

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7012857号

(P7012857)

(45)発行日 令和4年1月28日(2022.1.28)

(24)登録日 令和4年1月20日(2022.1.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99
A 6 1 K	47/14 (2006.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20

請求項の数 17 (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-536249(P2020-536249)

(86)(22)出願日 平成30年12月26日(2018.12.26)

(65)公表番号 特表2021-508480(P2021-508480 A)

(43)公表日 令和3年3月11日(2021.3.11)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/067480

(87)国際公開番号 WO2019/133588

(87)国際公開日 令和1年7月4日(2019.7.4)

審査請求日 令和2年6月26日(2020.6.26)

(31)優先権主張番号 62/610,565

(32)優先日 平成29年12月27日(2017.12.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 501394435

サミ ラブズ リミテッド

インド カルナータカ 5 6 0 0 5 8 バ

ンガロール ピーニャ インダストリアル

エリア セカンド フェイズ ファースト

メイン 1 9 / 1 アンド 1 9 / 2

(74)代理人 100094569

弁理士 田中 伸一郎

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100109070

弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高血糖症および関連状態を管理するための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

グルコシダーゼ酵素を阻害する方法であって：

i) グルコシダーゼ酵素をパラニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド基質と接触させる工程；

i i) 最適条件下で、チモヒドロキノンを含む組成物とインキュベートする工程；

i i i) 分光光度法および蛍光法を使用して吸光度の変化を読み取る工程；

i v) 前記吸光度を対照ブランクと比較し、式：

阻害パーセント＝[(対照の吸光度－阻害剤の吸光度)／対照の吸光度]×100

を使用して、チモヒドロキノンを含む組成物による酵素阻害百分率(IC₅₀)を決定する工程

を含み、前記チモヒドロキノンを含む組成物が、チモキノンの約0.1%～5%w/w、チモヒドロキノン約0.01%～10%w/w、脂肪酸約20%～95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約0.001%～3%w/w、安定剤0.1%～4.0%w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤0.2%～2%w/wを含む、人に対する医療行為を除く方法。

【請求項2】

前記安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

チモキノン約 0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約 0.01%~10%w/w、脂肪酸約 20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約 0.001%~3%w/w、安定剤 0.1%~4.0%w/w およびバイオアベイラビリティ増強剤 0.2%~2%w/w を含む、哺乳動物細胞によるグルコース取込みを高めるための組成物。

【請求項 5】

前記安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、請求項 4 に記載の組成物。

10

【請求項 6】

前記バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項 4~6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

チモキノン約 0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約 0.01%~10%w/w、脂肪酸約 20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約 0.001%~3%w/w、安定剤 0.1%~4.0%w/w およびバイオアベイラビリティ増強剤 0.2%~2%w/w を含む、血中グルコースレベルの低減をもたらして、哺乳動物における高血糖症および関連状態を治療管理するための組成物。

20

【請求項 9】

前記高血糖症および関連状態の管理が、グルコシダーゼ酵素の阻害によってグルコースの吸収を低下させること、グルコースの細胞取込みを高めること、フリーラジカルを低減させること、炎症を軽減させること、および糖化を低下させることによってもたらされる、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記高血糖症関連状態が、糖尿病、肥満、高リポタンパク血症、高脂血症、心血管系合併症、がん、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー、炎症、および骨粗鬆症を含む群から選択される病態に存在する、請求項 8 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8~12 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 14】

薬学的に／栄養補助に許容される賦形剤、補助剤、希釈剤または担体と共に製剤化され、錠剤、カプセル、ソフトジェル、シロップ、グミ、散剤、懸濁液、乳濁液、チュアブル、キャンディーまたは食料品の形態で経口投与される、請求項 8~13 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 15】

チモキノン約 0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約 0.01%~10%w/w、脂肪酸約 20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約 0.001%~3%w/w、安定剤 0.1%~4.0%w/w およびバイオアベイラビリティ増強剤 0.2%~

50

2 % w / w を含む、グルコシダーゼ酵素を阻害するための組成物。

【請求項 16】

非ヒト哺乳動物細胞によるグルコース取込みを高める方法であって、
前記非ヒト哺乳動物細胞を、チモキノン約 0.1 % ~ 5 % w / w、チモヒドロキノン約 0.01 % ~ 10 % w / w、脂肪酸約 20 % ~ 95 % w / w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約 0.001 % ~ 3 % w / w、安定剤 0.1 % ~ 4.0 % w / w およびバイオアベイラビリティ増強剤 0.2 % ~ 2 % w / w を含む組成物と接触させて、細胞によるグルコース取込みを高める工程を含む、方法。

【請求項 17】

非ヒト哺乳動物における高血糖症および関連状態を治療管理するための方法であって、
チモキノン約 0.1 % ~ 5 % w / w、チモヒドロキノン約 0.01 % ~ 10 % w / w、脂肪酸約 20 % ~ 95 % w / w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約 0.001 % ~ 3 % w / w、安定剤 0.1 % ~ 4.0 % w / w およびバイオアベイラビリティ増強剤 0.2 % ~ 2 % w / w を含む組成物を投与して、血中グルコースレベルの低減をもたらす工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その詳細が参照により本明細書に組み込まれる、2017年12月27日に出願された米国仮特許出願第62610565号の優先権を主張するPCT出願である。

本発明は、哺乳動物における高血糖症の治療管理に関する。より詳細には、本発明は、チモヒドロキノンを含む組成物と、高血糖症およびこれの関連状態の管理におけるそれらの治療能とに関する。

