sub-fracción I (C) se introduce por medio de la línea de alimentación 48 en la columna 50 para un fraccionamiento y una purificación adicionales, utilizando gel de sílice y un eluyente de acetato de etilo:hexano 9:1. De las fracciones purificadas resultantes, se descubre que la fracción I (C) (ii), después de analizarla, posee una marcada actividad supresora del apetito.

El producto purificado se identifica mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (como se indica en las Tablas 1 y 2 más abajo), como compuesto (1).

TABLA 1

*Datos de r.m.n. H^1 (300, 13 MHz) para el compuesto (1) $CDCl_3$
Compuesto (1)*

Átomo de Hidrógeno	J(HH)/Hz	$\delta_H/p.p.m.$
Aglicona-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*	7,1, 1,5	6,888
4*	7,1, 1,2	cc 1,806 cd
5*	1,6, 1,2	1,853 cd
Cim-1'	9,4, 2,1	4,816 dd
2' _{aq}	13,8, 3,7, 2,1	2,055 ddd
2' _{ax}	13,8, 9,4, 2,6	1,552 ddd
3'	3,7, 2,9, 2,6	3,776 ddd
4'	9,4, 2,9	3,179 dd

ES 2 363 230 T3

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

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'' ^{aq}	13,8, 9,4, 2,6	1,601 ddd
3'' ^{ax}	3,7, 2,9, 2,6	3,755 ddd
4''	9,4, 2,9	3,239 dd
5''	6,3, 9,4	3,898 dd
6''	6,3	1,243 d ^b
3''-OMe	-	3,392 s ^e
Tev-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} En cada columna pueden ser intercambiables. ^{d, e} En cada columna pueden ser intercambiables. * Hace referencia a los átomos del grupo tigloato		

ES 2 363 230 T3

TABLA 2

Datos del r.m.n. C^{13} Relevante (75,25 MHz) para el Compuesto (1) en $CDCl_3$

Radical Aglicona		Radical Azúcar	
Carbono	$\delta_c/p.p.m.$	Carbono	$\delta_c/p.p.m.$
1	37,04 T	cim-1'	95,84 D
2	29,44 T	2'	35,57 T
3	77,24 D	3'	77,05 D
4	38,62 T	4'	82,57 D
5	138,95 S	5'	68,48 D
6	131,90 D	6'	18,14 C
7	27,30 T	3'-OMe	57,93 C
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 C
14	85,69 S	3''-OMe	57,09 C
15	34,36 T	Tev - 1'''	104,28 D
16	24,31 T	2'''	74,62 D
17	57,18 D	3'''	85,30 D
18	9,85 C	4'''	74,62 D
19	19,27 C	5'''	71,62 D
20	216,85 S	6'''	17,75 C
21	33,01 C	3'''-OMe	60,60 C
1*	167,60 S		
2*	128,69 D		
3*	137,66 D		
4	14,41 C		
5*	12,08 C		
* Hace referencia a los átomos del grupo tigloato			

Compuesto (1)

Datos de IR: 3440 cm^{-1} (OH), 2910 cm^{-1} (CH), 1700 cm^{-1} (C=O) $[\alpha_D]^{120}_{589} = 12,67^\circ$ (C=3, CHCl-3) p.f. 147 - 152°C.

ES 2 363 230 T3

Ejemplo 4

Los resultados de los siguientes tres bioanálisis sobre el supresor del apetito se exponen más abajo, a saber:

- 5 a) Test de Irwin
- b) Test de Toxicidad Aguda; y
- 10 c) Test Anoréxico de Dosis Oral.

Test de Irwin

El propósito de este ensayo fue evaluar el supresor del apetito de la invención producido a partir de un extracto vegetal como se ha descrito antes en la presente memoria, de acuerdo con el test de Irwin en animales reducido para determinar la acción tranquilizante y sedante.

Procedimiento Experimental

El supresor del apetito fue extraído del material vegetal por el Solicitante mediante el método descrito antes en la presente memoria y administrado a dos de los cuatro grupos con cuatro animales cada uno: un grupo que no recibió tratamiento, un grupo que recibió el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), un grupo que recibió la muestra de ensayo a 50 mg/kg, y un grupo que recibió la muestra de ensayo a 300 mg/kg. El tratamiento se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal, y se realizaron observaciones a intervalos específicos hasta cinco horas después del tratamiento. Solamente se utilizaron los síntomas distintos de los observados en los animales tratados con DMSO en la interpretación de los resultados.

Resultados

Estaba claro que el disolvente, DMSO, tenía un marcado efecto sobre los animales, especialmente sobre el mecanismo de regulación térmica. Las temperaturas corporales de todos los animales tratados con el disolvente, solo o junto con la muestra de ensayo, mostraron una fuerte caída.

Los animales del grupo con una dosificación baja mostraron una disminución de la dispersión en la jaula y una disminución de la actividad locomotora, como en todos los demás grupos, incluyendo el grupo de control. Se observó apatía en el mismo grado que en el grupo tratado con DMSO. Se observó una disminución de la respiración de 15 a 60 minutos después del tratamiento. Asimismo se observó ptosis (cierre de los párpados) en un grado mayor que en el grupo con DMSO. Se observó una respuesta en el pabellón auricular (oreja) así como una respuesta positiva en los dedos, indicando medrosidad. La temperatura corporal cayó hasta 32,7°C después del tratamiento.

Los animales del grupo con una dosificación elevada mostraron como los otros grupos una disminución inicial de la dispersión en la jaula y una disminución de la actividad locomotora, pero mostraron un aumento de la dispersión y la actividad locomotora antes de la muerte, que se producía aproximadamente 1 hora después del tratamiento. Se produjeron convulsiones simétricas clónicas graves 30 minutos después del tratamiento. Inicialmente la respiración disminuyó, pero aumentó antes de la muerte. La respuesta del pabellón auricular (oreja) se retrasó y se observó una respuesta positiva de los dedos, indicando medrosidad, ambas como las observadas en los animales del grupo con una dosis baja. La temperatura corporal cayó hasta 30,7°C después del tratamiento. Se observó un aumento de la pasividad posicional así como un descenso del tono del organismo. Se observó una rotación anómala de las extremidades, disminuyó la fuerza de agarre, no estuvo presente una respuesta de dolor y se produjo una pérdida del reflejo de enderezamiento.

Discusión

Cuando se compararon con los animales de control y los animales tratados con DMSO, los animales que recibieron la dosis baja (50 mg/kg) mostraron solamente un descenso en la respiración y un incremento en el grado de ptosis. Los animales que recibieron la dosis elevada (300 mg/kg) de la muestra de ensayo reaccionaron muy intensamente mostrando convulsiones y muerte. Todas las demás observaciones realizadas en estos animales se pueden atribuir a los animales que están con convulsiones y muriendo. No se observaron signos que hicieran pensar en acciones tranquilizantes y sedantes tales como un marcado descenso de la dispersión en las jaulas, un descenso de la actividad locomotora y apatía en los grupos de ensayo que pudieran ser atribuidos a la muestra de ensayo.

Por lo tanto se puede concluir que la muestra de ensayo es letal para los ratones a 300 mg/kg y tiene efectos de supresión de la respiración sobre los ratones a 50 mg/kg, cuando se administra intraperitonealmente con DMSO como disolvente.

Ensayo de Toxicidad Aguda

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

ES 2 363 230 T3

Procedimiento Experimental

Se purificó un extracto vegetal preparado de acuerdo con la invención como se ha descrito antes, y que tenía acción supresora del apetito y se sometió a prueba una muestra de ensayo a dosis crecientes mediante tratamiento oral en ratones. Se utilizaron dos animales por grupo de dosificación, excepto en el grupo con la dosis más elevada en el que solamente se trató un animal. Los animales se examinaron para verificar su buena salud y sus masas corporales determinadas el día del tratamiento.

Las dosis oscilaron de 100 mg/kg a 3028,5 mg/kg. La dosis se calculó y se mezcló en almidón de patata preparado, de manera que cada animal recibió una dosis total de 0,2 ml. El animal 13 recibió 0,25 ml. El almidón de patata se preparó mezclando 20 g de almidón en un pequeño volumen de agua fría, y añadiéndolo a agua hirviendo, para hacer un volumen de 1 litro. La suspensión se dejó enfriar a la temperatura ambiente antes de administrar la dosis.

Los animales de los grupos 1 y 2 se trataron el mismo día.

Se observaron durante 24 horas y si no había señales de que hubieran desarrollado toxicidad, se trataba el siguiente grupo. Se siguió el mismo enfoque hasta que se hubieron tratado todos los animales. Se siguió este programa para asegurarse de que los animales no eran tratados innecesariamente cuando se había alcanzado una dosis tóxica aguda en el grupo anterior.

Se observaron los animales para determinar los signos clínicos de toxicidad inmediatamente (1-2 horas) después del tratamiento y después de eso diariamente.

Los animales supervivientes se sometieron a eutanasia mediante inyección intraperitoneal de pentobarbitona sódica (disponible en el mercado con el nombre comercial Euthanaze, Centaur®) el día 14 del experimento. Se realizó un examen *post-mortem* en estos animales, así como en el animal que murió durante el experimento. Se recogieron muestras para el estudio histopatológico.

Resultados

Grupo 1 (Grupo de Control)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el período de observación de 14 días. Las ingestas de alimento y agua estuvieron dentro de los parámetros normales. Los cambios en la masa corporal también estuvieron dentro de los parámetros normales. No se registraron cambios histopatológicos en las muestras de hígado.

Grupo 2 (100 mg/kg)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el período de observación. Las ingestas de alimento y agua fueron normales y los cambios en la masa corporal a lo largo del período de observación también fueron normales. No se observó patología macroscópica ni se registraron cambios histopatológicos o morfológicos en las muestras de hígado.

Grupo 3 (200 mg/kg)

Los animales de este grupo no mostraron síntomas clínicos de toxicidad durante el experimento. Las ingestas de alimento y agua fueron normales, así como los cambios en la masa corporal. No se observó patología macroscópica, pero los hígados mostraron cambios histopatológicos en el examen. La tumefacción turbia de los hepatocitos fue leve en el animal 6, pero moderada en el animal 5. Asimismo se produjo degeneración hidrópica moderada en los hepatocitos del animal 5.

Grupo 4 (400 mg/kg)

No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el período de observación, y no se observó patología macroscópica durante el examen *post-mortem*. Se observaron tumefacción turbia moderada y cambios hidróticos leves de los hepatocitos en el estudio histológico.

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

Grupo 5 (800 mg/kg)

Un animal (animal 10) murió tres horas después de la administración de la dosis sin mostrar ningún signo específico. El otro animal (animal 9) sobrevivió a todo el período de observación sin ningún signo de toxicidad. La ingesta de agua del animal superviviente fue normal (42,42 ml), mientras la ingesta de alimento fue elevada (134,2 g). La masa corporal se incrementó en 2,85 g que fue la más alta de todos los animales del experimento.

ES 2 363 230 T3

En el examen *post-mortem* del animal 10, que murió poco después de la administración de la dosis oral, los pulmones estaban congestionados. No hubo ninguna reacción extraña del organismo que pudiera haber indicado inhalación del material de ensayo. No se observó patología macroscópica en el animal 9. El animal 10 presentó una vacuolización citoplásmica leve (degeneración hidrópica), pero en el animal 9 fue moderada. La apariencia citoplásmica glandular del hígado se clasificó como moderada en ambos animales.

