(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090950 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.08

(22) Дата подачи заявки
2018.10.16

(51) Int. Cl. ***A61K 31/36*** (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОБЛЕГЧЕНИЯ ПОХМЕЛЬЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЪЮГАТ СЕЗАМОЛА И ПЕПТИДА В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА

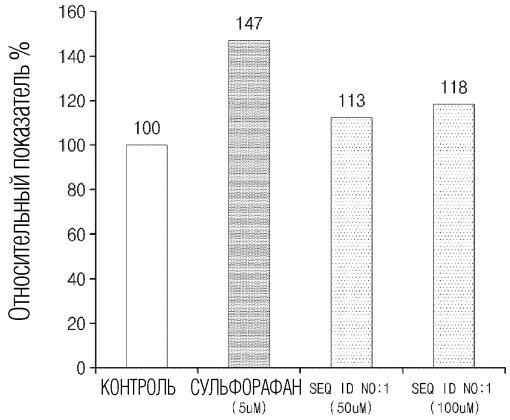
(31) **10-2017-0133836**
(32) **2017.10.16**
(33) **KR**
(86) **PCT/KR2018/012149**
(87) **WO 2019/078570 2019.04.25**
(88) **2019.06.27**

(71) Заявитель:
КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Чунг Йонг Джи, Ким Эюн Ми, Ли Эюнг Джи (KR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для облегчения похмелья, содержащей конъюгат сезамола и пептида в качестве активного ингредиента. Конкретно, конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению значительно повышает активность алкогольдегидрогеназы (ADH) или альдегиддегидрогеназы (ALDH), участвующих в процессе метаболизма алкоголя, быстро уменьшающих концентрацию алкоголя в организме и улучшающих вызванное алкоголем нарушение двигательной моторики, и, таким образом, имеет благоприятное свойство, выраженное в том, что его можно успешно использовать в качестве активного ингредиента в композиции, уменьшающей синдром похмелья.



202090950 A1

202090950 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562511EA/042

КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОБЛЕГЧЕНИЯ ПОХМЕЛЬЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ СЕЗАМОЛА И ПЕПТИДА В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА

Уровень техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к конъюгату сезамола и пептида и к композиции для облегчения похмелья, содержащей конъюгат в качестве активного ингредиента.

Введение

Уровень Потребления алкоголя в Корее является одним из самых высоких в мире, а социально-экономические и медицинские риски, связанные с употреблением алкоголя, быстро растут. Сообщалось, что чрезмерное употребление алкоголя затрагивает почти все системы организма, вызывая многочисленные заболевания, такие как заболевания печени, гастрит, панкреатит, повышение давления (гипертония), инсульт, диабет и болезни сердца.

Согласно недавним результатам Национального опроса состояния Здоровья и Питания нации, проведенного Корейским институтом Здравоохранения и Социального Обеспечения при Министерстве Здравоохранения и Благосостояния, количество дней употребления алкоголя для взрослых старше 20 лет в Корее в среднем составляет около 8 дней в месяц, около 11 дней для мужчин и 4 дней для женщин. В то же время было установлено, что количество случаев опьянения составило приблизительно 4,7%, по крайней мере, один раз в неделю, приблизительно 10,7% от 1 до 3 раз в месяц и приблизительно 13,2% от 1 до 3 раз каждые 3 месяца, что, таким образом, представляет собой проблему с точки зрения национального здравоохранения.

Таким образом, в настоящее время люди склонны выпивать чрезмерное количество алкоголя, превышающее норму, которая может контролироваться организмом человека, и интерес к медицинским препаратам или напиткам, способным устранять похмелье, неуклонно растет, в связи с чем рынок сбыта таких лекарственных препаратов в настоящее время по объему продаж превышает 100 миллиардов вон, что замечено даже зарубежными рынками сбыта.

Похмелье определяют такие симптомами, как головная боль, диарея, анорексия, тошнота, рвота, озноб и холодный пот, появляющиеся после употребления алкоголя, а объективные симптомы включают снижение когнитивной и двигательной способности, гематологические и гормональные изменения. Известно, что причиной похмелья являются обезвоживание, токсикоз, вызываемый алкоголем и его метаболитами (ацетальдегид, формальдегид, ацетон и т. д.) и дефицит питательных веществ (дефицит сахара в крови, витаминов и минералов), вызванный нарушением абсорбции питательных веществ. Степень похмелья сильно варьируется в зависимости от индивидуальной предрасположенности (в зависимости от наследственности и образа жизни (степень упитанности/качество питания, состояние моторики, степень обезвоживания и общее состояние здоровья).

После употребления, алкоголь метаболизируется в организме тремя путями, в

которых алкоголь метаболизируется до ацетальдегида и уксусной кислоты под действием алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы, присутствующих в желудочно-кишечном тракте или печени при условии что концентрация этанола низка, этанол метаболизируется в ацетальдегид и уксусную кислоту с помощью микросомальной системы окисления этанола (MEOS), присутствующей в эндоплазматической сети при условии что концентрация этанола высока, а затем, на последнем этапе, разлагается на диоксид углерода (CO_2) и воду (H_2O) под действием каталазы, присутствующей в пероксисомах. При введении допустимого количества алкоголя, вышеописанная метаболическая система действует плавно (скоординированно), так что симптомы, вызываемые алкогольным токсикозом, не возникают, но при введении большого количества алкоголя, система метаболизма алкоголя выходит из сбалансированного состояния и не может поддерживать био-гомеостаз, в результате чего возникает головная боль или чувство тяжести в голове, потеря концентрации, изжога и расстройство желудка как краткосрочные симптомы, а дисфункция печени может возникнуть в долгосрочной перспективе.

Между тем, в настоящее время напитки от похмелья, содержащие экстракты астрагала, семян лотоса, зародышей риса и ховении, а также напитки от похмелья, содержащие ферментированный рисо-соевый экстракт и порошок экстракта расторопши в качестве основного ингредиента, напитки от похмелья, содержащие экстракты ольхи и рябины в качестве активного ингредиента, являются коммерчески доступными, но, поскольку большинство из этих напитков содержат экстракты в качестве активных ингредиентов, обеспечение исходного сырья осуществляется с перебоями, а создание процессов или закупка оборудования, необходимого для экстракции в массовом производства является дорогостоящим. Кроме того, существует множество проблем, связанных с тем, что из-за самой природы экстрактов наблюдается значительная разница в степени уменьшения похмелья в зависимости от индивидуума, кроме того, для устранения похмелья требуется длительное время. По этой причине существует необходимость в разработке продукта, который был бы прост и эффективен, как в области обеспечения исходного сырья, так и возможности массового производства, и мог бы одновременно решить проблему быстрой деградации алкоголя и облегчения похмелья за короткое время.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачей настоящего изобретения является создание конъюгата сезамола и пептида для облегчения состояния похмелья.

Другой задачей настоящего изобретения является создание композиции для снятия похмелья, содержащей конъюгат в качестве активного ингредиента.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа снятия похмелья, включающего введение конъюгата или композиции, содержащей конъюгат в качестве активного ингредиента субъекту, нуждающемуся в этом.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

Для решения вышеуказанных задач, в одном аспекте настоящего изобретения

предоставлена фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья, содержащая конъюгат сезамола и пептида в качестве активного ингредиента.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставлены питательные вещества/пищевые добавки для предотвращения или облегчения похмелья, содержащие конъюгат сезамол и пептид в качестве активного ингредиента.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения представлен способ предотвращения или облегчения похмелья, включающий введение конъюгата сезамола и пептида или композиции, содержащей конъюгат, в качестве активного ингредиента субъекту, нуждающемуся в этом.

