

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047210**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.20

(21) Номер заявки
202091205

(22) Дата подачи заявки
2018.12.26

(51) Int. Cl. *C12N 15/81* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И СОПУТСТВУЮЩИХ СОСТОЯНИЙ**

(31) **62/610,565**

(32) **2017.12.27**

(33) **US**

(43) **2020.12.14**

(86) **PCT/US2018/067480**

(87) **WO 2019/133588 2019.07.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САМИ ЛАБС ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
**Маджид Мухаммед, Нагабхушанам
Кальянам (US), Мундкур Лакшми
(IN)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(56) **US-A1-20160213727
US-A1-20110076346
WO-A2-2005009332**

(57) Раскрыт способ терапевтического лечения гипергликемии у млекопитающих с использованием композиций, содержащих тимогидрохинон. Более конкретно, изобретение раскрывает композиции, содержащие тимогидрохинон, для ингибирования активности фермента α -глюкозидазы и увеличения клеточного поглощения глюкозы клетками млекопитающих. Также в изобретении раскрыты антиоксидантные, противовоспалительные и антигликирующие эффекты тимогидрохинона.

047210

B1

047210
B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящее изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке США №. 62610565, поданной 27 декабря 2017 г., подробности которой включены в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Область техники

Настоящее изобретение относится к терапевтическому лечению гипергликемии у млекопитающих. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим тимогидрохинон, и их терапевтическим возможностям в терапии гипергликемии и связанных с ней состояний.

Описание уровня техники

Гипергликемия - это состояние, при котором уровень глюкозы в крови остается повышенным. Хроническая гипергликемия, если ее не лечить, может вызвать вторичные осложнения, которые приводят к развитию многих заболеваний, таких как диабет, ожирение, гиперлипидемия, гиперлипидемия, сердечно-сосудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные расстройства, аллергия, воспаление и остеопороз. Повышенный уровень глюкозы в крови увеличивает выработку активных форм кислорода/азота и провоспалительных цитокинов, тем самым вызывая окислительный стресс и воспаление. Повышенные уровни глюкозы еще больше увеличивают неферментативное гликозилирование белков и других биомолекул (гликирование), что приводит к производству конечных продуктов гликирования (AGE), которые, как сообщается, являются основной причиной старения клеток. AGE также являются примером клеточного воспалительного каскада, приводящего к прогрессирующему ухудшению и апоптозу.

Применяемые в настоящее время лекарственные средства (например, метформин) эффективны для контроля уровня глюкозы в крови. Непрерывное потребление этих синтетических лекарственных средств вызывает множество побочных эффектов, которые включают гепатотоксичность и нефротоксичность. Таким образом, для контроля уровня глюкозы в крови требуется более безопасная и эффективная природная молекула на растительной основе.

Способы лечения, которые в настоящее время используются при лечении гипергликемии, включают введение ингибиторов против ключевых ферментов, которые регулируют расщепление углеводов и увеличивают поглощение глюкозы. В этом аспекте ингибиторы глюкозидазы имеют особое значение (Kim et al., Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology, 2013;42:223-227). α -Глюкозидаза необходима для расщепления гликогена до глюкозы. Она действует на сложные молекулы углеводов, образуя моносахаридные блоки, которые легко всасываются в кровоток. Ингибирование α -глюкозидазы приводит к уменьшению высвобождения глюкозы в кровоток, тем самым уменьшая состояние гипергликемии.

Существует много растительных ингибирующих молекул для α -глюкозидазы, которые обсуждаются в следующих документах уровня техники:

- 1) Thilagam et al., α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of *Senna surattensis*, Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2013; 6(1):24-30;
- 2) Poongunran et al., α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activities of Nine Sri Lankan Antidiabetic Plants, British Journal of Pharmaceutical Research, 2015;7(5): 365-374;
- 3) Kim et al., Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology, 2013;42:223-227.

Однако растительная молекула, которая эффективно ингибирует α -глюкозидазу и увеличивает поглощение глюкозы, необходима для эффективного лечения гипергликемии и связанных с ней состояний.

Nigella sativa хорошо известна благодаря своим многочисленным терапевтическим свойствам в системах медицины Аюрведа, Унани и Сиддхи. Сообщается, что это растение содержит много активных молекул, таких как тимохинон, тимогидрохинон, дитимохинон, п-цимен, карвакрол, 4-терпинеол, т-анетол, сесквитерпен лонгифолен, α -пинен, тимол, α -гедерин и гедерагенин (Ahmad et al., A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb, Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3 (5): 337-352), которые отвечают за благотворное воздействие растения. Некоторые из терапевтических эффектов *Nigella sativa* перечислены в следующих документах уровня техники:

- 1) Alimohammadi et al., Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: an experimental study with histopathological evaluation, Diagn Pathol. 2013; 8: 137;
- 2) Sultana et al., *Nigella sativa*: Monograph, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2015; 4 (4): 103-106;
- 3) Randhwa and Alghamdi, Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) - a review, Am J Chin Med. 2011; 39 (6): 1075-91;
- 4) Mahmood et al., *Nigella Sativa* as an Antiglycating Agent for Human Serum Albumin, International Journal of Scientific research, 2013;2(4):25-27;
- 5) Sobhi et al., Effect of lipid extracts of *Nigella sativa* L. seeds on the liver ATP reduction and alpha-glucosidase inhibition, Pak J Pharm Sci., 2016;29(1): 111-117;

6) Awasthi S, Understanding the mechanism of antidiabetic activity and efficacy of functional foods against advanced glycation end products: *Nigella sativa* and *Moringa oleifera*, *Planta Med*, 2013; 79 - PN8.