Grupo 6 (1.600 mg/kg)

Ninguno de los animales presentó signo clínico alguno de toxicidad a lo largo de la duración del experimento. No se observó patología macroscópica en el examen *post-mortem*, pero se observaron cambios degenerativos moderados en el hígado del animal 11 en el examen histopatológico. El animal 12 mostró una tumefacción turbia moderada y cambios hidróticos leves de los hepatocitos. Las ingestas de alimento y agua fueron normales, como el incremento de la masa corporal a lo largo del período experimental.

Grupo 7 (3.028,5 mg/kg)

Con esta dosificación solamente se trató un animal. Este animal no mostró signos de toxicidad durante el período de observación, y no se observó patología macroscópica. En el examen histopatológico, se observó tumefacción turbia moderada y degeneración hidrópica de los hepatocitos. El animal mostró una pérdida de masa corporal a lo largo del período de observación (-82, g), pero las ingestas de alimento y agua fueron normales.

Discusión

Puesto que se utilizó un número muy pequeño de animales en cada grupo de dosificación, resulta difícil sacar conclusiones. El hecho de que solamente un animal muriera a una tasa de dosis baja, sin mostrar ningún síntoma, podría indicar que la muerte no estuvo relacionada con la muestra de ensayo, sino debida al estrés durante y/o después del tratamiento. Ningún animal murió en los grupos de dosis más altas ni mostró signo alguno de toxicidad, lo que apoya más esta suposición.

El incremento de la ingesta de alimento mostrado en el animal 8 podría atribuirse posiblemente a un derrame excesivo de alimento como reflejó un pequeño incremento en la masa corporal. Se debe tener en cuenta que todos los animales de este experimento fueron tratados solamente una vez, y que es poco probable que un supresor del apetito tenga una influencia marcada sobre las ingestas de alimento o agua, o la masa corporal a lo largo de un período de 14 días, como era el caso de este experimento.

A partir del examen histopatológico de las muestras de hígado, quedó claro que los cambios patológicos estaban relacionados con la dosis, mostrando los animales que recibían dosis superiores los cambios de consideración. La patología observada no era de naturaleza metabólica, pero posiblemente estaba inducida por la muestra de ensayo. Los cambios solamente fueron degenerativos y por lo tanto reversibles. No se observaron signos de cambios hepatocelulares irreversibles.

Por lo tanto, se puede concluir que solamente un animal murió a una dosis inferior (800 mg/kg), pero que posiblemente la muerte no estuvo relacionada con la muestra de ensayo. Ninguno de los otros animales de ninguno de los grupos de dosificación mostró signo alguno de toxicidad durante el período de observación de 14 días después del tratamiento, ni murió como resultado del tratamiento. Una única dosis oral de la muestra de ensayo indujo cambios hepatocelulares reversibles relacionados con la dosis.

c) Ensayo Anoréxico de Dosificación Oral

El propósito de este ensayo fue determinar la actividad de un extracto vegetal preparado de acuerdo con la invención, y la dosis eficaz mínima, y al mismo tiempo investigar cualquier posible efecto secundario tal como la supresión respiratoria, como se encontró en el Test de Irwin (referido más arriba).

Procedimiento Experimental

Los animales se distribuyeron en grupos de tratamiento utilizando tablas de aleatorización. Cada grupo de tratamiento consistió en tres animales, con 6 animales en el grupo de control. Se administraron dosis de la muestra de ensayo a ratas hembra jóvenes con un peso corporal de 100-150 g en la aclimatación, durante tres días consecutivos. Los animales se identificaron por medio de etiquetas metálicas en las orejas y marcas en la piel con KMnO_4 para una fácil identificación. Los animales se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato para roedores convencionales, y estuvieron disponibles *ad libitum* agua y gránulos para roedores comerciales en polvo. Se midieron las ingestas de agua y alimento y se calcularon para cada día. Con el fin de encontrar la dosis eficaz mínima de la muestra de ensayo, se sometieron a ensayo cinco dosis. El tratamiento fue mediante gavage oral, con la muestra de ensayo suspendida en almidón de patata.

La sustancia de ensayo fue el compuesto (1), un polvo granular de color blanco preparado a partir de un extracto de un material vegetal de acuerdo con la invención, y la cantidad medida de la muestra de ensayo se mezcló con almidón de patata preparado y se administró. La mezcla del almidón de patata tuvo lugar inmediatamente antes de la dosificación cada día. Antes de la retirada del volumen de dosificación a cada animal, se mezclaron las suspensiones cuidadosamente utilizando un mezclador de vórtice.

ES 2 363 230 T3

Se sometió a ensayo un intervalo de dosificaciones, recibiendo el grupo de control solamente la sustancia portadora. Las dosis se seleccionaron basándose en los efectos observados en el Ensayo de Irwin descrito más arriba y fueron:

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

Grupo 2: 6,25 mg/kg

Grupo 3: 12,50 mg/kg

Grupo 4: 25,00 mg/kg

Grupo 5: 37,50 mg/kg

Grupo 6: 50,00 mg/kg.

Resultados

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

Se redujeron las ingestas medias de alimento para todos los grupos de tratamiento a lo largo del período de estudio. Los animales de los grupos con una dosificación superior mostraron un incremento en el consumo de agua.

No se vio afectada significativamente la frecuencia respiratoria de ninguno de los animales de ningún grupo de dosificación.

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

Discusión

Los datos recogidos durante el período de aclimatación confirmaron que todos los animales incluidos en este experimento estaban sanos y la ganancia de peso corporal fue comparable entre los animales.

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

Se experimentó una reducción de la ingesta de alimento y una reducción de la ganancia de masa corporal incluso con el grupo al que se había administrado la dosis más baja (6,25 mg/kg).

La pérdida real de masa corporal se experimentó en el grupo de 12,50 mg/kg.

Es importante observar que los grupos de tratamiento tenían todos un incremento en el consumo de agua cuando disminuía el consumo de alimento (Figura 2). Esto podía ser debido a un efecto diurético de la muestra de ensayo, o a una estimulación del centro de la sed en el cerebro.

El hecho de que no se produjera ninguna supresión respiratoria como se había observado en el ensayo de toxicidad aguda referido antes, con la ruta intraperitoneal, se observa como un aspecto positivo. Esto podía estar debido a una reducción de la absorción desde el tracto gastrointestinal, con la consiguiente reducción de la biodisponibilidad. La biodisponibilidad a las dosis orales sometidas a ensayo, no obstante, fue suficiente para que la muestra de ensayo fuera eficaz. La ligera reducción de la frecuencia respiratoria 1 hora después del tratamiento en la mayoría de los grupos podía ser atribuida a la carga del estómago con el volumen de la dosis y la consiguiente pasividad de los animales.

Los hígados friables observados en los grupos de tratamiento podían estar debidos a un cambio en el metabolismo energético derivado de la reducción de la ingesta de alimento, ocasionando un incremento del metabolismo de la grasa y una sobrecarga en el hígado. Si este era en efecto el caso, estos cambios podían ser considerados posiblemente cambios transitorios que se podrían recuperar con el tiempo después de haber alcanzado un estado estacionario, o después de la retirada de la muestra de ensayo. El posible efecto sobre el hígado también necesita una investigación adicional.

Puesto que este estudio fue concebido principalmente como un ensayo de escrutinio, se utilizaron pequeños grupos de animales de ensayo. Esto dificulta la interpretación estadística de los datos, especialmente cuando los animales individuales reaccionaban de manera totalmente diferente. Sin embargo, los datos indican que la muestra de ensayo tenía una acción supresora del apetito, incluso a la dosis más baja sometida a ensayo (6,25 mg/kg). No se produjeron signos clínicos de supresión respiratoria a las dosis sometidas a ensayo.

ES 2 363 230 T3

Ejemplo 5

Se almacenan primero plantas de *Hoodia* cosechadas recibidas o bien de su entorno natural o bien a través de un programa de cultivo a 4°C durante un máximo de 48 horas. Las plantas se lavan en agua corriente y después de eso se trocean en porciones de ± 1 cm. Las porciones troceadas se combinan todas y después se prensan en una prensa hidráulica a una presión de 300 bares durante un mínimo de 0,5 horas por prensado. Durante el prensado se recoge por separado la savia de la planta. La savia se almacena a -18°C hasta que se requiera un tratamiento adicional.

La savia se somete a secado de rocío en condiciones adecuadas para obtener un polvo de flujo libre. El contenido de humedad del polvo es preferiblemente menor del 5% después del secado de rocío y, si es necesario, se seca adicionalmente en un horno de vacío o utilizando una secadora de lecho fluido.

Se ha demostrado que tanto la savia como el material sometido a secado de rocío son eficaces como supresores del apetito en análisis biológicos en ratas.

Procedimiento Experimental

Se lavaron 50 kg de plantas de *Hoodia gordonii* con agua corriente y después de eso se trocearon en porciones de 1 cm. Las plantas troceadas se prensaron después en una prensa hidráulica a 300 bares durante un mínimo de 0,5 horas por lote. Se recogió la savia y se encontró que la masa era de 10 kg cuando se utilizaban plantas de *Hoodia gordonii* del entorno, y de 20 kg cuando se utilizaban plantas de *Hoodia gordonii* del programa de cultivo.

La savia (500 g) se sometió a secado de rocío utilizando las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo: 2,85 ml/min

Temperatura de entrada: 110°C

Temperatura de salida: 70°C

Temperatura de la cámara: 78°C.

El polvo sometido a secado de rocío obtenido era un polvo de flujo libre (22 g) con un contenido de humedad de 6,9%.

El polvo sometido a secado de rocío se analizó para determinar la concentración de ingrediente activo utilizando técnicas de HPLC. Se determinó que la concentración del ingrediente activo era de 13 g/kg de polvo sometido a secado de rocío.

Método de Análisis por HPLC

Eluyente: Acetonitrilo : agua isocrática (7:3)

Columna: Fase Inversa C-18

Absorbancia UV: 225 nm

Velocidad de Flujo: 1 ml/min

Volumen de Inyección: 10 μ l.

Método

Se disolvió el polvo sometido a secado de rocío (10 mg) en agua (0,5 ml) y acetonitrilo (0,5 ml). Se inyectaron 10 μ l de esta solución en la HPLC y se determinó la concentración del compuesto activo (1) utilizando una curva patrón que se había preparado a partir del compuesto puro (1).

Ejemplo 6

Los resultados de un estudio diseñado para evaluar los posibles efectos anoréxicos del compuesto (1) en ratas se presentan más abajo. En lo siguiente, las muestras sometidas a ensayo son savia pura (Muestra 1), savia sometida a secado de rocío (Muestra 2) y radical activo (Muestra 3). Las muestras 1 y 2 son la savia y la savia sometida a secado de rocío respectivamente, como se describe en el Ejemplo 5 anterior, la muestra 3 es un compuesto extraído con disolvente (1) de una pureza de $\geq 95\%$.