ПРЕИМУЩЕСТВА ИЗОРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению, конъюгат сезамола и пептида предоставляет преимущества, заключающиеся в значительном улучшении активности алкогольдегидрогеназы (ADH) и альдегиддегидрогеназы (ALDH), участвующих в процессе деградации алкоголя, и обеспечивающих быструю деградацию алкоголя в организме, а также улучшение состояния моторики, нарушенное алкоголем, в организме, благодаря чему данный конъюгат может быть с пользой применен в качестве активного ингредиента в композиции для облегчения похмелья.

Однако эффекты настоящего изобретения не ограничиваются вышеупомянутыми эффектами, и другие эффекты, не упомянутые здесь, будут понятны специалистам в данной области техники из следующего описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР/ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 представляет собой график, результаты которого подтверждают эффект увеличения активности альдегиддегидрогеназы (ALDH) при введении конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1.

ФИГ. 2 представляет собой график, результаты которого подтверждают эффект увеличения активности альдегиддегидрогеназы (ALDH) при введении конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2.

ФИГ.3 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую результат подтверждения эффекта увеличения экспрессии мРНК алкогольдегидрогеназы (ADH) и ALDH при введении конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, соответственно.

ФИГ.4 представляет собой график, показывающий результат подтверждения эффекта улучшения двигательной способности на модели мыши при введении конъюгатного комплекса, смешанного с конъюгатом сезамола и пептида в соответствии с настоящим изобретением.

ФИГ.5 представляет собой график, показывающий результат подтверждения эффекта снижения концентрации альдегида в сыворотке на модели мыши при введении

комплекса конъюгата, смешанного с конъюгатом сезамола и пептида в соответствии с настоящим изобретением.

ФИГ.6 представляет собой график, показывающий результат подтверждения эффекта снятия похмелья при введении комплекса конъюгата, смешанного с конъюгатом сезамола и пептида в соответствии с настоящим изобретением.

На ФИГ. 1-3, обозначение «SEQ ID NO: 1» подразумевает группу, обработанную конъюгатом сезамола и пептида, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, а обозначение «SEQ ID NO:2» подразумевает группу, обработанную конъюгатом из сезамола и пептида, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. На ФИГ. 4-6, обозначение «конъюгатный комплекс» представляет собой группу, обработанную комплексом, смешанным с конъюгатом сезамола и пептида, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и конъюгатом сезамола и пептида, имеющим аминокислоту последовательность SEQ ID NO:2 в массовом соотношении 1: 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

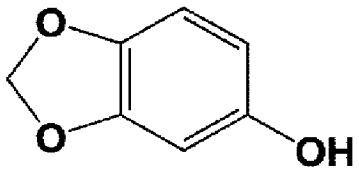
Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья, содержащая конъюгат сезамола и пептида в качестве активного ингредиента.

Сезамол представляет собой соединение с Химической Формулой $C_7H_6O_3$ и имеет химическую структуру, соответствующую следующей Химической Формуле 1.

[Химическая Формула 1]



Пептид относится к полимеру, состоящему из двух или более аминокислот, связанных пептидными связями, и имеет недостаток, заключающийся в том, что пептид не может быть эффективно введен в ткань или клетку-мишень из-за слишком большого размера самого пептида, или пептид исчезает из организма за короткое время, имея короткий период полужизни. Соответственно, пептид по настоящему изобретению содержит 20 или менее, предпочтительно 15 или менее, более предпочтительно 10 или менее аминокислот.

Пептид по настоящему изобретению может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 и может представлять собой варианты или фрагменты аминокислот, имеющих различающиеся последовательности вследствие делеций, инсерций и замен аминокислотных остатков или комбинации таковых, в пределах диапазона, не влияющего на функцию облегчения похмелья по настоящему изобретению. Аминокислотные замены на уровне пептида, которые не изменяет

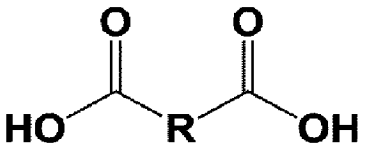
активность пептида в целом по ослаблению похмелья, известны в данной области техники. В некоторых случаях аминокислотные замены(модификации) могут быть осуществлены путем фосфорилирования, сульфатирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования и тому подобного. Соответственно, настоящее изобретение включает пептид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу идентичную пептиду, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, варианты или активные фрагменты таковых. По существу, «идентичный пептид» представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую гомологию последовательности 75% или более, предпочтительно 80% или более, более предпочтительно 90% или более и наиболее предпочтительно 95% или более с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 соответственно. Кроме того, пептид может дополнительно включать аминокислотную последовательность, предназначенную для определенной цели, например, для удлинения целевой последовательности, увеличения периода полужизни или стабильности пептида, маркер или меченые остатки.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть получен различными способами, хорошо известными в данной области техники. В качестве примера, пептид может быть получен с использованием рекомбинации полинуклеотида и белковой экспрессионой системы или получен методом синтеза in vitro с помошью химического синтеза, такого, как пептидный синтез, метод синтеза белка в бесклеточных системах и тому подобное.

Кроме того, для улучшения химической стабильности и улучшенния фармакологических свойств (таких как период полужизни, абсорбция, титр, эффективность и т. д.), модификации специфичности (например, расширение спектра биологической активности) и сниженной антигенности, N-конец пептида связывается с защитной группой, выбранной из списка, состоящего из ацетильной группы, флуоренилметоксикарбонильной группы, формильной группы, пальмитоильной группы, миристильной группы, стеарильной группы и полиэтиленгликоля (ПЭГ) для улучшения стабильности. При этом, «стабильность» означает стабильность при хранении (например, стабильность при хранении при комнатной температуре), а также стабильность in vivo, которая обеспечивается защитой пептида по настоящему изобретению от атаки фермента, расщепляющего белок in vivo.

Сезамол и пептид могут быть связаны друг с другом линкером. Линкер может представлять собой алифатическую, алициклическую или ароматическую дикарбоновую кислоту, предпочтительно алифатическую или алициклическую дикарбоновую кислоту и, более предпочтительно, алифатическую дикарбоновую кислоту. Более конкретно, алифатическая дикарбоновая кислота может представлять собой дикарбоновую кислоту, имеющую химическую структуру приведенной ниже Химической Формулы 2.

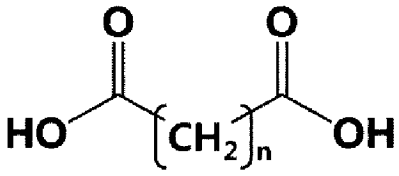
[Химическая Формула 2]



В Химической Формуле 2, R может представлять собой алкиленовую группу, имеющую от 1 до 12 атомов углерода, предпочтительно от 1 до 10 атомов углерода и, более предпочтительно, от 1 до 6 атомов углерода; алкениленовую группу, имеющая от 2 до 12 атомов углерода, предпочтительно от 2 до 10 атомов углерода и, более предпочтительно, от 2 до 6 атомов углерода; или алкиниленовую группу, имеющую от 2 до 12 атомов углерода, предпочтительно от 2 до 10 атомов углерода и, более предпочтительно, от 2 до 6 атомов углерода.

