

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090690 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

(51) Int. Cl. A61K 31/09 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.09

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ТРИМЕТИЛАМИН-N-ОКСИДА И
СВЯЗАННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 16585181

(32) 2019.09.27

(33) US

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

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
МАДЖИД МУХАММЕД (IN);
НАГАБХУШАНАМ КАЛЪЯНАМ (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способу снижения повышенных уровней циркулирующего триметиламин-N-оксида у млекопитающих, включающему использование композиции, содержащей птеростильбен для модификации разнообразия кишечной микрофлоры, измененной пищевыми продуктами, богатыми четвертичными аминами, такими как холин, карнитин, глицинбетаин (GBT), фосфатидилхолин и лецитин, и путем ингибирования фермента монооксигеназы печени FMO3.

A1

202090690

202090690

A1

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ТРИМЕТИЛАМИН–N–ОКСИДА И СВЯЗАННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

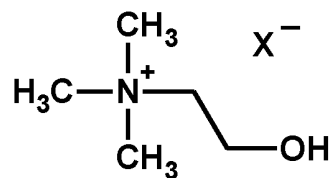
Изобретение в целом относится к композициям, содержащим птеростильбен. Более конкретно настоящее изобретение относится к композициям, содержащим птеростильбен для снижения уровня триметиламин–N–оксида путем модификации разнообразия кишечной микрофлоры и ингибирования фермента монооксигеназы печени.

ОПИСАНИЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

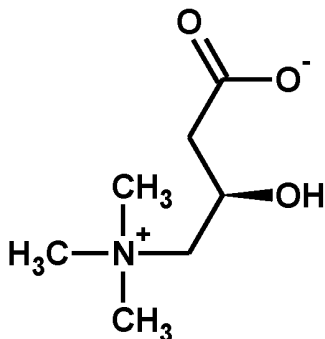
[001] Триметиламин–N–оксид (ТМАО), побочный продукт метаболизма L–карнитина кишечной микрофлорой, вовлечен в развитие множества заболеваний и дисфункций, в частности сосудистого воспаления. Влияние ТМАО на здоровье сердечно–сосудистой системы стало предметом интенсивных исследований в последнее время. Было продемонстрировано, что ТМАО способствует атеросклерозу и тесно связан с риском сердечно–сосудистых заболеваний (ССЗ) (Tang, et al., “Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk” *New Engl J Med.* 2013; 368, 1575–1584; Wang et al., “Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease” *Nature.* 2011 472, 57–63). Также предполагают, что ТМАО играет роль в развитии рака (Lim et al., “ТМАО, the Gut Microbiome, and Colorectal Cancer risk in the Multiethnic Cohort” NIH Project No. 5R01CA204368–02).

[002] Сообщалось, что пищевые продукты (например, красное мясо), богатые четвертичными аминами, такими как холин (STR#1), L–карнитин (STR#2), глицинбетаин (STR#3), фосфатидилхолин (STR#4) и лецитин, высвобождают ТМАО путем метаболизма указанных соединений кишечной микрофлорой с образованием триметиламина (ТМА), представленного STR#5, который затем превращается в триметиламин–N–оксид (ТМАО), представленный STR#6, с помощью фермента печени хозяина флавин-содержащей монооксигеназы 3 (FMO3) (Koeth et al., “Intestinal microbiota metabolism of L–carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis” *Nat Med.* 2013; 19, 576–585; Randrianarisoa et al., “Relationship of Serum Trimethylamine N–Oxide (ТМАО) Levels with early Atherosclerosis in Humans” *Scientific Reports.* 2016; 6, 26745). Лецитины представляют собой смеси

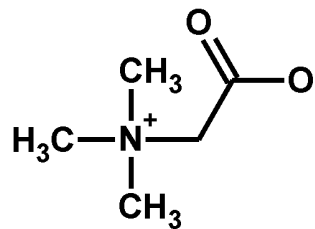
глицерофосфолипидов, включающих фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин и фосфатидную кислоту. Все указанные выше соединения имеют общую структуру триметиламина, представленную STR#5, которая ответственна за образование TMAO.



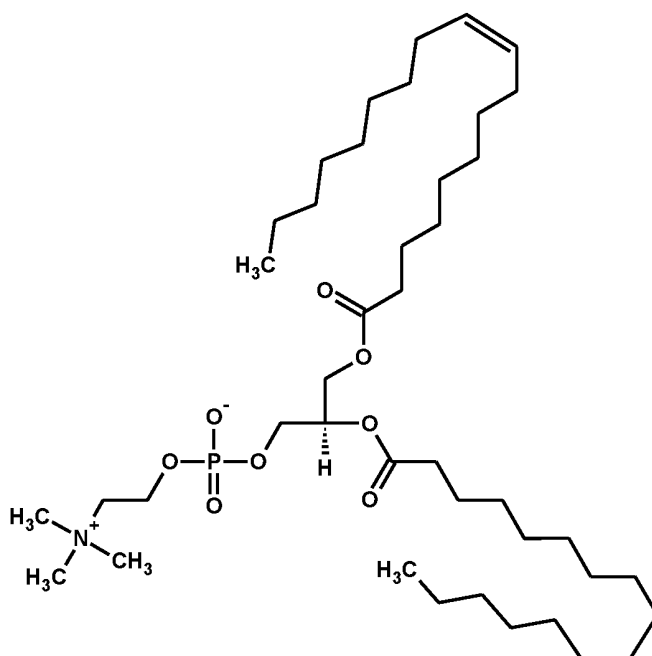
STR#1



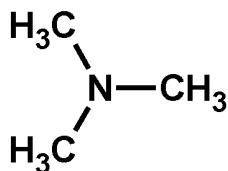
STR#2



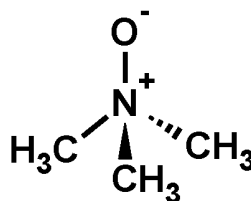
STR#3



STR#4



STR#5



[003] Несмотря на то, что известно, что кишечная микрофлора отвечает за образование ТМАО, генетические и биохимические механизмы, которые вовлечены в образование ТМАО, остаются неясными. Сообщают, что первый фермент, участвующий в метаболизме карнитина, представляет собой двухкомпонентную оксигеназу/редуктазу типа Риске, обозначенную как CntA/B (Zhu et al., “Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota” *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111, 4268–4273). Гены, кодирующие CntA/B, в основном обнаруживались у протеобактерий, особенно у гамма-протеобактерий (в основном происходящих из *Escherichia* и *Acinetobacter*), а также у некоторых бета-протеобактерий и фирмикут (Zhu et al., “Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111, 4268–4273; Rath et al., “Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota” *Microbiome*. 2017; 5, 54).

[004] Антибиотики, которые модифицируют разнообразие микрофлоры кишечника, заметно снижали уровни ТМАО (Koeth et al., “Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis” *Nat Med*. 2013; 19, 576–585). Однако антибиотики могут вызывать много нежелательных побочных эффектов и проблем, связанных с устойчивостью к антибиотикам. В последнее время исследования были сосредоточены на альтернативных стратегиях по снижению уровня ТМАО в плазме с использованием природных молекул из растительных источников. Птеростильбен, природный диметоксилированный аналог ресвератрола, недавно получил огромное внимание. Было обнаружено, что птеростильбен является более метаболически стабильным и проявляет более сильную фармакологическую активность, чем ресвератрол (Wang et al., “Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene” *BioFactors* 2018 44, 16–25; Lee et al., “Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: Targeting on epigenetic regulation” *BioFactors*. 2018; 44, 26–35). Птеростильбен проявляет многочисленные профилактические и терапевтические свойства при широком спектре заболеваний человека, включая неврологические, сердечно-сосудистые, метаболические и гематологические нарушения, и обычно считается безопасным для потребления человеком. Также сообщается, что птеростильбен модифицирует разнообразие микрофлоры кишечника, особенно бактериальные виды, принадлежащие к родам *Akkermansia* и *Odoribacter* при ожирении (Etcheberry et al., “Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to

obesity” Mol Nutr Food Res. 2017; 61). Однако общеизвестно, что разнообразие микрофлоры кишечника меняется с диетой (Rachel Feltman “The Gut’s Microbiome Changes Rapidly with Diet” Scientific American, December 14, 2013, <https://www.scientificamerican.com/article/the-guts-microbiome-changes-diet/>, accessed 30 August 2019), и мало что известно о влиянии птеростильбена на модификацию разнообразия микрофлоры в кишечнике после приема пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами, в частности, карнитином, который является источником ТМАО. Настоящее изобретение раскрывает эффект птеростильбена в отношении снижения уровней циркулирующего ТМАО путем а) модификации разнообразия микрофлоры кишечника после потребления пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами, и б) ингибирования активности FMO3.