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

ES 2 363 230 T3

La muestra 1 (savia pura) administrada oralmente, produjo reducciones dependientes de la dosis en el consumo de alimento que eran estadísticamente significativas a dosis de 1600 mg/kg y superiores cuando se comparaban con los controles tratados con vehículo. También se registraron reducciones concomitantes en el peso corporal (o tasa de crecimiento). El día de la dosificación, se registraron incrementos estadísticamente significativos en el consumo de agua a las 3 horas de la administración de la dosis (6400 y 10000 mg/kg) y a las 6 horas de la administración de la dosis (10000 mg/kg). Entre las 24 y las 48 horas posteriores a la administración de la dosis, se registraron reducciones estadísticamente significativas en el consumo de agua a dosis de 3200 mg/kg y superiores.

La muestra 2 (savia sometida a secado de rocío) administrada oralmente a 76 mg/kg también produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento y el peso corporal cuando se comparó con animales tratados con vehículo. No se registraron efectos estadísticamente significativos sobre el consumo de agua.

La muestra 3 (radical activo) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a una dosificación oral de 5,0 mg/kg. No se produjeron efectos estadísticamente significativos sobre los pesos corporales por el radical activo aunque el examen de los datos reveló una ligera caída del crecimiento cuando se compararon con los animales de control tratados con vehículo. No se registraron efectos estadísticamente significativos sobre el consumo de agua.

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

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

Sustancia de ensayo

Identidad	Muestra 1 (savia pura)	Muestra 2 (savia secada rocío)	Muestra 3 (radical activo)
Apariencia	Líquido pardo	Polvo	Polvo blanco
Condiciones de almacenamiento	-20°C en oscuridad	Temperatura ambiente en oscuridad	4°C en oscuridad
Pureza	Savia pura	Savia secada rocío pura	≥ 95%
Vehículo	Agua destilada	Agua destilada	Dimetilsulfóxido (DMSO)

Procedimiento Experimental

Se utilizaron 55 ratas macho Wistar para el estudio.

Los pesos corporales, el consumo de alimento (peso de la tolva de alimento) y consumo de agua (peso de la botella) se registraron diariamente a la misma hora cada día desde el día de la llegada hasta la terminación del estudio.

El día 1, las ratas recibieron una única dosis oral (gavage) de acuerdo con la siguiente tabla:

Grupo	n	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)
1	5	Vehículo (agua destilada)	-
2	4	Muestra 1 (savia pura)	800
3	5	Muestra 1 (savia pura)	1600
4	5	Muestra 1 (savia pura)	3200
5	5	Muestra 1 (savia pura)	6400
6	5	Muestra 1 (savia pura)	10000
7	5	Muestra 2 savia secada rocío	38
8	5	Muestra 2 savia secada rocío	76

ES 2 363 230 T3

	9	5	Muestra 3 (radical activo)	2,5
	10	5	Muestra 3 (radical activo)	5,0
5	11	3	Fenfluramina	7,5
	12	3	Vehículo (DMSO)	-

10 A los grupos 1 - 8 se les administraron las dosis utilizando un volumen de la dosis constante de 10 ml/kg y a los grupos 9 - 12 se les administraron las dosis a un volumen de 1 ml/kg.

15 El consumo de alimento y agua también se midieron a las 1, 3, y 6 horas de la administración de la dosis el Día 1.

Después de las medidas del Día 8, los animales se sacrificaron mediante asfixia con dióxido de carbono, y se extirparon los hígados y se colocaron en formalina tamponada al 10%, antes de la histología. Se tomaron secciones en cera de parafina de cada hígado de 4 - 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones adicionales se cortaron en un criostato a 12 μm y se tiñeron para determinar la grasa con Oil Red O (ORO).

20 *Análisis de los Datos*

Las medidas del consumo de alimento y agua después de la administración de la dosis y los pesos corporales en cada momento puntal para los animales tratados con P57 se compararon con los del grupo de control tratado con vehículo de un modo similar relevante utilizando el análisis de la varianza seguido del test de Williams para las comparaciones con los controles.

Los datos para los animales tratados con fenfluramina se compararon con los del grupo de control tratado con vehículo utilizando el test de la t de Student.

30 *Resultados*

Los resultados se resumen en las tablas.

35 La Muestra 1 (savia pura) administrada oralmente produjo reducciones relacionadas con la dosis marcadas en el consumo de alimento diariamente. La duración y la amplitud de estas reducciones en el consumo de alimento fueron dependientes de la dosis. A las 24 horas de la administración de la dosis, la Muestra 1 (savia pura) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a dosis de 1600 mg/kg y superiores cuando se comparó con los controles tratados con vehículo. La dosis más alta de la Muestra 1 (savia) (10000 mg/kg) produjo 40 reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento con una pauta diaria hasta 5 días después de la administración de la dosis.

La Muestra 2 (savia sometida a secado de rocío) y la Muestra 3 (radical activo) produjeron reducciones marcadas y estadísticamente significativas en el consumo de alimento a dosis orales de 76 y 5,0 mg/kg respectivamente. En ambos 45 casos los efectos duraron 48 horas después de la administración de la dosis.

El patrón de referencia, la fenfluramina (7,5 mg/kg, p.o.) produjo reducciones estadísticamente significativas en el consumo de alimento a las 6 y 24 horas de la administración de la dosis cuando se comparó con el grupo de control tratado con vehículo relevante (Grupo 12).

50 La Muestra 2 (savia sometida a secado de rocío) y la Muestra 3 (radical activo) no produjeron efectos relacionados con la dosis, marcados sobre el consumo de agua. El día de la administración de la dosis, la savia pura produjo incrementos estadísticamente significativos en el consumo de agua a las 3 horas de la administración de la dosis (6400 y 10000 mg/kg) y 6 horas después de la administración de la dosis (10000 mg/kg). Dos días después de la 55 administración de la dosis no obstante, se registraron descensos estadísticamente significativos en el consumo de agua en los animales que recibieron la Muestra 1 (savia) a 3200, 6400 y 10000 mg/kg. Estas reducciones no obstante, no estaban claramente relacionadas con la dosis y solamente se produjeron entre 1 y 2 días después de la administración de la dosis. La trascendencia biológica de estos efectos por lo tanto sigue sin estar clara.

60 La Muestra 1 (savia pura) produjo efectos estadísticamente significativos, relacionados con la dosis sobre los pesos corporales cuando se comparó con el grupo de control tratado con vehículo (Grupo 1). Cuando se administró oralmente a dosis de 3200 mg/kg y superiores, la Muestra 1 (savia pura) produjo reducciones estadísticamente significativas en el peso corporal o disminuyó las tasas de crecimiento cuando se comparó con los animales tratados con vehículo. Estos efectos fueron estadísticamente significativos desde 48 horas después de la administración de la dosis hasta el final del 65 estudio.

La Muestra 2 (savia sometida a secado de rocío) administrada oralmente a 76 mg/kg también produjo reducciones estadísticamente significativas en el crecimiento de los animales cuando se comparó con el grupo de control tratado

ES 2 363 230 T3

con vehículo (Grupo 1). Estos efectos fueron estadísticamente significativos entre los Días 3 (a las 48 horas de la administración de la dosis) y 5, inclusive.

5 Aunque la Muestra 3 (radical activo) parecía retrasar el crecimiento de los animales a la dosis más elevada (5,0 mg/kg) cuando se comparaba con el grupo de control tratado con vehículo relevante (Grupo 12), este efecto no era estadísticamente significativo.

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

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

TABLA 1a

*Efectos de la administración oral sobre el consumo de alimento en ratas
(datos pre-dosificación diaria)*

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de alimento del grupo (g ± dt) entre los Días				
			-6 --5	-5 --4	-4 --3	-3 --2	-2 --1
1	Vehículo (agua)	-	27,8 ± 1,54	24,2 ± 1,83	27,6 ± 3,67	28,3 ± 3,50	29,4 ± 2,66
2	Muestra 1 savia	800	28,3 ± 1,43	24,9 ± 0,82	27,7 ± 0,76	28,4 ± 1,51	30,1 ± 0,27
3	Muestra 1 savia	1600	29,0 ± 1,39	25,0 ± 2,16	27,4 ± 1,96	28,8 ± 0,61	29,5 ± 1,55
4	Muestra 1 savia	3200	27,2 ± 2,33	25,1 ± 2,46	26,0 ± 2,52	28,5 ± 2,29	27,6 ± 1,15
5	Muestra 1 savia	6400	28,7 ± 1,64	25,3 ± 1,73	27,3 ± 1,45	29,2 ± 1,09	30,3 ± 0,90
6	Muestra 1 savia	10000	28,5 ± 2,38	23,7 ± 2,73	26,0 ± 2,31	27,0 ± 3,50	28,7 ± 2,26
7	Muestra 2 secado rocío	38	28,1 ± 1,24	23,9 ± 1,79	24,5 ± 2,30	27,6 ± 1,61	28,5 ± 1,87
8	Muestra 2 secado rocío	76	28,7 ± 0,91	26,5 ± 1,55	27,1 ± 1,01	28,7 ± 1,99	28,9 ± 1,37
9	Muestra 3 radical activo	2,5	28,8 ± 1,49	26,4 ± 3,12	29,0 ± 1,99	29,4 ± 1,76	29,5 ± 2,81
10	Muestra 3 radical activo	5,0	28,3 ± 2,1	25,8 ± 1,86	28,1 ± 2,65	28,0 ± 2,65	28,5 ± 3,03
11	Fenfluramina	7,5	29,1 ± 0,66	25,3 ± 4,03	27,0 ± 1,53	30,8 ± 0,54	29,7 ± 2,84
12	Vehículo (DMSO)	-	27,9 ± 1,8	26,7 ± 2,11	28,7 ± 1,99	28,1 ± 4,06	30,5 ± 2,54
dt Desviación típica							

ES 2 363 230 T3

TABLA 1b

*Efectos de la administración oral sobre el consumo de alimento en ratas
(datos pre-dosificación diaria)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

ES 2 363 230 T3

TABLA 2a

*Efectos de la administración oral sobre el consumo de agua en ratas
(datos pre-dosificación diaria)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de alimento del grupo (g ± dt) entre los Días				
			-6 --5	-5 --4	-4 --3	-3 --2	-2 --1
1	Vehículo (agua)	-	40,9 ± 4,61	34,8 ± 4,15	37,6 ± 5,63	33,5 ± 7,42	32,2 ± 6,32
2	Muestra 1 savia	800	38,6 ± 1,96	37,1 ± 9,74	36,4 ± 4,81	28,1 ± 1,83	30,4 ± 4,75
3	Muestra 1 savia	1600	43,4 ± 10,53	35,9 ± 3,84	38,4 ± 4,56	31,1 ± 4,47	36,5 ± 5,39
4	Muestra 1 savia	3200	40,1 ± 5,58	33,3 ± 3,01	37,3 ± 4,46	31,3 ± 3,48	31,7 ± 3,18
5	Muestra 1 savia	6400	43,8 ± 8,57	36,3 ± 9,02	35,4 ± 8,18	34,0 ± 6,62	35,1 ± 5,72
6	Muestra 1 savia	10000	37,4 ± 5,34	32,7 ± 3,35	33,2 ± 4,86	29,0 ± 5,11	32,2 ± 3,27
7	Muestra 2 secado rocío	38	40,0 ± 4,36	35,8 ± 4,92	34,7 ± 3,20	30,2 ± 1,88	31,4 ± 2,98
8	Muestra 2 secado rocío	76	38,6 ± 1,98	37,0 ± 1,96	48,8 ± 21,5	31,6 ± 4,56	39,0 ± 17,27
9	Muestra 3 radical activo	2,5	42,0 ± 6,70	37,0 ± 5,05	34,1 ± 3,16	28,0 ± 2,58	31,6 ± 3,12
10	Muestra 3 radical activo	5,0	40,9 ± 4,48	34,2 ± 3,00	32,7 ± 1,26	28,2 ± 1,65	33,1 ± 4,82
11	Fenfluramina	7,5	47,0 ± 5,3	35,5 ± 7,49	34,7 ± 3,73	30,9 ± 2,12	31,6 ± 2,80
12	Vehículo (DMSO)	-	43,3 ± 5,67	34,5 ± 4,97	35,2 ± 4,34	28,3 ± 4,64	31,4 ± 6,44
dt Desviación típica							