В частности, линкер может представлять собой алифатическую насыщенную дикарбоновую кислоту, имеющую химическую структуру приведенной ниже Химической формулы 3.

[Химическая Формула 3]



В Химической Формуле 3 n представляет собой целое число от 1 до 12, предпочтительно, от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 6 и, наиболее предпочтительно, от 1 до 4.

Карбоксильная группа на одной стороне дикарбоновой кислоты образует сложноэфирную связь с гидроксильной группой (-OH) сезамола, а карбоксильная группа на другой стороне дикарбоновой кислоты образует пептидную связь с аминогруппой (-NH_2), расположенной на N-конце пептида, таким образом, что сезамол и пептид связаны друг с другом, образуя конъюгат по настоящему изобретению.

Кроме того, конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению может быть получен путем i) приготовления пептида, ii) связывания линкера с пептидом путем взаимодействия линкера с пептидом и iii) связывания сезамола с линкером посредством взаимодействия сезамола с линкером, связанным с пептидом.

Кроме того, конъюгат сезамола и пептида может представлять собой конъюгат сезамола и пептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, конъюгат сезамола и пептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или смесь таковых.

Для подтверждения эффекта увеличения активности альдегиддегидрогеназы (ALDH) при введении конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетки карциномы печени обрабатывали конъюгатом сезамола и пептида, представленного аминокислотной последовательностьи SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, соответственно, и затем проводили

анализ активности ALDH. В результате было подтверждено, что активность ALDH возрастала зависимым от концентрации образом в клетках, обработанных конъюгатом сезамола и пептида по настоящему изобретению (см. ФИГ. 1 и 2).

В дополнение к этому, чтобы подтвердить эффект увеличения экспрессии алкогольдегидрогеназы (ADH) и ALDH, участвующих в процессе деградации алкоголя, наблюдаемый при применении конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетки карциномы печени обрабатывали конъюгатом сезамола и пептида, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 соответственно, и затем уровни экспрессии ADH и ALDH определяли с помощью ОТ-ПЦР. В результате исследований было подтверждено, что экспрессия мРНК ADH4, ALDH1 и ALDH2 значительно возрастала в клетках, обработанных конъюгатом сезамола и пептида по настоящему изобретению, по сравнению с необработанной контрольной группой (см. ФИГ.3).

Кроме того, для подтверждения эффекта улучшения двигательной способности, наблюдаемого при введении конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 смешивали в массовом соотношении 1: 1 и затем вводили мышиной модели, обработанной алкоголем, после чего проводили поведенческий тест. В результате было подтверждено, что группа, которой вводили комплекс конъюгата, значительно улучшала двигательную способность, сниженную при введении алкоголя (см. ФИГ.4).

Далее, для подтверждения эффекта деградации алкоголя при введениии конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению, в конкретном воплощении настоящего изобретения комплекс конъюгата вводили мышиной модели обработанной алкоголем, а затем проводили анализ альдегида в сыворотке мыши. В результате было подтверждено, что группа, которой вводили комплекс конъюгата, демонстрировала сниженную концентрацию альдегида в сыворотке (см. ФИГ.5).

Кроме того, чтобы подтвердить эффект снятия синдрома похмелья при введении конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения субъектов клинического испытания просили принять комплекс конъюгата вместе с алкоголем, а затем концентрация алкоголя в крови измеряли через 1 час и 2 часа. В результате было подтверждено, что е группа, которой вводили комплекс конъюгата, демонстрировала значительно сниженную концентрацию алкоголя в крови (см. ФИГ.6).

Соответственно, конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению значительно увеличивает активность алкогольдегидрогеназы или альдегиддегидрогеназы, участвующих в процессе деградации алкоголя, быстро снижает концентрацию алкоголя в организме и улучшает вызванное алкоголем расстройство моторики, тем самым демонстрируя пригодность для использования в качестве активного ингредиента в

композиции для снятия похмелья.

Между тем, конъюгаты сезамола и пептидов по настоящему изобретению можно вводить в фармацевтически приемлемых носителях, таких как коллоидные суспензии, порошки, физиологический раствор, липиды, липосомы, микросферы или наносферические частицы. Эти конъюгаты могут формировать комплекс или быть связаны в комплексе с носителем и могут доставляться in vivo с использованием систем транспортировки, известных в данной области, таких как липиды, липосомы, микрочастицы, золото, наночастицы, полимеры, реагенты для конденсации, полисахариды, полиаминокислоты, дендримеры, сапонин, вещества, улучшающие адсорбцию, или жирные кислоты.

Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель может включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, камедь акации, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксибензат, метилгидроксибензоат тальк, стеарат магния и минеральное масло, которые обычно используются при приготовлении средств, но не ограничиваться таковыми. Кроме того, фармацевтическая композиция может дополнительно включать смазывающий агент, смачивающий агент, подслащивающий агент, ароматизатор, эмульгирующий агент, суспендирующий агент, консервант и тому подобное, в дополнение к вышеуказанным ингредиентам.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться перорально или парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, внутрикожно или местно) в соответствии с протоколом желаемого способа, и доза варьируется в зависимости от состояния и веса пациента, степени заболевания, лекарственной формы, а также способа и времени введения, но может быть соответствующим образом определена специалистами в данной области техники.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в фармацевтически эффективной дозе. В настоящем изобретении термин «фармацевтически эффективная доза» относится к достаточному количеству для лечения заболеваний, обладает приемлемым соотношением польза/риск, принятом в медицине, а эффективный уровень дозы может быть определен в соответствии с факторами, включающими тип и серьезность заболевания пациента, активность лекарственного средства, чувствительность к лекарственному средству, время введения, способ введения, скорость высвобождения, продолжительность лечения и учет одновременно используемых лекарственных средств, а также других факторов, хорошо известных в этой области медицины. Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может вводиться в виде отдельного терапевтического агента или в комбинации с другими средствами, способствующими ослаблению похмелья, и может вводиться одновременно, по отдельности или последовательно, или вместе с обычными средствами, снимающими похмелье, а также может вводиться однократно или многократно. Важно вводить

количество, позволяющее получить максимальный эффект с минимальным количеством побочных эффектов, учитывая все факторы, что может быть легко определено специалистами в данной области техники.

В частности, эффективная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от возраста, пола, состояния и веса пациента, степени абсорбции активного ингредиента in vivo, степени инактивации, степени экскреции, типа заболевания и лекарственных средств, которые должны использоваться в комбинации, и может быть увеличена или уменьшена в зависимости от пути введения, степени ожирения, пола, веса, возраста и тому подобного. Например, пептид по настоящему изобретению можно вводить в дозе от примерно 0,0001 мкг до 500 мг, предпочтительно от 0,01 мкг до 100 мг на 1 кг веса тела пациента в день.

2. Пищевая добавка для предотвращения или облегчения похмелья

Другой аспект настоящего изобретения относится к пищевой добавке для предотвращения или облегчения похмелья, содержащей конъюгат сезамол и пептид в качестве активного ингредиента.

