

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091205** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.12.14

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

(22) Дата подачи заявки
2018.12.26

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

(31) 62/610,565

(32) 2017.12.27

(33) US

(86) PCT/US2018/067480

(87) WO 2019/133588 2019.07.04

(71) Заявитель:
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)

(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 данном документе раскрыты антиоксидантные, противовоспалительные и антигликирующие эффекты тимогидрохинона.

202091205
A1

202091205

A1

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И СОПУТСТВУЮЩИХ СОСТОЯНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая PCT-заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США №. 62610565, поданной 27 декабря 2017 г., подробности которой включены в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] 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

[002] 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, гиперлипотеинемия, 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.

[003] 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.

[004] 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.

[005] 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.

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

[007] *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.

[008] 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 тимогидрохином, для лечения гипергликемии и связанных с ней нарушений.

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

[0010] Другим объектом изобретения является способ увеличения поглощения глюкозы клетками млекопитающих путем введения композиции, содержащей тимогидрохинон.

[0011] Еще одним объектом изобретения является способ терапевтического лечения гипергликемии и связанных с ней нарушений у млекопитающих с использованием композиции, содержащей тимогидрохинон.

[0012] Настоящее изобретение решает вышеупомянутые задачи и обеспечивает дополнительные связанные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] 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.

[0014] 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

[0015] На фиг. 1a и 1b показано графическое представление ингибирующей активности тимохинона (TQ), тимогидрохинона (THQ) и композиции, содержащей тимогидрохинон, в отношении α -глюкозидазы.

[0016] Фиг. 2 представляет собой графическое представление, показывающее процент поглощения глюкозы адипоцитами и митохондриями, обработанными тимохиноном (TQ), тимогидрохиноном (THQ) и композицией, содержащей тимогидрохинон.

[0017] 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).

[0018] 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).

[0019] 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.

[0020] 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

[0021] 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:

$$\% \text{ ингибирования} = [(\text{поглощение контроля} - \text{поглощение ингибитора}) / \text{поглощение контроля}] \times 100.$$

[0022] 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 гидроксианизол, 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.

[0023] 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 гидроксианизол, 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.

[0024] 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, гиперлиппротеинемию, гиперлипидемию, сердечно-сосудистые 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 гидроксианизол, 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 композицию 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.

[0025] Вышеупомянутые наиболее предпочтительные варианты осуществления, включающие технические признаки и технические эффекты настоящего изобретения, поясняются посредством иллюстративных примеров, приведенных ниже.

[0026] Пример 1: Ингибирование глюкозидазы.

[0027] 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 минут 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).

[0028] 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).

[0029] Пример 2: Увеличение поглощения глюкозы.

[0030] Клеточные линии скелетных мышц миобластов C2C12 (полученных в АТСС) 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 миотрубочках 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 часов 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 минут 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-D-глюкоза (2-NBDG), в течение 15 минут в темноте с последующей детекцией флуоресценции, продуцируемой клетками, с помощью проточной цитометрии.

[0031] Тимогидрохинон и композиция, содержащая тимогидрохинон, показали повышенное поглощение глюкозы в адипоцитах и мышечных клетках по сравнению с тимохиноном (фиг. 2a и 2b).

[0032] Пример 3 : Антиоксидантная активность тимогидрохинона.

[0033] Антиоксидантные свойства тимогидрохинона оценивали по активности захвата DPPH.

[0034] 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 α,α -дифенил- β -пикрилгидразила (DPPH) является одним из первых подходов к оценке антиоксидантного потенциала соединения.

[0035] Процедура

[0036] 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.

[0037] 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-луночной планшете, следуя методу, описанному ранее (Clarke et al., 2013). Планшет выдерживали в темноте в течение 15 минут, после чего измеряли поглощение раствора при 540 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов (TECAN Ltd, Männedorf, Switzerland). Пустые растворы (ДМСО, метанол) и стандарты (раствор Trolox в ДМСО) регистрировали одновременно. Экстракты подвергали скринингу с различными концентрациями для установления концентрации ингибирования (IC_{50} , концентрация, снижающая поглощение DPPH на 50 %).