ES 2 363 230 T3

TABLA 2b

*Efectos de la administración oral sobre el consumo de agua en ratas
(datos pre-dosificación diaria)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de alimento del grupo (g ± dt) entre los Días						
			1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
1	Vehículo (agua)	-	34,9 ± 5,45	36,9 ± 6,06	38,0 ± 7,59	37,2 ± 6,18	37,7 ± 5,54	35,3 ± 2,86	36,5 ± 5,85
2	Muestra 1 savia	800	30,9 ± 3,77	34,4 ± 8,12	38,2 ± 13,71	35,9 ± 13,51	39,5 ± 11,20	28,8 ± 1,22	31,8 ± 5,58
3	Muestra 1 savia	1600	29,2 ± 1,66	31,7 ± 5,35	41,3 ± 11,21	34,6 ± 4,10	48,1 ± 12,27	37,8 ± 7,28	36,9 ± 9,28
4	Muestra 1 savia	3200	35,9 ± 5,88	26,2* ± 2,66	30,5 ± 2,44	34,1 ± 4,80	45,8 ± 18,54	51,0 ± 35,21	42,6 ± 13,88
5	Muestra 1 savia	6400	33,4 ± 12,04	27,4* ± 8,13	32,6 ± 10,67	35,4 ± 10,78	45,2 ± 8,72	36,2 ± 6,72	35,9 ± 9,58
6	Muestra 1 savia	10000	31,7 ± 12,74	28,5* ± 8,85	32,4 ± 8,87	36,6 ± 6,50	40,7 ± 11,51	38,0 ± 6,66	37,5 ± 6,21
7	Muestra 2 secado rocío	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	46,11 ± 9,49
8	Muestra 2 secado rocío	76	45,0 ± 19,03	39,1 ± 16,89	46,9 ± 18,34	35,9 ± 3,40	41,9 ± 12,37	36,9 ± 8,47	38,1 ± 8,93
9	Muestra 3 radical activo	2,5	32,2 ± 4,01	36,1 ± 12,42	38,3 ± 11,71	41,5 ± 16,60	34,7 ± 7,57	33,0 ± 4,20	35,3 ± 8,70
10	Muestra 3 radical activo	5,0	33,9 ± 2,40	31,5 ± 8,12	35,1 ± 3,82	37,7 ± 5,99	39,5 ± 7,78	37,4 ± 11,07	37,8 ± 6,42
11	Fenfluramina	7,5	34,1 ± 3,60	37,2 ± 1,48	36,7 ± 3,92	33,8 ± 2,89	33,7 ± 5,43	32,1 ± 1,93	33,6 ± 2,50
12	Vehículo (DMSO)	-	40,7 ± 9,10	33,8 ± 9,37	32,9 ± 7,07	35,2 ± 11,49	33,8 ± 9,82	32,3 ± 7,44	32,0 ± 7,22

dt Desviación típica

Los Grupos 2 – 8 se compararon con el Grupo 1 con vehículo: *p<0,05

Los Grupos 9 – 11 se compararon con el Grupo 12 con vehículo (sin significación)

55

60

65

ES 2 363 230 T3

TABLA 3a

*Efectos de la administración oral sobre el peso corporal en ratas
(datos pre-dosificación diaria)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Consumo medio de alimento del grupo (g ± dt) el Día				
			-6	-4	-3	-2	-1
1	Vehículo (agua)	-	130,9 ± 5,56	150,7 ± 5,37	157,3 ± 5,29	168,1 ± 6,20	177,5 ± 6,70
2	Muestra 1 savia	800	131,6 ± 4,34	150,1 ± 4,84	158,5 ± 4,35	169,6 ± 4,99	177,7 ± 4,10
3	Muestra 1 savia	1600	130,1 ± 4,3	148,6 ± 6,59	156,7 ± 6,38	167,5 ± 6,04	176,6 ± 6,37
4	Muestra 1 savia	3200	130,8 ± 6,19	147,7 ± 7,56	154,4 ± 8,06	165,2 ± 8,43	175,8 ± 9,10
5	Muestra 1 savia	6400	132,6 ± 7,01	151,3 ± 7,23	158,4 ± 8,50	169,0 ± 8,79	178,1 ± 7,75
6	Muestra 1 savia	10000	132,3 ± 6,75	151,8 ± 9,08	157,3 ± 9,37	167,1 ± 10,41	175,4 ± 10,90
7	Muestra 2 secado rocío	38	131,7 ± 8,28	149,0 ± 5,85	156,2 ± 5,81	166,7 ± 5,54	175,6 ± 8,42
8	Muestra 2 secado rocío	76	130,0 ± 6,99	146,1 ± 6,00	155,9 ± 6,59	166,0 ± 6,87	175,1 ± 6,55
9	Muestra 3 radical activo	2,5	132,6 ± 7,63	148,9 ± 8,51	157,3 ± 8,91	169,8 ± 8,96	179,4 ± 8,71
10	Muestra 3 radical activo	5,0	133,5 ± 6,45	150,5 ± 9,55	158,8 ± 8,48	171,0 ± 7,72	179,0 ± 9,20
11	Fenfluramina	7,5	133,2 ± 9,21	152,7 ± 9,09	160,0 ± 9,82	170,0 ± 9,15	182,8 ± 10,21
12	Vehículo (DMSO)	-	129,1 ± 3,17	147,3 ± 4,37	155,0 ± 6,29	166,0 ± 5,91	174,8 ± 8,26
dt Desviación típica							

Tabla 3b

Efectos de la administración oral sobre el peso corporal en ratas (datos post-dosificación diaria)

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Peso corporal medio del grupo (n ± dt) el Día:							
			Pre-dosificación (1)	2	3	4	5	6	7	8
1	Vehículo (agua)	-	185,4 ± 7,77	192,6 ± 7,16	202,0 ± 10,17	211,2 ± 7,98	220,2 ± 10,35	227,2 ± 10,26	235,0 ± 11,82	242,8 ± 11,97
2	Muestra 1 savia	800	186,0 ± 4,90	187,0 ± 4,55	198,5 ± 4,20	206,8 ± 5,91	214,8 ± 4,65	222,8 ± 4,99	231,5 ± 3,70	240,0 ± 13,65
3	Muestra 1 savia	1600	185,0 ± 6,67	186,0 ± 8,28	193,2 ± 6,42	204,0 ± 6,40	212,4 ± 5,81	223,0 ± 6,33	232,6 ± 7,70	240,4 ± 6,66
4	Muestra 1 savia	3200	181,8 ± 9,18	184,6 ± 8,00	186,2 ± 8,67	189,8 ± 9,99	199,2 ± 9,34	210,6 ± 10,21	219,0 ± 11,29	228,4 ± 12,10
5	Muestra 1 savia	6400	186,6 ± 7,96	185,6 ± 6,39	103,8 ± 6,87	185,2 ± 9,18	191,2 ± 7,89	201,0 ± 6,89	213,0 ± 6,96	222,0 ± 7,94
6	Muestra 1 savia	10000	182,8 ± 12,22	181,4 ± 14,06	179,8 ± 15,85	180,6 ± 3,85	185,6 ± 11,28	192,2 ± 10,99	203,4 ± 11,60	212,4 ± 11,35
7	Muestra 2 secado rocío	38	183,4 ± 0,11	185,8 ± 9,23	196,8 ± 7,79	205,6 ± 9,79	214,4 ± 9,61	222,6 ± 9,34	231,4 ± 10,02	239,6 ± 11,40
8	Muestra 2 secado rocío	76	180,6 ± 6,47	183,4 ± 7,57	188,6 ± 6,73	198,2 ± 8,50	206,0 ± 9,43	214,0 ± 9,51	222,0 ± 9,49	232,2 ± 9,68
9	Muestra 3 radical activo	2,5	188,2 ± 9,42	191,2 ± 11,15	200,0 ± 11,25	209,6 ± 12,28	219,6 ± 12,95	229,4 ± 13,69	238,4 ± 14,50	247,0 ± 14,35
10	Muestra 3 radical activo	6,0	186,4 ± 10,02	192,0 ± 9,93	192,4 ± 9,84	201,0 ± 11,27	209,4 ± 12,70	219,8 ± 11,06	228,2 ± 12,28	236,0 ± 13,95
11	Fenfluramina	7,6	190,3 ± 9,71	190,3 ± 10,97	197,7 ± 7,37	207,7 ± 7,23	217,7 ± 10,69	224,3 ± 10,12	234,3 ± 12,70	243,3 ± 9,24
12	Vehículo (DMSO)	-	183,3 ± 8,33	190,3 ± 10,26	199,0 ± 10,82	207,7 ± 12,66	215,7 ± 14,05	222,3 ± 14,04	230,7 ± 15,95	239,0 ± 17,35
dt Desviación típica										
Los Grupos 2 – 8 se compararon con el Grupo 1 con vehículo: * p<0,05, ** p<0,01										
Los Grupos 9 – 11 se compararon con el Grupo 12 con vehículo (sin significación)										

ES 2 363 230 T3

Informe Histopatológico

El examen histopatológico se restringió al hígado. No se detectaron cambios relacionados con el tratamiento para la Muestra 1 (líquida), la Muestra 2 (savia sometida a secado de rocío), la Muestra 3 (radical activo), la fenfluramina o el grupo de control con DMSO.