Конъюгат сезамола и пептида является тем же самым, что и конъюгат сезамола и пептида, описанный в разделе «№1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья» и, таким образом, для подробного описания см. раздел «№ 1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья», и далее будет описана только конкретная конфигурация пищевой добавки.

Как и фармацевтическая композиция, конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению значительно повышает активность алкогольдегидрогеназы или альдегиддегидрогеназы, участвующих в процессе деградации алкоголя, быстро снижает концентрацию алкоголя в организме и улучшает вызванное алкоголем расстройство моторики, тем самым являясь выгодным для использования в качестве активного ингредиента в пищевой добавке для облегчения похмелья.

В пищевой добавке по настоящему изобретению активный ингредиент может быть добавлен к пищевому продукту, как есть, или употребляться вместе с другими пищевыми продуктами или пищевыми ингредиентами, а также может быть соответствующим образом использован в соответствии с общим способом. Количество смешиваемых активных ингредиентов может быть подходящим способом определено в соответствии с целью их использования (для предотвращения или улучшения симптома). В общем, при приготовлении пищевых продуктов или напитков, композицию по настоящему изобретению можно добавлять в количестве предпочтительно 15 мас.% или менее, более предпочтительно, 10 мас.% или менее по отношению к основному сырьевому материалу. Тем не менее, в случае длительного приема с целью охраны здоровья и гигиены или соответствия медицинским нормам, количество может быть равно или ниже, чем вышеупомянутый диапазон.

Пищевая добавка по настоящему изобретению может содержать другие ингредиенты в качестве основных ингредиентов без особых ограничений, в дополнение к

активным ингредиентам. Например, в обычных напитках, в качестве дополнительного ингредиента могут содержаться различные вкусовые агенты или натуральные углеводы. Примеры вышеупомянутых природных углеводов могут включать обычные сахара, такие как моносахариды, такие как глюкоза, фруктоза и тому подобное; дисахариды, такие как мальтоза, сахароза и т.п.; и полисахариды, такие как декстрин, циклодекстрин и тому подобное, и сахарные спирты, такие как ксилит, сорбит, эритрит и тому подобное. В качестве ароматизирующих агентов, отличных от описанных выше, могут быть выгодно использованы натуральные ароматизирующие агенты (тауматин, экстракт стевии (например, ребаудиозид А, глициргинин и т. д.) и синтетические ароматизирующие агенты (сахарин, аспартам и т. д.). Соотношение природных углеводов может быть соответствующим образом определено специалистом в данной области техники.

Кроме того, пищевая добавка по настоящему изобретению может содержать различные питательные вещества, витамины, минералы (электролиты), ароматизаторы, такие как синтетические и натуральные ароматизаторы, красители и усилители (сыр, шоколад и т. д.), пектиновую кислоту и соли таковой, альгиновую кислоту и соли таковой, органическая кислота, защитный коллоидный загуститель, регулятор pH, стабилизатор, консервант, глицерин, спирт, агент углекислоты, используемый в газированном напитке, и тому подобное. Эти ингредиенты могут быть использованы независимо или в комбинации, и соотношение этих добавок может быть легко определено специалистом в данной области техники.

3. Способ предотвращения или облегчения похмелья

Еще один аспект настоящего изобретения предоставляет способ предотвращения или облегчения похмелья, включающий введение конъюгата сезамола и пептида или композиции, содержащей конъюгат, в качестве активного ингредиента субъекту, нуждающемуся в этом.

Конъюгат сезамола и пептида является тем же самым, что конъюгат сезамола и пептида, раскрытый в разделе «№1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья» и, таким образом, подробное описание см. в разделе «№1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья».

Как описано выше, конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению или композиция, содержащий конъюгат в качестве активного ингредиента, например, фармацевтическая композиция или пищевая добавка, может быстро деградировать алкоголь в организме и улучшать вызванное алкоголем расстройство моторики, тем самым обеспечивая значительный эффект снятия похмелья при введении конъюгата или композиции субъекту, например, человеку, нуждающийся в этом.

Далее настоящее изобретение будет подробно описано с помощью Примеров Приготовления и Экспериментальных Примеров.

Тем не менее, последующие Примеры Приготовления и Экспериментальные Примеры просто иллюстрируют настоящее изобретение, поэтому содержание настоящего изобретения не может быть ограничено следующими Примерами Приготовления и

Экспериментальными Примерами.

[Пример получения 1] Получение сукцинилированного пептида

Пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, раскрытые в последующей Таблице 1, соответственно, синтезировали с помощью автоматического пептидного синтезатора (Milligen 9050, Millipore, США), и каждый пептид (1 ммоль) и янтарный ангидрид (200 мг, 2,0 экв.) растворяли в N, N-диметилформамиде (ДМФА, 10 мл) и добавляли N, N-диизопропилэтиламин (DIEA) (388 мг, 3,0 эквив.), реакцию проводили при комнатной температуре в течение 2 часов для сукцинилирования каждого пептида. Эти синтезированные сукцинилированные пептиды были очищены по-отдельности с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой C18 (HLPC) (Waters Associates, США). Использовалась колонка ACQUITY UPLC BEH300 C18 (2,1 на 100 мм, 1,7 мкм, Waters Co, США).

[Таблица 1]

№ Последовательности	Аминокислотная последовательность
1	SIPCKLQSG
2	WLNRRAN

[Пример приготовления 2] Приготовление конъюгата сезамола и пептида по настоящему изобретению

В пептидном реакторе к сукцинилированному пептиду (1 ммоль), полученному [в Примере получения 1], растворенному в диметилформамиде (ДМФ, 10 мл), добавляли 1-гидроксибензотриазол (HOBt, 270 мг, 2,0 эквив.), (бензотриазол-1-илокси) трипирролидинофосфонийгексафторфосфат (PyBOP, 1,04 г, 2,0 экв.) и сезамол (277 мг, 2,0 экв.) и перемешивали в течение 30 минут. К смеси добавляли N, N-диизопропилэтиламин (DIEA, 388 мг, 3 экв.) и проводили реакцию в течение 4 часов при комнатной температуре, а затем подвергали процессам перекристаллизации, фильтрации и сушки с использованием диэтилового эфира (10 мл, 10 ммоль) с целью получения конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и конъюгата сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, соответственно.

[Экспериментальный пример 1] Подтверждение эффекта повышения активности альдегиддегидрогеназы.

Алкоголь конвертировали в ацетальдегид с помощью алкогольдегидрогеназы (ADH), фермента деградации алкоголя, и полученный ацетальдегид конвертировали и окисляли до ацетата с помощью альдегиддегидрогеназы (ALDH). Поэтому, чтобы подтвердить эффект увеличения активности ALDH, участвующей в процессе деградации алкоголя, клетки карциномы печени обрабатывали конъюгатами сезамола и пептидов обоих типов, полученных в [Примере Приготовления 2], и затем проводился анализ активности ALDH.

В частности, клетки гепатоцеллюлярной карциномы печени (HepG2), представляющие собой клетки карциномы печени человека, инокулировали в 6-луночный планшет с плотностью 4 × 10^5 клеток /на лунку и затем инкубировали в течение ночи. После этого оба типа конъюгатов сезамола и пептидов, полученных [в Примере получения 2], применяли в концентрации 50 мкМ или 100 мкМ соответственно, и инкубировали в течение 24 часов, затем клетки собирали и анализировали активность ALDH с использованием набора для анализа активности ALDH (abcam, ab155893). Тем временем группу позитивного контроля обрабатывали 5 мкМ сульфолафаном.