【背景技術】

【0002】

高血糖症とは、血中グルコースレベルが高いままの状態である。慢性高血糖症は、治療しないまま放置すると、糖尿病、肥満、高リポタンパク血症、高脂血症、心血管系合併症、がん、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー、炎症、および骨粗鬆症などの多くの疾患の発病にいたる二次的合併症を引き起こす恐れがある。血中グルコースレベルの上昇によって、活性酸素種／活性窒素種および炎症誘発性サイトカインの産生が高まり、それにより、酸化ストレスおよび炎症が引き起こされる。グルコースレベルの上昇によってさらに、タンパク質およびその他の生体分子の非酵素的グリコシル化（糖化反応）が高まり、その結果、細胞老化の主たる原因であると報告されている終末糖化産物（AGE）の産生にいたる。AGEはまた、進行性悪化およびアポトーシスにいたる細胞性の炎症カスケードを例示するものでもある。

投与されている現在の薬物（たとえばメトホルミン）は、血液グルコースレベルを制御するのに効果的である。これらの合成薬物を継続的に摂取すると、肝毒性および腎毒性を含む多くの副作用がもたらされる。したがって、血液グルコースレベルを管理するために、より安全かつ効果的な植物性の天然分子が正当化される。

高血糖症の管理に現在用いられている処置方法には、炭水化物の分解を調節するキー酵素に対する阻害剤を投与すること、およびグルコースの取込みを高めることが含まれる。この態様では、グルコシダーゼ阻害剤が特に重要である（Kim et al., Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*, Journal of Microbiology, 2013;42:223-227）。 α -グルコシダーゼは、グリコーゲンのグルコースへの分解に必須である。それは複雑な炭水化物分子に作用して、血流に容易に吸収される単糖単位を生じる。 α -グルコシダーゼを阻害すると、血流へのグルコース放出の低減がもたらされ、それによって高血糖症状態が低下する。

【0003】

以下の先行技術で論議されている、 α -グルコシダーゼに対する多くの植物性阻害分子が

存在する：

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.

しかし、 α -グルコシダーゼを効果的に阻害し、グルコース取込みを高める植物性分子が、高血糖症および関連状態の効果的な管理に必要である。

ニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*) は、医薬に関するアーユルヴェーダ、シッダおよびウナニの各システムではその多くの治療特性で良く知られている。この植物は、チモキノン、チモヒドロキノン、ジチモキノン、p-シメン、カルバクロール、4-テルピネオール、 α -アネトール、セスキテルペンロンギフォレン、 α -ピネン、チモール、 α -ヘデリンおよびヘデラゲニンなどの多数の活性分子を含有すると報告されており (Ahmad et al., A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb, Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(5): 337-352)、これらの分子が、この植物の有益な効果を担っている。ニゲラ・サティバの治療効果の一部については、以下の先行技術文献に列記されている：

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

【0004】

ニゲラ・サティバの報告されている生物学的効果のほとんどは、全抽出物に関するか、具体的にはチモキノンに関するかのいずれかである。特に高血糖症の管理に関連してチモヒドロキノンの生物学的効果に関する報告は入手できない。チモヒドロキノンはチモキノンの還元型であるが、構造的にも機能的にも異なる。したがって、本発明は、高血糖症および関連障害の管理向けにチモヒドロキノンで強化された新規で非自明な組成物を開示する。

【0005】

本発明の主要な目的は、チモヒドロキノンを含む組成物を使用して α -グルコシダーゼの活性を阻害するための方法を開示することである。

本発明の別の目的は、チモヒドロキノンを含む組成物を投与することにより、哺乳動物細胞によるグルコースの取込みを高める方法を開示することである。

本発明のさらに別の目的は、チモヒドロキノンを含む組成物を使用して、哺乳動物における高血糖症および関連障害を治療管理するための方法を開示することである。

本発明は上記の目的を解決し、関連する利点をさらに提供する。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、チモヒドロキノンを含む新規な組成物を開示する。具体的には、本発明は、酵素 α -グルコシダーゼの活性を阻害するためのチモヒドロキノンを含有する組成物を開示する。本発明はまた、哺乳動物細胞によるグルコースの細胞取込みを高めるためのチモヒドロキノンを含有する組成物の使用も開示する。より詳細には、本発明は、チモヒドロキノンを含有する組成物を使用して、哺乳動物における高血糖症を治療管理するための方法を開示する。チモヒドロキノンの抗酸化、抗炎症および抗糖化の効果も本明細書において開示する。

本発明の他の特徴および利点は、例として本発明の原理を例示する添付の図面と併せて、以下のより詳細な説明から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1a】チモキノン(TQ)、チモヒドロキノン(THQ)およびチモヒドロキノン組成物の α -グルコシダーゼ阻害活性のグラフ表示を示す図である。

【図1b】チモキノン(TQ)、チモヒドロキノン(THQ)およびチモヒドロキノン組成物の α -グルコシダーゼ阻害活性のグラフ表示を示す図である。

【図2】チモキノン(TQ)、チモヒドロキノン(THQ)およびチモヒドロキノン組成物で処理された脂肪細胞および筋細胞によるグルコース取込みの百分率を示すグラフ表示の図である。

【図3】インスリン(3a)、チモキノン(TQ)(3b)、チモヒドロキノン(THQ)(3c)、およびチモヒドロキノン組成物(3d)で処理された哺乳動物細胞によるグルコース取込みの代表的ヒストグラムを示す図である。未処理の細胞は対照群としての役割を担う(3e)。