Большинство известных биологических эффектов *Nigella sativa* относится либо к целому экстракту, либо конкретно к тимохинону. Сообщения о биологических эффектах тимогидрохинона, особенно в отношении лечения гипергликемии, отсутствуют. Хотя тимогидрохинон является восстановленной формой тимохинона, он отличается как структурно, так и функционально. Таким образом, настоящее изобретение раскрывает новые и неочевидные композиции, обогащенные тимогидрохиноном, для лечения гипергликемии и связанных с ней нарушений.

Основным объектом изобретения является способ ингибирования активности α -глюкозидазы с использованием композиции, содержащей тимогидрохинон.

Другим объектом изобретения является способ увеличения поглощения глюкозы клетками млекопитающих путем введения композиции, содержащей тимогидрохинон.

Еще одним объектом изобретения является способ терапевтического лечения гипергликемии и связанных с ней нарушений у млекопитающих с использованием композиции, содержащей тимогидрохинон.

Настоящее изобретение решает вышеупомянутые задачи и обеспечивает дополнительные связанные преимущества.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым композициям, содержащим тимогидрохинон. Конкретно, изобретение относится к композициям, содержащим тимогидрохинон, для ингибирования активности фермента α -глюкозидазы. Изобретение также относится к применению композиций, содержащих тимогидрохинон, для увеличения клеточного поглощения глюкозы клетками млекопитающих. Более конкретно, изобретение относится к способу терапевтического лечения гипергликемии у млекопитающих с использованием композиций, содержащих тимогидрохинон. Также в данном документе раскрыты антиоксидантные, противовоспалительные и антигликирующие эффекты тимогидрохинона.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего более подробного описания изобретения, рассматриваемого в сочетании с сопроводительными графическими материалами, иллюстрирующими, в качестве примера, принцип изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1a и 1b показано графическое представление ингибирующей активности тимохинона (TQ), тимогидрохинона (THQ) и композиции, содержащей тимогидрохинон, в отношении α -глюкозидазы.

Фиг. 2 представляет собой графическое представление, показывающее процент поглощения глюкозы адипоцитами и митохондриями, обработанными тимохиноном (TQ), тимогидрохиноном (THQ) и композицией, содержащей тимогидрохинон.

На фиг. 3 показаны характерные гистограммы поглощения глюкозы клетками млекопитающих, обработанных инсулином (3a), тимохиноном (TQ) (3b), тимогидрохиноном (THQ) (3c) и композицией, содержащей тимогидрохинон (3d). Необработанная клетка служит контрольной группой (3e).

На фиг. 4 показано графическое представление активности тимохинона (TQ) (4a), тимогидрохинона (THQ) (4b) и композиции, содержащей тимогидрохинон, (4c) в отношении захвата DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил).

На фиг. 5 показано графическое представление активности захвата DPPH, и композиций, ингибирующих активность глюкозидазы, с увеличением процентного содержания тимогидрохинона. Увеличение содержания тимогидрохинона напрямую связано с увеличением биологической активности.

На фиг. 6 показано графическое представление активности композиций в отношении захвата DPPH, и композиций, ингибирующих активность глюкозидазы, с увеличением процентного содержания тимохинона. Увеличение содержания тимохинона обратно коррелирует с увеличением биологической активности.

Описание наиболее предпочтительных вариантов осуществления изобретения

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования фермента глюкозидазы, причем указанный способ включает стадии:

- i) приведения в контакт фермента глюкозидазы с паранитрофенил- α -d-глюкопиранозидным субстратом;
- ii) инкубирования с эффективными дозами тимогидрохинона или композиции, содержащей тимогидрохинон, в оптимальных условиях;
- iii) считывания изменения поглощения с использованием спектрофотометрического и флуориметрического методов;
- iv) сравнения поглощения с контрольным образцом и определения процента ингибирования фермента (IC_{50}) тимогидрохиноном или композицией, содержащей тимогидрохинон, с использованием формулы:

$$\% \text{ ингибирования} = \left[\frac{\text{поглощение контроля} - \text{поглощение ингибитора}}{\text{поглощение контроля}} \right] \times 100.$$

В связанном варианте осуществления композиция содержит приблизительно 0,1-5 мас./мас.% тимо-

хинона, приблизительно 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, приблизительно 20-95 мас./мас.% жирных кислот, приблизительно 0,001-3 мас./мас.% α -гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% стабилизатора и 0,2-2 мас./мас.% усилителя биодоступности. В другом связанном варианте осуществления стабилизатор выбран из группы, включающей розмариновую кислоту, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, метабисульфит натрия, пропилгаллат, цистеин, аскорбиновую кислоту и токоферолы. В еще одном связанном варианте осуществления усилитель биодоступности выбран из группы, включающей пиперин, кверцетин, экстракт чеснока, экстракт имбиря и нарингин.

