



УКРАЇНА

(19) UA (11) 88165 (13) C2
(51) МПК
C07D 311/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

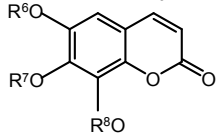
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ТРИЗАМІЩЕНИХ БЕНЗОПІРАНОНІВ

1

(21) а200612964
(22) 30.06.2005
(24) 25.09.2009
(86) РСТ/ЕР2005/007051, 30.06.2005
(31) 10 2004 032 440.9
(32) 05.07.2004
(33) DE
(46) 25.09.2009, Бюл.№ 18, 2009 р.
(72) ГЕРМЕР ШТЕФАН, DE, ГАУЕР ГЕРМАНН, DE,
КОХ ЕґОН, DE, ШЕЦКАРЛ, DE
(73) ДР. ВІЛЬМАР ШВАБЕ ГМБГ УНД КО. КГ, DE
(56) Latte, K.P. J. of Biosciences, 55 (7/8), pp.528-533
US 2003/175777; 18.09.2003

(57) 1. Застосування сполук загальної формули I



де радикали R^6 , R^7 та R^8 незалежно представляють Н або SO_3H , та їх фізіологічно прийнятних солей для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями.

2. Застосування за п.1, де радикали R^6 , R^7 та R^8 - атоми гідрогену.

3. Застосування за п.1, де радикали R^6 та R^8 представляють SO_3H , а радикал R^7 - гідроген.

4. Застосування за будь-яким із пп.1-3, де одна або більше сполук загальної формули I міститься у рослинному екстракті.

5. Застосування за п.4, де рослинний екстракт є екстрактом із видів пеларгонії.

6. Застосування за п.5, де рослинний екстракт є екстрактом з *Pelargonium sidoides*.

7. Застосування за будь-яким із пп.4-6, де концентрація принаймні одної сполуки загальної формули I у сухому вмісті рослинного екстракту складає 0,1%-10%.

8. Застосування за будь-яким із пп.4-6, де концентрація принаймні одної сполуки загальної формули I у сухому вмісті рослинного екстракту складає 0,5%-5%.

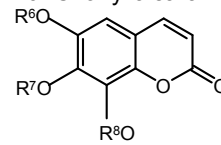
9. Застосування за будь-яким із пп.1-8, де патологічний стан вибрано із групи:

цукровий діабет типу I та/або II,

2

запальні хвороби, що охоплюють ревматоїдний артрит, астму, виразковий коліт, хворобу Крона, псоріаз, нейродерматит, інфікування бактеріями, вірусами, що охоплюють грип, СНІД, вірусний гепатит, та іншими патогенами, що охоплюють паразитів, грибки та пріони, атеросклероз та ендотеліальна дисфункція, ішемія, неврологічні хвороби, що охоплюють хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона та інші нейродегенеративні хвороби, або катаракта та пухлинні хвороби.

10. Сполука загальної формули I



де радикали R^6 , R^7 та R^8 незалежно представляють Н або SO_3H , та

її фізіологічно прийнятна сіль, за умови, що R^6 , R^7 та R^8 не представляють одночасно Н.

11. Сполуки за п.10, де R^6 та R^8 представляють SO_3H , а R^7 - гідроген, або R^6 - SO_3H , а R^7 та R^8 - гідроген, або R^8 - SO_3H , а R^6 та R^7 - гідроген.

12. Рослинний екстракт, що містить одну або більше сполук за п.10 або 11.

13. Рослинний екстракт за п.12, де рослинний екстракт є екстрактом із видів пеларгонії.

14. Рослинний екстракт за п.13, де рослинний екстракт є екстрактом з *Pelargonium sidoides*.

15. Рослинний екстракт за будь-яким із пп.12-14, де концентрація принаймні одної сполуки(сполук) за пп.10 або 11 у сухому вмісті рослинного екстракту складає 0,1%-10%.

16. Рослинний екстракт за п.15, де концентрація принаймні одної сполуки(сполук) за п.10 або 11 у сухому вмісті рослинного екстракту складає 0,5%-5%.

17. Продукт для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями, який містить принаймні одну сполуку загальної формули I, яку визначено в пп.1, 2 або 3.

18. Продукт за п.17, яким є медикамент.

(19) UA (11) 88165 (13) C2

19. Продукт за п.17, яким є дієтичний харчувальний продукт.
20. Фармацевтичний препарат, що складається принаймні з одної сполуки загальної формули I, яку визначено в пп.1, 2 або 3, та придатних ад'ювантів, як форма для перорального застосування.

21. Фармацевтичний препарат, що містить рослинний екстракт за будь-яким із пп.12-16 та придатні ад'юванти, як форма для перорального застосування.