[0038] 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.

[0039] Тимогидрохинон является мощным антиоксидантом с IC₅₀ 1,78 мкг/мл (фиг. 4b). Композиция, содержащая тимогидрохинон, также продемонстрировала превосходный антиоксидантный потенциал с IC₅₀ 540,1 мкг/мл (фиг. 4c), что намного эффективнее тимохинона (фиг. 4a).

[0040] Пример 4: Противовоспалительная активность тимогидрохинона

[0041] 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.

[0042] 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.

[0043] Реагенты и буферы: липополисахарид (LPS, Sigma Chemicals, США), физиологический раствор с фосфатным буфером, RPMI, FBS.

[0044] Набор ELISA: Набор ELISA для TNF человека, Krishgen Biosciences, США.

[0045] Процедура

[0046] Противовоспалительную активность исследовали с использованием клеточной линии моноцитов/макрофагов человека. THP-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.

[0047] Клетки 1X105 THP-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 часа 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.

[0048] Результаты

[0049] Результаты показали, что тимогидрохинон ингибировал TNF- α (таблица 1), что указывает на значительную противовоспалительную активность, не влияя на жизнеспособность клеток.

[0050] 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

[0051] Пример 5: Антигликирующая активность тимогидрохинона.

[0052] 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 N ϵ -(карбоксиметил)-лизин (CML), пирралин, пентозидин, связаны с дегенеративными нарушениями, включая старение, диабет, атеросклероз, болезнь Альцгеймера и почечную недостаточность.

[0053] 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 противодействия вторичным осложнениям, связанным с гипергликемией. Тимохинон и тимогидрохинон были протестированы на их антигликирующее действие.

[0054] 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 часов. 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.

[0055] Материалы

[0056] Рибоза, бычий сывороточный альбумин (БСА), 96-луночные черные планшеты для микротитрования.

[0057] 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 °С. 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.

[0058] Результаты

[0059] Ингибирование AGE весперлизина и пентозидина тимохиноном и тимогидрохиноном сведено в таблицу 2.

[0060] Таблица 2: Процент ингибирования AGE тимогидрохиноном

Концентрация (мкг/мл)	% 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

[0061] Результаты показали, что тимогидрохинон является биологически более активной молекулой и проявляет повышенную биологическую активность по сравнению с тимохиноном.

[0062] Также оценивали биологические эффекты композиций с увеличенным процентным содержанием тимогидрохинона. В таблице 3 приведен перечень композиций с увеличенным содержанием тимогидрохинона.

[0063] 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

[0064] 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, гиперлипопротеинемию, гиперлипидемию, сердечно-сосудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аллергию, воспаление и остеопороз.

[0065] 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.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

к ответу на уведомление экспертизы от 21.08.2020

1. Способ ингибирования фермента глюкозидазы, включающий 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:

$$\% \text{ ингибирования} = [(\text{поглощение контроля} - \text{поглощение ингибитора}) / \text{поглощение контроля}] \times 100.$$

2. Способ по п. 1, где композиция, содержащая тимогидрохинон, 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.

3. Способ по п. 2, где стабилизатор в указанной композиции выбран из группы, состоящей из розмариновой кислоты, бутилированного гидроксанизола, бутилированного гидрокситолуола, метабисульфита натрия, пропилгаллата, цистеина, аскорбиновой кислоты и токоферолов.

4. Способ по п. 2, где усилитель биодоступности в указанной композиции выбран из группы, содержащей пиперин, кверцетин, экстракт чеснока, экстракт имбиря и нарингин.

5. Способ увеличения поглощения глюкозы клетками млекопитающих, включающий стадии приведения в контакт клеток млекопитающих с эффективной дозой тимогидрохинона или композиции, содержащей тимогидрохинон, для увеличения поглощения глюкозы клетками.

6. Способ по п. 5, где 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.