【図4】チモキノン(TQ)(4a)、チモヒドロキノン(THQ)(4b)、およびチモヒドロキノン組成物(4c)のDPPH消去活性のグラフ表示を示す図である。

【図5】チモヒドロキノンの百分率が増加する組成物のDPPH消去活性およびグルコシダーゼ阻害活性のグラフ表示を示す図である。チモヒドロキノン含有率の上昇は、生物活性の上昇と直接関連していた。

【図6】チモキノンの百分率が増加する組成物のDPPH消去活性およびグルコシダーゼ阻害活性のグラフ表示を示す図である。チモキノン含有率の増加は、生物活性の増加と逆に関連していた。

【発明を実施するための形態】

【0008】

最も好ましい実施形態では、本発明は、グルコシダーゼ酵素を阻害する方法であって：

i) グルコシダーゼ酵素をパラニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド基質と接触させる工程；

ii) 最適条件下で、有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含む組成物とインキュベートする工程；

iii) 分光光度法および蛍光法を使用して吸光度の変化を読み取る工程；

iv) 吸光度を対照ブランクと比較し、式：

阻害パーセント = [(対照の吸光度 - 阻害剤の吸光度) / 対照の吸光度] $\times$ 100

を使用して、チモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含有する組成物による酵素阻害百分率(IC₅₀)を決定する工程

を含む方法を開示する。

【0009】

関連する実施形態では、組成物は、チモキノン約0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約0.01%~10%w/w、脂肪酸約20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約0.001%~3%w/w、安定剤0.1%~4.0%w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤0.2%~2%w/w、を含む。別の関連する実施形態では、安定剤は、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、

10

20

30

40

50

メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される。さらに別の関連する実施形態では、バイオアベイラビリティ増強剤は、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される。

別の最も好ましい実施形態では、本発明は、哺乳動物細胞によるグルコース取込みを高める方法であって、哺乳動物細胞を有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含有する組成物と接触させて、細胞によるグルコース取込みを高める工程を含む方法を開示する。関連する実施形態では、組成物は、チモキノン約0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約0.01%~10%w/w、脂肪酸約20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約0.001%~3%w/w、安定剤0.1%~4.0%w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤0.2%~2%w/w、を含む。別の関連する実施形態では、安定剤は、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される。さらに別の関連する実施形態では、バイオアベイラビリティ増強剤は、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される。別の関連する実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0010】

別の好ましい実施形態では、本発明は、哺乳動物における高血糖症および関連状態を治療管理するための方法であって、有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含有する組成物を投与して、血中グルコースレベルの低減をもたらす工程を含む方法を開示する。関連する実施形態では、高血糖症および関連状態の管理は、グルコシダーゼ酵素の阻害によるグルコースの吸収を低下させること、グルコースの細胞取込みを高めること、フリーラジカルを低減させること、炎症を軽減させることおよび糖化を低下させることによってもたらされる。別の関連する実施形態では、高血糖症関連状態は、糖尿病、肥満、高リポタンパク血症、高脂血症、心血管系合併症、がん、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー、炎症、および骨粗鬆症を含む群から選択される病態に存在する。関連する実施形態では、組成物は、チモキノン約0.1%~5%w/w、チモヒドロキノン約0.01%~10%w/w、脂肪酸約20%~95%w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約0.001%~3%w/w、安定剤0.1%~4.0%w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤0.2%~2%w/w、を含む。別の関連する実施形態では、安定剤は、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される。さらに別の関連する実施形態では、バイオアベイラビリティ増強剤は、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンの群から選択される。別の関連する実施形態では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。別の関連する実施形態では、組成物は、薬学的に／栄養補助に許容される賦形剤、補助剤、希釈剤または担体と共に製剤化され、錠剤、カプセル、ソフトジェル、シロップ、グミ、散剤、懸濁液、乳濁液、チュアブル、キャンディーまたは食料品の形態で経口投与される。

【0011】

本発明の技術的特徴および技術的效果を具体化する前述の最も好ましい実施形態を、下記の例示的な実施例を通して説明する。

【実施例】

【0012】

(実施例1)：グルコシダーゼの阻害

グルコシダーゼ阻害については、 α -グルコシダーゼ (Code G5003; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 米国) を、0.2%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) および0.02%アジ化ナトリウム (Sigma-Aldrich) を含有する、67mMリン酸カリウム緩衝液、pH6.8に溶かし、これを酵素源として使用した。パラニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド (Sigma-

10

20

30

40

50

Aldrich) を基質として使用した。チモキノ、チモヒドロキノ、およびチモヒドロキノを含有する組成物を秤量し、63、125、250、および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で調製し、等容量の蒸留水で補充した。上記組成物50 μL を酵素源 (0.15 U/ mL) 50 μL と共に5分間インキュベートした。インキュベーション後、基質 (1.25 mM) 50 μL を添加し、さらに室温で20分間インキュベートした。基質の添加前後、マイクロプレートリーダー (BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader) 上、吸光度を405 nmで測定した。基質の添加と同時に吸光度の上昇が得られた。各試験を3回実行し、平均吸収を使用して、 α -グルコシダーゼ阻害の百分率を計算した。アカルボスを種々の濃度で陽性対照として使用した。上記組成物の異なる濃度の阻害活性については、100から、陰性対照 (すなわち、試験液として使用される水) の吸光度変化に対する上記組成物の吸光度の差 (%) を引いたものとして表した。測定は3回繰返して行い、IC₅₀ 値 (すなわち、最大活性の50%阻害という結果がもたらされる上記組成物の濃度) を決定した。