В другом наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу увеличения поглощения глюкозы клетками млекопитающих, причем указанный способ включает стадии приведения в контакт клеток млекопитающих с эффективной дозой тимогидрохинона или композиции, содержащей тимогидрохинон, для увеличения поглощения глюкозы клетками. В связанном варианте осуществления композиция содержит приблизительно 0,1-5 мас./мас.% тимохинона, приблизительно 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, приблизительно 20-95 мас./мас.% жирных кислот, приблизительно 0,001-3 мас./мас.% α -гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% стабилизатора и 0,2-2 мас./мас.% усилителя биодоступности. В другом связанном варианте осуществления стабилизатор выбран из группы, включающей розмариновую кислоту, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, метабисульфит натрия, пропилгаллат, цистеин, аскорбиновую кислоту и токоферолы. В еще одном связанном варианте осуществления усилитель биодоступности выбран из группы, включающей пиперин, кверцетин, экстракт чеснока, экстракт имбиря и нарингин. В другом связанном варианте осуществления клетки млекопитающих являются клетками человека.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу терапевтического лечения гипергликемии и связанных состояний у млекопитающих, причем указанный способ включает этапы введения эффективной дозы тимогидрохинона или композиции, содержащей тимогидрохинон, для снижения уровней глюкозы в крови. В связанном варианте осуществления терапия гипергликемии и связанных состояний достигается путем снижения поглощения глюкозы путем ингибирования фермента глюкозидазы, увеличения клеточного поглощения глюкозы, уменьшения содержания свободных радикалов, уменьшения воспаления и уменьшения гликирования. В другом связанном варианте осуществления состояния, связанные с гипергликемией, присутствуют при патологических состояниях, выбранных из группы, включающей диабет, ожирение, гиперлиппротеинемия, гиперлипидемию, сердечнососудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аллергию, воспаление и остеопороз. В связанном варианте осуществления композиция содержит приблизительно 0,1-5 мас./мас.% тимохинона, приблизительно 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, приблизительно 20-95 мас./мас.% жирных кислот, приблизительно 0,001-3 мас./мас.% α -гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% стабилизатора и 0,2-2 мас./мас.% усилителя биодоступности. В другом связанном варианте осуществления стабилизатор выбран из группы, включающей розмариновую кислоту, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, метабисульфит натрия, пропилгаллат, цистеин, аскорбиновую кислоту и токоферолы. В еще одном связанном варианте осуществления усилитель биодоступности выбран из группы пиперина, кверцетина, экстракта чеснока, экстракта имбиря и нарингина. В другом связанном варианте осуществления клетки млекопитающих являются клетками человека. В другом связанном варианте осуществления композиции составляют с фармацевтически/нутрицевтически приемлемыми вспомогательными веществами, адьювантами, разбавителями или носителями и вводят перорально в форме таблеток, капсул, гелевых капсул, сиропов, жевательных конфет, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных таблеток, конфет или пищевых продуктов.

Вышеупомянутые наиболее предпочтительные варианты осуществления, включающие технические признаки и технические эффекты настоящего изобретения, поясняются посредством иллюстративных примеров, приведенных ниже.

Пример 1. Ингибирование глюкозидазы.

Для ингибирования глюкозидазы α -глюкозидазу (код G5003; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) растворяли в 67 мМ калий-фосфатном буфере с pH 6,8, содержащем 8, содержащем 0,2 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich) и 0,02 % азида натрия (Sigma-Aldrich), который использовали в качестве источника фермента. В качестве субстрата использовали паранитрофенил- α -D-глюкопиранозид (Sigma-Aldrich). Тимохинон, тимогидрохинон и композицию, содержащую тимогидрохинон, взвешивали, готовили в концентрации 63, 125, 250 и 500 мкг/мл и готовили с равными объемами дистиллированной воды. 50 мкл указанной композиции инкубировали в течение 5 мин с 50 мкл источника фермента (0,15 ед./мл). После инкубации добавляли 50 мкл субстрата (1,25 мМ) и дополнительно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряли при 405 нм на считывающем устройстве для микропланшетов (BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader) до добавления субстрата и после добавления субстрата. Было получено увеличение поглощения при добавлении субстрата. Каждый тест проводили три раза, и среднее значение поглощения использовали для расчета процента ингибирования α -глюкозидазы. Акарбозу использовали в качестве положительного контроля в различных концентрациях. Ингибирующая активность при разных концентрациях указанной композиции была выражена как 100

минус разница поглощения (%) указанной композиции относительно изменения поглощения отрицательного контроля (то есть воды, используемой в качестве тестового раствора). Измерения провели три раза и было определено значение IC_{50} (то есть концентрация указанной композиции, которая приводит к 50% ингибированию максимальной активности).

Тимогидрохинон (IC_{50} 71,9 мкг/мл) и композиция, содержащая тимогидрохинон (IC_{50} 150,9 мкг/мл), показали эффективное ингибирование α -глюкозидазы по сравнению с тимохиноном (IC_{50} 407,6 мкг/мл) (фиг. 1a и 1b).

