



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82879 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 36/82 (2007.01)

A61K 33/06

A61K 33/32

A61K 33/34

A61K 33/04

A61K 31/375

A61P 9/02 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ КОНТРАКЦІЇ КЛІТИН ГЛАДКОЇ МУСКУЛАТУРИ

1

2

(21) a200511385

(22) 26.05.2004

(24) 26.05.2008

(86) PCT/US2004/016902, 26.05.2004

(31) 10/449,828

(32) 30.05.2003

(33) US

(31) 10/855,111

(32) 26.05.2004

(33) US

(46) 26.05.2008, Бюл.№ 10, 2008 р.

(72) ІВАНОВ ВАДИМ, ІВАНОВА СВЕТЛАНА, РУМІ  
ВАХІД М., НЕДЗВЕЦЬКІ АЛЕКСАНДРА, РАТ  
МАТТІАС, DE/ZA

(73) MATTIAC PAT

(56) DR. RATH: 'Epican Forte' NATURAL HEALTH  
CONSULTANTS 01 March 1998, pages 1 - 3  
US A 6,054,128 25.04.2000(57) 1. Спосіб інгібування контракції клітин гладких  
м'язів людини, що цього потребує, що включає  
призначення нутрицевтичної композиції, де  
зазначена нутрицевтична композиція містить  
екстракт зеленого чаю, аскорбінову кислоту, лізин,  
пролін, аргінін, магній, N-ацетилцистеїн, селен,  
мідь та марганець.2. Спосіб за пунктом 1, де екстрактом зеленого  
чаю є щонайменше одна сполука, вибрана з  
наступної групи: епікатехін, епікатехін-3-галат,  
епігалокатехін та епігалокатехін-3-галат.3. Спосіб за пунктом 2, де екстрактом зеленого  
чаю є епігалокатехін-3-галат.4. Спосіб за пунктом 1, де аскорбіновою кислотою  
є аскорбат кальцію, аскорбат магнію або  
аскорбілпальмітат.5. Спосіб за пунктом 1, де нутрицевтична  
композиція містить 500 мг – 2000 мг екстракту  
зеленого чаю, 400 мг – 1500 мг аскорбінової  
кислоти, 400 мг – 1500 мг лізину, 500 мг – 1500 мг  
проліну, 200 мг – 1000 мг аргініну, 0,5 мг – 2 мг  
магнію, 10 мг – 60 мг N-ацетилцистеїну, 10мкг –  
60мкг селену, 0,5 мг – 5мг міді та 0,5мг – 2мг  
марганцю.6. Спосіб за пунктом 5, де нутрицевтична  
композиція складається з 1000 мг екстракту  
зеленого чаю, 710мг аскорбінової кислоти, 1000 мг  
лізину, 750 мг проліну, 500 мг аргініну, 1 мг магнію,  
30 мг N-ацетилцистеїну, 30 мкг селену, 2 мг міді та  
1 мг марганцю.7. Спосіб за пунктом 1, де нутрицевтична  
композиція додатково містить принаймні один  
інгредієнт з групи, яка складається з ресвератролу  
та геністеїну.

8. Спосіб за пунктом 1, де нутрицевтична

композиція є дозованою формою, вибраною з

наступних: рідка оральна дозована форма, тверда

оральна дозована форма, таблетки або капсули.

9. Спосіб за пунктом 1, де нутрицевтична

композиція застосовується для зниження

рівня глюкози.

10. Спосіб за пунктом 1, де нутрицевтичну

композицію вводять людині.

11. Спосіб за пунктом 10, де нутрицевтичну

композицію призначають у денній кількості, що

становить 1000 мг екстракту зеленого чаю, 710 мг

аскорбінової кислоти, 1000 мг лізину, 750 мг

проліну, 500 мг аргініну, 1 мг магнію, 30 мг N-

ацетилцистеїну, 30 мкг селену, 2 мг міді та 1 мг

марганцю.

(13) C2

(11) 82879

(19) UA

Дана заявка є частиною продовження Заявки США на корисну модель №10/449,828 подану 30 травня 2003 року, опис якої включений сюди як посилання в усій своїй повноті.

Винахід стосується нутрицевтичної композиції та способу інгібування контракції клітин гладких м'язів, і таким чином може знижувати кров'яний тиск у пацієнтів-гіпертоніків.

З документальних джерел відомі численні патофізіологічні та клінічні наслідки гіпертензії. Такі наслідки можуть бути як короткотривалими і спричиняти погане самопочуття і знижену працездатність, так і довготривалими і викликати інфаркт міокарду, інсульт, зупинку серця, ниркові захворювання, ниркову недостатність та інші. Крім того, наслідки гіпертензії можуть посилюватись у зв'язку з іншими хворобами, такими як діабет. За оцінками останніх років у Сполучених Штатах 50% смертей від серцево-судинних захворювань пов'язані з або є результатом гіпертензії. Гіпертензія залишається найбільш розповсюдженою причиною серцевої недостатності або інших хворобливих станів, які потребують усунювання ліцензії проводились значні та всебічні дослідження. Однак, відомі способи лікування таких захворювань включають наприклад призначення інгібіторів ангіотензин-перетворювального ферменту (ACE інгібіторів). Такі способи лікування мають серйозні недоліки при довготривалому використанні, серед яких найбільш суттєвими є вартість такого лікування та значні побічні ефекти.