7. Способ по п. 6, где стабилизатор в указанной композиции выбран из группы, состоящей из розмариновой кислоты, бутилированного гидроксианизола, бутилированного гидрокситолуола, метабисульфита натрия, пропилгаллата, цистеина, аскорбиновой кислоты и токоферолов.

8. Способ по п. 6, где усилитель биодоступности в указанной композиции выбран из группы, включающей пиперин, кверцетин, экстракт чеснока, экстракт имбиря и нарингин.

9. Способ по п. 6, где клетки млекопитающих представляют собой клетки человека.

10. Способ терапевтического лечения гипергликемии и связанных состояний у млекопитающих, включающий стадии введения эффективной дозы тимогидрохинона или композиции, содержащей тимогидрохинон, для снижения уровней глюкозы в крови.

11. Способ по п. 10, 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.

12. Способ по п. 10, где состояния, связанные с гипергликемией, присутствуют при патологических состояниях, выбранных из группы, включающей диабет, ожирение, гиперлиппротеинемию, гиперлипидемию, сердечно-сосудистые осложнения, рак, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, аллергию, воспаление и остеопороз.

13. Способ по п. 10, где 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.

14. Способ по п. 13, где стабилизатор в указанной композиции выбран из группы, состоящей из розмариновой кислоты, бутилированного гидроксианизола, бутилированного гидрокситолуола, метабисульфита натрия, пропилгаллата, цистеина, аскорбиновой кислоты и токоферолов.

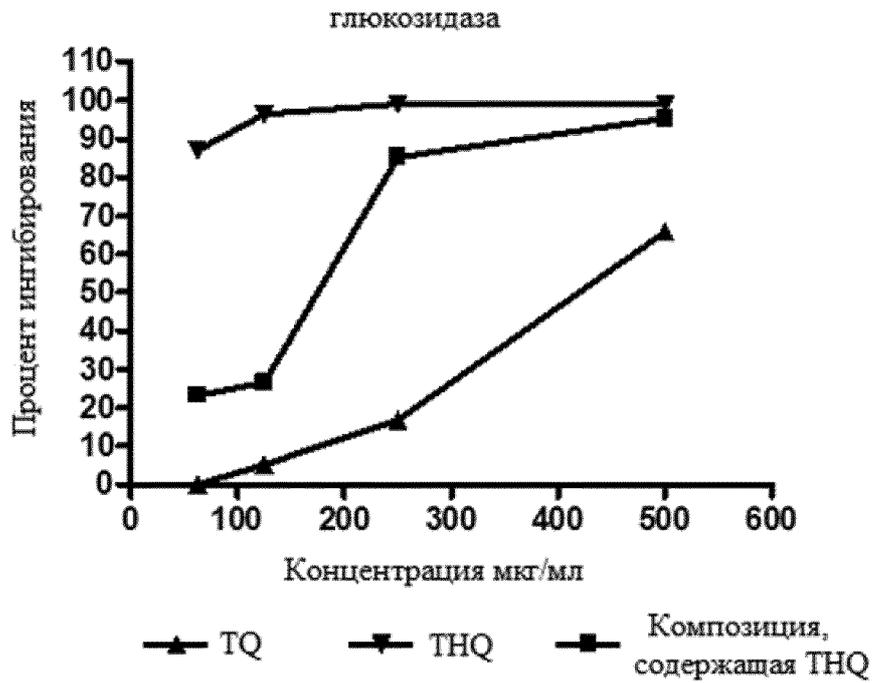
15. Способ по п. 13, где усилитель биодоступности в указанной композиции выбран из группы, включающей пиперин, кверцетин, экстракт чеснока, экстракт имбиря и нарингин.

16. Способ по п. 10, где клетки млекопитающих представляют собой клетки человека.