Пример 2. Увеличение поглощения глюкозы.

Клеточные линии скелетных мышц миобластов C2C12 (полученных в ATCC) хранили в DMEM (среда, модифицированная по способу Дульбекко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки при 37°C и 5 % CO_2 . Двадцать тысяч клеток на лунку высевали в 24-луночный планшет. Когда клетки достигли 80-90% слияния, дифференцировку индуцировали путем замены ростовой среды на DMEM, содержащую 1% лошадиную сыворотку. Эксперименты проводили в полностью дифференцированных микротрубочках C2C12 через 4-5 дней в среде дифференцировки. Затем клетки обрабатывали 0,5% БСА (бычий сывороточный альбумин) в среде с низким содержанием глюкозы в течение 16 ч и промывали холодным фосфатным буфером Кребса-Рингера без глюкозы. Затем клетки обрабатывали различными нецитотоксическими концентрациями образцов в среде DMEM с низким содержанием глюкозы с или без инсулина в концентрации 0,1 мкМ в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки промывали холодным PBS и окрашивали 5 мкМ флуоресцентного аналога D-глюкозы, 2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)амино]-2-дезоксид-Д-глюкоза (2-NBDG), в течение 15 мин в темноте с последующей детекцией флуоресценции, продуцируемой клетками, с помощью проточной цитометрии.

Тимогидрохинон и композиция, содержащая тимогидрохинон, показали повышенное поглощение глюкозы в адипоцитах и мышечных клетках по сравнению с тимохиноном (фиг. 2a и 2b).

Пример 3. Антиоксидантная активность тимогидрохинона.

Антиоксидантные свойства тимогидрохинона оценивали по активности захвата DPPH.

Хроническое повышение уровня сахара в крови приводит к образованию активных форм кислорода. Активные формы кислорода (АФК), включая супероксидные, гидроксильные, пероксильные и алкоксирадикалы, захватываются клеточными антиоксидантами, что поддерживает равновесие. Повреждения, вызванные АФК, вызывают раздражение кожи, воспаление, старение, рак и многие другие заболевания. Метод захвата свободных радикалов а,а-дифенил-Р-пикрилгидразила (DPPH) является одним из первых подходов к оценке антиоксидантного потенциала соединения.

Процедура.

DPPH является стабильным свободным радикалом в растворе метанола с поглощением при 520 нм. Если свободные радикалы захватываются молекулой антиоксиданта, полученный раствор выглядит желтым. Способность внеклеточного метаболита к донорству атомов водорода или электронов измеряли путем отбеливания окрашенного в фиолетовый цвет раствора DPPH в метаноле.

Тимохинон, тимогидрохинон и композиция, содержащая тимогидрохинон, были приготовлены в различных концентрациях. Для анализа захвата радикала DPPH 20 мкл испытуемого материала смешивали со 180 мкл DPPH в метаноле в 96-луночном планшете, следуя методу, описанному ранее (Clarke et al., 2013). Планшет выдерживали в темноте в течение 15 мин, после чего измеряли поглощение раствора при 540 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов (TECAN Ltd, Männedorf, Switzerland). Пустые растворы (DMCO, метанол) и стандарты (раствор Trolox в DMCO) регистрировали одновременно. Экстракты подвергали скринингу с различными концентрациями для установления концентрации ингибирования (IC_{50} , концентрация, снижающая поглощение DPPH на 50%).

Активность захвата свободных радикалов рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ активности захвата} = \frac{(B - C) - (S - C)}{(B - C)} \times 100$$

где: B - поглощение референсного раствора (OD (оптическая плотность) DPPH);

C - поглощение референсного пустого раствора (OD только метанола);

S - поглощение тестируемого раствора;

C - поглощение тестируемого пустого раствора.

Тимогидрохинон является мощным антиоксидантом с IC_{50} 1,78 мкг/мл (фиг. 4b). Композиция, содержащая тимогидрохинон, также демонстрировала превосходный антиоксидантный потенциал с IC_{50} 540,1 мкг/мл (фиг. 4c), что намного эффективнее тимохинона (фиг. 4a).

Пример 4. Противовоспалительная активность тимогидрохинона.

Хроническая гипергликемия усиливает клеточное воспаление, увеличивая выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α . Тимохинон, тимогидрохинон и композиция, содержащая тимогидрохинон, были протестированы на их противовоспалительную активность путем оценки их ингибирующей TNF- α активности.

Клетки: THP1 - моноциты человека, приобретенные в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA) и поддерживаемые в виде однослойной культуры в среде RPMI (Roswell Park

Memorial Institute medium) (RPMI Life technologies, CA, USA) с добавлением 10 % (об./об.) термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS; GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Life technologies) при 37°C в увлажненном 5 % CO₂-инкубаторе.

Реагенты и буферы: липополисахарид (LPS, Sigma Chemicals, США), физиологический раствор с фосфатным буфером, RPMI, FBS.

Набор ELISA: набор ELISA для TNF человека, Krishgen Biosciences, США.

Процедура.