Також існують численні публікації щодо механізмів патогенезу гіпертензії. Одною з головних причин розвитку гіпертензії прийнято вважати утворення та активність ангіотензину II, оскільки його надлишок спричиняє надмірно сильне скорочення артерій, порушує процес релаксації артерій і тому призводить до підвищення кров'яного тиску. Таким чином, значні зусилля направлені на розроблення фармацевтичних сполук, здатних зменшувати утворення ангіотензину II (тобто ACE інгібіторів, які блокують перетворення ангіотензину I в ангіотензин II клітинами стінок артерій) або блокувати біологічну активність ангіотензину II (тобто агоністи рецепторів ангіотензину). Обидва класи сполук проходять тестування в експериментальних умовах на здатність блокувати ангіотензин-залежну контракцію стінок артерій з використанням артерій вилучених у лабораторних тварин, або модель культуральних клітин гладких м'язів введених у колагеновий гель (КГМ гель). Здатність тестованої сполуки до блокування контракційної дії ангіотензину II у таких експериментальних моделях безперечно означає, що така сполука буде блокувати і активність ангіотензину II інакше істотно впливати на процес релаксації артерій людини [Life Sci 2003 Oct 17; 73(22): 2883-98]. Shen et al. описують катехіни зеленого чаю, які викликають стадійну контракцію аорти щурів, Chen et al. описують дію очищених епікатехінів зеленого чаю на контракцію. Sanae et al., описують дію катехінів на судинний тонус грудної аорти з

ендотелієм у щурів. Huang et al., описують роль ендотеліального оксиду азоту у судинній відповіді на флавоноїди та епікатехіни [Acta Pharmacol. Sin. 2000 Dec; 21(12): 1119-24]. Тоді як ці посилання припускають можливу роль екстрактів зеленого чаю у регулюванні судинного тону, його прямий вплив на клітини гладких м'язів залишається менш зрозумілим. Невідомо, чи інші інгредієнти зможуть покращити дію екстракту зеленого чаю на контракцію клітин гладких м'язів.

У зв'язку з вищеведеними даними, існує потреба у нутрицевтичній композиції та способі прямого інгібування клітин гладких м'язів для лікування гіпертонічної хвороби, існує також потреба у способі застосування нутрицевтичної композиції для попередження та відновлення чутливості артерій до подразників, який забезпечить адекватне скорочення та релаксацію клітин гладкої мускулатури артерій.

Даний винахід стосується способу інгібування контракції клітин гладких м'язів який полягає в дії на клітини гладких м'язів з використанням нутрицевтичної композиції, яка містить екстракт зеленого чаю, аскорбінову кислоту, лізин, пролін, аргінін, магній, N-ацетилцистеїн, селен, мідь та марганець.

Переважаю, екстрактом зеленого чаю є щонайменше одна сполука, обрана з наступної групи: епікатехін, епікатехін-3-галат, епігалокатехін та епігалокатехін-3-галат. Більш переважно, екстрактом зеленого чаю є епігалокатехін-3-галат.

Переважаю, аскорбінова кислота знаходиться у вигляді аскорбату кальцію, аскорбату кальцію, аскорбату магнію або аскорбілпальмітату.

Переважаю, лікування полягає у призначенні людині Переважаю, призначена нутрицевтична композиція містить 1000мг екстракту зеленого чаю, 710мг аскорбінової кислоти, 1000мг лізину, 750мг проліну, 500мг аргініну, 1мг магнію, 30мг N-ацетилцистеїну, 30мкг селену, 2мг міді та 1мг марганцю.

Переважаю, нутрицевтична композиція додатково містить щонайменше одну сполуку з групи, що складається з ресвератролу та геністеролу. Ще однією даного винаходу є забезпечення способу призначення нутрицевтичної композиції, корисної для зниження кров'яного тиску.

Також задачею винаходу є застосування нутрицевтичних сполук з природних джерел, які є безпечними.

Ще однією задачею даного винаходу є забезпечення способу уповільнення несприятливої дії подразника, яка веде до скорочення клітин гладких м'язів, що в свою чергу підвищує кров'яний тиск і викликає гіпертензію.

Іншою задачею даного винаходу є забезпечення способу призначення нутрицевтичної композиції, коли нутрицевтичну композицію призначають у денних кількостях, зазначених у таблиці 1.

Фіг.1 зображує дію 0,1IU/мл тромбіну на клітини гладких м'язів у КГМ гелі, що містить композицію 1 ("композиція EF") у порівнянні зі зразком без композиції EF. Контрольний КГМ гель не містить тромбіну.

Фіг.2 зображує дію 1,0мкМ ангіотензину II на клітини гладких м'язів у КГМ гелі, що містить композицію 1 ("композицію EF") порівняно до зразку без композиції EF. Контрольний КГМ гель не містить ангіотензину II.