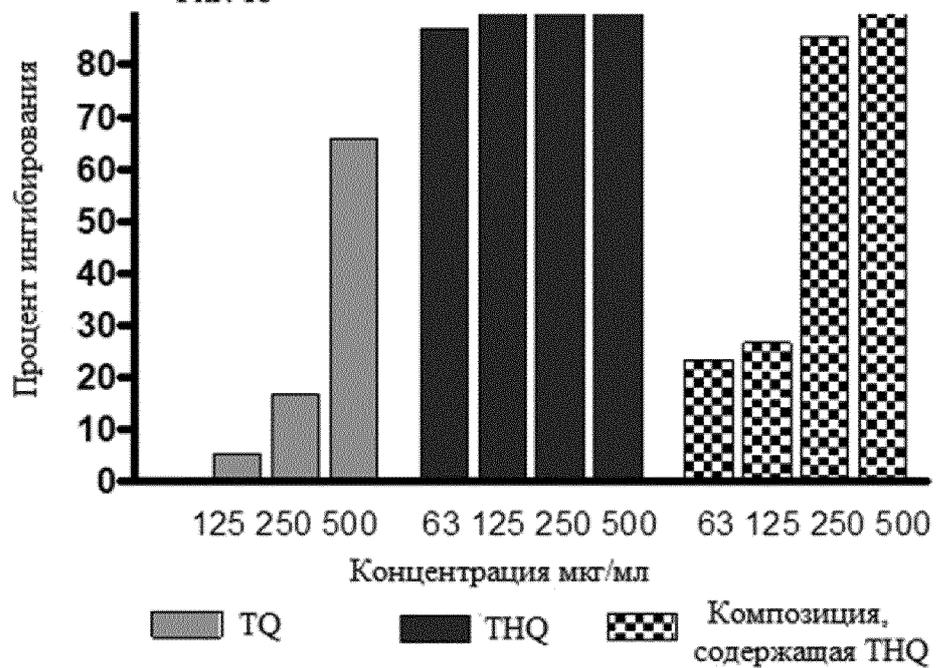
17. Способ по п. 13, где композиция составлена с фармацевтически/нутрицевтически приемлемыми вспомогательными веществами, адъювантами, разбавителями или носителями и вводится перорально в форме таблеток, капсул, гелевых капсул, сиропов, жевательных конфет, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных таблеток, конфет или пищевых продуктов.

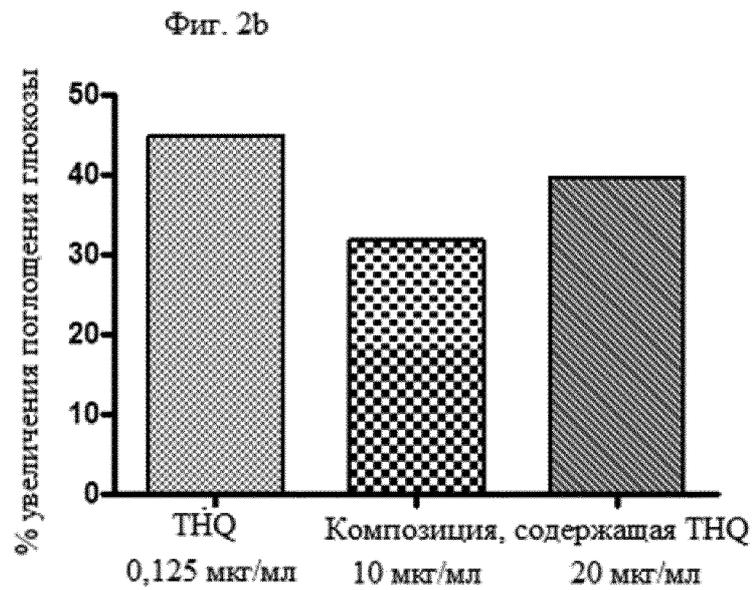
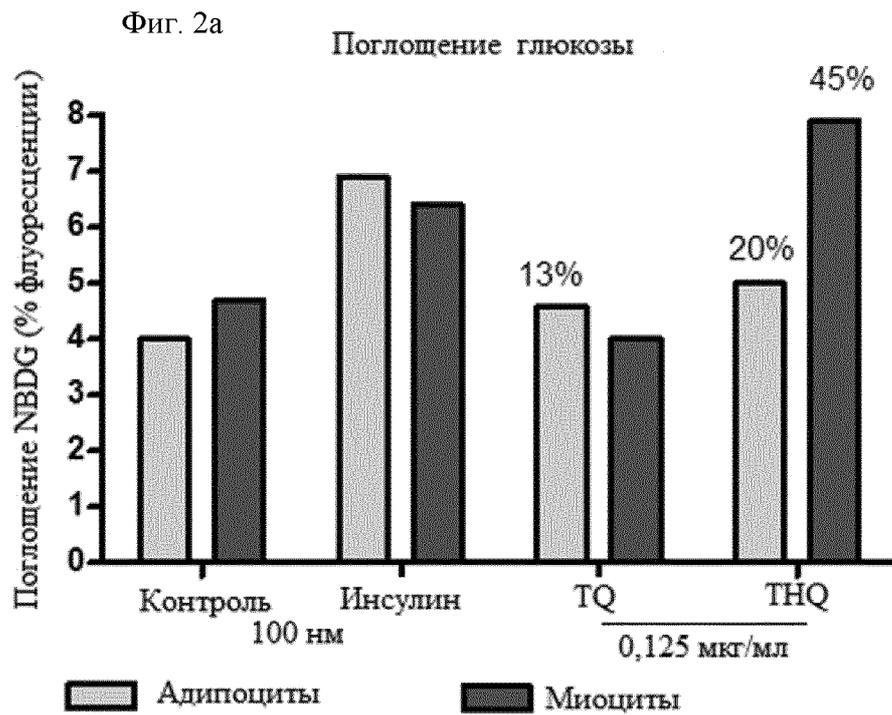
КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И СОПУТСТВУЮЩИХ СОСТОЯНИЙ