チモヒドロキノ (IC₅₀ 71.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびチモヒドロキノを含む組成物 (IC₅₀ 150.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、チモキノ (IC₅₀ 407.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較した場合、 α -グルコシダーゼの効果的な阻害を呈した (図1aおよび図1b)。

【0013】

(実施例2) : グルコース取込みの上昇

骨格筋細胞株C2C12筋芽細胞 (ATCCから調達した) を、10%ウシ胎児血清を補充したDMEM中、37°C、5%CO₂で維持した。1ウェルあたり2万個の細胞を24ウェルプレートに播種した。細胞がコンフルエンス80~90%に達したとき、その増殖培地を、1%ウマ血清を含有するDMEMに交換することにより分化を誘導した。実験は、分化培地中で4~5日後に完全に分化したC2C12筋管で行った。次いで、細胞を低グルコース培地中0.5%BSAで16時間処理し、グルコースを含まない低温のクレブスリンガーリン酸緩衝液で洗浄した。次いで、細胞を、0.1 μM 濃度のインスリンと共に、またはそれ無しで低グルコースDMEM培地中、様々な非細胞毒濃度の試料で、37°Cで30分間処理した。次いで、細胞を、低温PBSで洗浄し、蛍光性のD-グルコースアナログ2-[N-(7-ニトロベンザ-2-オキサー-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコース (2-NBDG) 5 μM にて暗所で15分間染色し、これに続いて、細胞により生じた蛍光のフローサイトメトリー検出を行った。

チモヒドロキノおよびチモヒドロキノを含む組成物は、チモキノと比較した場合、脂肪細胞および筋細胞におけるグルコース取込みの増強を示した (図2aおよび図2b)。

【0014】

(実施例3) : チモヒドロキノの抗酸化活性

チモヒドロキノの抗酸化能を、DPPH消去活性によって評価した。

血糖レベルが慢性的に上昇すると、活性酸素種の形成にいたる。スーパーオキシド、ヒドロキシル、ペルオキシル、およびアルコキシの各ラジカルといった活性酸素種 (ROS) は、細胞の抗酸化物質によって消去され、平衡が保たれる。こういったROSが引き起こした損傷は、皮膚の刺激、炎症、老化、がん、およびその他の多くの疾患の原因となる。 α , α -ジフェニル- β -ピクリルヒドラジル (DPPH) フリーラジカル消去法は、化合物の抗酸化能を評価する第1のアプローチの1つである。

【0015】

手順

DPPHは、520 nmに吸収をもつ、メタノール溶液中で安定なフリーラジカルである。フリーラジカルが抗酸化分子によって消去されると、生成する溶液は黄色に見える。細胞外代謝産物の水素原子または電子の供与能を、紫色のDPPHメタノール溶液の漂白法によって測定した。

チモキノ、チモヒドロキノ、およびチモヒドロキノを含む組成物を、種々の濃度で調製した。DPPHラジカル消去アッセイの場合、先に記載の方法 (Clarke et al., 2013) にしたがって、試験材料20 μL を、96ウェルプレート中、メタノール中DPPH

180 μ Lと混合した。プレートを暗所に15分間維持し、その後、マイクロプレートリーダー（TECAN Ltd、Mannedorf、スイス）を使用して、溶液の吸光度を540 nmで測定した。ブランク（DMSO、メタノール）および標準液（DMSOのTrolox溶液）を同時に記録した。抽出物を様々な濃度でスクリーニングして、阻害濃度を確立した（IC₅₀、DPPH吸光度を50%低減させる濃度）。

【0016】

フリーラジカル消去活性は、以下のように計算した。

$(B - C) - (S - C)$

消去活性パーセント = $\frac{(B - C) - (S - C)}{(B - C)} \times 100$

$(B - C)$

（式中、

B = 基準溶液の吸光度（DPPHのOD）

C = 基準溶液ブランクの吸光度（メタノールのみOD）

S = 試験溶液の吸光度

C = 試験溶液ブランクの吸光度）

チモヒドロキノンは、IC₅₀が1.78 μ g/mLであり、強力な抗酸化剤である（図4b）。チモヒドロキノンを含む組成物も、IC₅₀が540.1 μ g/mL（図4c）であり、優れた抗酸化能を呈し、この抗酸化能はチモキノン（図4a）よりもはるかに効果的である。

【0017】

（実施例4）：チモヒドロキノンの抗炎症活性

慢性高血糖症は、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を高めることにより、細胞性炎症を増大する。チモキノン、チモヒドロキノン、およびチモヒドロキノンを含む組成物を、これらのTNF- α 阻害活性を評価することにより、これらの抗炎症活性について試験した。

細胞：American Type Culture Collection (ATCC、Manassas、VA) から購入したTHP1-ヒト単球であり、10% (v/v) 熱不活化ウシ胎児血清 (FBS; Gibco/Invitrogen、Carlsbad、CA)、100単位/mLペニシリンおよび100 μ g/mLストレプトマイシン (Life Technologies) を補充した、Rosewell park memorial institute培地 (RPM1 Life Technologies、CA、米国) 中、単層培養として、加湿した5% CO₂インキュベーター内で、37°Cで維持した。