Заявлений винахід стосується застосування тризаміщених бензопіранонів для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями, та нових тризаміщених бензопіранонів та їхніх фізіологічно прийнятних солей. Заявлений винахід, крім того, стосується рослинних екстрактів, медикаментів, продуктів дієтичного харчування та фармацевтичних препаратів.

Вільні радикали - атоми або молекули, які мають неспарений електрон на їх зовнішній орбіталі. Для біологічних процесів найважливішими вільними радикалами є молекулярний кисень, здатний при відновленні утворювати різноманітні метаболіти. Ці метаболіти, звичайно, узагальнюють під сукупним терміном "активні види кисню" (ABK). Приклади ABK охоплюють супероксид-аніон, гідроксильний радикал, гідроген пероксид, пероксид-аніон, синглетний кисень, гіпохлорид, оксид нітрогену та пероксонітрид.

ABK спонтанно утворюються в різних біологічних процесах. Особливо важливим є так званий "респіраторний розрив" лейкоцитів, де після стимулювання клітин мікроорганізмами, ксенобіотиками або ендогенними субстанціями утворюються супероксид-радикал та інші ABK як продукти реакції активування молекулярного кисню мембранною NADPH-оксидазою. Респіраторний розрив є одним із найважливіших механізмів раннього неспецифічного імунного захисту та переважно служить для знищення інфекційних збудників та новоутворених клітин. Крім того, ABK переважно генеруються втратою електронів у результаті недостатньо спряжених реакцій. Це відбувається, наприклад, у синтезі простагландинів та лейкотриєнів з арахідонової кислоти, протягом мітохондріального дихання, каталізованим ксантиноксидазою окисненням гіпоксантину в ішемічних станах або у процесі опосередкованої цитохромом P450 метаболізації ксенобіотиків.

Оскільки респіраторний розрив по суті є реакцією, потрібно для захисту від інфекцій, збільшене та безперервне утворення ABK, звичайно, є шкідливим тому, що окислювальна атака не є обмеженою щодо вторгнення мікроорганізмів, але також власна тканина організму піддається їх токсичному потенціалу. Це, зокрема, призводить до неінфекційних хвороб, як-то збільшення утворення ABK у процесі аутоімунної хвороби, при дегенеративних хворобах, протягом ішемії або при метаболізації фармацевтичних засобів. Небажана дія вільних радикалів та ABK базується на їхній взаємодії з нуклеїновими кислотами (наприклад, індукуванні розривів молекулярного ланцюгу ДНК),

білками (наприклад, денатурації, інактивації системи ферментів), вуглеводами (наприклад, деполімеризації гіалуронових кислот) та, зокрема, ліпідів (наприклад, перокиснення ліпідів, пошкодження мембран, утворенні прозапальних простагландинів та лейкотриєнів).

Після припущення приблизно 50 років тому, що активні види кисню (ABK) залучені у патогенез різних хвороб, тепер упевнено вважають, що ці молекули грають важливу роль у патогенезі численних хвороб, як-то цукрового діабету типу I та II, запальних хвороб (наприклад, ревматоїдного артрити, астми, виразкового коліту, псоріазу), бактеріальних та вірусних інфекцій (наприклад, грипу, СНІДу, вірусного гепатиту), атеросклерозу, ішемії, неврологічних хвороб (наприклад, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона та інших нейродегенеративних хвороб), катаракти, серпоподібної клітинної анемії та пухлинних хвороб, крім того, вони також є несуть спільну відповідність за процеси старіння (A. Bendich (1994) у: B. Frei (ed.) "Natural Antioxidants in Human Health and Disease", Academic Press, San Diego, p. 447; E. Peterhans (1997) J. Nutr. 127, 962 S; D. V. Parke (1999) у: T. K. Basu et al. (ed.) "Natural Antioxidants in Human Health", CAB International, p. 1).

Організм має різні системи захисту проти шкідливої дії вільних радикалів та ABK. Вони охоплюють вітаміни (наприклад, вітаміни E та C) та інші низькомолекулярні сполуки (наприклад, глутатіон, сечову кислоту), антиокиснювальні ферменти (наприклад, супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази), а також метал-зв'язувальні білки (наприклад, трансферин, церулоплазмін). Однак, власні антиокиснювальні системи організму часто є активними тільки протягом вихідної фази патологічного процесу тому, що збільшення концентрації ABK, яку утворено при розвитку патологічного процесу, набагато перевершує здатність механізмів ендогенного захисту.