Противовоспалительную активность исследовали с использованием клеточной линии моноцитов/макрофагов человека. ТНР-моноциты реагируют на липополисахариды (LPS) путем секреции провоспалительных цитокинов. Фактор некроза опухоли (TNF-α) является одним из основных цитокинов, который запускает каскад воспалительных реакций. Концентрацию TNF-α измеряли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Снижение концентрации TNF-α указывает на противовоспалительную активность соединения.

Клетки 1X105 ТНР-1 стимулировали 100 нг липополисахарида (LPS, 0,1 мкг/мл) для индукции секреции TNF-α. Клетки предварительно обрабатывали различными концентрациями тестируемых материалов (тимохинон, тимогидрохинон и композиция, содержащая тимогидрохинон) перед обработкой LPS. Супернатанты клеток собирали через 24 ч после обработки и секрецию TNF-α оценивали с помощью ELISA для цитокинов, как описано производителем. Нестимулированные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Предел обнаружения был меньше 1 пг/мл.

Результаты.

Результаты показали, что тимогидрохинон ингибировал TNF-α (табл. 1), что указывает на значительную противовоспалительную активность, не влияя на жизнеспособность клеток.

Таблица 1

Противовоспалительная активность тимогидрохинона

	Концентрация (мкг/мл)	Ингибирование (%)
Тимохинон	0,13	35
	0,06	31
	0,03	22
Тимогидрохинон	0,13	11,9
	0,06	4,5
	0,03	2,5
Композиция, содержащая тимогидрохинон	25	26,2
	12,5	19,8
	6,25	14,9

Пример 5. Антигликирующая активность тимогидрохинона.

Конечные продукты гликирования (AGE) генерируются неферментативным образованием аддукта между аминокетонами белков (преимущественно лизина и аргинина) и карбонильными группами восстанавливающего сахара, также известными как реакция Майяра. На ранних стадиях восстанавливающие сахара реагируют со свободными аминокетонами с образованием нестабильного альдиминового соединения, которое подвергается молекулярной перегруппировке с образованием стабильного продукта раннего гликирования, известного как продукт Amadori. На более поздних стадиях процесс гликирования посредством реакций окисления, дегидратации и циклизации приводит к образованию конечных продуктов гликирования, также известных как AGE. Известно, что различные структуры AGE, такие как Nε-(карбоксиметил)-лизин (CML), пирралин, пентозидин, связаны с дегенеративными нарушениями, включая старение, диабет, атеросклероз, болезнь Альцгеймера и почечную недостаточность.

Известно, что пентозидины накапливаются у пациентов с диабетом, а весперлизины обнаруживаются при катарактогенезе и диабетической ретинопатии. Агенты, которые могут предотвращать гликирование, могут эффективно использоваться для предотвращения вторичным осложнениям, связанным с гипергликемией. Тимохинон и тимогидрохинон были протестированы на их антигликирующее действие.

AGE могут быть как флуоресцентными, так и не флуоресцентными по своей природе. Обычно AGE типа весперлизина характеризуются возбуждением при 370 нм и эмиссией при 440 нм, в то время как AGE в виде пентозидина характеризуются возбуждением при 335 нм и эмиссией при 385 нм. Принцип основан на том факте, что рибозный сахар и бычий сывороточный альбумин смешиваются в определенном соотношении и инкубируются в течение 24 ч. Образующийся в результате реакции весперлизиноподобный AGE оценивали по увеличению флуоресценции, детектируемой при Ex/Em при 390/460 нм, и при Ex/Em при 320/405 нм для пентозидинов.

Материалы.

Рибоза, бычий сывороточный альбумин (БСА), 96-луночные черные планшеты для микротитрования.

Метод рибоза-БСА: 10 мкл различных концентраций образцов добавляли к 40 мкл БСА (исходный раствор 25 мг/мл) и 50 мкл D-рибозы (исходный раствор 150 мг/мл) добавляли в лунку черного 96-луночного микропланшета и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. БСА был взят в качестве контроля. Образующиеся AGE (конечные продукты гликирования) детектировали по флуоресценции при Ex/Em при 390/460 нм для весперлизина и при Ex/Em при 320/405 нм для пентозидина.

Результаты.

Ингибирование AGE весперлизина и пентозидина тимохиноном и тимогидрохиноном сведено в табл. 2.

Таблица 2

Концентрация (мкг/мл)	Процент ингибирования AGE тимогидрохиноном			
	% ингибирования весперлизина Ex/Em при 390/460 нм		% ингибирования пентозидина Ex/Em при 320/405 нм	
	TQ	THQ	TQ	THQ
250	56,69	60,42	61,80	89,31
125	44,54	52,28	44,57	68,33
62,5	40,81	43,83	0,06	49,55
31,25	38,55	34,06	23,59	28,73
15,63	0	23,03	0	5,39
IC ₅₀	157,80	108,30	142,70	65,89

Результаты показали, что тимогидрохинон является биологически более активной молекулой и проявляет повышенную биологическую активность по сравнению с тимохиноном.

Также оценивали биологические эффекты композиций с увеличенным процентным содержанием тимогидрохинона. В табл. 3 приведен перечень композиций с увеличенным содержанием тимогидрохинона.