試薬および緩衝液：リポ多糖 (LPS、Sigma chemicals、米国)、リン酸緩衝生理食塩水、RPMI、FBS

ELISAキット：Human TNF ELISA kit、Krishgen Biosciences、米国

【0018】

手順

抗炎症活性を、炎症性サイトカインを分泌することによりリポ多糖 (LPS) に応答するヒト単球/マクロファージ細胞株THP-単球を使用して試験した。腫瘍壊死因子 (TNF- α) は、炎症反応のカスケードを誘発する主要なサイトカインの1つである。TNF- α の濃度は、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) を使用して測定した。TNF- α 濃度の低減が指し示すことは、化合物の抗炎症活性である。

1 $\times$ 10⁵ THP-1細胞をリポ多糖 (LPS、0.1 μ g/mL) による100 ngで刺激して、TNF- α 分泌を誘導した。細胞を様々な濃度の試験物質 (チモキノン、チモヒドロキノン、およびチモヒドロキノンを含む組成物) で前処理し、その後、LPS処理を行った。細胞上清を処理の24時間後に収集し、製造業者が記載するサイトカインELISAによって分泌TNF- α を見積もった。非刺激細胞を陰性対照として使用した。検出限界は<1 pg/mLであった。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

結果

結果から、チモヒドロキノンが $\text{TNF-}\alpha$ を阻害し（表 1）、細胞生存率に影響を与えずに有意な抗炎症活性を示すことが分かった。

【表 1】

表1: チモヒドロキノンの抗炎症活性

	濃度($\mu\text{g/mL}$)	阻害パーセント
チモキノン	0.13	35
	0.06	31
	0.03	22
チモヒドロキノン	0.13	11.9
	0.06	4.5
	0.03	2.5
チモヒドロキノン組成物	25	26.2
	12.5	19.8
	6.25	14.9

10

【 0 0 2 0 】

（実施例 5）：チモヒドロキノンの抗糖化活性

終末糖化産物（AGE）は、メイラード反応としても知られる、タンパク質のアミノ基（主にリジンおよびアルギニン）と還元糖のカルボニル基との間の非酵素的付加物形成によって、生成される。初期段階では、還元糖が遊離アミノ基と反応して不安定なアルジミン化合物を形成し、この化合物は、分子転位を経て、アマドリ産物として知られる安定した初期糖化産物を形成する。後期段階では、酸化、脱水、および環化の各反応を通じた糖化プロセスにより、AGEとも知られる終末糖化産物が形成される。Nε-（カルボキシメチル）-リジン（CML）、ピラリン、ペントシジンなどのAGEの種々の構造が、老化、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、および腎不全を含めて、変性疾患に関連付けられることが知られている。

30

【 0 0 2 1 】

ペントシジンは糖尿病患者において蓄積することが知られており、ベスペルリシンは白内障および糖尿病性網膜症に見いだされる。糖化を予防できる薬剤を効果的に使用して、高血糖症に伴う二次的合併症に対処することができる。チモキノンおよびチモヒドロキノンを、これらの抗糖化効果について試験した。

AGEは、本質的に、蛍光性の場合もあり、非蛍光性の場合もある。通常、ベスペルリシンタイプのAGEは370 nmで励起し、440 nmで発光するが、ペントシジン様AGEは335 nmで励起し、385 nmで発光する。この原理は、リボース糖およびウシ血清アルブミンを特定の比で混合し、24時間インキュベートするという事実に基づいている。反応によって形成されたベスペルリシン様AGEは、390 / 460 nmでのEx / Emで検出される蛍光の上昇によって見積り、ペントシジンは320 / 405 nmでのEx / Emで検出した。

40

【 0 0 2 2 】

材料

リボース、ウシ血清アルブミン、96 ウェルブラックマイクロプレート

リボース-BSA法：96 ウェルブラックマイクロプレートの1ウェル当たりで、種々の濃度の試料10 μL を、BSA（ウシ血清アルブミン、25 mg / mLストック）40 μL およびD-リボース（150 mg / mLストック）50 μL に添加し、37℃で24時間インキュベートした。BSAを対照とした。形成されたAGE（終末糖化産物）を、ベスペルリジンについては390 / 460 nmでのEx / Emで、ペントシジンAGEにつ

50

いては320／405 nmでのEx／Emで蛍光によって検出した。

【0023】

結果

チモキノンおよびチモヒドロキノンによるAGEベスペルリシンおよびペントシジンの阻害を表2に表示した。

【0024】

【表2】

表2: チモヒドロキノンによるAGEの阻害百分率

濃度(μ g/mL)	ベスペルリシンの阻害パーセント 390/460nmでのEx/Em		ペントシジンの阻害パーセント 320/405nmでのEx/Em	
	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

10

20

【0025】

結果から、チモヒドロキノンは生物学的により強力な分子であり、チモキノンと比較した場合、増強された生物学的活性を呈することが分かった。

チモヒドロキノンの百分率が増加する組成物の生物学的効果も評価した。表3に、チモヒドロキノン含有率が増加する組成物のリストを提供する。

【表3】

表3: チモヒドロキノンを含有する組成物

組成物	% TQ	% THQ
1	0.643	0.029
2	0.620	0.093
3	0.558	0.120
4	0.450	0.250

30

40

【0026】

組成物中のチモヒドロキノン含有率の上昇は、生物活性との相関を示さなかったチモキノン（図6）と比較した場合、DPPH消去およびグルコシダーゼ阻害がより高いことと相関していた（図5）。したがって、チモヒドロキノンは、それらに限定されないが、高血糖症、糖尿病、肥満、高リポタンパク血症、高脂血症、心血管系合併症、がん、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー、炎症、および骨粗鬆症を含めて、種々の疾患および障害を効果的に管理するための製剤に効果的に組み入れることができる。