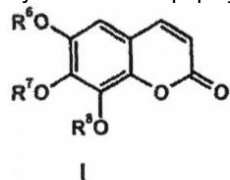
Тому вважають, що окиснювальний стрес створює диспропорцію між концентрацією ABK та системами антиокиснювального захисту. Таким чином, завдяки особливій важливості ABK відносно численних хвороб існує надзвичайна зацікавленість у субстанціях, що мають антиокиснювальні властивості, які можна застосовувати в профілактиці та лікуванні таких патологічних станів.

Оскільки ABK є особливо важливими для запальних реакцій, а окиснювальний стрес часто супроводжується збільшенням синтезом прозапальних ейкозаноїдів (наприклад, простагландинів, лейкотриєнів) та цитокінів (наприклад, IL-1, TNF- α , IL-6), зокрема, існує потреба в субстанціях, які ви-

являють антиокиснювальні властивості та, крім того, також попереджують утворення цих медіаторів запалення.

Заявлений винахід стосується сполук для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями.

Ця проблема вирішується застосуванням сполук загальної формули I,



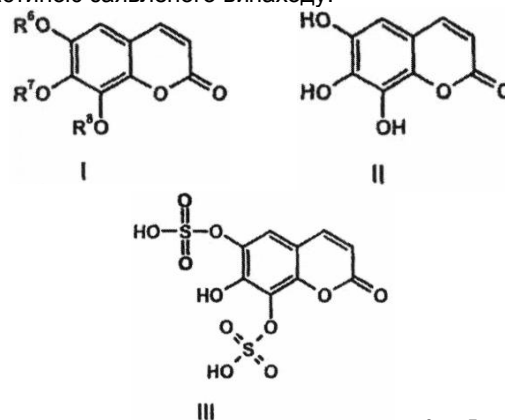
де радикали R^6 , R^7 та R^8 незалежно представляють H або SO_3H , та їх фізіологічно прийнятних солей для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями.

Несподівано виявлено, що 6,7,8-тригідрокси-2H-1-бензопіран-2-он (сполука II), зокрема, виявляє переважні фармакологічні властивості. На додаток до потужної антиокиснювальної дії ця сполука також інгібує синтез лейкотриєнів та простагландинів, а також синтез прозапальних цитокінів IL-1 β , TNF- α та IL-6. Таким чином, сполука II є по суті придатною для лікування або профілактики патологічних хвороб, супроводжуваних окиснювальним стресом, як-то цукрового діабету типу I та/або II, атеросклерозу та ендотеліальної дисфункції, ішемії, неврологічних хвороб (наприклад, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона та інших нейродегенеративних хвороб), катаракти та пухлинних хвороб. Однак, сполука II, зокрема, є переважною для патологічних хвороб, що мають запальну компоненту, як-то ревматоїдного артриту, астми, виразкового коліту, хвороби Крона, псоріазу, нейродерматиту та інфікування бактеріями, вірусами (наприклад, грипу, СНІД'у, вірусного гепатиту) та іншими патогенами (наприклад, паразитами, грибом та пріонами). Сполуку II вже описано у літературі (O.Kayser та H.Kolodziej, *Phytochemistry* 39, 1181-1185 (1995); S.Kumar, A.B.Ray, C.Konno, Y.Oshima та H.Hikino, *Phytochemistry* 27, 636-638 (1988); K.P.Latte, O.Kayser, N.Tan, M.Kaloga та H.Kolodziej, *Z.Naturforsch.* 55c, 528-533 (2000)), однак, фармакологічна дія сполуки II дотепер невідома. Сполука II міститься у *Pelargonium sidoides* тільки у концентрації 0,0004 % (Kayser et al.; Latte et al., зістав з вищезазначеним) та у *Pelargonium reniforme* тільки у концентрації 0,02% (Latte et al., зістав з вищезазначеним). З того можна зробити висновок, що сполука II, відповідно, у цих низьких концентраціях не забезпечує значний внесок у біологічну ефективність *Pelargonium sidoides* та *reniforme*.

Тому заявлений винахід полягає в застосуванні сполуки II для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями.

Також можна застосовувати сполуку II у формі етерів сульфатної кислоти загальної формули I внаслідок виділення сполуки II із цієї сполуки після

перорального застосування. Тому сполуки загальної формули I також є придатними для лікування або профілактики вищезгаданих патологічних станів. Переважними сполуками загальної формули I є 6,7-дигідрокси-8-сульфокси-2H-1-бензопіран-2-он ($R^6=R^7=H$; $R^8=SO_3H$) та 7,8-дигідрокси-6-сульфокси-2H-1-бензопіран-2-он ($R^6=R^8=H$; $R^7=SO_3H$). Особливо переважним є 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2H-1-бензопіран-2-он ($R^6=R^8=SO_3H$; $R^7=H$; сполука III). Сполуки загальної формули I, де принаймні один із радикалів R^6 , R^7 або R^8 представляє SO_3H , є новими. Тому, ці сполуки, та, зокрема, сполука III, а також їх застосування для лікування або профілактики патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями, також є частиною заявленого винаходу.