Таблица 3

Композиции, содержащие тимогидрохинон		
Состав	% TQ	% THQ
1	0,643	0,029
2	0,620	0,093
3	0,558	0,120
4	0,450	0,250

Увеличение содержания тимогидрохинона в композициях коррелировало с более высоким уровнем захвата DPPH и ингибированием глюкозидазы (фиг. 5) по сравнению с тимохиноном, который не показал корреляции с биологической активностью (фиг. 6). Таким образом, тимогидрохинон может быть эффективно включен в составы для эффективного лечения различных заболеваний и расстройств, включая без ограничений гипергликемию, диабет, ожирение, гиперлипотеинемия, гиперлипидемию, сердечно-сосудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аллергию, воспаление и остеопороз.

Другие модификации и изменения изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и руководств. Таким образом, хотя в данном документе были конкретно описаны только некоторые варианты осуществления изобретения, будет очевидно, что в него могут быть внесены многочисленные модификации без отклонения от сущности и объема изобретения, и его следует интерпретировать только в сочетании с прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования фермента глюкозидазы, включающий стадию:

приведения в контакт фермента глюкозидазы с тимогидрохиноном или композицией, содержащей 0,1-5 мас./мас.% тимохинона, 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, 20-95 мас./мас.% жирных кислот, 0,001-3 мас./мас.% α-гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% розмариновой кислоты и 0,2-2 мас./мас.% пиперина.

2. Способ увеличения поглощения глюкозы клетками млекопитающих, включающий стадию приведения в контакт клеток млекопитающих с тимогидрохиноном или композицией, содержащей 0,1-5

мас./мас.% тимохинона, 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, 20-95 мас./мас.% жирных кислот, 0,001-3 мас./мас.% α -гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% розмариновой кислоты и 0,2-2 мас./мас.% пиперина.

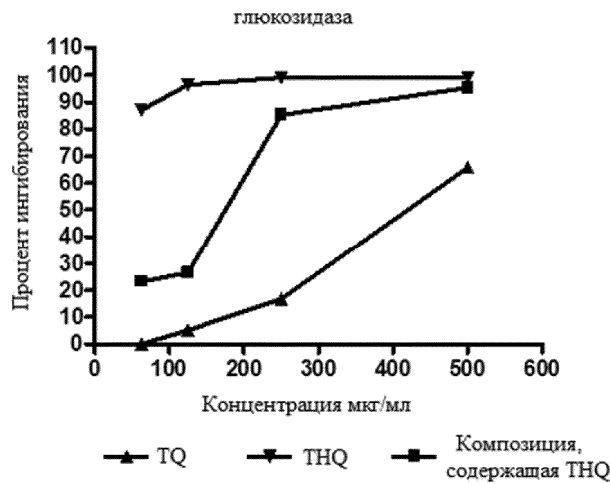
3. Способ терапевтического лечения гипергликемии и связанных состояний у млекопитающего, включающий стадию введения тимогидрохинона или композиции, содержащей 0,1-5 мас./мас.% тимохинона, 0,01-10 мас./мас.% тимогидрохинона, 20-95 мас./мас.% жирных кислот, 0,001-3 мас./мас.% α -гедерина или гедерагенина, 0,1-4,0 мас./мас.% розмариновой кислоты и 0,2-2 мас./мас.% пиперина, для снижения уровней глюкозы в крови.

4. Способ по п.3, где терапия гипергликемии и связанных состояний достигается путем снижения абсорбции глюкозы путем ингибирования фермента глюкозидазы, увеличения клеточного поглощения глюкозы, уменьшения свободных радикалов, уменьшения воспаления и уменьшения гликирования.

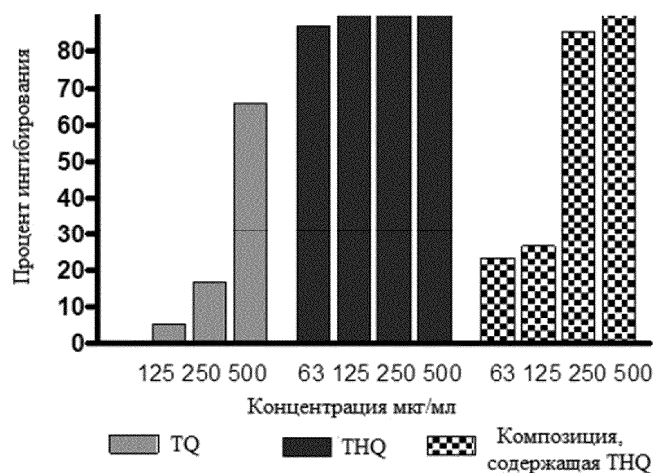
5. Способ по п.3, где состояния, связанные с гипергликемией, присутствуют при патологических состояниях, выбранных из группы, включающей диабет, ожирение, гиперлиппротеинемия, гиперлипидемию, сердечно-сосудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аллергию, воспаление и остеопороз.

6. Способ по п.3, где млекопитающее представляет собой человека.