本発明の他の修正および変更は、前述の開示および教示から当業者にとって明らかであろう。したがって、本明細書で本発明のある特定の実施形態のみについて具体的に説明した

50

が、多数の修正は、本発明の精神と範囲から逸脱することなくそれらに加えることができ、添付の特許請求の範囲と併せてのみ解釈すべきであることが明らかであろう。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔１〕グルコシダーゼ酵素を阻害する方法であって：

 i) グルコシダーゼ酵素をパラニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド基質と接触させる工程；

 i i) 最適条件下で、有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含む組成物とインキュベートする工程；

 i i i) 分光光度法および蛍光法を使用して吸光度の変化を読み取る工程；

 i v) 吸光度を対照ブランクと比較し、式：

 阻害パーセント＝〔（対照の吸光度－阻害剤の吸光度）／対照の吸光度〕×１００

を使用して、チモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含む組成物による酵素阻害百分率（IC₅₀）を決定する工程を含む方法。

〔２〕チモヒドロキノンを含む組成物が、チモキノン約０．１％～５％w/w、チモヒドロキノン約０．０１％～１０％w/w、脂肪酸約２０％～９５％w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約０．００１％～３％w/w、安定剤０．１％～４．０％w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤０．２％～２％w/wを含む、前記〔１〕に記載の方法。

〔３〕安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、前記〔２〕に記載の組成物。

〔４〕バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、前記〔２〕に記載の組成物。

〔５〕哺乳動物細胞によるグルコース取込みを高める方法であって、

 哺乳動物細胞を有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含む組成物と接触させて、細胞によるグルコース取込みを高める工程を含む、方法。

〔６〕組成物が、チモキノン約０．１％～５％w/w、チモヒドロキノン約０．０１％～１０％w/w、脂肪酸約２０％～９５％w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約０．００１％～３％w/w、安定剤０．１％～４．０％w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤０．２％～２％w/wを含む、前記〔５〕に記載の方法。

〔７〕安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、前記〔６〕に記載の組成物。

〔８〕バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、前記〔６〕に記載の組成物。

〔９〕哺乳動物細胞がヒト細胞である、前記〔６〕に記載の組成物。

〔１０〕哺乳動物における高血糖症および関連状態を治療管理するための方法であって、有効用量のチモヒドロキノンまたはチモヒドロキノンを含む組成物を投与して、血中グルコースレベルの低減をもたらす工程を含む、方法。

〔１１〕高血糖症および関連状態の管理が、グルコシダーゼ酵素の阻害によるグルコースの吸収を低下させること、グルコースの細胞取込みを高めること、フリーラジカルを低減させること、炎症を軽減させること、および糖化を低下させることによってもたらされる、前記〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕高血糖症関連状態が、糖尿病、肥満、高リポタンパク血症、高脂血症、心血管系合併症、がん、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー、炎症、および骨粗鬆症を含む群から選択される病態に存在する、前記〔１０〕に記載の方法。

〔１３〕組成物が、チモキノン約０．１％～５％w/w、チモヒドロキノン約０．０１％～１０％w/w、脂肪酸約２０％～９５％w/w、 α -ヘデリンまたはヘデラゲニン約０．００１％～３％w/w、安定剤０．１％～４．０％w/wおよびバイオアベイラビリティ増強剤０．２％～２％w/wを含む、前記〔１０〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔14〕安定剤が、ロスマリン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウム、没食子酸プロピル、システイン、アスコルビン酸およびトコフェロールを含む群から選択される、前記〔13〕に記載の組成物。

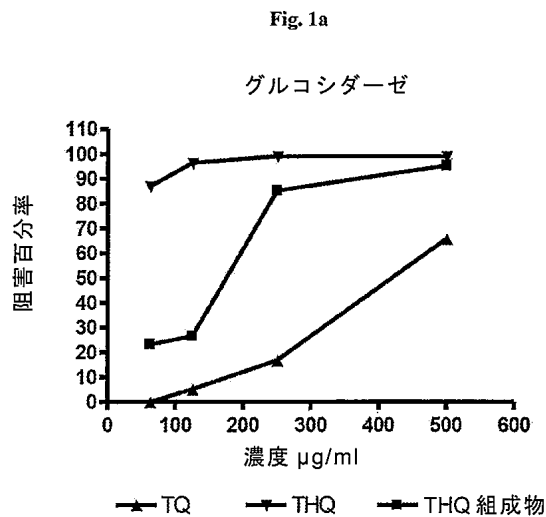
〔15〕バイオアベイラビリティ増強剤が、ピペリン、ケルセチン、ニンニク抽出物、ショウガ抽出物、およびナリンギンを含む群から選択される、前記〔13〕に記載の組成物。