Фіг.3 зображує скорочення КГМ гелю 1мкМ ангіотензину II та в присутності різних кількостей композиції EF.

Фіг.4 зображує скорочення КГМ гелю зростаючою концентрацією 110нМ, 330нМ та 1000нМ ангіотензину II та в присутності 100мкг/мл композиції EF.

Фіг.5 зображує скорочення КГМ гелю ангіотензином II та в присутності композиції EF, аскорбінової кислоти (АК), ЕГКГ та комбінації аскорбінова кислота - ЕГКГ.

Фіг.6 зображує скорочення КГМ гелю ангіотензином II та в присутності аргініну у різних концентраціях.

Фіг.7 зображує скорочення КГМ гелю ангіотензином II та в присутності хлориду кальцію, хлориду магнію та комбінації хлорид кальцію-хлорид магнію.

Фіг.8 зображує скорочення КГМ гелю ангіотензином II та дія ресвератролу та геністеїну та в присутності 100мкг/мл композиції EF.

Фіг.9 зображує скорочення КГМ гелю ангіотензином II та в присутності різних концентрацій N-ацетилцистеїну.

Фіг.10 зображує скорочення КГМ гелю 1мкМ ангіотензину II у присутності різних концентрацій лізину та проліну.

В даному тексті терміну "EF" відповідає нутрицевтична композиція, що містить 1000мг екстракту зеленого чаю, 710мг аскорбінової кислоти, 1000мг лізину, 750мг проліну, 500мг аргініну, 1мг магнію, 30мг N-ацетилцистеїну, 30мкг селену, 2мг міді та 1мг марганцю; лізин включає L-лізин та його похідне, пролін включає L-пролін та його похідні, аргінін включає L-аргінін та його похідні; скорочення КГМ позначає клітини гладких м'язів, позначенню ЕГКГ відповідає (-)-епігалокатехін-3-галат, позначенню ЕК - епікатехін, а саме (-)-епікатехін, ЕКГ позначає епікатехін-3-галат, а саме (-)-епікатехін-3-галат, ЕГК відповідає назві епігалокатехін і позначає (-)-епігалокатехін. Біофлавоноїди рослинного походження включають катехіни (які в свою чергу включають ЕГКГ, ЕГ, ЕКГ та ЕК) які відповідають за структурну цілісність стінок артерій та взаємодіють з численними подразниками, що спричиняють артеросклероз. Нутрицевтичне тлумачення у даній заявці та визначена відповідно до директив Американської Асоціації Серця (АНА) і включає обидва стани: гіпертензивний та прегіпертензивний. Прегіпертензивний стан визначається АНА як такий, що характеризується систолічним кров'яним тиском від 120 до 139мм Нг та діастолічним кров'яним тиском від 80 до 89мм Нг. Гіпертензивний стан визначається систолічним кров'яним тиском більшим за 140мм Нг та діастолічним кров'яним тиском більшим за 90мм Нг. Нутрицевтична композиція відповідно до даного винаходу включає щонайменше один флавоноїдний компонент. Флавоноїдний компонент включає екстракт зеленого чаю.

Екстракт зеленого чаю є комерційно доступним від US Pharma Lab. (Somerset, NJ) (назва продукту: GreenHerb - екстракт зеленого чаю у вигляді порошку). Екстракт зеленого чаю містить загалом біля 80мас.% поліфенолів. Серед поліфенолів, катехіни присутні у кількості 60мас.%. Серед катехінів, ЕГКГ знаходиться у кількості біля 35мас.%. Екстракт зеленого чаю також містить кофеїн (біля 1,0мас.%).

Нутрицевтична композиція відповідно до даного винаходу містить екстракт зеленого чаю, аскорбінову кислоту, лізин, пролін, аргінін, магній, N-ацетил цистеїн, селен, мідь та марганець.

Переважно, нутрицевтична композиція відповідно до даного винаходу містить 500мг - 2 000мг екстракту зеленого чаю, 400мг - 1,500мг аскорбінової кислоти, 400мг - 1,500мг лізину, 500мг - 1,500мг проліну, 200мг - 1000мг аргініну, 0,5мг - 2мг магнію, 10мг - 60мг N-ацетилцистеїну, 10мкг - 60мкг селену, 0,5мг - 5мг міді та 0,5мг - 2мг марганцю.

Більш переважно, нутрицевтична композиція відповідно до даного винаходу містить 1 000мг екстракту зеленого чаю, 710мг аскорбінової кислоти, 1 000мг лізину, 750мг проліну, 500мг аргініну, 1мг магнію, 30мг N-ацетилцистеїну, 30мкг селену, 2мг міді та 1мг марганцю.

Переважно, нутрицевтична композиція додатково містить ресвератрол або геністеїн. Переважні дози ресвератролу та геністеїну складають 10-50мкМ; а більш переважною є доза 1,0мкМ - 30мкМ.