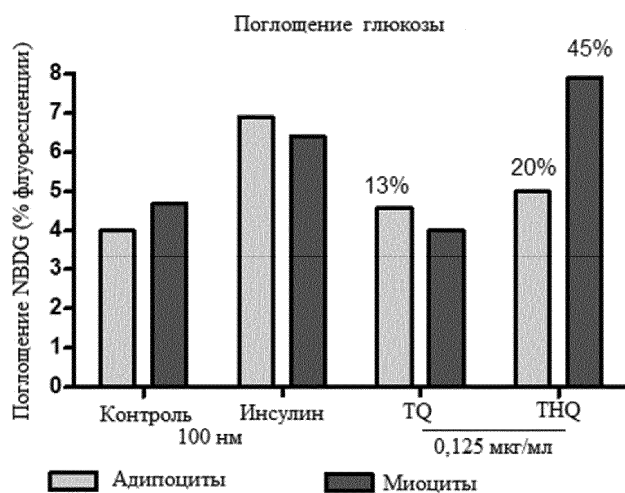
7. Способ по любому из пп.1-3, где композиция составлена с фармацевтически/нутрицевтически приемлемыми вспомогательными веществами, адъювантами, разбавителями или носителями и вводится перорально в форме таблеток, капсул, гелевых капсул, сиропов, жевательных конфет, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных таблеток, конфет или пищевых продуктов.