Фиг. 1a

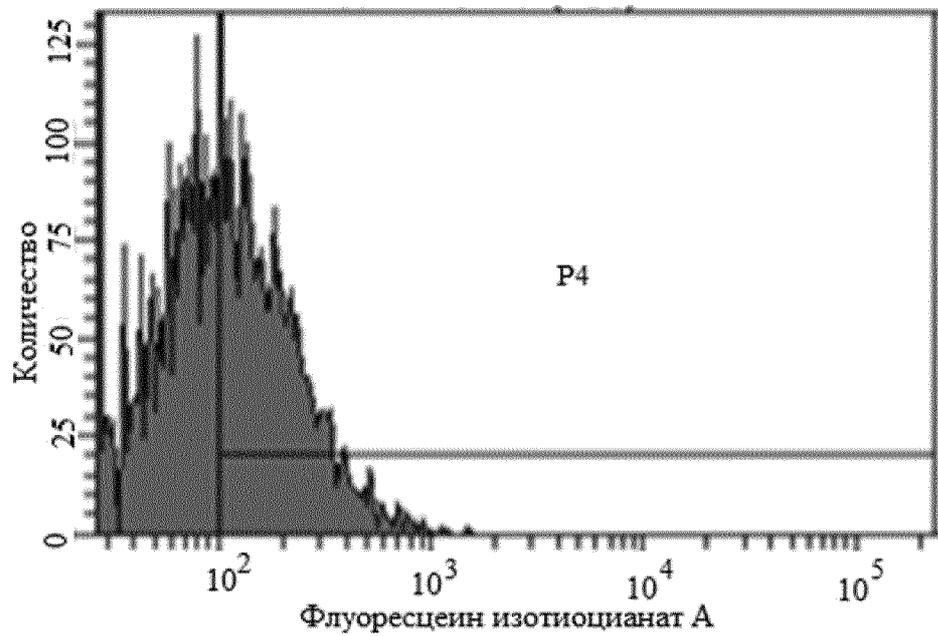


Фиг. 1b

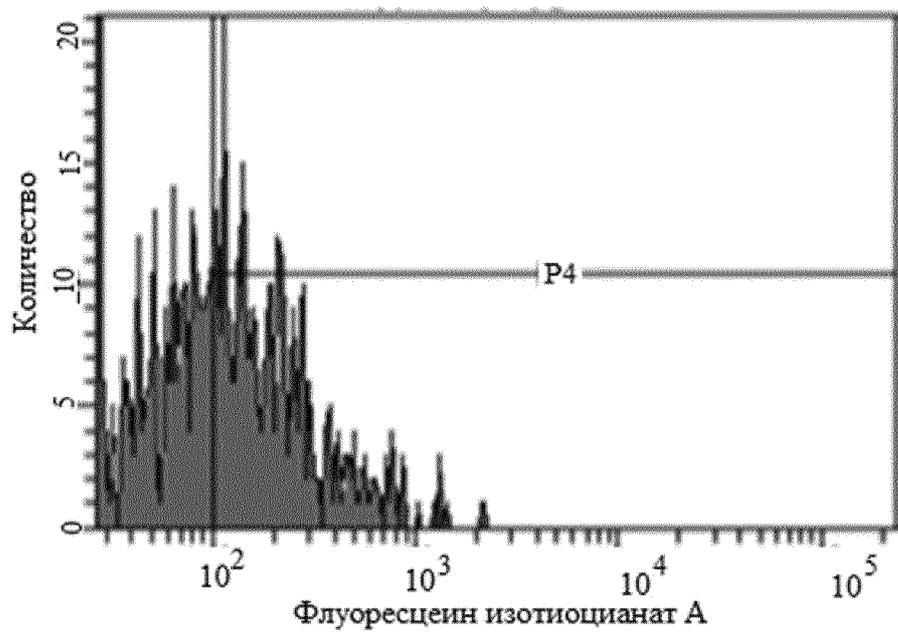




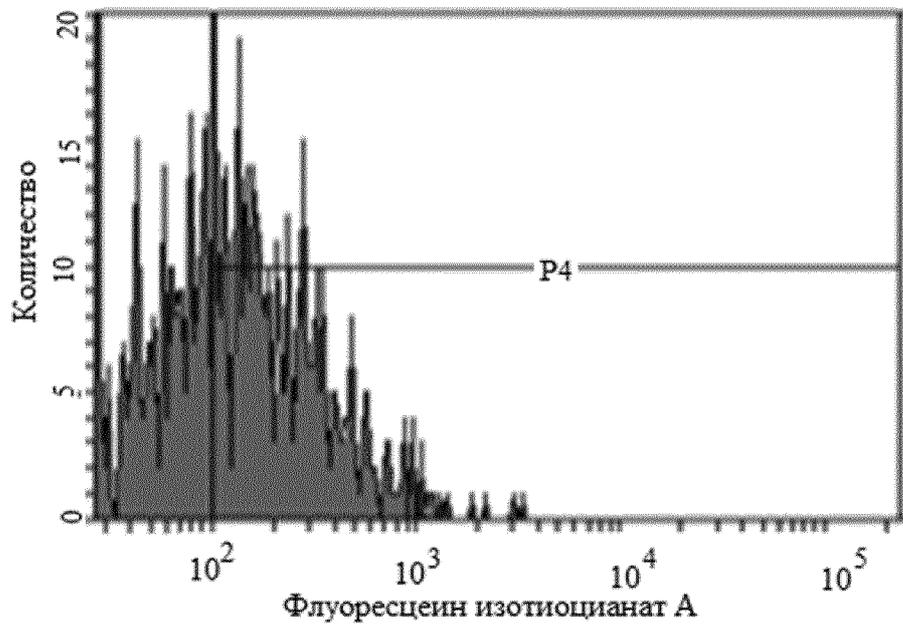