[005] Главной целью изобретения является раскрытие композиции, содержащей птеростильбен, для снижения уровня ТМАО у млекопитающих.

[006] Другой целью изобретения является раскрытие композиции, содержащей птеростильбен, для модификации разнообразия микрофлоры кишечника, изменяемого пищевыми продуктами, богатыми четвертичными аминами.

[007] Еще одной целью изобретения является раскрытие композиции, содержащей птеростильбен, для ингибирования активности фермента монооксигеназы печени FMO3.

[008] Настоящее изобретение решает вышеупомянутые задачи и обеспечивает соответствующие преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[009] Согласно предпочтительному воплощению настоящее изобретение относится к способу снижения уровней циркулирующего ТМАО у млекопитающих, включающему введение композиции, содержащей птеростильбен, млекопитающим, нуждающимся в таком снижении.

[010] В частности, изобретение относится к способу снижения уровней циркулирующего ТМАО у млекопитающих, включающему использование композиции, содержащей птеростильбен, путем модификации разнообразия микрофлоры кишечника, измененного пищевыми продуктами, богатыми четвертичными аминами, и путем ингибирования фермента монооксигеназы печени FMO3.

[011] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из последующего более подробного описания вместе с сопровождающими изображениями, которые иллюстрируют, в качестве примера, принцип изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[012] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии этого патента или публикации патентной заявки с цветными чертежами будут предоставлены ведомством по запросу и при оплате необходимой пошлины.

[013] Фиг. 1А является графическим представлением результатов полимеразной цепной реакции, используемой для количественного определения уровня экспрессии воспалительного гена VCAM-1. Значения даны как среднее $\pm$ SE (стандартная ошибка). ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[014] Фиг. 1В является графическим представлением результатов полимеразной цепной реакции, используемой для количественного определения уровня экспрессии воспалительного гена TNF α . Значения даны как среднее $\pm$ SE. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[015] Фиг. 1С является графическим представлением результатов полимеразной цепной реакции, используемой для количественного определения уровня экспрессии е-селектина. Значения даны как среднее $\pm$ SE. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[016] Фиг. 2А является графическим представлением уровней ТМАО в плазме самок мышей В6, измеренных с использованием ЖХ–МС/МС (жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией). Значения даны как среднее $\pm$ SD (стандартное отклонение), n равно 3 для каждой группы. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[017] Фиг. 2А является графическим представлением уровней карнитина в плазме самок мышей В6, измеренных с использованием ЖХ–МС/МС. Значения даны как среднее $\pm$ SD (стандартное отклонение), n равно 3 для каждой группы. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[018] Фиг. 3А является графическим представлением тепловой карты анализа секвенирования гена 16S рРНК микрофлоры слепой кишки на уровне рода. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[019] Фиг. 3В является графическим представлением доли *Erysipelotrichia* (*Turibacter*), значительно измененной при добавлении карнитина. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[020] Фиг. 3С является графическим представлением частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), демонстрирующего различный состав микрофлоры слепой кишки среди групп. Каждая точка данных представляет один образец, а форма точки обозначает группу (процентное изменение, описываемое каждой PLS, показано в скобках). ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

[021] Фиг. 4 является графическим представлением уровней экспрессии мРНК FMO3 печени, определенных с помощью ОТ-кПЦР (количественная ПЦР с обратной транскрипцией) и нормализованные к GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Значения даны как среднее $\pm$ SD, n равно 3 для каждой группы. ND означает нормальную диету; Car – карнитин; Pte – птеростильбен; Abs – смесь антибиотиков.

ОПИСАНИЕ НАИБОЛЕЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВОПЛОЩЕНИЙ

[022] Согласно наиболее предпочтительному воплощению изобретение относится к способу нормализации повышенных уровней циркулирующего триметиламин-N-оксида у млекопитающих, включающему стадию введения композиции, содержащей птеростильбен, млекопитающим, нуждающимся в таком снижении. В одном из аспектов уровни триметиламин-N-оксида являются повышенными после потребления пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами. В одном из аспектов четвертичные амины выбраны из группы, включающей холин, карнитин, глицинбетаин (GBT) и фосфатидилхолин, и лецитин. В одном из аспектов четвертичный амин представляет собой карнитин. Согласно еще одному воплощению пищевые продукты, богатые четвертичными аминами, выбраны из группы, включающей мясо, морепродукты, птицу, приготовленные зеленые овощи, такие как брюссельская капуста и брокколи, бобовые, такие как соевые бобы, фасоль и черные бобы, и молоко.

[023] В одном из аспектов снижение уровней триметиламин–N–оксида с помощью композиции, содержащей птеростильбен, достигается путем а) модификации разнообразия микрофлоры кишечника за счет потребления пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами, и б) ингибирования фермента монооксигеназы печени FMO3. В другом аспекте изобретение также относится к способу модификации разнообразия микрофлоры кишечника, в котором филы кишечной микрофлоры, модифицированной птеростильбеном, выбраны из группы, включающей Bacteroidetes, Deferribacteres, Firmicutes, Proteobacteria и Verrucomicrobia. В другом аспекте изобретения филы кишечной микрофлоры, модифицированной птеростильбеном, выбраны из группы, включающей Bacteroidetes и Firmicutes. В другом аспекте изобретения род кишечной микрофлоры, модифицированной птеростильбеном, выбран из группы, состоящей из Enterobacter, Escherichia, Ruminococcaceae, Ruminiclostridium, Alistipes, Lachnospiraceae, Mucispirillum, Bacteroides, Marvinbryantia, Lactobacillus, Prevotellaceae, Blautia, Turibacter, Intestinimonas, Eubacterium, Oscillibacter, Lachnospiraceae, Lachnoclostridium, Ruminococcus, Anaerotruncus, Lachnospiraceae, Romboutsia, Parabacteroides, Butyricicoccus, Roseburia, Ruminococcaceae, and Akkermansia. В другом аспекте род кишечной микрофлоры, модифицированной птеростильбеном, выбран из группы, состоящей из Bacteroides и Turibacter.

[024] В одном из воплощений, в композицию, содержащую птеростильбен, включают фармацевтически/нутрицевтически приемлемые наполнители, адъюванты, усилители биодоступности, антиоксиданты, разбавители или носители, и вводят перорально в форме таблеток, капсул, сиропов, жележных пастилок, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных препаратов, конфет или пищи.

[025] Указанные выше наиболее предпочтительные воплощения, включающие технические признаки и технические эффекты настоящего изобретения, поясняются посредством иллюстративных примеров ниже.