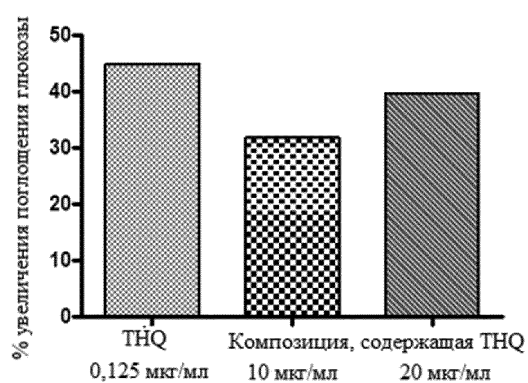
Фиг. 1a



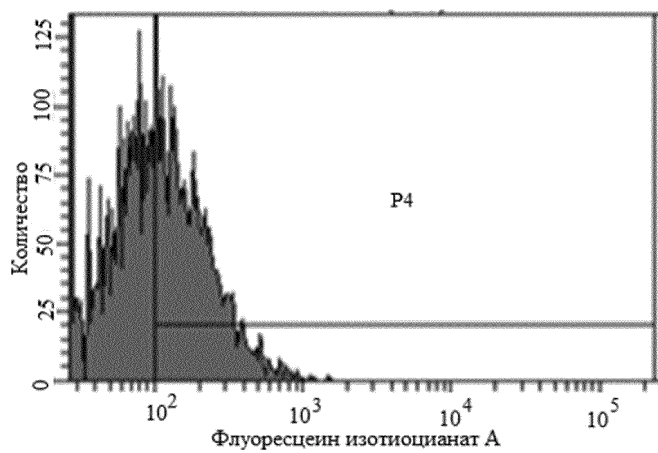
Фиг. 1b



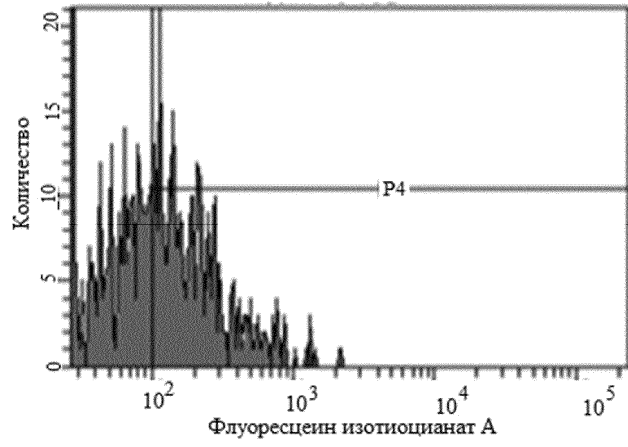
Фиг. 2а



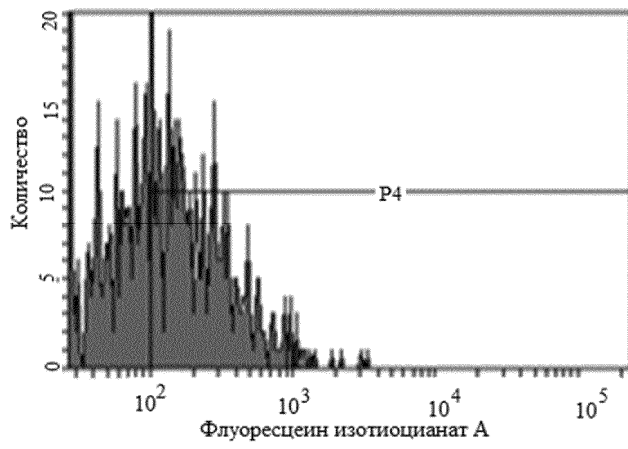
Фиг. 2b



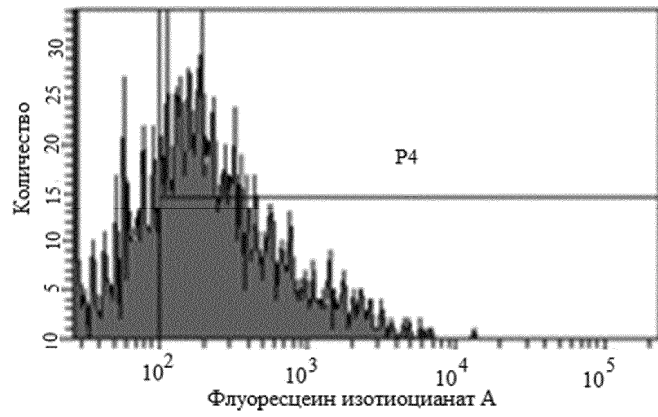
Фиг. 3а



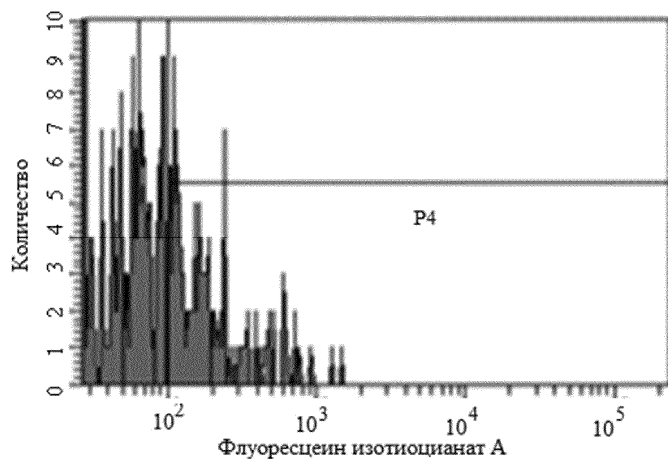
Фиг. 3b



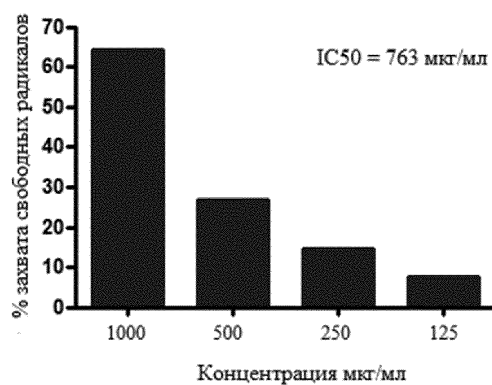
Фиг. 3c



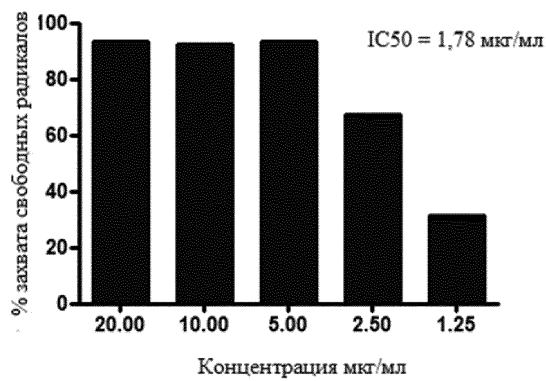
Фиг. 3d



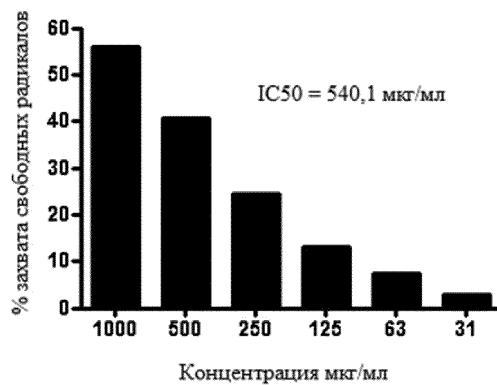
Фиг. 3е



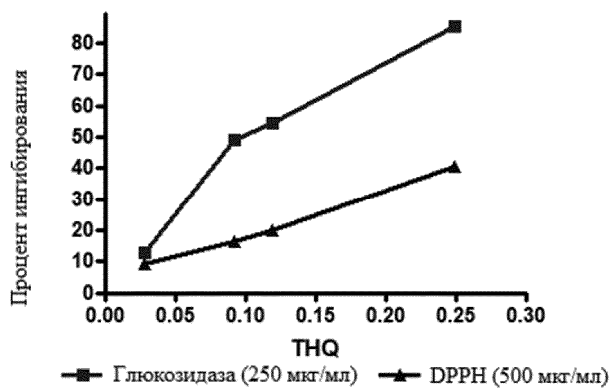
Фиг. 4а



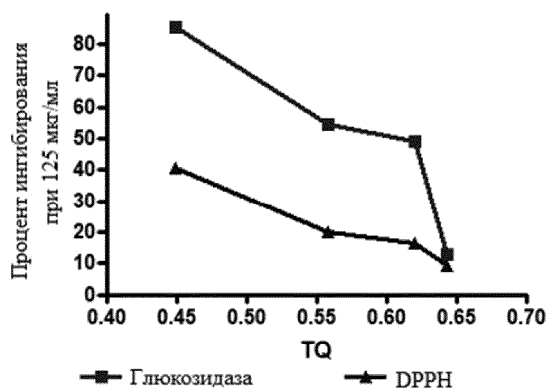
Фиг. 4б



Фиг. 4с



Фиг. 5



Фиг. 6