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

10

(Tabla pasa a página siguiente)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA
Resumen de incidencias de la patología macroscópica

	Grupo 1 0 mg/kg	Grupo 2 800 mg/kg	Grupo 3 1600 mg/kg	Grupo 4 3200 mg/kg	Grupo 5 6400 mg/kg	Grupo 6 10000 mg/kg
Sexo: Machos	5	4	5	5	5	5
Machos del estudio	5	4	5	5	5	5
Animales completados	5	4	5	5	5	5
Hígados	5	4	5	5	5	5
Examinados	0	0	1	2	3	3
Sin anomalías detectadas	0	1	0	0	0	3
Focos de células inflamatorias parenquimales (Total)	0	1	0	0	0	1
Mínimo	0	0	0	0	0	1
Hipertrofia de hepatocitos – centrilobular (Total)	0	0	0	0	0	1
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Hemopoyesis extramedular (Total)	2	0	0	0	0	0
Mínimo	2	0	0	0	0	0
Necrosis de hepatocitos – focal (Total)	1	0	0	0	0	0
Mínimo	1	0	0	0	0	0
Infiltración linfocitaria portal (Total)	3	4	4	3	2	2
Mínimo	3	4	4	3	2	2
Hepatocitos eosinofílicos – focal (Total)	1	0	0	0	0	0
Mínimo	1	0	0	0	0	0
Fibrosis portal (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0
Hígados	5	4	5	5	5	5
Examinados (tinción ORO)	2	3	2	4	3	3
Sin anomalías detectadas	3	1	2	1	2	2
Grasa hepatocitos – centrilobular (Total)	3	1	2	1	2	2
Mínimo	0	0	1	0	0	0
Grasa hepatocitos – periportal (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0

TABLA
(continuación)

	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12
	38 mg/kg	76 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	7,5 mg/kg	0 mg/kg
	5	5	5	5	3	3
	5	5	5	5	3	3
Hígados						
Examinados	5	5	5	5	3	3
Sin anomalías detectadas	2	2	0	1	0	2
Focos de células inflamatorias parenquimales (Total)	0	0	0	0	0	1
Mínimo	0	0	0	0	0	1
Necrosis de hepatocitos – focal (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0
Infiltración linfoide portal (Total)	3	3	5	4	3	1
Mínimo	3	3	5	4	3	1
Leucocitos portales (Total)	0	0	1	0	0	0
Mínimo	0	0	1	0	0	0
Hígado						
Examinado (tinción ORO)	5	5	5	5	3	3
Sin anomalías detectadas	5	3	3	3	2	2
Grasa hepatocitos – centriolobular (Total)	0	2	2	2	1	1
Mínimo	0	2	2	2	1	0

ES 2 363 230 T3

Ejemplo 7

Más abajo se describe un bioanálisis adicional, que empleó las mismas muestras de ensayo descritas en el Ejemplo 6. Los animales de este estudio recibieron una dieta restringida, esto es, los animales solamente recibieron alimento entre las 12,00 y las 3,00 pm diariamente. Esto es diferente de todos los demás análisis biológicos llevados a cabo hasta ahora, en los cuales el alimento se encontraba disponible para las ratas *ad. lib.* Los animales se aclimataron a lo largo de un período de siete días (días -7 a -1), la administración de la dosis tuvo lugar desde el día 0 hasta el día 6 a las 9,00 am mediante gavage oral. El período de recuperación fue desde el día 7 hasta el día 13. Los grupos de dosificación se describen en la siguiente Tabla 1. Se debe observar que el grupo de control real está marcado como Grupo 09. El Grupo 5 es un grupo controlado que recibió una dieta equivalente a la del Grupo 4. El propósito de este grupo fue evaluar el efecto que tiene una dieta restringida sobre las vidas de los animales.

Resultados

Los resultados generados durante el estudio demostraron que el período de aclimatación fue demasiado corto. Las ratas se alimentan principalmente durante la noche y el cambio repentino a un acceso restringido al alimento durante 3 horas a lo largo del día, dio como resultado ingestas diarias bajas. La ingesta diaria de alimento todavía estaba creciendo en la mayor parte de los grupos al final del período de aclimatación cuando empezaron los elementos del ensayo. Como resultado de esto, el efecto de los materiales de ensayo no afectó significativamente a la ingesta de alimento de las ratas durante el período de administración de la dosis.

En la Tabla D1 y en la Tabla D2 se muestran las masas corporales medias para los diferentes grupos del día -7 al -1 y los días 0 a 6. El efecto de las diferentes dosificaciones de la savia y la savia sometida a secado de rocío se muestra en los gráficos adjuntos como el % de cambio de la masa corporal del día 0 al 7 (Figura 5), y el % de cambio de la masa corporal del día -7 al 7 (Figura 6). La pérdida de masa corporal está claramente relacionada con la dosis especialmente con las dosis más elevadas. El examen histopatológico de los hígados no mostró ninguna patología significativa en los grupos que recibieron los elementos del ensayo.

Alimento

Se midió el consumo de alimento diariamente, durante la aclimatación y durante el estudio. El alimento estuvo disponible durante un período de 3 horas de alimentación diariamente, comenzando a las 12,00 y terminando a las 15,00. Los animales se mantuvieron en ayunas durante el resto del tiempo. Los animales del Grupo 5 recibieron una cantidad medida de alimento el Día 1, equivalente al consumo medio de alimento del Grupo 4 el Día 0. Este patrón de alimentación controlada para el Grupo 5, determinado a partir del consumo medio de alimento del Grupo 4 del día anterior, fue seguido los Días 1 - 7.

Agua

Se proporcionó agua en recipientes convencionales. El agua (Magalies Water Board Tap Water, adecuada para consumo humano) estuvo disponible *ad libitum*. El consumo de agua se midió una vez al día, a la misma hora cada día, después de determinar el consumo de alimento.

Aclimatación

Los animales se aclimataron durante siete días antes del comienzo del estudio, tiempo durante el cual se determinaron el consumo de alimento y agua como se ha descrito antes. Las masas corporales se determinaron en una pauta diaria durante este tiempo.

Diseño del Estudio y Procedimientos

50 TABLA 1

DISEÑO DEL ESTUDIO				
GRUPO	ENSAYO	NÚMERO	DOSIS	ELEMENTO DEL ENSAYO
01	6♂	001 – 006	100 mg/kg	Savia congelada
02	6♂	007 – 012	400 mg/kg	Savia congelada
03	6♂	013 – 018	1600 mg/kg	Savia congelada
04	6♂	019 – 024	3200 mg/kg	Savia congelada
05	6♂	025 – 030	CONTROL	Agua Purificada Elga Opción 4

ES 2 363 230 T3

TABLA 1 (continuación)

DISEÑO DEL ESTUDIO				
GRUPO	ENSAYO	NÚMERO	DOSIS	ELEMENTO DEL ENSAYO
06	6♂	031 – 036	2,2 mg/kg	Savia sometida a secado rocío
07	6♂	037 – 042	8,8 mg/kg	Savia sometida a secado rocío
08	6♂	043 – 048	35 mg/kg	Savia sometida a secado rocío
09	6♂	049 - 054	CONTROL	Agua Purificada Elga Opción 4

Ruta de Administración

Los elementos del ensayo se administraron con una pauta diaria durante siete días, utilizando una aguja intragástrica. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 18 horas antes de la administración del elemento (comienzo a las 09,00).

Duración del Tratamiento

Los animales se trataron durante siete días consecutivos (desde el Día 0 - Día 6). Se sacrificaron 3 animales de cada grupo 24 horas después de la última administración de la dosis (Día 7). Los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento (Día 13). Este procedimiento se siguió para todos los grupos excepto para el Grupo 5, donde tres animales se sacrificaron 24 horas después de la última alimentación controlada (Día 8), los tres animales restantes se sacrificaron 7 días después del último tratamiento (Día 13).

Masas Corporales

Las masas corporales se determinaron diariamente, aproximadamente la misma hora cada día durante la duración del estudio, incluyendo la duración del período de aclimatación.

Eutanasia

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

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

Exámenes Oftalmoscópicos

Los exámenes oftalmoscópicos, utilizando un oftalmoscopio, se realizaron antes de la primera administración del elemento de ensayo y al terminar, en todos los animales de todos los grupos.

Patología Macroscópica

Se realizó un examen *post mortem* completo a cada animal que había sido sometido a eutanasia al final del período de estudio.

Histopatología

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

ES 2 363 230 T3

TABLA D.1

Masas corporales medias/grupo/semana

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día -7	Día -6	Día -5	Día -4	Día -3	Día -2	Día -1
01	Muestra 1 (savia)	100	203,38 ± 95,39	197,13 ± 90,63	192,75 ± 89,49	188,62 ± 86,75	184,95 ± 84,80	182,48 ± 83,47	182,25 ± 82,57
02	Muestra 1 savia	400	192,53 ± 65,60	183,92 ± 61,20	178,25 ± 59,37	173,17 ± 58,10	170,82 ± 57,42	168,25 ± 58,40	169,37 ± 59,25
03	Muestra 1 savia	1600	149,25 ± 54,80	142,87 ± 51,89	136,85 ± 52,17	132,37 ± 49,64	131,50 ± 49,50	129,67 ± 48,89	131,12 ± 48,22
04	Muestra 1 savia	3200	224,15 ± 80,70	214,45 ± 77,25	207,10 ± 76,38	201,82 ± 75,42	198,25 ± 74,82	194,83 ± 75,34	196,77 ± 74,56
05	Agua purificada Elga opción 4 (control)	-	214,55 ± 74,90	204,85 ± 72,41	198,57 ± 71,79	193,48 ± 68,49	192,40 ± 67,48	190,87 ± 67,39	190,15 ± 65,24
06	Muestra 2 (Savia secado rocío)	2,2	208,65 ± 65,74	199,37 ± 62,49	193,18 ± 61,18	188,25 ± 60,89	186,22 ± 59,98	184,55 ± 58,86	185,97 ± 58,76
07	Muestra 2 (Savia secado rocío)	8,8	256,95 ± 77,55	246,02 ± 73,67	237,47 ± 73,53	232,62 ± 71,73	229,78 ± 71,76	228,07 ± 69,88	228,45 ± 68,81
08	Muestra 2 (savia secado rocío)	35	194,37 ± 43,74	185,83 ± 42,70	177,53 ± 41,10	172,05 ± 40,13	170,10 ± 39,49	187,25 ± 37,61	168,00 ± 38,83
09	Agua purificada Elga opción 4 (control)	-	171,52 ± 69,81	162,67 ± 62,68	154,95 ± 61,83	151,38 ± 59,48	149,63 ± 57,66	148,30 ± 7,12	149,07 ± 56,01

ES 2 363 230 T3

TABLA D.2 (continuación)

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
01	Muestra 1 (Savia)	100	183,87 ± 83,33	175,83 ± 81,82	175,72 ± 79,05	175,48 ± 77,54	175,53 ± 76,20	177,95 ± 73,99	178,43 ± 72,68
02	Muestra 1 (Savia)	400	173,45 ± 60,73	164,58 ± 58,52	164,75 ± 58,37	166,22 ± 57,69	166,55 ± 57,79	169,93 ± 57,47	171,77 ± 57,29
03	Muestra (Savia)	1600	134,38 ± 46,01	129,20 ± 44,74	127,53 ± 43,20	127,20 ± 41,36	126,70 ± 39,19	128,00 ± 39,22	128,07 ± 38,66
04	Muestra (Savia)	3200	199,60 ± 75,16	196,38 ± 73,96	192,20 ± 71,20	189,05 ± 69,11	186,57 ± 66,29	186,05 ± 67,45	185,68 ± 65,73
05	Agua purificada Elga Opción 4 (control)	-	194,27 ± 67,46	187,93 ± 65,48	181,97 ± 65,01	177,53 ± 64,73	174,73 ± 61,08	172,85 ± 58,63	171,45 ± 56,79
06	Muestra 2 (Savia secado rocío)	2,2	189,07 ± 60,15	181,52 ± 58,99	181,48 ± 557,79	184,42 ± 55,64	185,75 ± 55,29	189,35 ± 54,66	189,68 ± 53,70
07	Muestra 2 (Savia secado rocío)	8,8	230,28 ± 69,32	221,55 ± 68,02	220,17 ± 66,63	221,80 ± 63,88	222,82 ± 63,56	224,82 ± 62,38	224,90 ± 62,05
08	Muestra 2 (Savia secado rocío)	35	169,10 ± 38,40	164,42 ± 38,03	162,50 ± 36,81	162,75 ± 36,36	162,52 ± 36,93	164,30 ± 37,69	164,22 ± 37,18
09	Agua purificada Elga opción 4 (control)	-	151,02 ± 55,45	146,55 ± 53,77	148,10 ± 52,67	149,70 ± 52,05	152,58 ± 50,37	155,82 ± 49,91	157,85 ± 49,70