Нутрицевтична композиція відповідно до даного винаходу призначена для введення ссавцю, зокрема - людині, у зручній дозованій формі, відомій з рівня техніки. Відомі з рівня техніки форми призначення включають парентеральну, ентеральну та особливо оральну. Тверді та рідкі оральні дозовані форми є особливо переважними. Тверді оральні дозовані форми добре відомі з попереднього рівня техніки і включають таблетки, капсули та споживних нутрицевтичних виробів. Тверді оральні дозовані форми можуть вміщувати один або більшу кількість фармацевтично прийнятних наповнювачів. Фармацевтично прийнятні наповнювачі сприяють або роблять можливим виготовлення дозованої форми для біологічно активного матеріалу і включають розріджувачі, зв'язувальні агенти, лубриканти, змашувальні речовини, дезінтегранти, барвники та смакові добавки. Наповнювач є фармацевтично прийнятним, якщо окрім своїх цільових функцій він є нетоксичним, добре переноситься при прийнятті всередину та не абсорбує біологічно активні інгредієнти. У іншому втіленні винаходу ці інгредієнти призначають у формі таблеток. Таблетки виготовляють за допомогою відомих технік пресування з використанням методів сухого і вологого гранулювання та гранулювання у псевдорозрідженому шарі. Ефективні кількості кожного з конкретних інгредієнтів (в рамках EF композиції) поєднують з бажаною кількістю фармацевтично прийнятного наповнювача (наприклад, лактози, крохмалю, декстрину, етилцелюлози та подібних. Інгредієнти змішують у

змішувачі. Використовують змішувачі таких типів: з подвійною камерою, планетарного типу та швидкісний змішувач ножового типу, відомі спеціалістам у даній галузі техніки. Таблетки роблять з покриттям або без нього. Капсули, які ще називають капсулами сухого наповнення, є твердими оральними дозованими формами, в яких композиція знаходиться у контейнері для ковтання зручного розміру, який типово виготовляють з желатину. Тверді незаповнені капсули, зручні для вміщування нутрицевтичної композиції відповідно до даного винаходу, є комерційно доступними. Способи наповнення капсул є добре відомим з рівня техніки [Edward Rudnic та Joseph B. Schwartz, Oral Solid Dosage Forms, Volume II, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Chapter 92,1615,1642-1647 (під ред. Alfonso R. Gennaro, 19<sup>e</sup> вид., 1995)].

Протокол експерименту

Під час експерименту застосовували наступні вихідні матеріали та обладнання.

1. Культуральні клітини гладких м'язів судин (КГМ) виділені з аорти людини. Використовують клітини з 4 по 8 пасажів.

2. Колаген людини типу I.

3. Ангіотензин II.

4. Тромбін.

5. Композиція EF (лізин, пролін, аргінін, вітамін С (як аскорбінова кислота, аскорбат кальцію, аскорбат магнію, або аскорбілпальмітат), магній, N-ацетилцистеїн, селен, мідь та марганець. 6 капсул композиції EF містять 1000мг лізину, 750мг проліну, 500мг L-аргініну, 710мг вітаміну С, 50мг магнію, 1000мг стандартизованого екстракту зеленого чаю (80% поліфенолів - 800мг (без кофеїну)) 30мг N-ацетилцистеїну, 30мг селену, 2мг міді, 1мг марганцю (всі інгредієнти є комерційно доступними) (ЕГКГ).

7. Ресвератрол.

8. Культуральне середовище для клітин (ОМЕМ).

9. 24-лунковий пластиковий планшет з культурою клітин, попередньо інкубований з 2мг/мл сироватки бичачого альбуміну.

10. Цифрова камера.

11. Програмне забезпечення для аналізу цифрових знімків (Scion Corporation).

Таблиця 1

Композиція 1 ("Композиція EF")

Сполука	Денна доза
L-Лізин	1000мг
L-Пролін	750мг
L-Аргінін	500мг
Вітамін С, як аскорбінова кислота, аскорбат кальцію, аскорбат магнію або аскорбілпальмітат	710мг
Магній	50мг
Стандартизований екстракт зеленого чаю, 80% поліфенолів - 800мг (без кофеїну)	1000мг

Методики:

Ми випробували здатність екстрактів зеленого чаю (тобто біофлавоноїдів) та різних інгредієнтів до інгібування контракційної активності клітин гладких м'язів. Культуральні клітини гладких м'язів аорти людини (КГМ) (комерційно доступні від Clonetics) використовували і вміщували у тривимірну матрицю, що містить колаген типу I (1мг/мл). Колаген одержували від Sigma, а виготовлення матриці описане нижче. Контракцію гелю стимулювали 1мкМольним ангіотензином II (Ang II) у вільному від сироватки середовищі і площину гелю оцінювали за допомогою аналізу цифрового зображення через 24 години.

Культура клітин гладких м'язів

Конфлюентні культури КГМ видаляли з культуральної колби трипсинізацією та промивали розчином фосфатного буферу (PBS) від сироватки, яку містило середовище. Концентрацію клітин у суспензії доводили до 500000клітин/мл у DMEM, вільному від сироватки. Суспензію клітин потім перемішували у пропорції 1:1 з крижаним розчином колагену типу I (2мг/мл) у розчині фосфатного буфера (PBS). Кінцева концентрація колагену типу I складала 1мг/мл, а кінцева концентрація клітин - 250000/мл.