[026] ПРИМЕРЫ

[027] Пример 1: Птеростильбен для снижения уровня триметиламин–N–оксида

[028] Животная модель и протокол обработки

[029] Шестинедельных самок мышей C57BL/6 (B6) покупали к BioLASCO (Taippei, Taiwan) и акклиматизировали в течение 1 недели. Мышей кормили без ограничений экспериментальными рационами LabDiet Rodent 5001. Перечисленный ниже протокол

использования животных был рассмотрен и одобрен Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (NTU105–EL–00115). В этом эксперименте мышей случайным образом разделили на четыре группы: получающие нормальную диету, диету с 1,3% карнитином с водой, диету с 1,3% карнитином с водой вместе с 0,05% птеростильбеном (около 250 мг/кг/сутки), и диету с 1,3% карнитином с водой вместе со смесью антибиотиков в течение 6 недель. Мыши получали смесь пероральных антибиотиков (ванкомицин 500 мг/л, метронидазол 1 г/л, неомицин 1 г/л и ампициллин 1 г/л в питьевой воде) в течение 6 недель. Смесь антибиотиков подавляла симбиотическую микрофлору кишечника и подавалась через желудочный зонд каждые 12 часов. В конце шестинедельного исследования мышей умерщвляли асфиксией CO₂.

[030] Экстракция РНК и обратная транскрипция

[031] РНК печени и аорты экстрагировали с использованием реагента TRIzol. Разделение фаз проводили путем добавления 200 мкл хлороформа / 1 мл TRIzol. После центрифугирования водную фазу (вверху) переносили в новую пробирку. Добавляли 500 мкл изопропанола в новую пробирку и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для осаждения РНК. Использовали 75% этанол для удаления органических реагентов и солей. Ресуспензировали осадок в ddH₂O (дистиллированная деминерализованная вода).

[032] Качество РНК и концентрации РНК затем определяли количественно с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000. Каждый образец РНК обратно транскрибировали в кДНК с использованием 1 мкг РНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора для синтеза кДНК SensiFAST™, включающего случайные гексамеры и олиго(дТ) в общем объеме реакции 20 мкл, следуя инструкциям производителя. Вкратце, обратную транскрипцию проводили в течение 15 минут при 42 °C с последующим нагреванием при 85 °C в течение 5 минут для инактивации фермента. Полученную кДНК хранили при –20 °C для длительного хранения и использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

[033] Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (кПЦР)

[034] Уровни мРНК определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием системы ПЦР в реальном времени StepOnePlus и мастер-смеси SYBR Green по сравнению с конститутивно экспрессируемым геном (GAPDH) с использованием метода относительной количественной оценки ($\Delta\Delta C_t$). Последовательности

праймеров для реакций SYBR Green были разработаны и синтезированы Mission Biotech. Список последовательностей праймеров показан ниже.

[035] Таблица 1: Последовательности праймеров

Название гена	Последовательность праймера (5'–3')	Размер продукта (п.о.)
FMO3	TGCTGCAGAACTCAGCCATGTAGCTC	183
	ATCTGCCTTGTGTACCACCAGTC	
TNF- α	AGTGACAAGCCTGTAGC	202
	TGAGGAGCACGTAAGTCG	
VCAM-1	AGTTGGGGATTTCGTTGTTC	107
	CATTCCTTACCACCCCATTC	
E-селектин	CCAGAATGGCGTCATGGA	89
	TAAAGCCCTCATTGCATTGA	
GAPDH	TCAACGGCACAGTCAAGG	126
	ACTCCACGACATACTCAGC	

[036] Количественная оценка уровней карнитина и TMAO в плазме

[037] ЖХ–МС/МС использовали для количественной оценки L–карнитина и TMAO в плазме в режиме положительного MRM (мониторинг множественных реакций) с использованием приборной водной системы UPLC (Acquity, Waters, Mildford, MA, USA) и масс–спектрометра с тройным квадруполом (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK). Разделение проводили с использованием колонки Agilent ZORBAX NH2 (5 мкм, 4,6 мм × 250 мм), и колонку термостатировали при 30 °C. Подвижная фаза А состояла из 10 mM NaOAc и 0,6% уксусной кислоты в ACN (акрилонитрил), а подвижная фаза В состояла из 10 mM NaOAc и 0,6% уксусной кислоты в воде. Градиентный профиль показан в таблице 2.

[038] Таблица 2: Градиентный профиль, используемый в методе ЖХ-МС/МС

Время градиента (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Подвижная фаза А (%)	Подвижная фаза В (%)
Исходное	0,800	10,0	90,0
0,50	0,800	10,0	90,0
1,00	0,800	20,0	80,0
2,50	1,000	45,0	35,0
3,00	1,000	60,0	40,0
4,00	1,000	60,0	40,0
4,45	1,000	70,0	30,0

[039] Параметры МС были установлены следующим образом: 100 °С для температуры источника, 650 °С для температуры десольватации, 2 л/ч для газового потока в конусе, 600 л/ч для потока десольватационного газа и 1500 В для капиллярного напряжения. Напряжение на конусе было установлено на уровне 10 В. Концентрации каждого аналита в образцах определяли по калибровочным кривым.

[040] Анализ микрофлоры методом секвенирования следующего поколения

[041] Состав микробного сообщества оценивали путем пиросеквенирования генов 16S рНК, полученных из слепой кишки мыши (n равно 3 для каждой группы). Тотальная ДНК была выделена и очищена с использованием набора InnusPEED Stool DNA в соответствии с инструкциями производителя. Качество образцов ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000. Образцы ДНК отправляли в Biotools Co., Ltd. для амплификации гена 16S рНК, конструирования библиотеки последовательностей и секвенирования. Области V3–V4 бактериальной 16S рДНК были амплифицированы с использованием технологии ПЦР. Библиотеки ДНК секвенировали на платформе IlluminaHiSeq2500 и генерировали парные чтения (250 п.о.).

[042] Статистический анализ

[043] Количественные данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием SPSS 12.0. Р-значение, составлявшее менее 0,05, считали статистически значимым и применяли критерий множественного диапазона Дункана, если значение р составляло менее 0,05. Графики строили с помощью программы SigmaPlot 12.5.

[044] Результаты

[045] Шестинедельных мышей C57BL/6 (B6) со сходной начальной массой случайным образом разделяли на четыре экспериментальные группы следующим образом: получающие нормальную диету (ND), воду с 1,3% карнитином (Car), воду с карнитином с 0,05% птеростильбеном (Car+Pte) и воду с карнитином со смесью антибиотиков (Car+Abs). Поскольку метронидазол придает питьевой воде настолько неприятный вкус, что мыши воздерживаются от питья, мышам группы Car+Abs вводили пероральную смесь антибиотиков (включая ванкомицин 500 мг/л, метронидазол 1 г/л, неомицин 1 г/л и ампициллин 1 г/л в питьевой воде) в течение 6 недель, чтобы истощить их кишечную микрофлору. После 6 недель, мышей умерщвляли путем удушения CO₂ для дальнейшего механистического исследования.

[046] Анализ экспрессии генов сосудистого воспаления в аорте и оценка уровней карнитина и ТМАО в плазме

[047] Группа, получавшая карнитин, показала значительно повышенную экспрессию VCAM-1, TNF- α и E-селектина по сравнению с ND-группой (фиг. 1A, 1B и 1C). Экспрессия гена сосудистого воспаления в группе Car+Pte была значительно ниже по сравнению с группой, получавшей карнитин, и сходной с группой ND. Группа Car+Abs показала пониженную экспрессию VCAM-1 и TNF- α .

[048] Уровень циркулирующего ТМАО был значительно выше в группе, получавшей карнитин, по сравнению с группой ND, вплоть до 8-кратного увеличения уровня ТМАО (фиг. 2A). Однако уровень ТМАО в плазме в группе Car+Abs резко снизился, вследствие того факта, что образование ТМАО из карнитина индуцируется метаболизмом кишечной микрофлоры хозяина. При введении антибиотиков возможности продуцирования ТМАО практически полностью были исчерпаны. В группе Car+Pte уровень ТМАО в плазме также

значительно понизился по сравнению с группой, получавшей карнитин, хотя подавление повышения ТМАО не сходно с таковым в группе ND. Уровень карнитина в плазме в группе Car+Abs был самым высоким среди групп, поскольку метаболизм карнитина в ТМАО с помощью кишечной микрофлоры не происходил у мышей, получавших антибиотик (фиг. 2B). Уровень карнитина в плазме в группе, получавшей карнитин, сходен с уровнем в группе ND. Примечательно, что птеростильбен увеличивал уровень циркулирующего карнитина и снижал уровень ТМАО в плазме. Эти результаты показывают, что птеростильбен может подавлять метаболическую активность кишечной микрофлоры в отношении метаболизма карнитина в ТМАО и улучшать абсорбцию карнитина.