Для анализа активности ALDH каждую из собранных клеток обрабатывали буфером для анализа активности ALDH, включенным в набор, а затем лизировали гомогенизатором во льду. После этого клетки центрифугировали при условиях 4°C и 13000 об/мин в течение 10 минут, а затем собирали супернатант. Собранный супернатант обрабатывали буфером для анализа ALDH, субстратом ALDH и ацетальдегидом и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 часа, затем измеряли оптическую плотность спектрофотометром при 450 нм в течение 20 минут с интервалами в 2 минуты. После этого активность ALDH рассчитывали по следующей формуле [Уравнение 1].

[Уравнение 1]

Активность ALDH= $\frac{B}{\Delta T \times V}$ X Увеличение разведения=нмоль/мин/мл=мЕ/мл

где:

- B: количество NADH (нмоль), полученное в экспериментальной группе
- $\triangle$ T: время реакции (мин)
- V: объем (мл) экспериментальной группы, используемой в реакционной лунке

В результате, как показано на ФИГ. 1 и 2, было подтверждено, что оба типа конъюгатов сезамола и пептида по настоящему изобретению значительно увеличивали активность ALDH по сравнению с необработанной контрольной группой, соответственно (ФИГ. 1 и 2).

[Экспериментальный пример 2] Подтверждение эффекта увеличения экспрессии ADH и ALDH

С целью подтверждения эффекта увеличения экспрессии ADH и ALDH, участвующих в процессе деградации алкоголя, клетки карциномы печени обрабатывали конъюгатами сезамола и пептидов обоих типов, полученных в [Примере получения 2], соответственно, а затем проводили ОТ-ПЦР.

В частности, клетки HepG2 инокулировали в 6-луночный планшет при плотности 4 × 10^5 клеток/на лунку и затем инкубировали в течение ночи. После этого оба типа конъюгатов сезамола и пептидов, полученных в [Примере получения 2], применяли для обработки в концентрации 10 мкМ или 50 мкМ соответственно и инкубировали в течение 6 часов, затем клетки собирали. После этого из собранных клеток выделяли общую РНК в

соответствии с протоколом производителя, используя Trizol (Invitrogen, США), а затем 1 мкг выделенной РНК использовали для синтеза кДНК в соответствии с протоколом производителя, используя набор для синтеза кДНК (Intron, Корея). кДНК подвергали ПЦР с использованием праймеров, представленных в приведенной ниже Таблице 2, и затем подвергали электрофорезу в 5% агарозном геле для определения уровней экспрессии мРНК ADH4, ALDH1 и ALDH2.

[Таблица 2]

Праймер		Последовательность (5'→3')	№ последовательности
ADH4	Прямой	CTGAAACCATGAAAGCAGCC	3
	Обратный	GCCGATTATTAGCTCCTCTGG	4
ALDH1	Прямой	GGAGCCAAAAGGGTCATCAT	5
	Обратный	GTGATGGCATGGACTGTGGT	6
ALDH2	Прямой	CAAATTACAGGGTCAACTGCTAT	7
	Обратный	CCACACTCACAGTTTTCACTTC	8

В результате, как показано на ФИГ.3, было подтверждено, что оба типа конъюгатов сезамола и пептида по настоящему изобретению значительно увеличивали экспрессию мРНК ADH4, ALDH1 и ALDH2 по сравнению с независимой контрольной группой, соответственно (см. ФИГ.3). Для быстрой деградации алкоголя необходимо индукция этого процесса путем увеличения активности ADH и ALDH, которые являются ферментами, участвующими в деградации алкоголя, и, таким образом, по результатам [Экспериментального примера 1] и [Экспериментального примера 2], можно видеть, что конъюгаты сезамола и пептидов по настоящему изобретению значительно увеличивают активность и экспрессию ADH и ALDH, что способствует быстрой деградации алкоголя.

[Экспериментальный пример 3] Подтверждение эффекта улучшения двигательной моторики на модели мышей, получавших алкоголь

Для подтверждения эффекта улучшения двигательной моторики на модельном животном, которому вводили алкоголь, после того как в животное были введены конъюгат сезамола и пептида, полученного [в Примере получения 2], и алкоголь, был проведен поведенческий тест с использованием устройство Rota-rod.

В частности, 8-недельных самцов мышей Balb/c использовавшихся в качестве мышиной модели, подготавливали в течение 1 недели при свободном кормлении твердым кормом и водопроводной водой, а затем использовали для теста. Кроме того, мышей разделили на (1) обычную контрольную группу, (2) группу, получавшую алкоголь, и (3) экспериментальную группу, и использовали для эксперимента в количестве 5 мышей на группу.

Для проведения поведенческого теста мышей помещали на устройство Rota-rod и подвергали адаптивной тренировке три или более раза.

Перед проведением поведенческого теста мышей, которых держали натощак в течение 4 часов, помещали в устройство Rota-rod перед введением алкоголя, где те ходили/передвигались в условиях постепенного увеличения числа оборотов в минуту с 4 до 40 об/мин, до потери двигательной способности и падения; время, прошедшее до падения на нижнюю подставку, было измерено и преобразовано во вторичные единицы для получения значения времени сопротивляемости падению (сек).

После этого конъюгат сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и конъюгат сезамола и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, смешивали в массовом соотношении 1: 1, для получения комплекса (далее называемого «конъюгатный комплекс»), а затем комплекс растворяли в воде и вводили мышам экспериментальной группы перорально в дозе 100 мг/кг и затем оставляли на 30 минут. Параллельно, тот же самый объем воды вводился перорально контрольной группе. Впоследствии 20% алкоголь вводили перорально каждой мыши в группе, получавшей алкоголь, и в экспериментальной группе по 400 мкл на субъекта, и через 30 минут, 1 час и 2 часа были получены значения сопротивляемости падению (в сек). для каждой группы при использовании устройство Rota-rod так, как описано выше.

В результате, как показано на ФИГ. 4, до проведения поведенческого теста, нормальная контрольная группа, группа, получавшая алкоголь, и экспериментальная группа имели среднее значение сопротивляемости падению (сек) около 250, и все три группы имели одинаковые значения сопротивляемости падению (сек).

С другой стороны, в результате проведения поведенческого теста после 30 минут, 1 часа и 2 часов после введения алкоголя было подтверждено, что группа, получившая алкоголь, значительно уменьшила значение сопротивляемости падению (сек), в то время как экспериментальная группа, которой вводили конъюгатный комплекс по настоящему изобретению вместе с алкоголем, значительно увеличивала значение сопротивляемости падению (сек) по сравнению с группой, которой вводили алкоголь (ФИГ. 4).

Из приведенных выше результатов видно, что конъюгаты сезамола и пептидов по настоящему изобретению значительно улучшают двигательную моторику, снижающуюся при употреблении алкоголя.

[Экспериментальный пример 4] Подтверждение эффекта деградации алкоголя на мышиной модели с введением алкоголя

Чтобы подтвердить эффект деградации алкоголя на животных моделях, которым вводили алкоголь, проводили анализ содержания альдегида в мышиной сыворотке.