У загальній формулі I радикали R^6 , R^7 та R^8 незалежно представляють атом гідрогену або SO_3H . Сполуки загальної формули I, а також сполуки II та III також можуть бути у формі їх фізіологічно прийнятних солей лужного металу, лужноземельного металу та інших, наприклад, солей калію. Ці солі також є предметом заявленого винаходу.

Крім того, рослинні екстракти, зокрема, з видів пеларгонії, що містять одну або більше сполук загальної формули I, де принаймні один із залишків R^6 , R^7 та R^8 є SO_3H , та отримані з них фармацевтичні препарати, складають частину заявленого винаходу. Таким чином, ці екстракти, що мають концентрацію принаймні одної сполуки загальної формули I у складі сухої речовини рослинного екстракту 0,1%-10%, є переважними разом із тими, що мають концентрацію 0,5%-5%, які є особливо переважними. Склад сухої речовини відповідає сухому залишку згідно з Ph. Eur. (рідинних екстрактів), де аналіз також можна робити безпосередньо, наприклад, у рідинному екстракті та сухому залишку може бути визначеним розрахунком.

Отримання сполуки II можна здійснювати гідролізом та/або розщепленням етеру, наприклад, комерційно доступного фраксину або сполуки загальної формули I, де принаймні один із радикалів R^6 , R^7 та R^8 представляє SO_3H .

Отримання сполуки загальної формули I де принаймні один із радикалів R^6 , R^7 та R^8 представляє SO_3H , можна здійснювати реакцією сполуки II із комплексом сульфур триоксид-триметиламін, або у разі сполуки III - виділенням із придатного

рослинного матеріалу, наприклад, із сухих корінців *Pelargonium sidoides*. Сполуки 6,7-дигідрокси-8-сульфокси-2H-1-бензопіран-2-он (загальна формула I; $R^6=R^7=H$; $R^8=SO_3H$) та 7,8-дигідрокси-6-сульфокси-2H-1-бензопіран-2-он (загальна формула I; $R^7=R^8=H$; $R^6=SO_3H$) можна також отримувати частковим гідролізом сполуки III.

Згідно із заявленим винаходом екстракти можна отримувати зі змінним складом із рослин пеларгонії або їхніх частин відомими способами отримання, застосовуючи розчинники як-то воду, метанол, етанол, ацетон, тощо, та їх суміші при температурах від кімнатної температури до 60°C при перемішуванні від слабкого до енергійного, або перколяцією від 10 хвилин до 24 годин. Переважними екстракційними розчинниками є вода або суміші етанолу та води з відсотком води принаймні 50мас.%, особливо переважно - у співвідношенні етанол/вода 10/90-15/85 (масова частка). Згідно із заявленим винаходом подальші концентрати сполуки загальної формули I можна отримувати, як-то розподіленням у шарах рідина-рідина, застосовуючи, наприклад, 1-бутанол/воду або етилацетат/воду, адсорбцію-десорбцію, застосовуючи іонообмінники LH20, HP20 та інші смоли, або хроматографічне розділення, застосовуючи RP18, силікагель тощо. Якщо потрібно, подальшу обробку для отримання сухих екстрактів по суті роблять відомими способами видалення розчинника при збільшеній температурі та/або зменшеному тиску, або сушкою сублімацією. Згідно з Європейською Фармакопеею сухі екстракти, звичайно, мають сухий залишок принаймні 95мас.%.

Згідно із заявленим винаходом сполуки загальної формули I та екстракти, що містять принаймні одну із цих сполук, відповідно, переважно можна застосовувати перорально у формі порошків, гранул, таблеток, драже, капсул, або як розчин.

Дозування є ефективним при застосуванні 0,1мг-250мг на добу, переважно 0,3мг-50мг на добу одної або більше сполук загальної формули I.

Для отримання таблеток принаймні одну сполуку загальної формули I або відповідний екстракт змішують із придатними фармацевтично прийнятними ад'ювантами, як-то лактозою, целюлозою, діоксидом силіцію, кроскармелозою та магній стеаратом та пресують у таблетки, котрі, як варіант, забезпечені придатним покриттям, наприклад, зробленим із гідроксиметилпропілцелюлози, поліетиленгліколю, барвниками (наприклад, титан оксидом, ферум оксидом) та тальком.

У випадку патологічних станів, асоційованих з окиснювальним стресом та/або запальними реакціями, ефективність сполуки II підтверджується наступними описаними експериментами.