Фиг. 3а



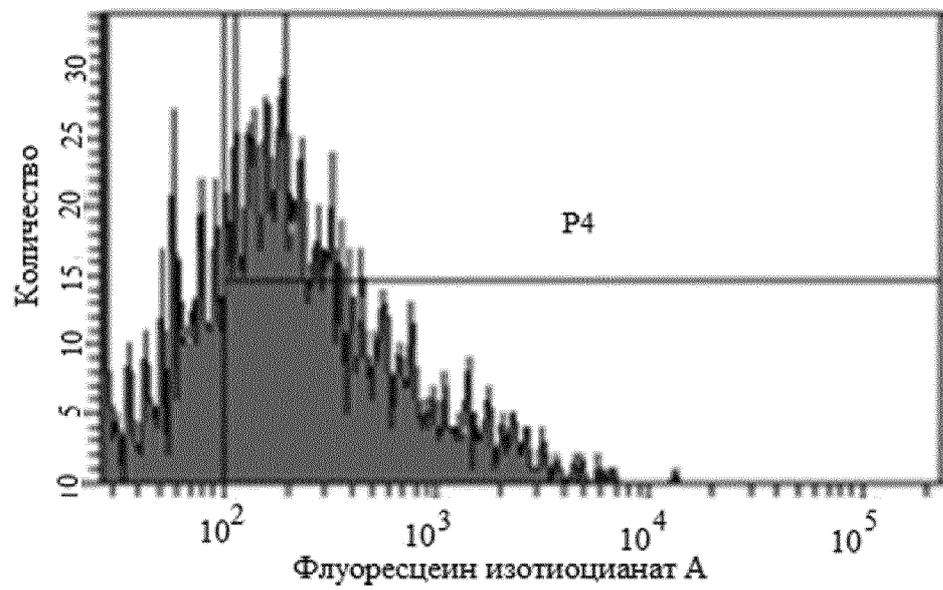
Фиг. 3б



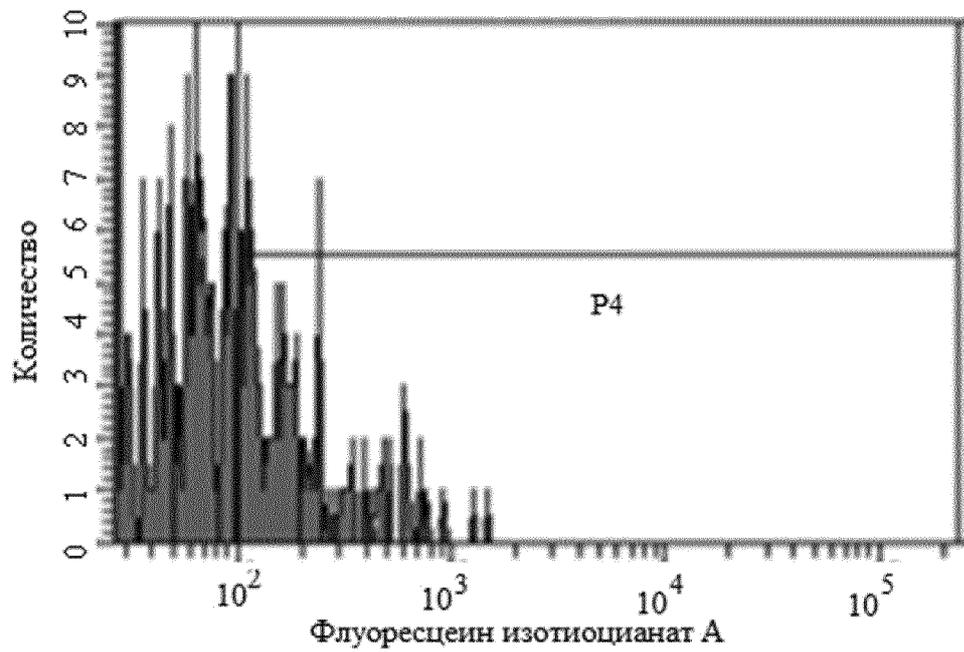
Фиг. 3с