В частности, были взяты пробы крови в ①нормальной контрольной группе, в ② группе, получавшей алкоголь, и в ③ экспериментальной группе после завершения поведенческого теста в течение 2 часов в [Экспериментальном примере 3], соответственно. Затем извлеченную кровь затвердевали при комнатной температуре в

течение 20 минут, а затем центрифугировали при 3000 об/мин для получения сыворотки в виде супернатанта. Анализ альдегида в полученной сыворотке проводили с использованием набора для количественного определения альдегида (abcam, ab112113). Более конкретно, 2 × Yellos реакционную смесь, состоящую из полученной сыворотки и реактива набора, смешивали в соотношении 1: 1, а затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли оптическую плотность при 550 нм с использованием спектрофотометра.

В результате, как показано на ФИГ. 5, было подтверждено, что группа, которой вводили алкоголь, имела более высокую концентрацию альдегида в сыворотке, чем группа контроля, тогда как экспериментальная группа, которой вводили комплекс конъюгата по настоящему изобретению вместе с алкоголем, имела значительно более низкую концентрацию альдегида в сыворотке, чем группа, получавшая алкоголь (ФИГ 5).

Из приведенных выше результатов можно заключить, что конъюгаты сезамола и пептидов по настоящему изобретению значительно увеличивают активность и экспрессию ADH и ALDH, вызывая быструю деградацию алкоголя.

[Экспериментальный Пример 5] Подтверждение эффекта снятия похмелья

Для подтверждения эффекта снятия похмелья были проведены клинические испытания с использованием комплекса конъюгатов.

В частности, для проведения клинических испытаний было привлечено 4 взрослых мужчин и 4 взрослых женщины в возрасте от 20 до 40 лет. После этого был проведен контрольный тест с целью исследования основных закономерностей абсорбции алкоголя у субъектов. Более конкретно, после того, как субъекты съели одинаковую еду, субъектов держали натощак в течение 3 часов, после чего субъекты выпивали коммерческую бутылку с 20% ликером (соджу) в течение 30 минут. Концентрации алкоголя в крови после 1 часа и 2 часов питья измеряли с помощью алкотестера (Sentek Korea, AL-9000).

После этого, с целью подтверждения эффекта снятия похмелья комплексом конъюгата, выждав 3 дня после контрольного теста, 100 мл напитка, содержащего 100 частей/млн (100 ppm) каждого из двух типов конъюгатов сезамола и пептидов, полученных [в Примере получения 2] были даны тем же субъектам, и через 30 минут алкоголь был введен тем же способом, что и в методе, описанном выше, а затем была измерена концентрация алкоголя в крови, после чего концентрации алкоголя в крови были сравнены с результатом контрольного теста и проанализированы для построения графиков.

В результате, как показано на ФИГ. 6, было подтверждено, что группа, принимавшая конъюгатный комплекс по настоящему изобретению, имела значительно сниженную концентрацию алкоголя в крови после 1 часа и 2 часов приема алкоголя по сравнению с группой, которой был предложен только алкоголь (ФИГ. 6).

Следовательно, из приведенных выше результатов можно видеть, что конъюгат сезамола и пептида по настоящему изобретению индуцирует быструю деградацию алкоголя и уменьшает похмелье.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья, содержащая конъюгат сезамола и пептида в качестве активного ингредиента.

2. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по п.1, в которой сезамол и пептид связаны друг с другом линкером.

3. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по п.2, в которой линкер представляет собой дикарбоновую кислоту.

4. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по любому из пп.1-3, где последовательность пептида содержит от 5 до 15 аминокислот.

5. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по п.4, где пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

6. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по п.5, в которой конъюгат представляет собой конъюгат сезамола и пептида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, конъюгат сезамола и пептида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или смесь таковых.

7. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по любому из пп.1-3, где композиция повышает активность алкогольдегидрогеназы (ADH) или альдегиддегидрогеназы (ALDH).

8. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по любому из пп.1-3, где композиция улучшает вызванные алкоголем нарушения двигательной моторики.

9. Фармацевтическая композиция для предотвращения или облегчения похмелья по любому из пп.1-3, где композиция имеет форму, выбранную из группы, состоящей из порошков, гранул, таблеток, капсул, суспензий, эмульсий, сиропов, препаратов для наружного применения, суппозиториев и стерильных инъекционных растворов.

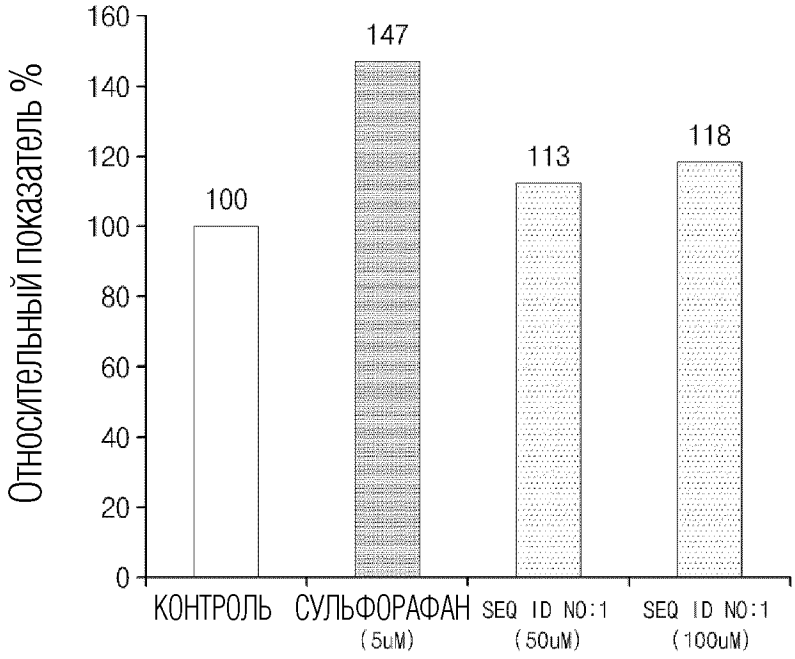
10. Пищевая добавка для предотвращения или облегчения похмелья, содержащая конъюгат сезамола и пептида в качестве активного ингредиента.