Антиокиснювальні властивості:

Автоокиснення ліпідів асоційовано з випромінюванням світла. Визначення цієї надзвичайно слабкої хемілюмінесценції можна застосовувати для визначення пероксидів та розрахунку ефективності оксидантів. У цих дослідженнях використовували тканину мозку самців мишей (NMRI; 20-30г; Centre d'Elevage Janvier, Le Genest-Saint Isle, France) як багату ліпідами тканину. Після видалення мозок промивали холодним льодяним бу-

ферованим фосфатом фізіологічним розчином (БФФР, pH=7,4) та звільняли від мозкових оболонок та залишкової крові. Зразки тканин гомогенізували 4-кратним об'ємом (об'єм до маси) БФФР, та центрифугували при 1000×g, 4°C протягом 10 хвилин. Надосадкові рідини одразу розбавляли тим самим буфером до 3-кратного об'єму та зберігали на льоду. 250мкл розбавленого надосадкової рідини переносили в тест-пробірку та інкубували протягом 10 хвилин при 37°C у 6-канальному люменометрі (Multi-Biolumat LB 9505 C, Berthold, Bad Wildbad). Після додавання 25мкл сполуки II у БФФР із 2,5% ДМСО інкубацію продовжували протягом подальших 10 хвилин. Тоді визначали інтенсивність хемілюмінесценції (CL) протягом 60 хвилин. Відсоток інгібування автоокиснення розраховували у порівнянні з виміряним одночасно контрольним розчинником (БФФР з 2,5% ДМСО). Сполука II інгібує автоокиснення ліпідів із чудовою потужністю при концентрації напівмаксимального інгібування 53нг/мл (Фіг.1). На відміну від тролоксу, часто застосовуваного як еталонна речовина у визначеннях антиокиснювальної властивості, котрий показував концентрацію напівмаксимального інгібування тільки 1665нг/мл.

На Фіг. показано вплив сполуки II та тролоксу на автоокиснення ліпідів. Для трьох незалежних тестів встановлено відсоток інгібування пероксидування ліпідів порівняно з контролем розчинником (середнє значення ± СВ).

Інгібування синтезу прозапальних цитокінів:

Вплив сполуки II на синтез прозапальних цитокінів IL- β , TNF- α та IL-6 визначали застосуванням активованих перитонеальних макрофагів мишей. Для отримання активованих макрофагів інтраперитонеально вводили в самців мишей NMRI (Centre d'Elevage Janvier, Le Genest-Saint Isle, France) 3×10^9 вбитих бактерій *Corynebacterium parvum* (Changzhou Yanshen Co. Ltd., Changzhou, China) у 0,5мл БФФР. Через 6 діб черевну порожнину промивали 2,5мл збалансованого фізіологічного розчину Хенкса (ЗФРХ), вільного від кальцію та магнію, що додавали з 10 одиниць/мл гепарину. Клітини ресуспендували при концентрації 2×10^6 клітин/мл у повному середовищі RPMI, доповненому 10% сироваткою зародка теляти. У комірці 96-коміркових мікротитрувальних планшетів вводили відповідно 200мкмоль суспензії клітин. Після 2 годинного періоду інкубації видаляли клітини, що не прилипли, та клітинний газон, що залишився, промивали двічі культивативним середовищем (37°C). Макрофаги преінкубували протягом 30 хвилин зі сполукою II, а тоді індукували синтез прозапальних цитокінів додаванням 1мкг/мл ліпополісахариду *E. coli* (серотип 0127:B8, Sigma, Deisenhofen). Після інкубації протягом 24 годин (37°C, 5% CO₂ у повітрі) клітини руйнували заморожуванням та таненням протягом 3 разів, клітини надосадкових шарів виділяли та заморожували при -80°C до аналізу. Визначення концентрації цитокіну у надосадковому шарі клітин виконували за допомогою комерційних тест-комплектів (Duosets IL-1 β , TNF- α та IL-6, R&D, Wiesbaden) у відповідності із інструкціями виробника. Усі дослідження проводили 3 рази. Вплив сполуки II на си-

нтез цитокінів оцінювали у порівнянні з контролем розчинником (0,1% ДМСО у повному середовищі RPMI), що тестували одночасно. Як можна бачити нижче з таблиці 1, сполука II при концентрації

100мкг/мл давала значне інгібування синтезу всіх трьох вимірюваних цитокінів із дією на продукування IL-6, що відзначалася як найміцніша.

Таблиця 1

Вплив сполуки II на синтез прозапальних цитокінів у активованих перитонеальних макрофагах миші.

Показано середнє значення \pm СВ трьох паралельних тестів.