[049] Анализ состава кишечной микрофлоры

[050] Родовой анализ показал, что в группе, получавшей карнитин, наблюдается увеличение относительной численности *Turibacter*, который относится к *Erysipelotrichia* (фиг. 3A и 3B). Птеростильбен увеличивал относительную распространенность *Bacteroides* по сравнению с группой, получавшей карнитин (Фиг. 3A). Сообщают, что *Bacteroides* отрицательно связаны с уровнем ТМАО в плазме (Chen et al., “Resveratrol Attenuates Trimethylamine–N–Oxide (TMAO)–Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota” MBio. 2016; 7, e02210–e02215). Примечательно, что в группе Car+Pte доля *Erysipelotrichia* снизилась по сравнению с группой, получавшей карнитин. Эти данные свидетельствуют о том, что птеростильбен может манипулировать кишечной микрофлорой, измененной при кормлении карнитином.

[051] На графике PLS–DA показано, что PLS 1 и PLS 2 объяснили изменение состава микрофлоры кишечника на 29,43% и 14,39% соответственно (Фиг. 3C). Эти данные свидетельствуют о том, что птеростильбен может быть полезен для нового терапевтического воздействия для купирования сосудистого воспаления и ослабления атеросклероза за счет коррекции состава кишечной микрофлоры и снижения способности к выработке ТМАО.

[052] Анализ уровня экспрессии мРНК фермента печени FMO3

[053] Группа, получавшая карнитин, показала примерно трехкратное увеличение уровня экспрессии мРНК FMO3 печени по сравнению с группой ND. Однако наблюдали значительное снижение уровней мРНК FMO3 печени в группе, получавшей птеростильбен, по сравнению с группой, получавшей карнитин (Фиг. 4). Это может быть причиной снижения уровня ТМАО в плазме в группе Car+Pte. Введение антибиотиков подавляло выработку

вторичных желчных кислот и вызывало накопление первичных желчных кислот, таких как холевая кислота, поскольку в группе, получавшей антибиотики, наблюдалось повышение уровня мРНК FMO3, аналогичное группе карнитина.

[054] Пример 2: композиции/препараты, содержащие птеростильбен

[055] Учитывая, что птеростильбен полезен для снижения уровня циркулирующего ТМАО, путем модификации разнообразия микрофлоры кишечника его можно использовать в качестве пищевой добавки для ослабления воздействия ТМАО, особенно после употребления продуктов, богатых четвертичными аминами (например, красного мяса), особенно карнитином. Он может быть эффективно смешан с различными композициями/препаратами, которые можно употреблять после приема продуктов, богатых карнитином, чтобы смягчить их потенциальные вредные эффекты.

[056] В одном из аспектов один или более антиоксидантов и противовоспалительных агентов выбраны из группы, состоящей из комплекса витаминов А, D, Е, К, С, В, розмариновой кислоты, альфа-липоевой кислоты, оксиресвератрола, эллаговой кислоты, глицирризиновой кислоты, эпигаллокатехин галлата, полифенолов растений, глабридина, морингового масла, олеаноловой кислоты, олеуропеина, карнозной кислоты, урокановой кислоты, фитоена, липоидной кислоты, липоамида, ферритина, уебинебилен, дезинферицина, биллифинолина, аскорбилпальмитата, аскорбилфосфата магния, аскорбилацетата, токоферолов и производных, такие как ацетат витамина Е, мочевая кислота, α-глюкозилрутин, калалаза и супероксиддисмутаза, глутатиона, соединений селена, бутилированного гидроксианизола (ВНА), бутилированного гидрокситолуола (ВН) метабисульфита натрия (SMB), пропилгаллата (PG) и аминокислоты цистеина, но не ограничиваются ими.

[057] В другом связанном аспекте один или более усилителей биодоступности выбирают из группы, состоящей из пиперина, тетрагидропиперина, кверцетина, экстракта чеснока, экстракта имбиря и нарингина, но не ограничиваются ими.

[058] В таблицах 3-6 проиллюстрированы примеры препаратов, содержащих птеростильбен.

[059] Таблица 3: Предварительная смесь, содержащая птеростильбен

Активные ингредиенты Птеростильбен (50–500 мг) β-глюкогаллин и галлат муциновой кислоты, <i>Bacillus coagulans</i> MTCC 5856, Fenumannans, аквазол трифалы, 20% гинегерол
Вспомогательные вещества Мальтодекстрин, лимонная кислота, яблочная кислота, сукралоза, ароматические добавки лайма, мяты и манго имбиря, а также искусственная ароматическая добавка мяты, порошок зиры, порошок черной соли, асафетида

Инструкция по применению: растворить требуемую предварительную смесь в 200–300 мл воды и хорошо перемешать перед использованием.

[060] Таблица 4: Таблетки птеростильбена

Активные ингредиенты Птеростильбен (50–500 мг)
Вспомогательные вещества Микрокристаллическая целлюлоза, гипромеллоза, кроскармеллоза натрия, коллоидный диоксид кремния, стеарат магния

[061] Таблица 5: Капсулы птеростильбена

Активные ингредиенты Птеростильбен (50–500 мг)
Вспомогательные вещества [062] Микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, стеарат магния

[063] В таблице 6 показан иллюстративный пример жевательной желейной композиции, содержащей птеростильбен.

[064] Таблица 6: Желейная композиция птеростильбена

Активные ингредиенты Птеростильбен (50–500 мг), пектин, сироп глюкозы из зерен пшеницы
Вспомогательные вещества Лимонная кислота, молочная кислота, масло лимонной цедры (ароматизатор), DL–винная кислота, очищенный сахар

[065] Вышеуказанные композиции являются лишь иллюстративными примерами, любой препарат, содержащий указанные выше активные ингредиенты, предназначенный для указанного назначения, будет считаться эквивалентом.

[066] Другие модификации и вариации настоящего изобретения будут очевидными для специалистов в данной области из предшествующего описания и рекомендаций. Таким образом, хотя в данном документе конкретно описаны только некоторые варианты осуществления изобретения, очевидно, что в него могут быть внесены многочисленные модификации, не выходящие за пределы сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ нормализации повышенных уровней циркулирующего триметиламин-N-оксида у млекопитающих, включающий стадию введения композиции, содержащей птеростильбен, млекопитающим, нуждающимся в таком снижении.

2. Способ по п. 1, где уровни триметиламин-N-оксида повышены после употребления пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами.

3. Способ по п. 1, где снижение уровней триметиламин-N-оксида с помощью композиции, содержащей птеростильбен, достигается путем а) модификации разнообразия кишечной микрофлоры, измененной употреблением пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами, и б) ингибирования фермента монооксигеназы печени флавин-содержащей монооксигеназы 3.

4. Способ по п. 2, где четвертичные амины выбраны из группы, состоящей из холина, карнитина, глицинбетаина, и фосфатидилхолина, и лецитина.

5. Способ по п. 2, где четвертичный амин представляет собой карнитин.

6. Способ по п. 2, где указанные пищевые продукты выбраны из группы, состоящей из мяса, морепродуктов, птицы, приготовленных зеленых овощей, таких как брюссельская капуста и брокколи, бобовых, таких как соевые бобы, фасоль и черные бобы, и молока.

7. Способ модификации разнообразия кишечной микрофлоры, измененной употреблением пищевых продуктов, богатых четвертичными аминами, включающий стадию введения млекопитающим композиции, содержащей птеростильбен, где филы кишечной микрофлоры, измененной птеростильбеном, выбраны из группы, состоящей из Bacteroidetes, Deferribacteres, Firmicutes, Proteobacteria и Verrucomicrobia.