ES 2 363 230 T3

TABLA D.3 (continuación)

Grupo	Tratamiento oral	Dosis (mg/kg)	Masas corporales medias (g) & Desviación típica						
			Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13
01	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	100	185,38 ± 72,64	234,73 ± 62,44	236,73 ± 62,39	234,07 ± 62,09	236,33 ± 62,31	239,07 ± 60,24	238,43 ± 59,85
02	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	400	178,83 ± 58,24	225,63 ± 13,05	277,13 ± 14,18	227,10 ± 14,03	229,43 ± 16,97	234,93 ± 8,35	236,20 ± 15,97
03	Muestra 1 (Savia) (GHA I 35A)	1600	132,22 133,80 ± 37,08	± 55,17	135,23 ± 455,74	134,53 ± 54,96	138,30 ± 53,03	139,30 ± 51,10	142,80 ± 49,51
04	Muestra 1 (Savia) (GHA 9 35A)	3200	188,57 ± 66,14	199,63 ± 61,07	198,90 ± 57,48	198,70 ± 54,55	194,73 ± 52,78	194,93 ± 50,78	197,93 ± 51,57
05	Agua purificada Elga Opción 4 (control)	-	173,97 ± 54,29	172,98 ± 52,06	157,80 ± 58,62	158,87 ± 57,76	160,80 ± 57,67	163,40 ± 56,27	167,80 ± 58,49
06	Muestra 2 (Savia secado rocío) (GHA I 59)	2,2	196,00 ± 53,09	190,27 ± 27,78	190,27 ± 29,54	192,60 ± 29,09	194,73 ± 29,68	196,07 ± 29,04	198,60 ± 30,18
07	Muestra 2 (Savia secado rocío) (GHA I 59)	8,8	231,30 ± 61,91	177,27 ± 24,48	178,17 ± 23,79	180,67 ± 25,04	182,03 ± 25,31	186,10 ± 24,60	189,73 ± 23,58
08	Muestra 2 (Savia secado rocío) (GHA I 59)	35	167,48 ± 36,75	164,90 ± 22,54	166,63 ± 23,08	168,43 ± 22,66	171,67 ± 24,42	174,90 ± 25,70	178,57 ± 23,58
09	Agua purificada Elga opción 4 (control)	-	165,50 ± 49,27	193,73 ± 22,37	196,87 ± 21,86	198,07 ± 21,02	199,83 ± 20,21	204,93 ± 18,65	207,13 ± 18,22

ES 2 363 230 T3

TABLA 1

*Evaluación histológica de secciones de hígado de ratas macho
Muestra 1*

GRUPO 1: 100 mg/kg Muestra 1			GRUPO 2: 400 mg/kg Muestra 1		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas		Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	01	NPL		07	FHS1
	02	NPL		08	NPL C1 +
	03	NPL C1 +		09	NPL
Día 13	04	NPL MLC	Día 13	10	DHS1+
	05	FHS1+		11	NPL
	06	NPL		12	DHS1+

GRUPO 3: 600 mg/kg Muestra 1			GRUPO 4: 3200 mg/kg Muestra 1		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas		Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	13	NPL		19	NPL
	14	NPL		20	NPL
	15	NPL		21	NPL
Día 13	16	NPL	Día 13	22	DHS1+
	17	DHS1+		23	FHS1+
	18	NPL		24	NPL

35 *Grupo 5: Control: Agua purificada Elga opción 4: ingesta alimento restringida*

GRUPO 5: Control: agua purificada Elga opción 4		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	25	NPL MLC
	26	NPL
	27	NPL
Día 13	28	DHS1+
	29	DHS1+
	30	NPL

Leyenda:

- C = Congestión
- DHS = Hinchazón células hidrópicas difusa
- FHS = Hinchazón células hidrópicas focal
- NPL = Sin lesiones parenquimales
- MLC = Infiltración linfocítica mínima
- 1+ = suave
- 2+ = moderado
- 3+ = grave.

ES 2 363 230 T3

TABLA 2

*Evaluación histológica de secciones de hígado de ratas macho
Muestra 2*

5

GRUPO 6: 2,2 mg/kg Muestra 2			GRUPO 7: 8,8 mg/kg Muestra 2		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas		Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	31	NPL		37	NPL
	32	NPL MLC		38	NPL
	33	FHS1+		39	NPL C1+
Día 13	34	NPL	Día 13	40	DHS1+
	35	DHS1+		41	NPL
	36	NPL		42	MLC FHS1+

10

15

20

GRUPO 8: 35 mg/kg Muestra 2		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	43	NPL
	44	NPL
	45	NPL
Día 13	46	NPL
	47	NPL C1+
	48	MLC FHS1+

25

30

Grupo 9: Control: Agua purificada Elga opción 4

35

GRUPO 9: Control: Agua purificada Elga opción 4		
	Animal Núm.	Lesiones hepáticas
Día 7	49	NPL
	50	NPL
	51	FHS 1+
Día 13	52	DHS1+
	53	NPL
	54	FHS1+

40

45

50

Leyenda:

C = Congestión

DHS = Hinchazón células hidrópicas difusa

FHS = Hinchazón células hidrópicas focal

NPL = Sin lesiones parenquimales

MLC = Infiltración linfocítica mínima

1+ = suave

2+ = moderado

3+ = grave.

55

60

65

ES 2 363 230 T3

No se registraron lesiones específicas en las secciones del hígado de las ratas experimentales que recibieron la savia congelada así como la savia sometida a secado de rocío que pudieran ser atribuidas a la administración oral de los productos químicos mencionados antes. La hinchazón hidrópica de las células registrada tanto en las ratas de control como experimentales puede indicar hinchazón de células metabólicas normales y cambios anóxicos. Se encontraron focos mínimos de infiltración perivascular linfocítica en algunos animales y es muy probablemente una observación casual. En unas pocas ratas se encuentra presente una congestión de grado leve en los sinusoides hepáticos y debe ser considerada una observación casual.

Un rasgo importante de la invención demostrado por los resultados de este estudio es que no se desarrolló tolerancia a ninguna de las muestras a lo largo del período de ensayo. Esto puede proporcionar un beneficio considerable, concretamente en relación con el tratamiento de la obesidad.

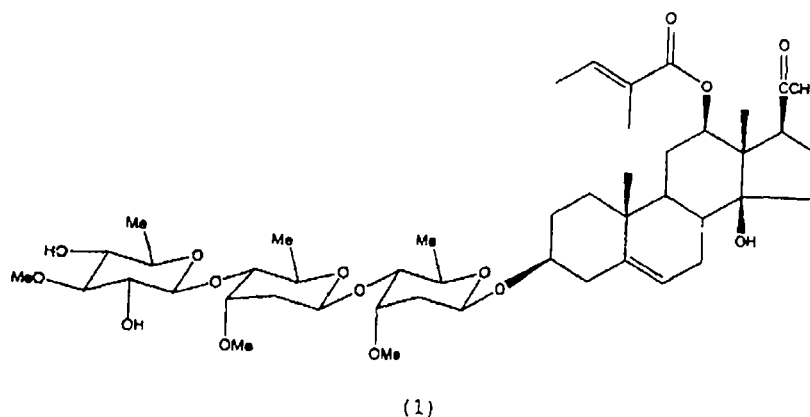
Si bien los compuestos y composiciones han sido descritos principalmente en relación a sus propiedades como supresores del apetito, se debe observar que esta expresión - "supresor del apetito" - se utiliza en la presente memoria para indicar la actividad que tiende a limitar el apetito y/o aumentar la sensación de saciedad, y por tanto tiende a reducir la ingesta calórica total; esto a su vez tiende a contrarrestar la obesidad. Por consiguiente, esta invención proporciona un método para tratar, prevenir o combatir la obesidad en un ser humano o un animal no humano que comprende administrar a dicho ser humano o animal no humano una cantidad de una composición o extracto que contiene un compuesto de fórmula (1) para tratar, prevenir o combatir la obesidad.

El término "animal" según se utiliza en la presente memoria se extiende, pero no está restringido a, animales de compañía, p. ej., mascotas domésticas y animales amaestrados; los ejemplos no limitantes de tales animales incluyen ganado vacuno, ovejas, hurones, cerdos, camellos, caballos, volatería, peces, conejos, cabras, perros y gatos.

Como agente anoréxico o en el tratamiento o prevención de la obesidad en seres humanos, se administra ventajosamente un compuesto de fórmula (1), o la composición definida en una cualquiera de las siguientes reivindicaciones, a dicho ser humano en una cantidad de dosificación de 0,01 mg/kg/día a 10 mg/kg/día. Un intervalo de dosificación preferido es de 0,05 mg/kg/día a 0,5 mg/kg/día. Cuando se utiliza la forma en polvo del extracto sometido a secado de rocío, un intervalo de dosificación preferido es de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día; es especialmente preferido de 0,5 mg/kg/día a 5 mg/kg/día.

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para suprimir el apetito en un ser humano o animal, comprendiendo el método administrar a dicho ser humano o animal una composición que comprende un extracto de una planta del género *Trichocaulon* o el género *Hoodia*, cuyo extracto contiene una cantidad eficaz de un glicósido esteroideo supresor del apetito de dicha planta, donde el glicósido esteroideo tiene la fórmula



2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el extracto es obtenible por medio de un procedimiento que incluye las etapas de tratar el material vegetal con un disolvente para extraer una fracción que tiene actividad supresora del apetito, separar la solución de extracción del resto del material vegetal, eliminar el disolvente de la solución de extracción y recuperar el extracto.

3. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el extracto es obtenible por medio de un procedimiento que incluye las etapas de prensar el material vegetal para separar la savia del material vegetal sólido y recuperar la savia libre del material vegetal sólido para formar el extracto.

4. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la planta del género *Trichocaulon* o del género *Hoodia* se selecciona entre las especies *Trichocaulon piliferum* y *Trichocaulon officinale* y la planta del género *Hoodia* se selecciona entre las especies *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*.

5. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el procedimiento incluye la etapa de concentrar el agente activo del material extraído mediante extracción adicional con un disolvente.

6. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, donde el disolvente de la etapa o las etapas de extracción con disolvente del procedimiento es uno o más de cloruro de metileno, agua, metanol, hexano, acetato de etilo o una de sus mezclas.

7. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde el procedimiento incluye la etapa de concentrar el agente activo del material extraído mediante separación cromatográfica.

8. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, donde la separación cromatográfica emplea uno o más de cloroformo, metanol, acetato de etilo, hexano o una de sus mezclas como eluyente.

9. Un método como se reivindica en la reivindicación 7 u 8, donde el procedimiento incluye llevar a cabo la separación cromatográfica en una columna, recoger el producto eluido en fracciones de la columna, evaluar las fracciones para determinar su actividad supresora del apetito, y seleccionar al menos una fracción que contiene el agente supresor del apetito.

10. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, donde en el procedimiento el extracto se trata para formar un polvo de flujo libre.

11. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto de fórmula (1) se aísla y/o purifica a partir de dicha planta.

12. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto de fórmula (1) se aísla y/o purifica a partir de un extracto derivado de dicha planta.

13. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la planta se selecciona entre *Hoodia currorii*, *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*.

ES 2 363 230 T3

14. Un método como se reivindica en la reivindicación 13, donde la planta se selecciona entre *Hoodia gordonii* y *Hoodia lugardii*.

5 15. Un método como se reivindica en la reivindicación 13, donde la planta es *Hoodia gordonii*.

16. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es una comida o una bebida.

10 17. Un método como se reivindica en la reivindicación 16, donde la composición es una comida.

18. Un método como se reivindica en la reivindicación 16, donde la composición es una bebida.

15 19. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el apetito de un ser humano es suprimido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

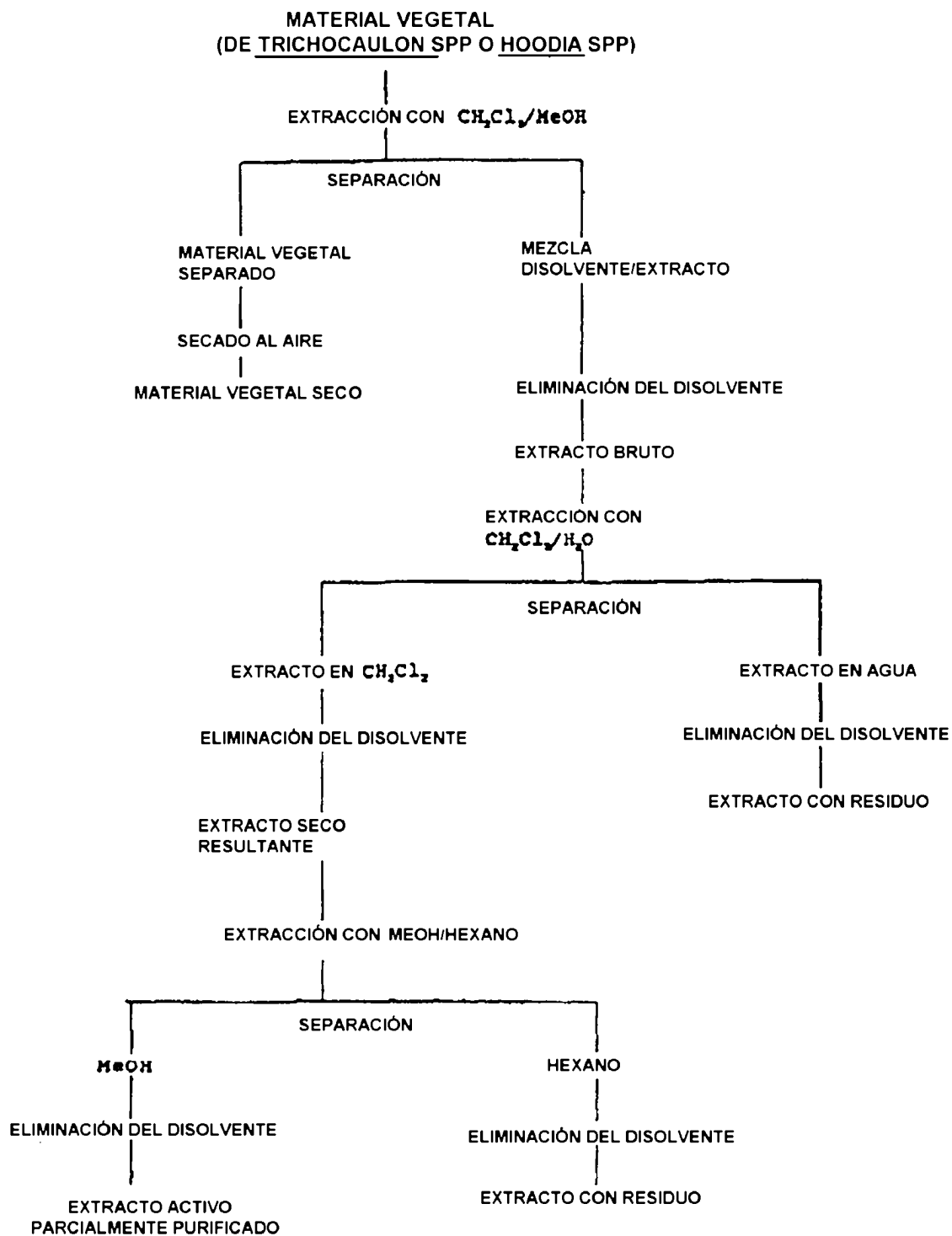


FIG 1

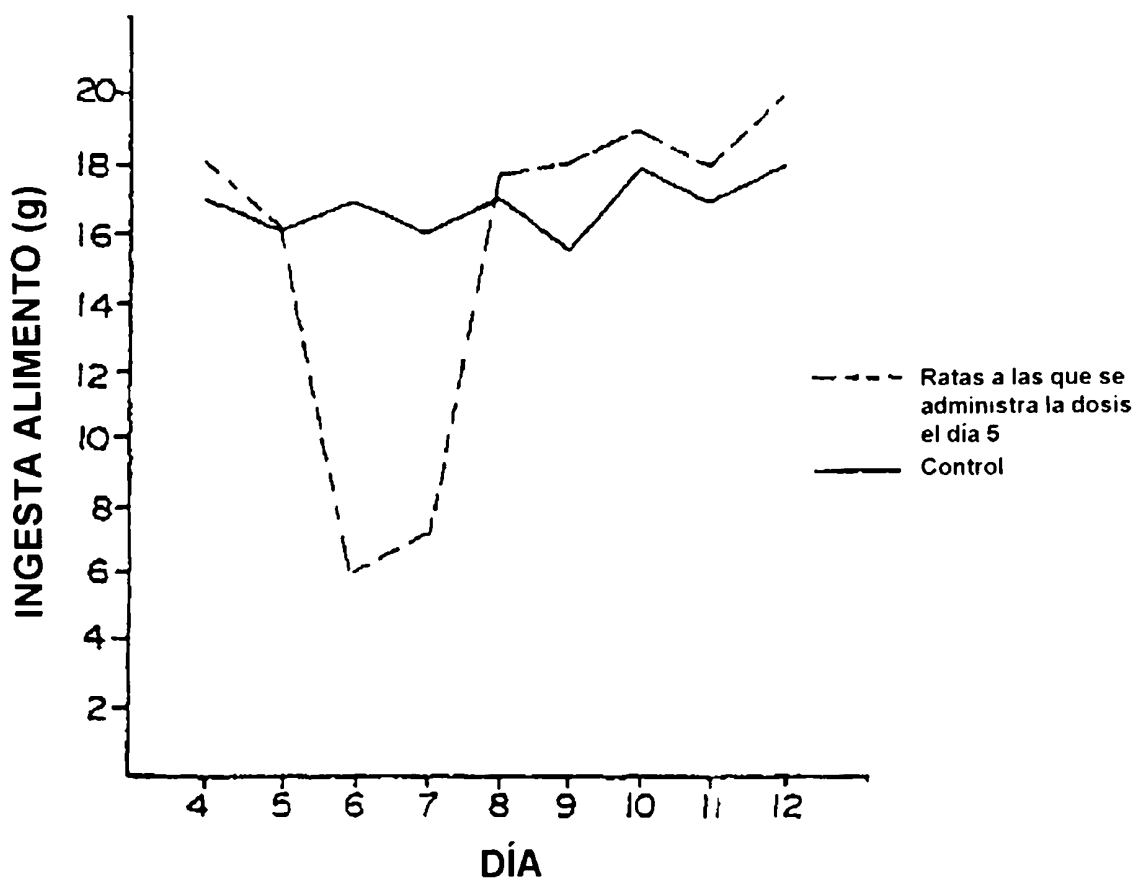


FIG 2

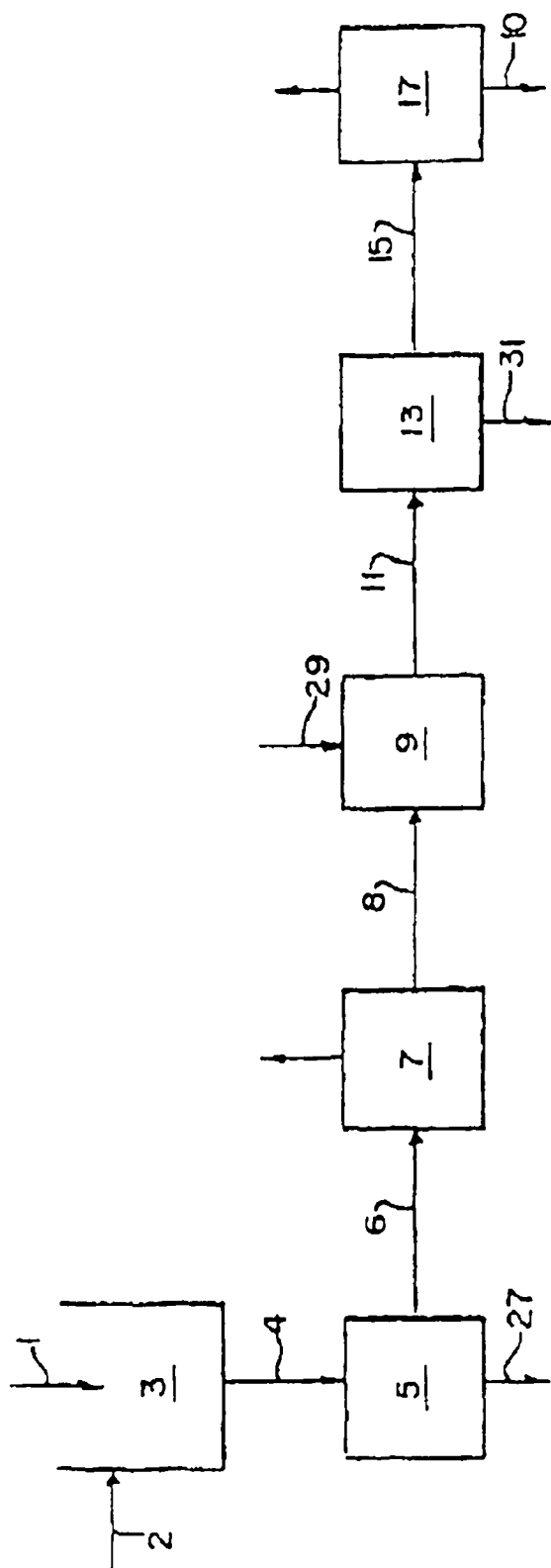


FIG 3

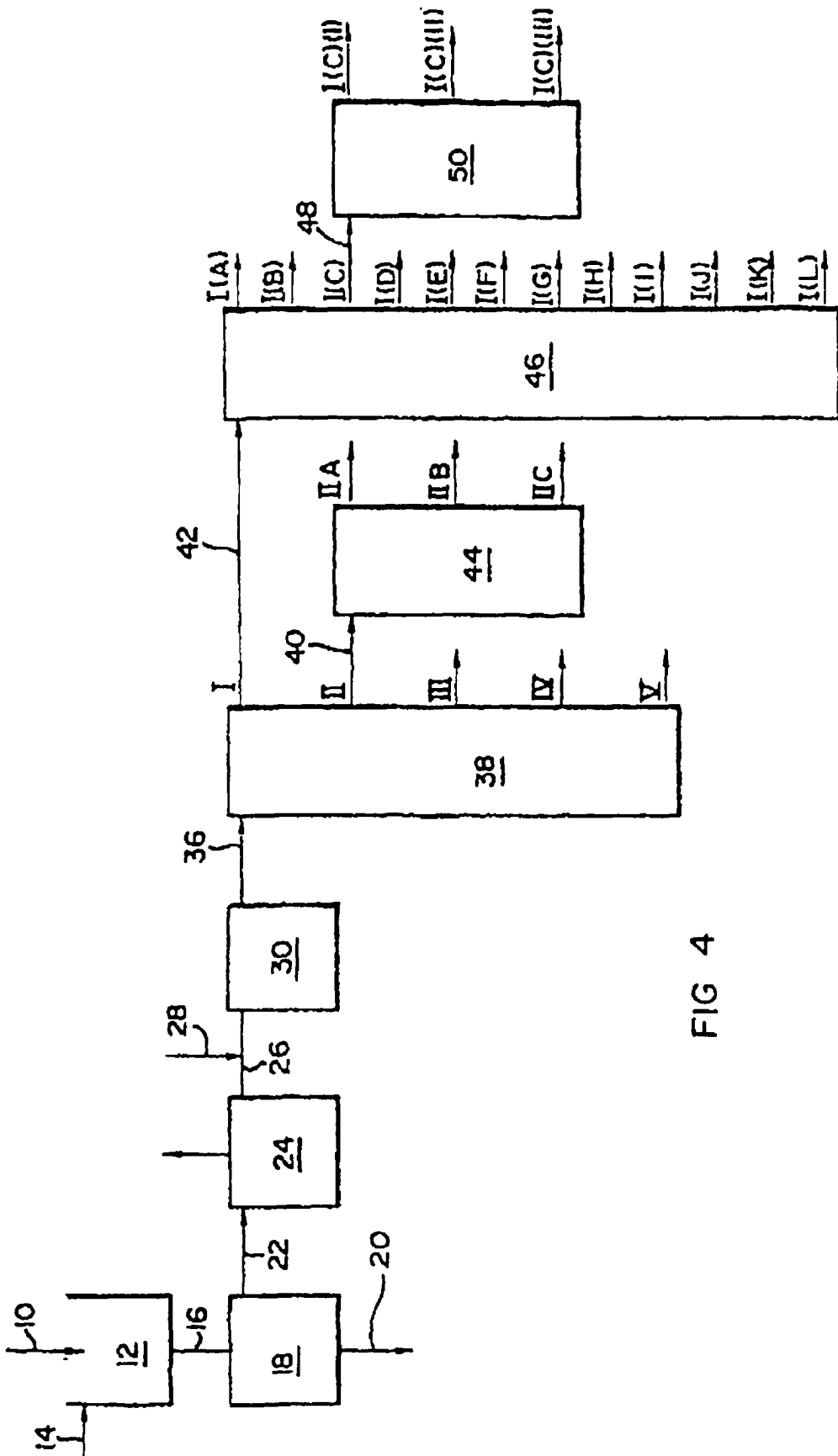


FIG 4

%CAMBIO EN LA MASA CORPORAL DÍAS -7 A 7

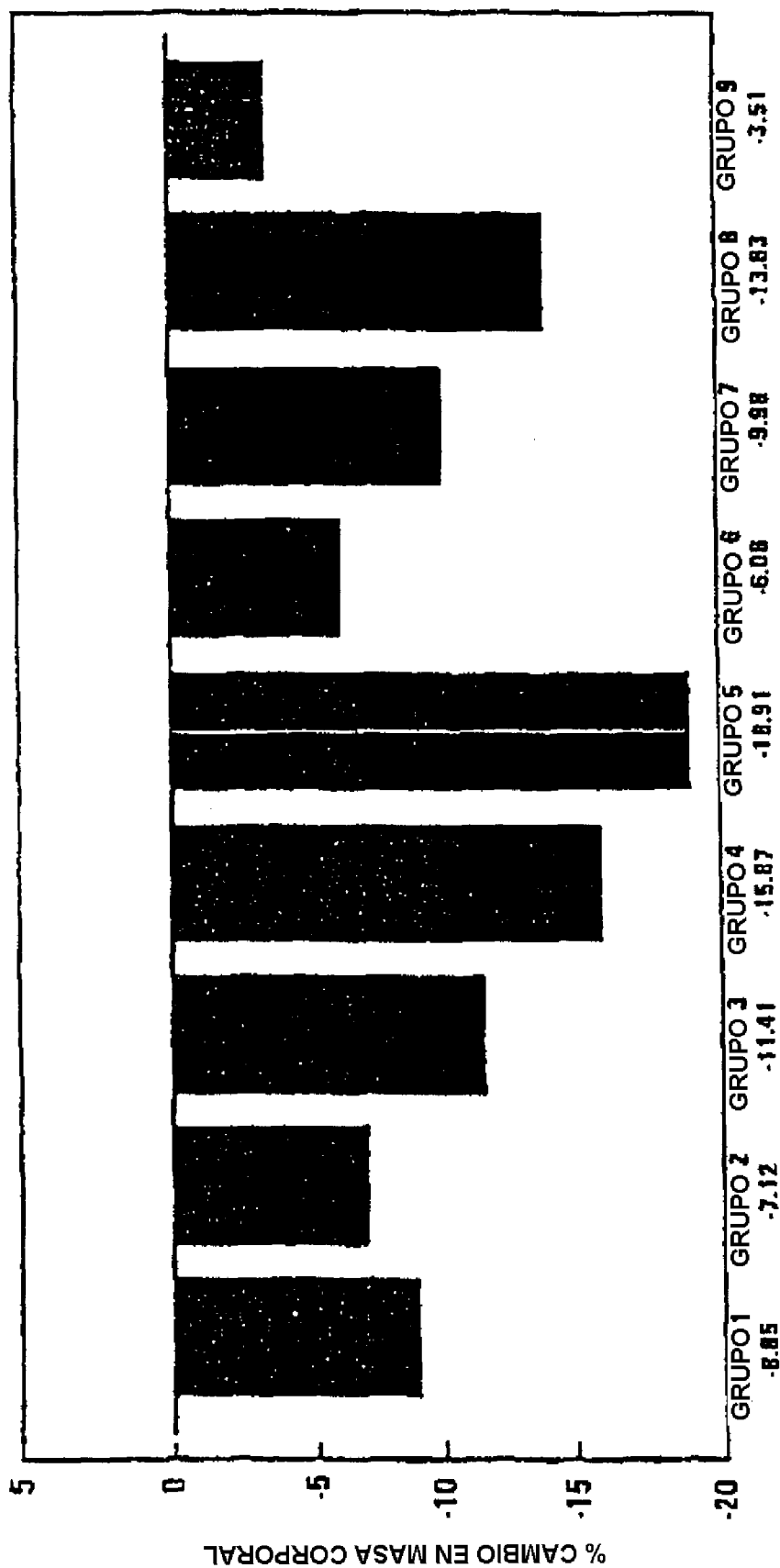


FIG 5

%CAMBIO EN LA MASA CORPORAL DÍAS -7 A 7

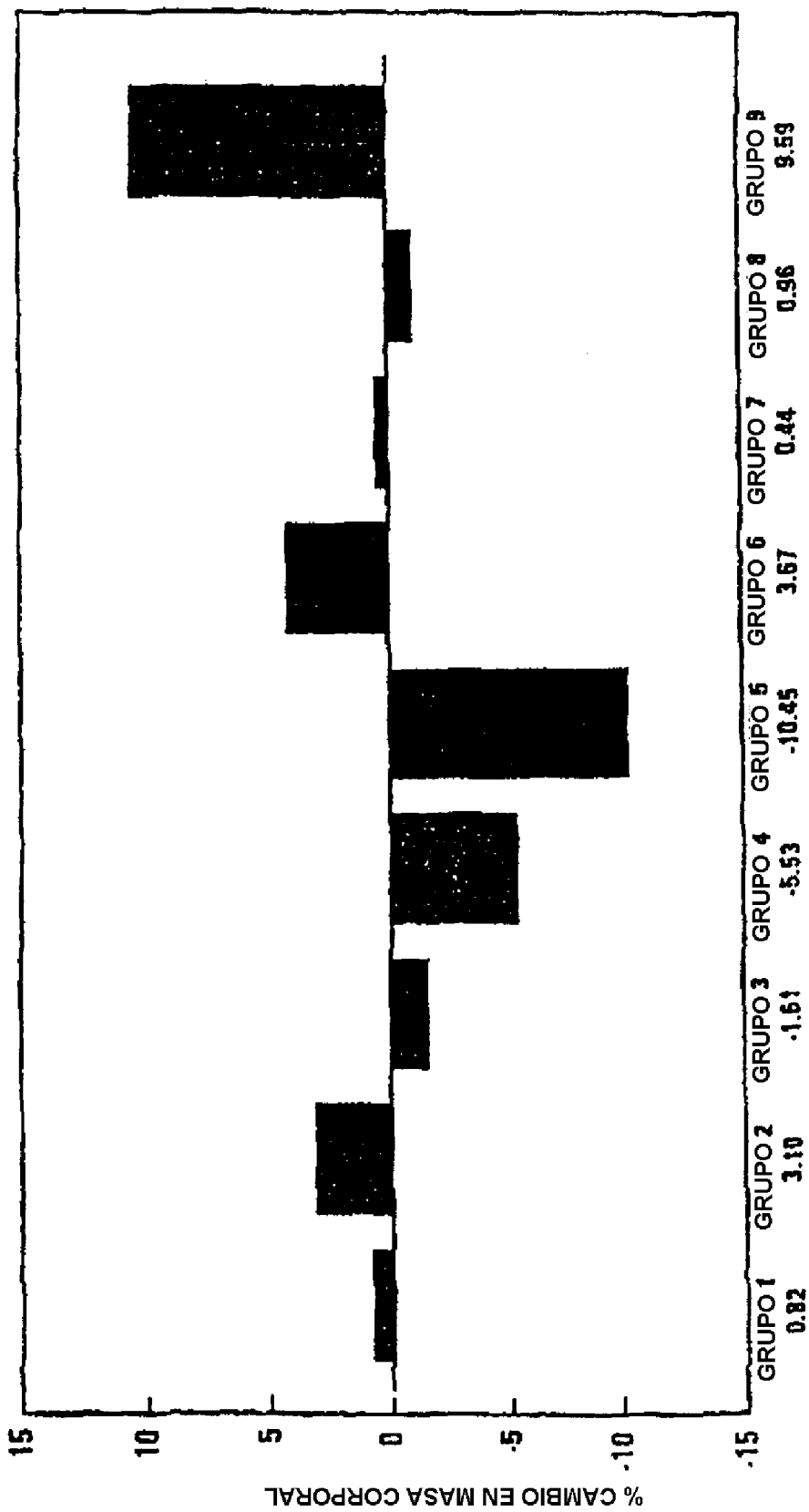


FIG 6