Дію сполуки II розраховували як відсоток зміни у порівнянні з контролем розчинником

Тест	IL- β		TNF- α		IL-6	
	пг/мл	Дія(%)	пг/мл	Дія (%)	пг/мл	Дія(%)
Контроль	3553 \pm 293		8393 \pm 923		31449 \pm 2201	
Сполука II 100 мкг/мл	430 \pm 65	-88*	6251 \pm 7	-26*	976 \pm 244	-97*
Сполука II 30мкг/мл	3356 \pm 87	-6	10189 \pm 1018	+21	22519 \pm 3153	-28*
Сполука II 10 м кг/мл	3789 \pm 72	+7	10050 \pm 462	+19	23078 \pm 3461	-27*

*можлива похибка $P < 0,05$, t-тест

Інгібування активності циклооксигенази та ліпоксигенази цільної крові людини:

Для досліджень застосовували гепаринізовану цільну кров людини. 100мкл цільної крові додавали в кожну комірку 96-коміркових мікротитрувальних планшетів. Окремі планшети застосовували для визначення активності циклооксигенази-1 (COX1) та ліпоксигенази (LO), а також для індукції циклооксигенази-2 (COX2).

Сполуку II розбавляли у мінімальному основному середовищі Дульбеко (МОСД) 1% розчином антибіотиків/антигрибкових засобів та 2ммоль L-глутаміну (Sigma, Deisenhofen), застосовуючи ДМСО (кінцева концентрація - 0,1%) як промотор розчинності. Після додавання 50 мкл сполуки II тести інкубували протягом 60 хвилин при 37°C. Для стимулювання синтезу ейкозаноїду послідовно додавали 50мкл кальцій-іонофору A23187 (кінцева концентрація 50мкмоль) Після інкубації протягом наступних 30 хвилин при 37°C мікротитрувальні планшети центрифугували протягом 5 хвилин при 4°C та 150g. Плазму відбирали піпеткою та заморожували при -80 °C до аналізу.

Для перевірки активності COX2 зразки крові (100 мкл/комірку) спочатку для інактивації COX1

обробляли аспірином (50мкл у МОСД, кінцева концентрація 12мкг/мл) протягом 6 годин при 37°C. Тоді сполуку II та розчинник (МОСД з 0,1% ДМСО), відповідно додавали в об'ємі 25 мкл. Крім того, для індукції експресії COX2 додавали 25мкл ліпополісахариду E.coli (серотип 0127:B8, кінцева концентрація 10мкг/мл). Після інкубації протягом 18 годин при 37 °C отримували плазму, як описано вище, і також зберігали при -80 °C до аналізу.

У зразках плазми визначали TXB₂, PGE₂ та цистеніллейкотриєни (цистеніл-LT) як параметри активності COX1, COX2 та LO. Для аналізу комерційні тест-комплекти EIA (TXB₂ та PGE₂: Caymann/IBL, Hamburg; цистеніллейкотриєни: CAST-2000, Milenia, Bad Nauheim) застосовували згідно із інструкціями виробника. З результатів зрозуміло (зістав з таблицею 2), що сполука II дає потужне інгібування активності COX2 та LO. Із другого боку вплив на активність COX1 поганий. Цей спектр ефективності вважають надзвичайно переважним внаслідок того, що в терапевтичному застосуванні сполуки II не розглядали побічну дію звичайних інгібіторів COX1 внаслідок інгібування агрегації тромбоцитів, як-то шлунково-кишкові ускладнення (ерозії, виразки) або кровотечі.

Таблиця 2

Вплив сполуки II на синтез цистенілу-LT, TXB₂ та PGE₂ у цільній крові людини.

Показано середнє значення \pm СВ двох паралельних тестів.

Дію сполуки II розраховували як відсоток зміни у порівнянні з контролем розчинником

Тест	Цистеніл-LT		TXB ₂		PGE ₂	
	пг/мл	Дія(%)	пг/мл	Дія(%)	пг/мл	Дія(%)
Контроль	7227 \pm 612		9777 \pm 1389		10773 \pm 944	
Сполука II 100мкг/мл	661 \pm 520	-91	9115 \pm 244	-7	2232 \pm 68	-79
Сполука II 30мкг/мл	2089 \pm 90	-71	9993 \pm 6658	+2	2626 \pm 503	-76
Сполука II 10мкг/мл	3557 \pm 86	-51	7825 \pm 881	-20	3679 \pm 41	-66
Сполука II 3мкг/мл	5193 \pm 542	-28	7278 \pm 430	-26	5499 \pm 86	-49

Приклад 1: Отримання 6,7,8-тригідрокси-2Н-1-бензопіран-2-ону (Сполука II)

20г (42,7ммоль) 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2Н-1-бензопіран-2-онієвої солі калію перемішували

ли у 480 мл приблизно 2 Н гідрохлоридної кислоти протягом 20 годин при 40-50°C. Після охолодження осаджений сирий продукт відфільтровували та перекристалізовували з води (гаряче фільтрування). Кристалізатор відфільтровували, промивали та сушили у вакуумі при 100°C: 5,9г (71%), точка плавлення: початок розкладу при 260°C; ^1H та ^{13}C ЯМР узгоджуються з показниками О.Кайсер та Н.Колодziej (Phytochemistry 39,1181-1185(1995)).