КГМ-колагенові суспензії розподіляли по 300мкл у 24 лунковому планшеті таким чином, щоб

повністю вкрити дно лунок планшета. Потім планшети інкубували протягом однієї години при 37°C для полімеризації гелю. До полімеризованого гелю додавали 0,5мл вільного від сироватки експериментального середовища, що не містить добавок (контроль), або 1мкМоль/л ангіотензину II з або без сполуки, що випробовується. Планшети потім обережно перекидали на бік для того, щоб відділити гель від пластикового дна лунок, потім вміщували планшет в інкубатор з контрольованою атмосферою, зі вмістом 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Після інкубування протягом 24 годин, планшети виймали з інкубатора та робили знімки планшетів з рухливими гелями за допомогою цифрової камери. Площину поверхні гелю визначали за допомогою програмного забезпечення для аналізу цифрових зображень від Scion Corporation. Експеримент здійснювали в трьох повторях та результати представляли як середні значення +/- середньоквадратичне відхилення.

Для спостереження дії різних компонентів композиції EF та для визначення синергічної дії різних інгредієнтів композиції EF, якщо така існує, проводили дослідження інгібування контракції клітин гладких м'язів. Такі дослідження могли б пролити світло на лікування та/або попередження гіпертензії.

Вивчалися різні інгредієнти, включаючи епігалокатехін галат (ЕГКГ). Спочатку окремо вивчали епігалокатехін галат та інші інгредієнти і оцінювали їх дію. Потім вивчали синергічну дію епігалокатехін галату з іншими інгредієнтами.

#### Результати

Як ангіотензин II так і тромбін (використані як агоністи) викликали контракцію клітин гладких м'язів у КГМ гелі. Ці агоністи надалі спричиняли скорочення всього гелю. Додавання ангіотензину II або тромбіну приводило до контракції всього гелю. Різницю між площею поверхні КГМ гелю, який не містив агентів, що викликають контракцію, та площею поверхні гелю, що містив такий агент, яку вимірювали через 24 години після заповнення планшету, відносили до дії цього агенту.

Використовуючи такі дослідження контракції КГМ гелю, оцінювали різні сполуки щодо їх здатності інгібувати скорочення клітин гладких м'язів. Серед інгредієнтів екстрактів зеленого чаю, епігалокатехін галат виявився найбільш активним інгібітором контракції випробовуваного гелю при додаванні у концентрації 30мкмоль/л. Інгібування контракції гелю біофлавоноїдами (включаючи ЕКГГ) не залежало від антиоксидантної дії, оскільки аскорбінову кислоту не використовували для проведення цих досліджень.

#### Приклад 1

Фіг.1 показує здатність композиції EF до інгібування контракції клітин гладких м'язів спричиненої дією тромбіну. В цьому досліді КГМ гель без агента, що викликає контракцію, (контроль) та гель з таким агентом (тромбін 0,1IU/мл) порівнювали з гелем, який містив тромбін в концентрації 0,1IU/мл, після додавання композиції EF у кількості 100мкг/мл. Контрольний КГМ гель без агента, що викликає контракцію, та необроблений гель продемонстрував незначне скорочення. Таким чином, клітини гладких м'язів мають тенденцію до скорочення, навіть без присутності агента, який його викликає.

КГМ гель з тромбіном в якості агента, який викликає контракцію, продемонстрував більше скорочення КГМ гелю. Однак, коли КГМ гель обробляли тромбіном (0,1IU/мл) та композицією EF, КГМ гель не скорочувався так як КГМ гель з агентом, що викликає таке скорочення або без нього. Таким чином, композиція EF продемонструвала значне інгібування контракції КГМ гелю та протигіпертензивну дію.

#### Приклад 2

Фіг.2 демонструє здатність композиції EF до інгібування контракції клітин гладких м'язів, викликаної ангіотензином II (агентом, що викликає контракцію). КГМ гель без агента, що викликає контракцію (ангіотензин II), та з таким агентом у концентрації 1,0мкМ порівнювали з гелем, який містить ангіотензин II (1,0мкМ), оброблений композицією EF (100мкг/мл).

КГМ гель з ангіотензином II в якості агента, що викликає контракцію, демонстрував більшу контракцію КГМ гелю. Коли КГМ гель обробляли ангіотензином II (1,0мкМ) та композицією EF, КГМ гель не скорочувався так само сильно як КГМ гелі з агентом, що викликає контракцію або без такого. Ці обидва досліді щонайменше перевірили

припущення щодо ефективності композиції EF як протигіпертензивного агента. Відповідно, ці дані разом (Фіг.1 та 2) ясно вказують на те, що композиція EF є ефективною при інгібуванні контракції клітини гладких м'язів та таким чином, може бути корисною для зниження кров'яного тиску.

#### Приклад 3

Фіг.3 показує залежність активності композиції EF відносно інгібування контракції клітин гладких м'язів, викликаної ангіотензином II, від дози. КГМ гель, що містить 1,0мкМ ангіотензину II обробляли композицією EF зі зростаючими концентраціями 11, 33 та 100мкг/мл та порівнювали з контрольним зразком, містив ангіотензин II, але без композиції EF. Це дало змогу побудувати криву відповіді на дозу, яка продемонструвала меншу контракцію (більш значне зменшення скорочення поверхні КГМ гелю) при зростанні концентрації композиції EF.