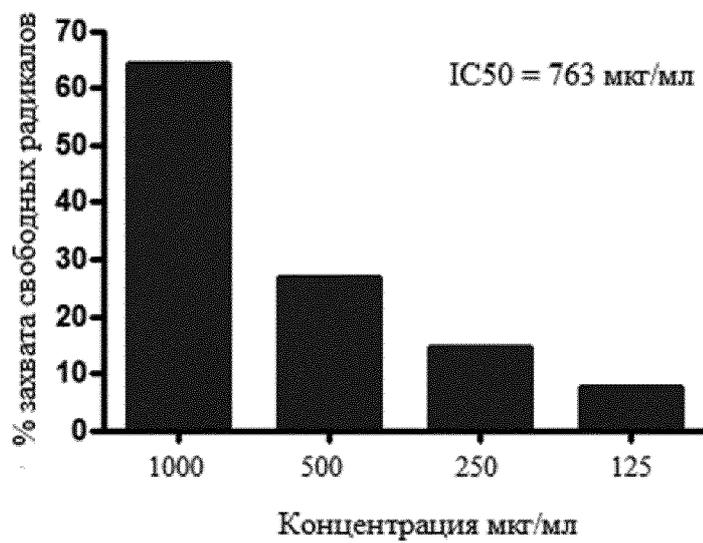
Фиг. 3d



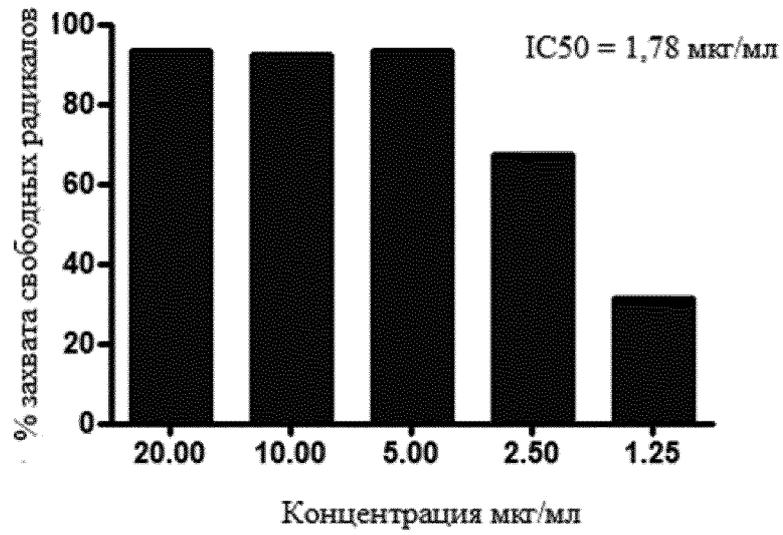
Фиг. 3е



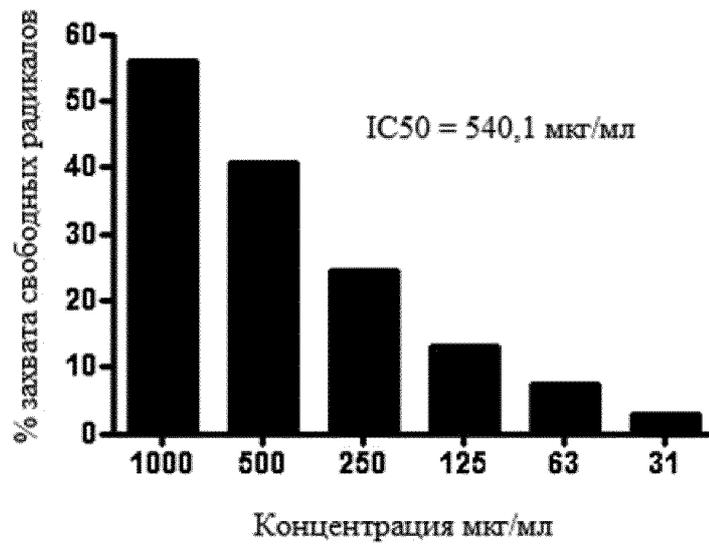
Фиг. 4а



Фиг. 4b



Фиг. 4с



КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ
И СОПУТСТВУЮЩИХ СОСТОЯНИЙ