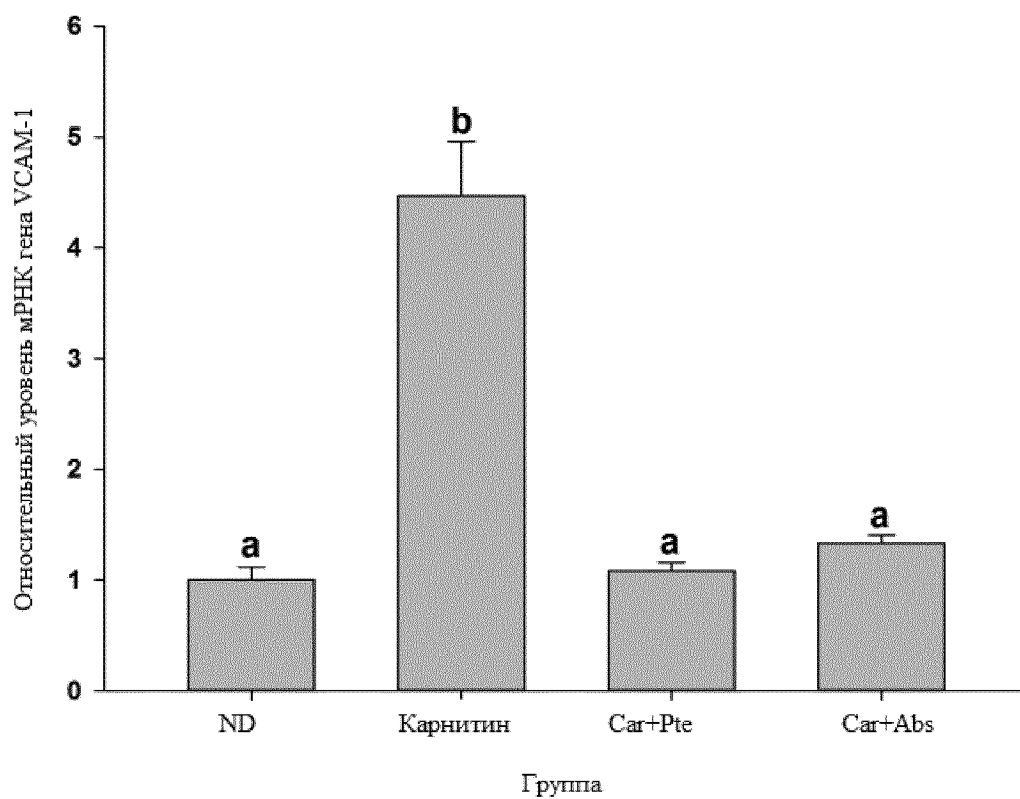
8. Способ по п. 7, где филы кишечной микрофлоры, измененной птеростильбеном, выбраны из группы, состоящей из Bacteroidetes и Firmicutes.

9. Способ по п. 7, где род кишечной микрофлоры, измененной птеростильбеном, выбран из группы, состоящей из Escherichia, Ruminococcaceae, Ruminiclostridium, Alistipes, Lachnospiraceae, Mucispirillum, Bacteroides, Marvinbryantia, Lactobacillus, Prevotellaceae, Blautia, Turibacter, Intestinimonas, Eubacterium, Oscillibacter, Lachnospiraceae, Lachnoclostridium, Ruminococcus, Anaerotruncus, Lachnospiraceae, Romboutsia, Parabacteroides, Butyricicoccus, Roseburia, Ruminococcaceae и Akkermansia.

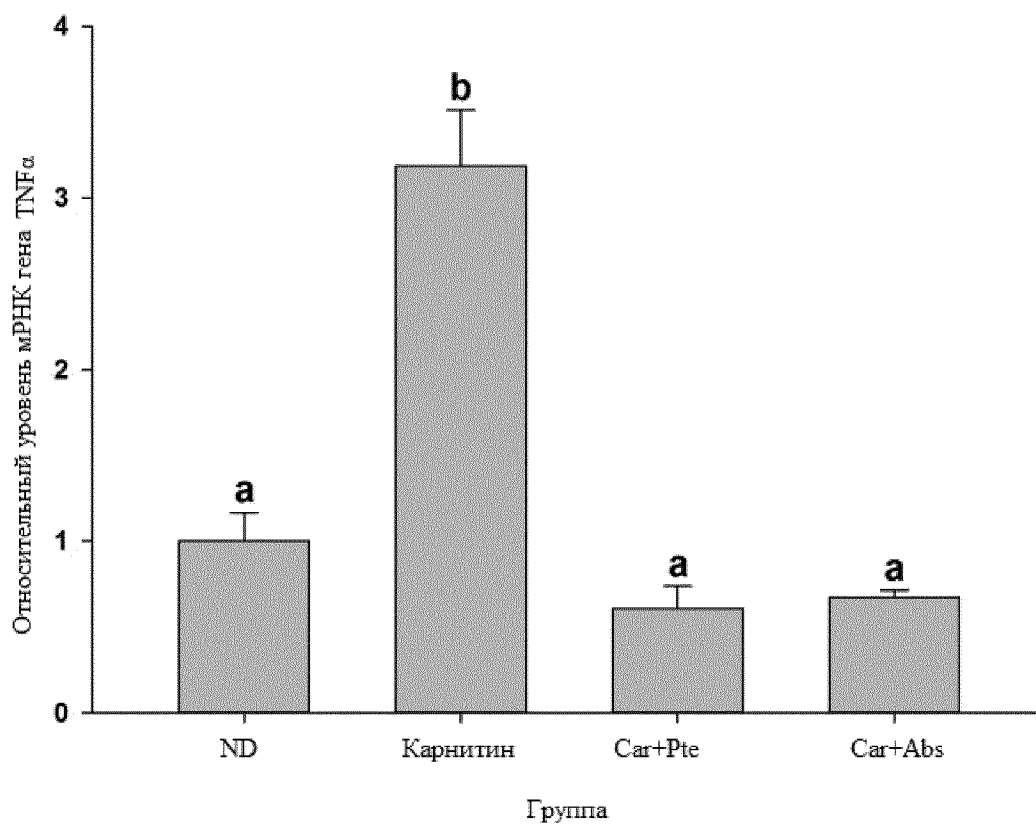
10. Способ по п. 7, где род кишечной микрофлоры, измененной птеростильбеном, выбран из группы, состоящей из Bacteroides и Turibacter.

11. Способ по п. 1 или 7, где в композицию, содержащую птеростильбен, включают фармацевтически/нутрицевтически приемлемые наполнители, адъюванты, усилители биодоступности, антиоксиданты, разбавители или носители, и указанную композицию вводят перорально в форме таблеток, капсул, сиропов, желейных пастилок, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных препаратов, конфет или пищи.