#### Приклад 4

Далі ми випробовували відповідні складові композиції EF щодо інгібування контракції клітин гладких м'язів. Також ми досліджували, чи мають складові композиції EF синергічну дію. Для цього різні складові композиції EF випробовували окремо, або в комбінації з іншими інгредієнтами на їх здатність інгібувати контракцію клітин гладких м'язів.

Фіг.4 показує вплив аскорбінової кислоти, ЕКГГ та аскорбінової кислоти в поєднанні з ЕКГГ на його здатність інгібувати контракцію клітин гладких м'язів КГМ гелю примушували скорочуватись за допомогою ангіотензину II (1,0мкМ). Контрольний КГМ гель містив самий лише ангіотензин II. Композиція EF (100мкг/мл) сильно інгібувала контракцію клітин гладких м'язів. Аскорбінова кислота (100мкМ) окремо не впливала на викликану ангіотензином II контракцію клітин гладких м'язів. ЕКГГ в кількості 15мкМ не мав помітної інгібувальної дії. Комбінація аскорбінової кислоти та ЕКГГ також не мала будь-якого вартого уваги інгібувального ефекту. Ці дані вказують, що при інгібуванні контракції клітин гладких м'язів синергічно діють різні складові композиції EF. Зазначаємо, що аскорбінову кислоту та ЕКГГ використовували у еквівалентних концентраціях, знайдених в композиції EF.

#### Приклад 5

Фіг.5 показує окремо дію аргініну на інгібування контракції клітин гладких м'язів. Аргінін (0,50мМ та 1,0мМ) застосовували до КГМ гелю, що містив 1,0мкМ ангіотензину II та 0,5мМ аскорбінової кислоти. Еквівалентні концентрації аргініну застосовували до КГМ гелю, що містив 1,0мкМ ангіотензину II але без аскорбінової кислоти. Концентрація аргініну у 100мкг/мл композиції EF складає 50мкМ. Таким чином концентрації аргініну які окремо застосовували до КГМ гелю були відповідно в 10 разів та в 20 разів більшими за концентрацію аргініну у композиції EF. Концентрація аскорбінової кислоти у КГМ гелі, що містив аскорбінову кислоту складала 0,5мМ, що в 5 разів більше за концентрацію аскорбінової кислоти у EF. Незважаючи на такі підвищені концентрації, аскорбінова кислота та аргінін, по

одному або разом не мали помітної дії на інгібування контракції клітин гладких м'язів.

#### Приклад 7

Фіг.7 демонструє дію окремо та разом кальцію та магнію (у формі хлориду кальцію та хлориду магнію) на інгібування контракції клітин гладких м'язів. Концентрація кальцію у 100мкг/мл композиції EF складає 12мкМ. Концентрація магнію у композиції EF дорівнює 50мкМ. Концентрація кальцію та магнію використана у даному досліді по скороченню КГМ гелю складала 2,0мМ. Таким чином, концентрації кальцію та магнію, які застосовували до КГМ гелю були десь відповідно у 160 разів та 40 разів більшими за концентрацію кальцію та магнію у композиції EF. У якості агента, що викликає контракцію, у всіх КГМ гелях використовували ангіотензин II (1мкМ). Незважаючи на це, підвищені концентрації хлориду кальцію та хлориду магнію окремо, або разом, не вплинули помітним чином на контракцію клітин гладких м'язів, спричинену ангіотензином II.

Хоча композиція EF не містила ресвератролу або геністеїну, ми вивчили їх спільну дію з композицією EF. Фіг.8 демонструє вплив геністеїну та ресвератролу окремо, або в комбінації один з одним, на інгібування контракції клітин гладких м'язів. Ресвератрол застосовували до КГМ гелю та порівнювали з КГМ гелем, що не містив ресвератролу. Концентрація ресвератролу, який застосовували до КГМ гелю складала 15мкМ та 30мкМ. До одного КГМ гелю додавали окремо геністеїн у концентрації 30мкМ, щоб дослідити його вплив, якщо такий існує. Концентрація ресвератролу, яку застосовували до КГМ гелю дорівнювала 15мкМ та 30мкМ. Геністеїн та ресвератрол разом додавали до КГМ гелю обидва у концентрації 15мкМ. Як агент, що викликає контракцію, у всіх КГМ гелях застосовували ангіотензин II (1мкМ). Були проведені дві серії експериментів, одна серія з КГМ гелем без композиції EF та серія КГМ гелів, що містять композицію EF. Концентрація ресвератролу 15мкМ та 30мкМ у комбінації з композицією EF має тенденцію проявляти деяку інгібувальну дію, вона була більш вираженою за присутності композиції EF. Для всіх КГМ гелів спостерігався адитивний протигіпертензивний ефект, який легко визначити, причому цей ефект спостерігався незалежно від того, чи був це ресвератрол, гіпестейн, або обидва. Крива відповіді на дозу була очевидною для серій, що містили 15мкМ та 30мкМ ресвератролу з або без композиції EF, однак, крива відповіді на дозу для серій, що містили ресвератрол і композицію EF була більш вираженою.