11. Пищевая добавка для предотвращения или облегчения похмелья по п.10, в которой пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

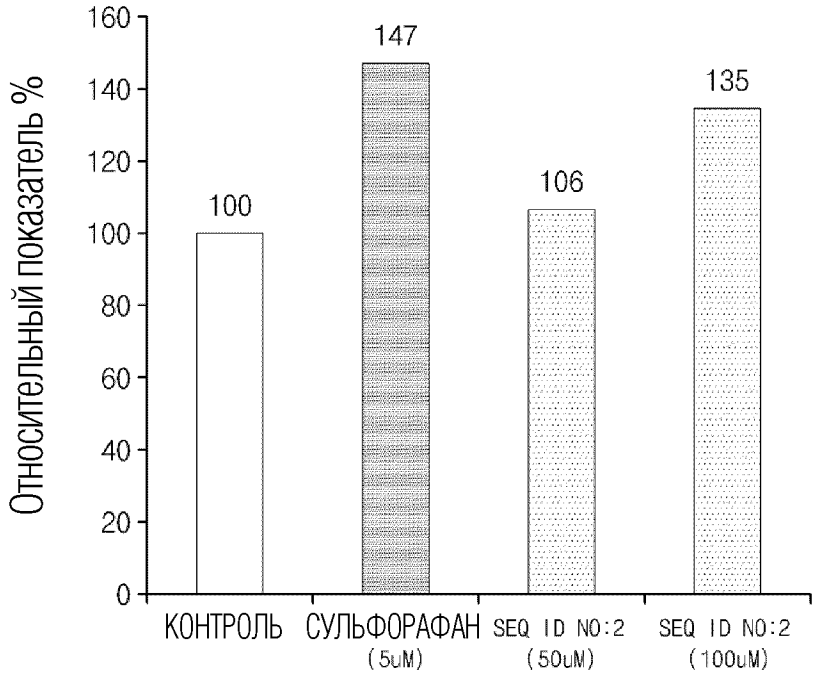
12. Пищевая добавка для предотвращения или облегчения похмелья по п.10, в которой конъюгат представляет собой конъюгат сезамола и пептида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, конъюгат сезамола и пептида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или смесь таковых.

По доверенности

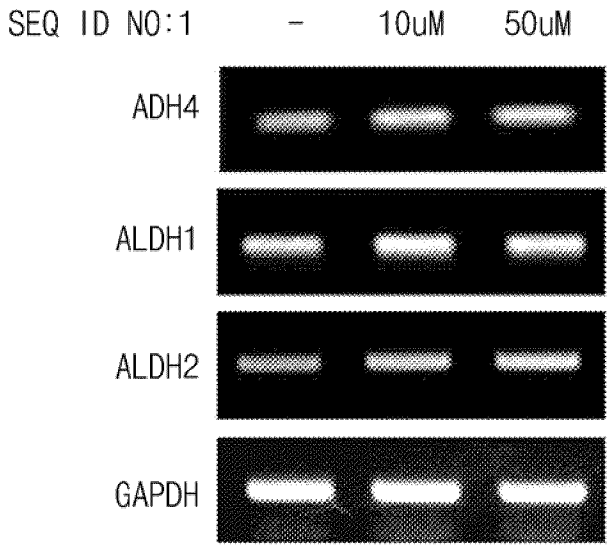
ФИГ. 1

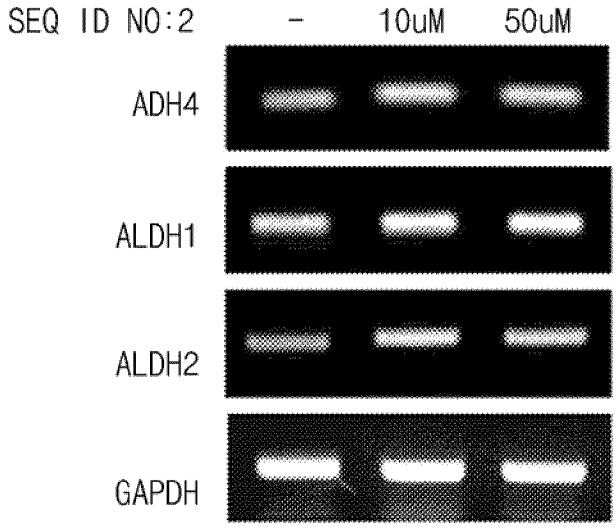

Относительный показатель %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
100
147
113
118
КОНТРОЛЬ
СУЛЬФОРАФАН (5uM)
SEQ ID NO:1 (50uM)
SEQ ID NO:1 (100uM)

ФИГ. 2

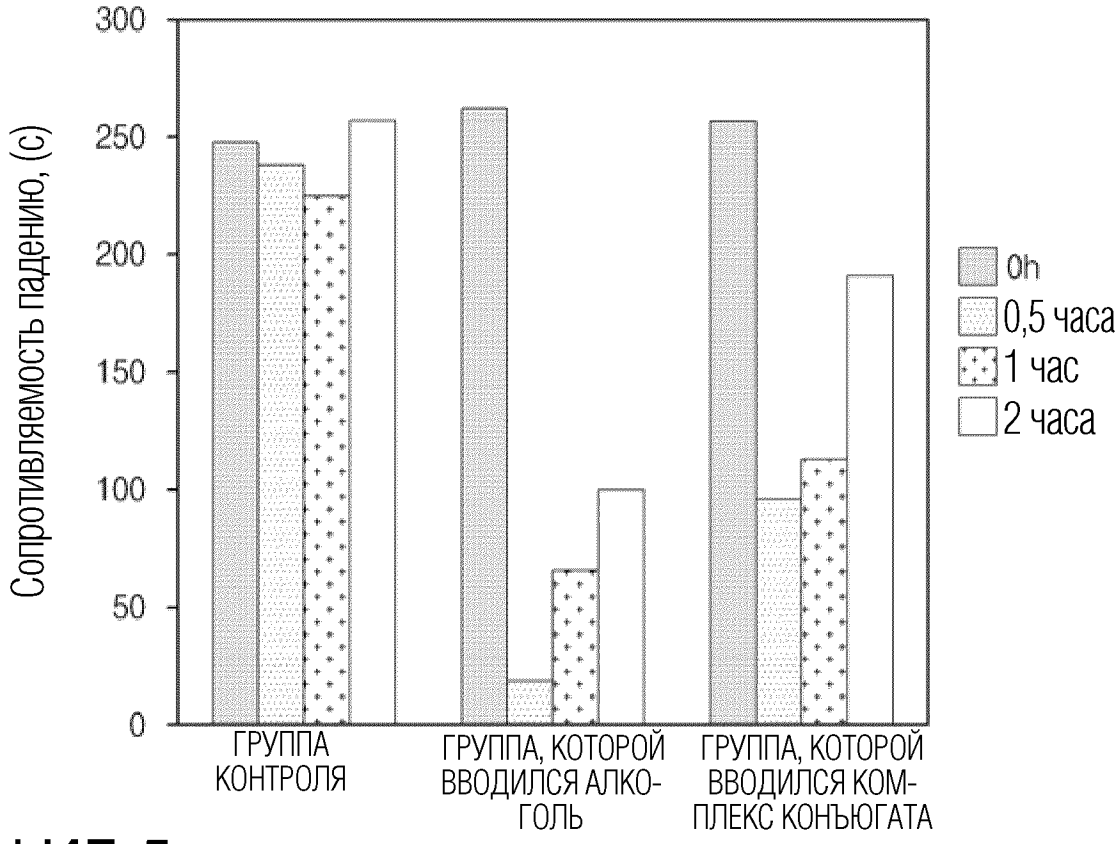

Относительный показатель %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
100
147
106
135
КОНТРОЛЬ
СУЛЬФОРАФАН (5uM)
SEQ ID NO:2 (50uM)
SEQ ID NO:2 (100uM)