〔16〕哺乳動物細胞がヒト細胞である、前記〔10〕に記載の方法。

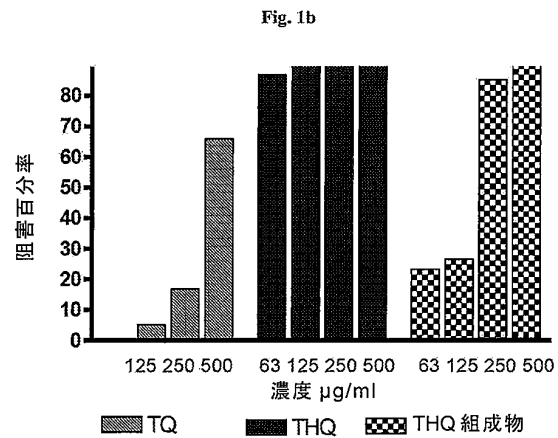
〔17〕薬学的に／栄養補助に許容される賦形剤、補助剤、希釈剤または担体と共に製剤化され、錠剤、カプセル、ソフトジェル、シロップ、グミ、散剤、懸濁液、乳濁液、チュアブル、キャンディーまたは食料品の形態で経口投与される、前記〔13〕に記載の組成物。

【図面】

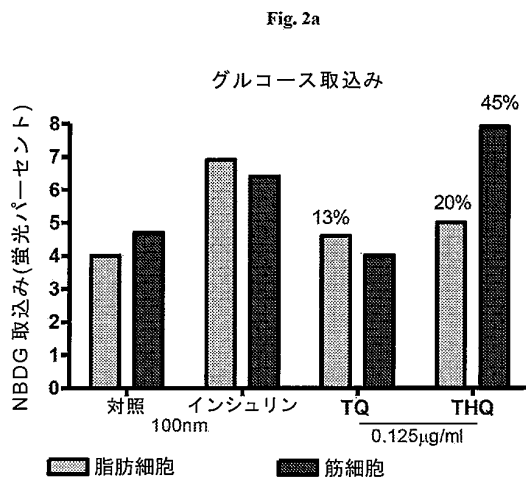
【図1a】



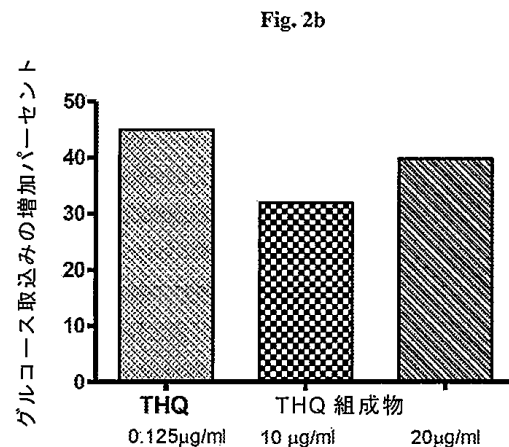
【図1b】



【図2a】



【図2b】



10

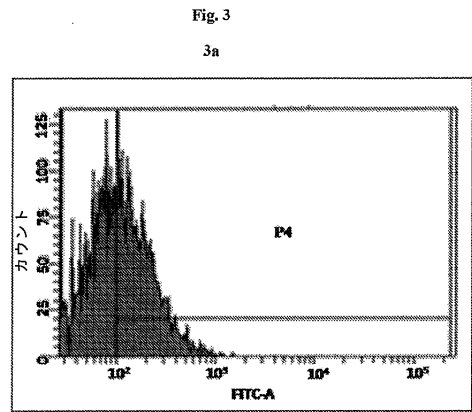
20

30

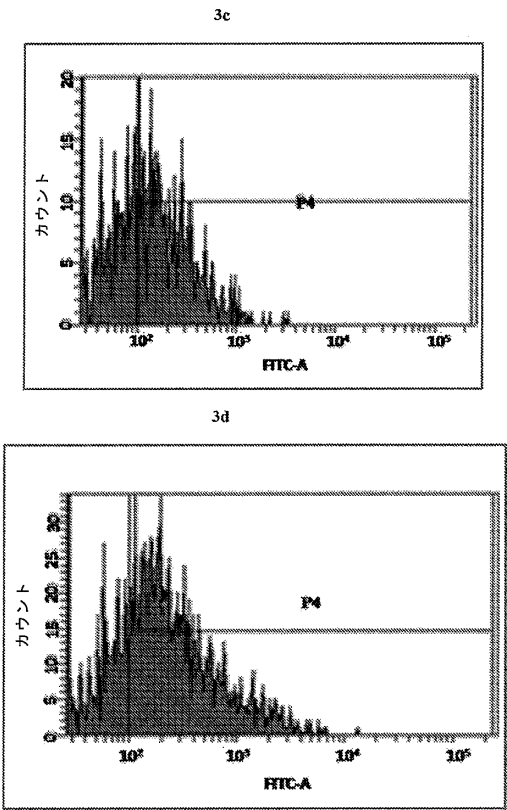
40

50

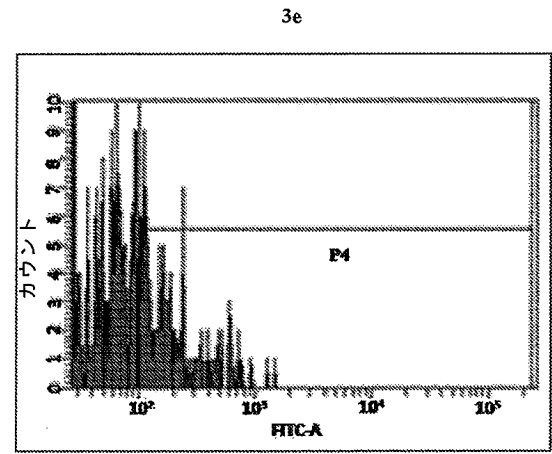
【図 3 - 1】



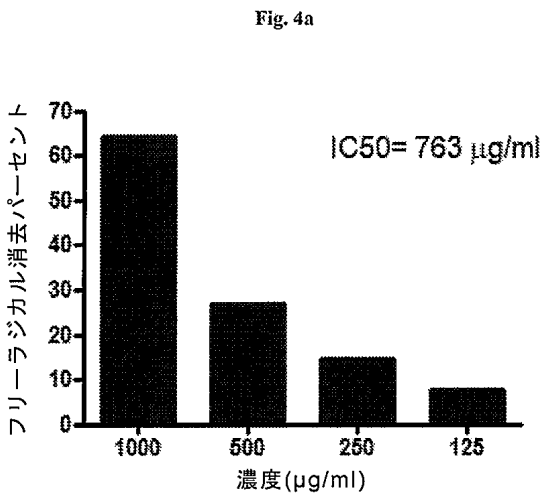
【図 3 - 2】



【図 3 - 3】



【図 4 a】



10

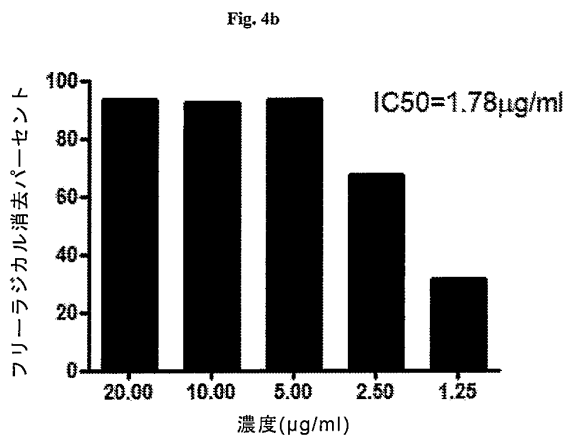
20

30

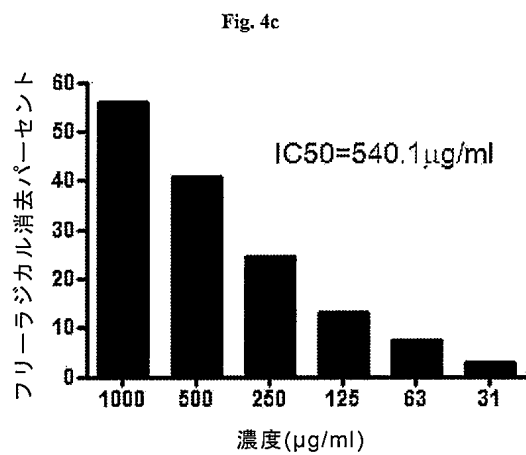
40

50

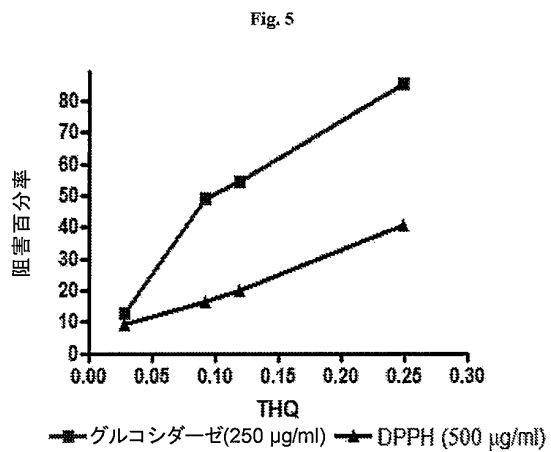
【図 4 b】



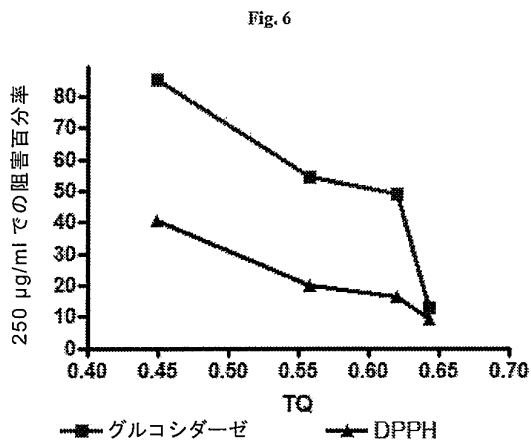
【図 4 c】



【図 5】



【図 6】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/46	(2006.01)	A 6 1 K	47/46	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/05	(2006.01)	A 6 1 K	31/05	
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48	
A 6 1 K	9/06	(2006.01)	A 6 1 K	9/06	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071	

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72)発明者 マジード ムハンメド

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 2 0 イースト ウィンザー レイク ドライヴ 2 0
サビンサ コーポレーション内

(72)発明者 ナガブシャナム カリヤナム

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 2 0 イースト ウィンザー レイク ドライヴ 2 0
サビンサ コーポレーション内

(72)発明者 ムンドクル ラクシュミ

インド 5 6 0 0 5 8 バンガロール ピーニャ インダストリアル エリア セカンド フェイズ フ
ァースト メイン 1 9 / 1 アンド 1 9 / 2 サミ ラブズ リミテッド内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 8 5 8 9 (WO, A 1)

Journal of Medicinal Plants, 2011年, Vol.10, No.39, p90-94, <http://jmp.ir/article-1-205-en.pdf>参照

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 9

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)