#### Приклад 8

Фіг.9 демонструє ефективність N-ацетилцистеїну при інгібуванні контракції клітин гладких м'язів. Концентрація N-ацетилцистеїну у 100мкг/мл композиції EF складала 20мкМ. Концентрації N-ацетилцистеїну, які застосовували до КГМ гелю складали відповідно 2,2, 6,7, 20 та 60мкМ. Ангіотензин II додавали у концентрації 1мкМ як агент, що викликає контракцію, до всіх КГМ гелів. Незважаючи на такі підвищені концентрації, N-ацетилцистеїн не спричиняв помітної протиконтракційної дії.

#### Приклад 9

Фіг.10 показує активність лізину та проліну, окремо або разом, при інгібуванні контракції клітин гладких м'язів. Концентрація лізину у 100мкг/мл композиції EF складала 110мкМ. Концентрації лізину, які додавали до КГМ гелю були відповідно 0,25, 0,50 та 1мМ. Таким чином, концентрації, які застосовували до КГМ гелю були відповідно десь у 2 рази, 4,5 разів та 9 разів більшими за концентрацію лізину у композиції EF. Концентрація проліну у 100мкг/мл композиції EF складає 100мкМ. Концентрації проліну, який додавали до КГМ гелю, були 0,25, 0,50 та 1мМ. Таким чином, концентрації, які застосовували до КГМ гелю були відповідно у 2,5 рази, 5 разів та 10 разів більшими за концентрацію проліну у композиції EF. Лізин та пролін додавали разом до КГМ гелю у концентрації 0,50мМ. Як агент, що викликає контракцію, у всіх КГМ гелів застосовували ангіотензин II (1мкМ). Незважаючи на підвищені концентрації проліну та лізину, окремо, або разом вони не забезпечували помітного протиконтракційного ефекту.

Однак, результати досліджень вказують на те, що нутрицевтична композиція, яка містить екстракт зеленого чаю (і містить ЕГКГ як біофлавоноїд), аскорбінову кислоту, лізин, пролін, аргінін, магній, N-ацетилцистеїн, селен, мідь та марганець, має синергічну дію при регулюванні КГМ-опосередкованого скорочення. Нутрицевтична композиція має сильний потенціал для протидії патофізіологічній активності агоністів, включаючи тромбін та ангіотензин II. Не маючи конкретно визначеного механізму дії, синергічна дія композиції EF може бути пов'язана з цілісністю міжклітинних матриць.

#### Приклад 10

Нами досліджена дія окремих катехінів на викликане ангіотензином II скорочення клітин гладких м'язів аорти людини. Досліджували катехін (30мкМ), епікатехін (30мкМ), епігалокатехін галат (30мкМ) та епігалокатехін галат (30мкМ), а як стимулятор контракції клітин гладких м'язів використовували ангіотензин II. Скорочення гелю представлене як відсоток на який зменшувалась площа поверхні гелю через 24 години інкубування. Ангіотензин II (1мкМ) спричиняв скорочення на  $85,26 \pm 1,18\%$  (середнє значення  $\pm$  середньоквадратичне відхилення). Ангіотензин II (1мкМ) плюс катехін (30мкМ) спричиняв скорочення на  $76,83 \pm 1,63\%$ . Ангіотензин II (1мкМ) плюс епікатехін (30мкМ) спричиняв скорочення на  $78,59 \pm 7,03\%$ . Ангіотензин II (1мкМ) плюс епігалокатехін галат (30мкМ) спричиняв скорочення на  $65,70 \pm 6,56\%$ . Ангіотензин II (1мкМ) плюс епігалокатехін галат (30мкМ) спричиняв скорочення на  $61,23 \pm 9,14\%$ .

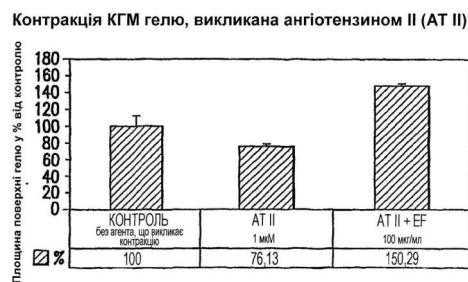
Відповідно, даний винахід забезпечує для нутрицевтичної композиції можливість терапевтичного впливу. Компоненти, з яких складається нутрицевтична композиція діють синергічно при інгібуванні контракції клітин гладких м'язів, і, таким чином, вона відновлює та мінімізує недостатню чутливість артерій, яка призводить до гіпертензії. Більш того, даний винахід забезпечує потенціальну терапію з використанням нутрицевтичної композиції, яка може уповільнити

несприятливу дію чинників, які спричиняють скорочення клітин гладких м'язів, яке підвищує кров'яний тиск та призводить до хронічної гіпертензії. Даний винахід відноситься до вибору природних сполук та екстрактів, які є більш ефективними за фармацевтичні сполуки, не маючи притаманних їм небажаних побічних ефектів, вже не згадуючи про економічні переваги, а саме - вартість.