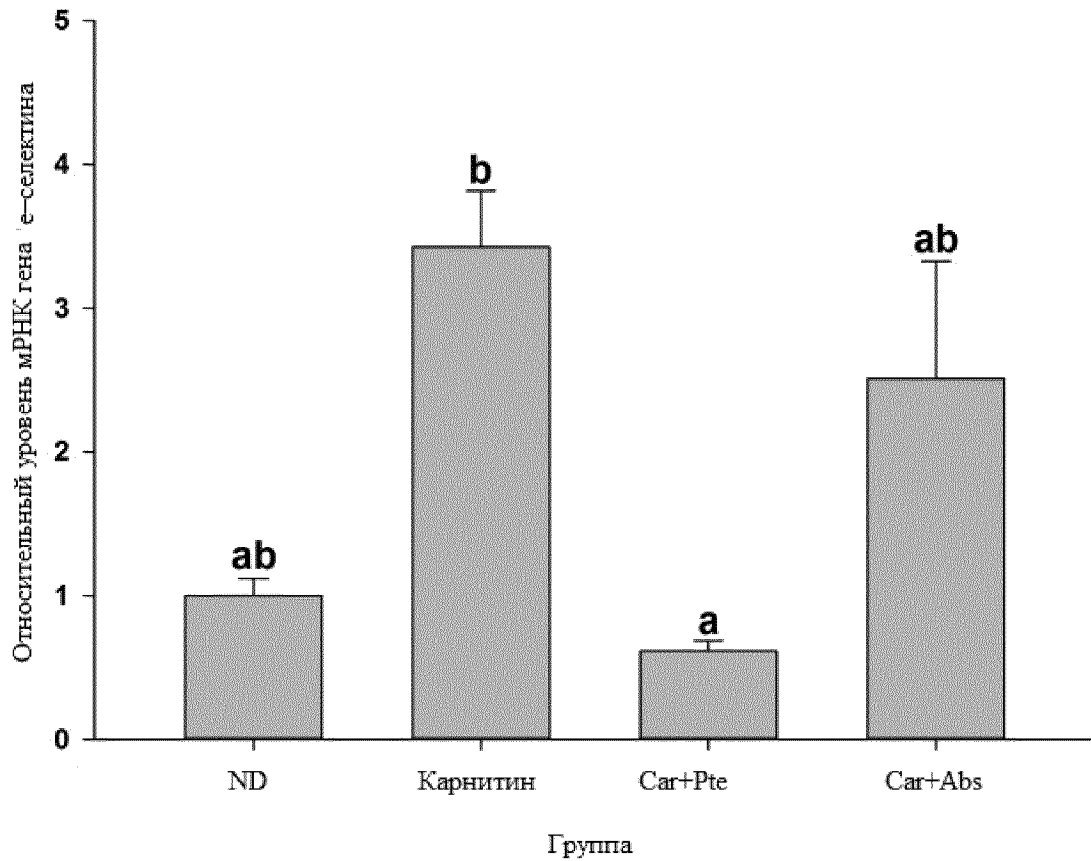
ФИГ. 1А



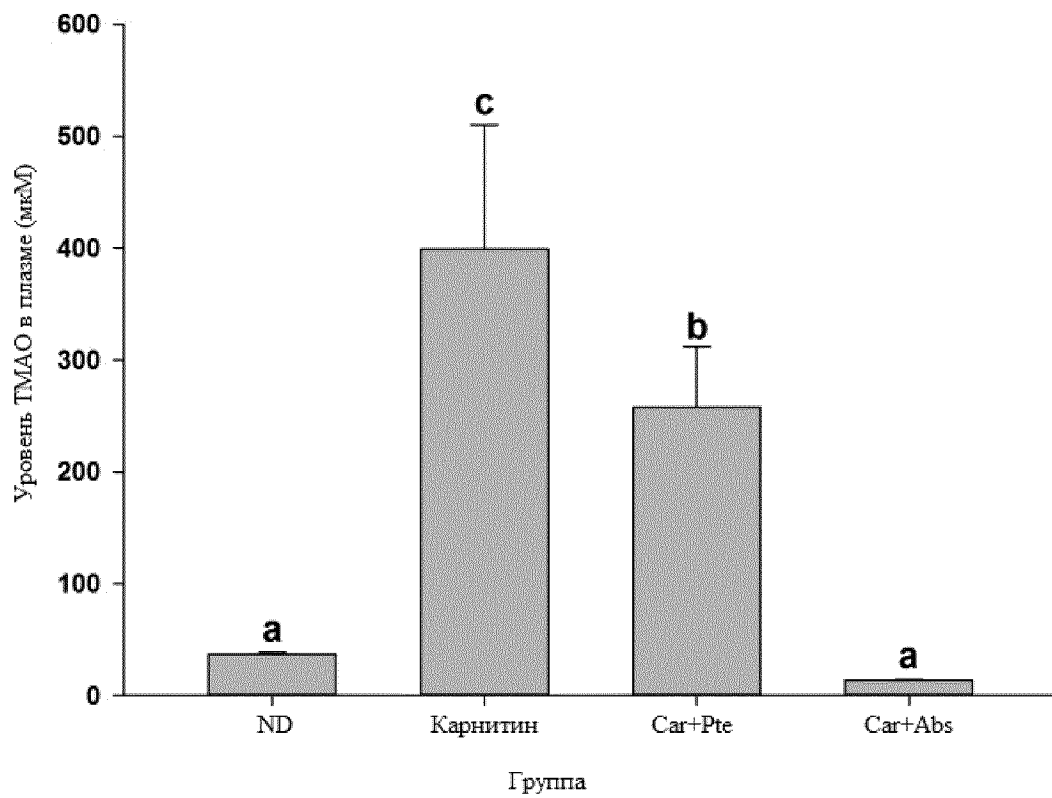
ФИГ. 1В



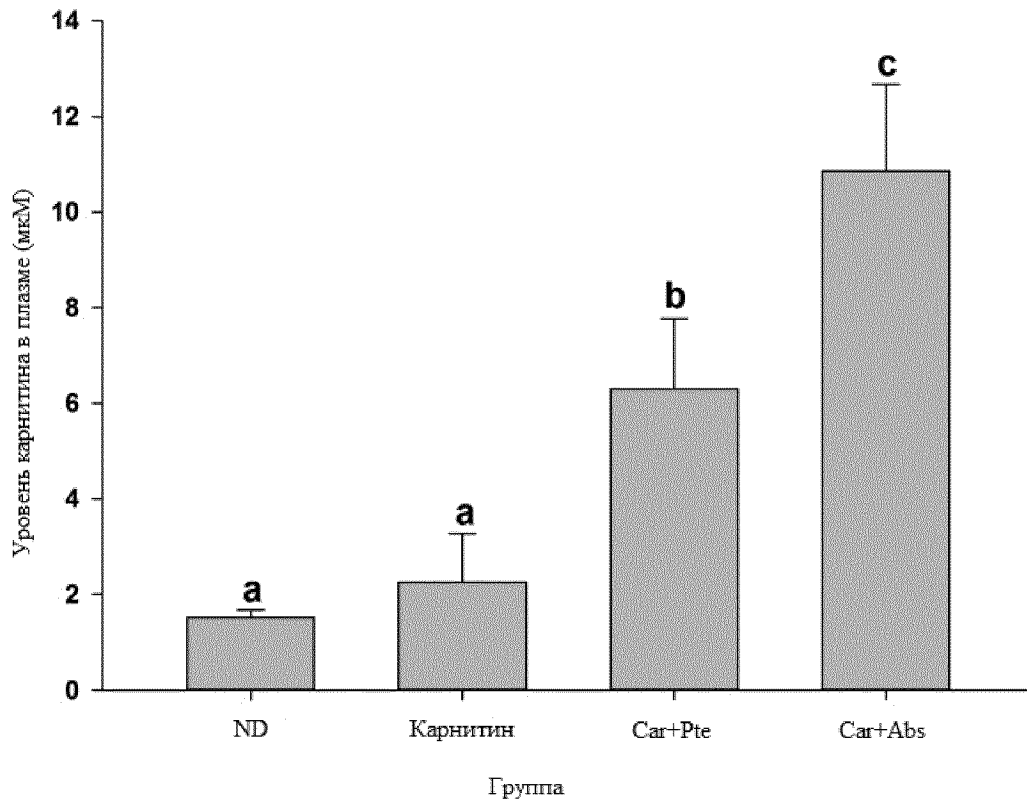
ФИГ. 1С



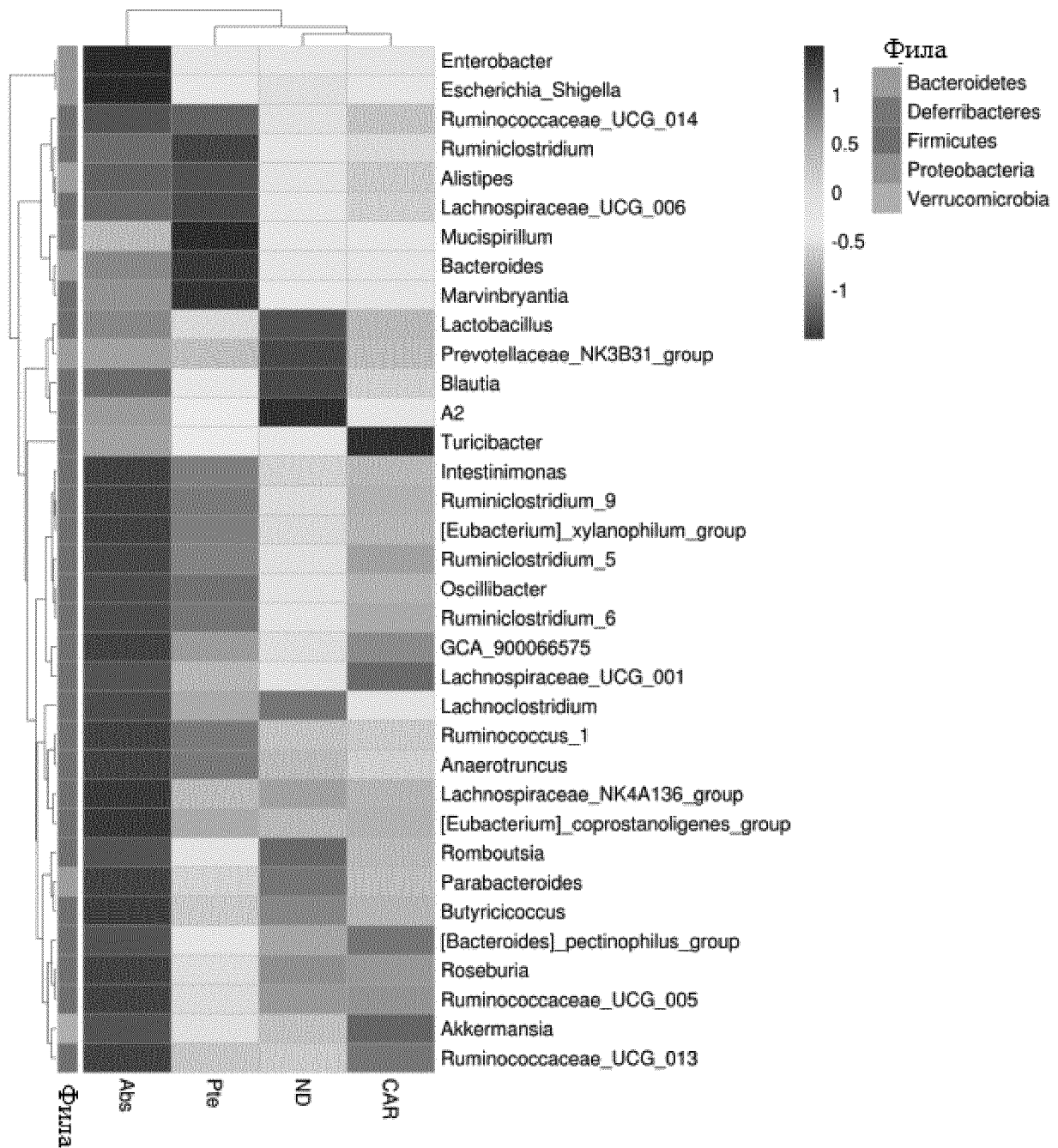
ФИГ. 2А



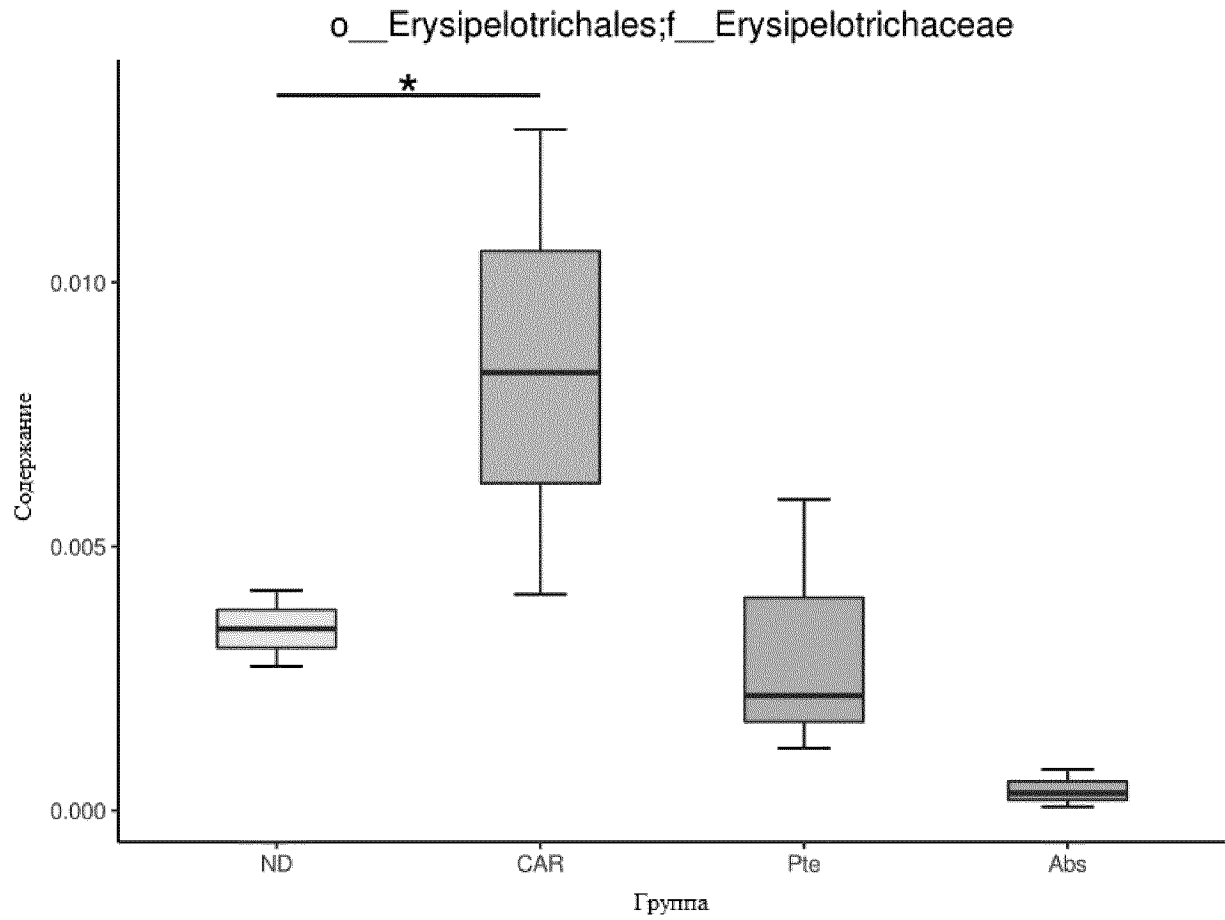
ФИГ. 2В



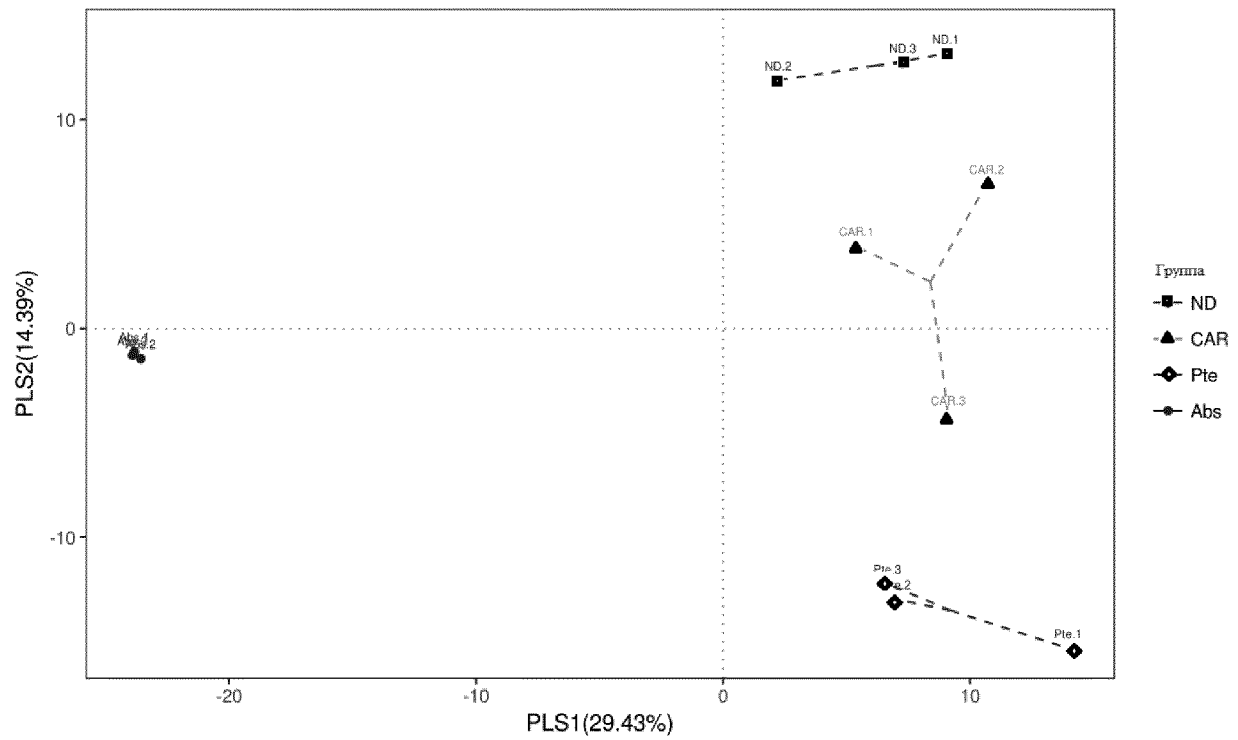
ФИГ. 3А



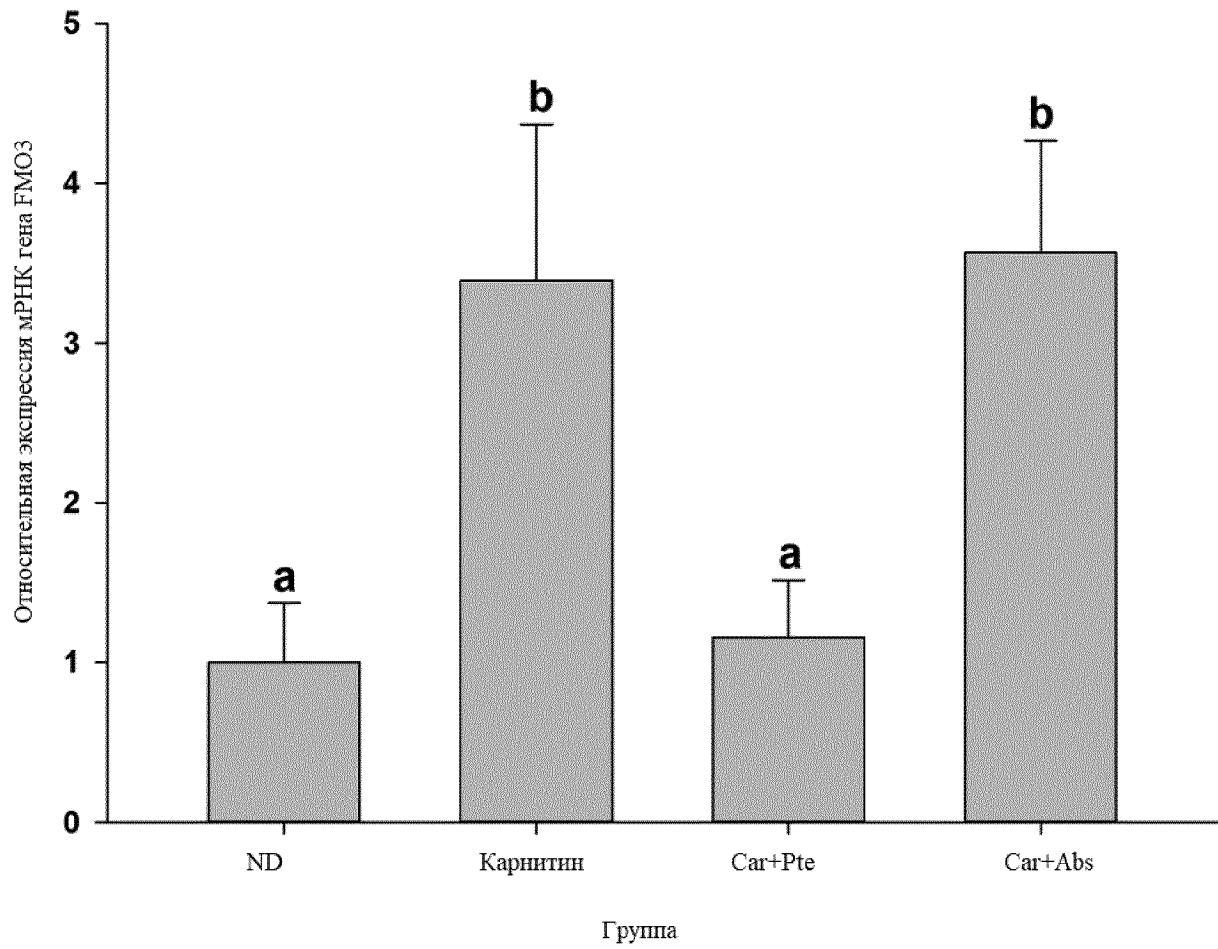
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С



ФИГ. 4



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202090690

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 31/09 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 31/09, 31/085, 31/075, A61P 1/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Google, Embase, EAPATIS, Espasenet, Patentscope, RUPTO, USPTO; pterostilbene, TMAO, gut