ФИГ. 3

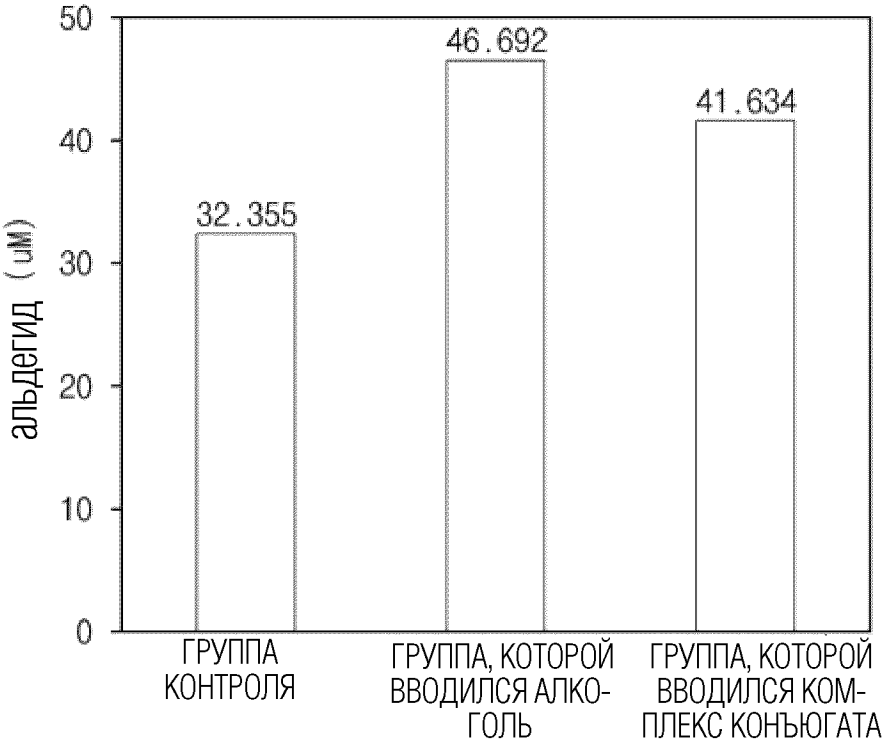

SEQ ID NO:1
-
10uM
50uM
ADH4
ALDH1
ALDH2
GAPDH


SEQ ID NO:2
-
10uM
50uM
ADH4
ALDH1
ALDH2
GAPDH

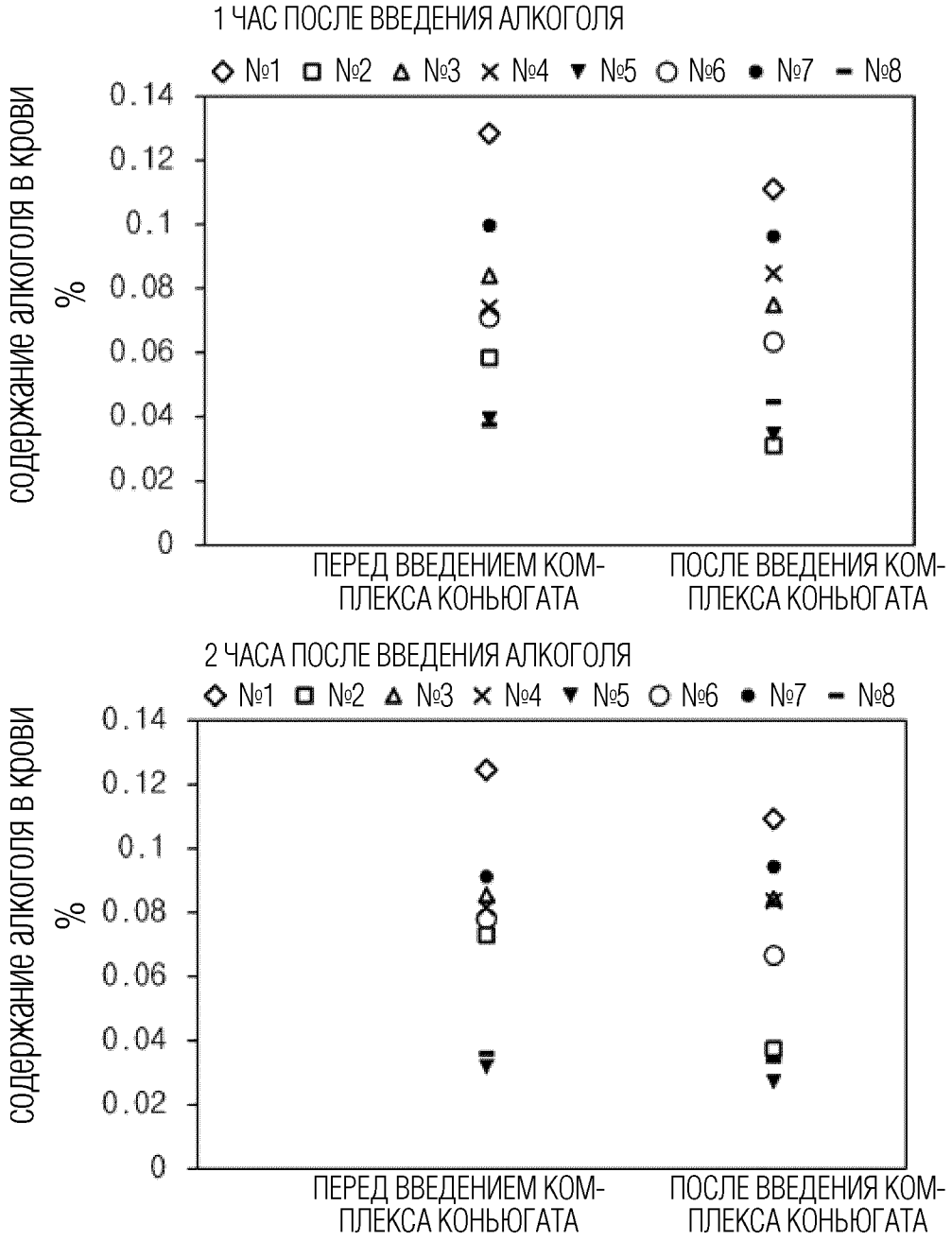
ФИГ. 4


Сопротивляемость паденю, (с)
300
250
200
150
100
50
0
0h
0,5 часа
1 час
2 часа
ГРУППА КОНТРОЛЯ
ГРУППА, КОТОРОЙ ВВОДИЛСЯ АЛКО-ГОЛЬ
ГРУППА, КОТОРОЙ ВВОДИЛСЯ КОМ-ПЛЕКС КОНЪЮГАТА

ФИГ. 5


альдегид (uM)
50
40
30
20
10
0
32.355
46.692
41.634
ГРУППА КОНТРОЛЯ
ГРУППА, КОТОРОЙ ВВОДИЛСЯ АЛКО-ГОЛЬ
ГРУППА, КОТОРОЙ ВВОДИЛСЯ КОМ-ПЛЕКС КОНЪЮГАТА

ФИГ. 6


1 ЧАС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АЛКОГОЛЯ
№1 №2 №3 №4 №5 №6 №7 №8
содержание алкоголя в крови
%
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
ПЕРЕД ВВЕДЕНИЕМ КОМ-ПЛЕКСА КОНЬЮГАТА
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КОМ-ПЛЕКСА КОНЬЮГАТА
2 ЧАСА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АЛКОГОЛЯ
№1 №2 №3 №4 №5 №6 №7 №8
содержание алкоголя в крови
%
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
ПЕРЕД ВВЕДЕНИЕМ КОМ-ПЛЕКСА КОНЬЮГАТА
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КОМ-ПЛЕКСА КОНЬЮГАТА