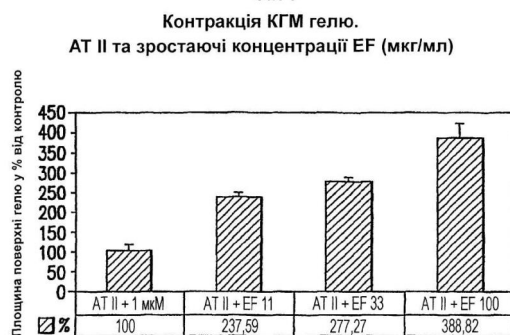
Зрозуміло, що дані приклади наведені не для обмеження розкриття представленого переважного втілення винаходу, і не претендують на представлення всіх модифікацій та змін, які відповідають духу та обсягу даного винаходу. Всі наведені публікації та інші посилання включені тут як посилання в усій своїй повноті.



Фіг. 1

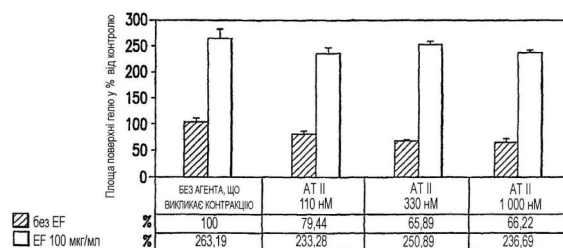


Фіг. 2

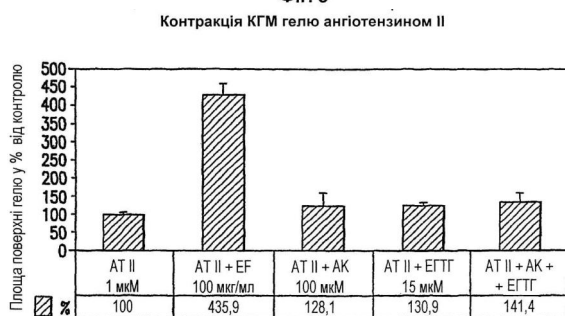


Фіг. 3

Контракція КГМ гелю та зростаючими концентраціями ангіотензину II

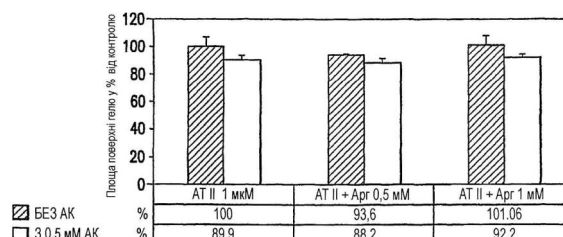


Фіг. 4

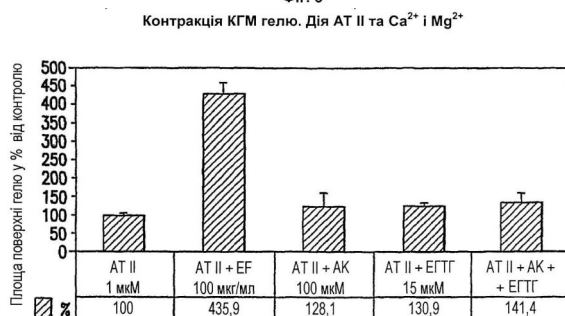


Фіг. 5

Контракція КГМ гелю. Дія AT II, аргініну та аскорбату

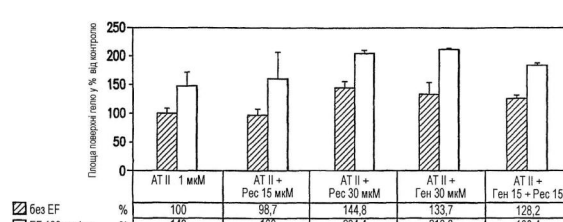


Фіг. 6



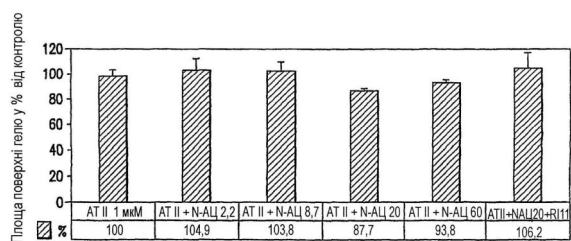
Фіг. 7

Контракція КГМ гелю. Дія ресвератролу та геністеїну



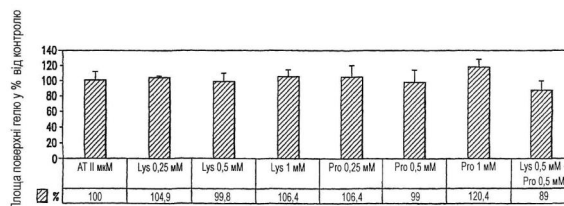
Фіг. 8

Контракція КГМ гелю. Дія АТ II та N-ацетилцистеїну (мкМ)



Фіг. 9

Контракція КГМ гелю. Дія лізину та проліну у присутності АТ II.



Фіг. 10