microbial, food, quaternary amine, choline, carnitine, lecithin, FMO3

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WANG ANLU, et al. Using herbal medicine to target the "microbiota-metabolism-immunity" axis as possible therapy for cardiovascular disease//Pharmacological Research, Volume 142, April 2019, Pages 205-222; реферат, разделы 2.2.2.; 3.1.2; 3.1.3; табл.2 №6.	1-11
Y	-----	7-11
Y	ETXEBERRIA U, et al. Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity.// Mol Nutr Food Res. First published:05 July 2016 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mnfr.201500906 (doi:10.1002/mnfr.201500906) Реферат, разделы Материалы и методы п. 2.1; Результаты пп. 3.1-3.3; Обсуждение п. 4; Выводы.	7-11
Y	ETXEBERRIA U., et al. Structural changes in gut microbiota composition of obese Zucker rats following oral administration of pterostilbene// Obesity Reviews 2016, 17, SUPPL. 2 (30), Abstract	7-11
A	RU 2549760 C2 (М.Ю. СИДОРЕНКО и др), 27.04.2015, реферат	1-11
A	WO 2011051483 (ESTRELA ARIQUEL JOSE MARIA), 05.05.2011, формула, реферат	1-11
A	US2013017605 A1, (MAJEED MUHAMMED et al), 17.01.2013, описание	1-11

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

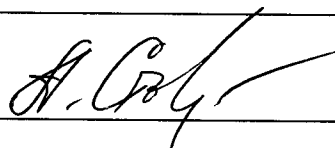
«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **04/08/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В.Чебан