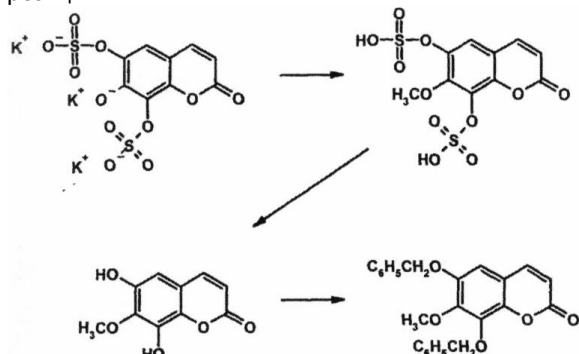
Приклад 2: Виділення та визначення структури 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2Н-1-бензопіран-2-онієвої солі калію (сіль калію сполуки III)

15кг корінців *Pelargonium sidoides* просочували двічі при кімнатній температурі 75л та 40л води, відповідно. Водний екстракт концентрували приблизно до 1/3, туди додавали 7кг амоній сульфату та його екстрагували декілька разів сумішшю 3/2 2-бутанолу/етанолу. Органічні фази поєднували та концентрували випарюванням.

Цей залишок хроматографували на колонці HP20 (елюент: вода). Фракції 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2Н-1-бензопіран-2-ону концентрували, доводили рН до 8, застосовуючи розчин калій гідроксиду, та розбавляли етанолом у співвідношенні 1/1. Осад відфільтровували та суспендували у воді. Доводили рН до 1,0,7 розчином калій гідроксиду та розбавляли етанолом у співвідношенні 1/1. Отриманий у результаті осад перерозчиняли у гарячій воді. Гарячий розчин фільтрували та розбавляли етанолом у співвідношенні 1/1. Осаджений кристалізатор відфільтровували, промивали та сушили у вакуумі при 50°C: 27,6г (0,14% відносно рослинного матеріалу, розраховано стосовно вільної кислоти).

Точка плавлення: початок розкладу при 216°C; $\text{C}_9\text{H}_3\text{K}_3\text{O}_{11}\text{S}_2$ (468,55) знайдено: С 23,08%, Н 0,70%, К 24,65%, S 13,9% - розраховано: С 23,07%, Н 0,65%, К 25,04%, О 37,56%, S 13,69%; ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8=7,62 (d, J=9,1 Гц, Н-4), 7,03 (с, Н-5), 5,59 (d, J=9,1Гц, Н-3); ^{13}C ЯМР ($\text{fMCO}-d_6$): 5 = 162,9 (C-7), 161,9 (C-2), 147,7 (C-8), 145,1 (C-4), 142,2 (C-6), 13,04 (C-8a), 115,5 (C-5), 102,4 (C-3), 101,5 (C-4a).

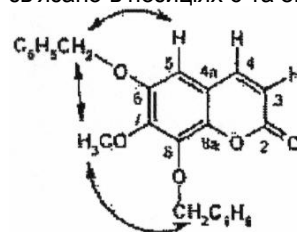
Кислотний гідроліз калій тригідроксилкумарин-дисульфату призводить до 6,7,8-тригідроксилкумарину (зістав із Прикладом 1). Для подальшого визначення структури сполуки III дериватизували згідно з наступною послідовністю реакцій:



Для цього калій 7-метилетер-тригідроксилкумариндисульфат реагував із метилйодидом у присутності калій карбонату при

60°C у ДМФ. Після підкислення концентрованою гідрохлоридною кислотою реакційну суміш перемішували протягом 24 годин при 50°C, екстрагували етилацетатом та хроматографували через силікагель (елюент: гептан / етилацетат 7/3): 6,8-дигідрокси-7-метоксикумарин. Ця сполука реагувала з бензилбромідом у присутності калій карбонату та калій йодиду у ДМФ при кімнатній температурі. Суміш концентрували та залишок розподіляли між водою та TBME. Органічну фазу концентрували та хроматографували через силікагель (елюент: толуол/етанол 95/5): 6,8-дигідрокси-7-метоксикумарин.

Характер заміщення останньої сполуки визначали методами одномірної та двомірної спектроскопії ЯМР у CDCl_3 . Чітка кореляція NOESY між Н-5 та одним із сигналів CH_2 дозволяла зробити однозначний висновок про залишок бензилокси у 6 позиції. Крім того, сигнал OCH_3 корелює з обома сигналами CH_2 , показуючи, що метоксил розташовано між двома залишками бензилокси, тобто у 7-позиції. Кореляції HMBC між C-7 та Н-5, а також OCH_3 , а також між C-8 та Н-4, а також 8- CH_2 , підтверджують тип заміщення, прийнятий від NOESY. З послідовності отримання досліджуваних похідних та їхньої структури, зрозуміло, що сульфоксидові радикали тригідроксилкумарин-дисульфату зв'язано в позиціях 6 та 8.



Приклад 3: Рослинний екстракт із вмістом 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2Н-1-бензопіран-2-ону (Сполука III)

500г корінців *Pelargonium sidoides* екстрагували 3кг води протягом 4 годин при кімнатній температурі. Екстрагований рослинний матеріал відфільтровували та знов екстрагували 2кг води, як вище зазначено, та фільтрували. Фільтрати поєднували, концентрували приблизно при 35°C та сушили сублімацією: 58,7г (11,7%) сухого екстракту з вмістом сполуки III 1,54%.

Приклад 4: Рослинний екстракт із вмістом 6,8-біс(сульфокси)-7-гідрокси-2Н-1-бензопіран-2-ону (Сполука III)

Приблизно 1,25кг корінців *Pelargonium sidoides* екстрагували приблизно 12,5кг етанолу / води 11/89 (масова частка) при кімнатній температурі. Після фільтрування фільтрат концентрували приблизно при 45°C та сушили сублімацією: 9,04г (7,2%) сухого екстракту з вмістом сполуки III 1,86%.

Приклад 5: Таблетки

Для отримання таблеток, що містять 5-250мг активного інгредієнту залежно від бажаної ефективності потрібно:

Сполуки II 200-5000г

Порошку целюлози 2000г

Кукурудзяного крохмалю 1200г

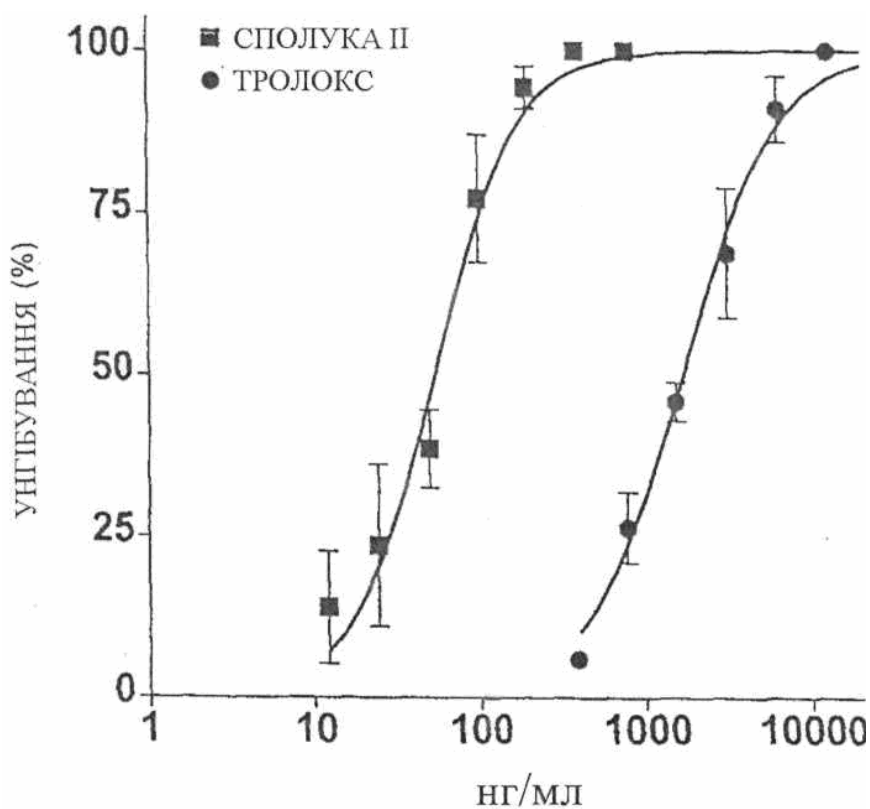
Колоїдної силікатної кислоти 80г

Магній стеарату 20г

Лактози до 10000г

Активним інгредієнтом, як варіант, є головний, гомогенно змішаний з ад'ювантами та відповідно запресований звичайним шляхом у таблетки, що

мають масу 250мг та діаметр 9мм. При дозах, що перевищують 125мг, відповідно запресовують у таблетки, що мають масу 500мг та діаметр 11мм. Якщо потрібно, таблетки забезпечують покриттям плівкою.



Фіг.