

Область изобретения

Данное изобретение относится, в общем, к применению докозапентаеновой кислоты (C22:5n-6) (DPA_n-6), докозапентаеновой кислоты (C22:5n-3) (DPA_n-3) и докозатетраеновой кислоты (C22:4n-6) (DTA_n-6) в качестве субстратов для производства новых оксилипинов и, собственно, к получаемым оксилипинам. Изобретение относится далее к применению DPA_n-6, DPA_n-3, DTA_n-6 и/или оксилипинов, происходящих из них, в частности, в качестве противовоспалительных соединений. Изобретение относится также к новым способам производства масел, богатых полиненасыщенной кислотой с длинной цепью (длинноцепочечной полиненасыщенной кислотой) (LCPUFA), и к композициям, которые содержат повышенные и эффективные количества происходящих из LCPUFA оксилипинов, и в частности докоза-ноидов.

Предпосылки изобретения

В 1990 годах исследователи идентифицировали гидроксипроизводные некоторых жирных кислот в макроводорослях (морских водорослях) и описали возможную роль данных соединений в заживлении ран и клеточной сигнализации в организмах (Gerwick & Bernart 1993; Gerwick et al. 1993; Gerwick 1994). Они обнаружили, что данные соединения сходны с соединениями, продуцируемыми в организме человека липоксигеназным способом. Те же самые исследователи попытались разработать культуры клеточной суспензии данных морских водорослей для продуцирования (производства) эйкозаноидов и родственных оксилипинов из C18 жирных кислот (линовой кислоты и линоленовой кислоты) и арахидоновой кислоты (C20: 4n-6) (ARA) в красных, коричневых и зеленых морских водорослях. Однако производство биомассы морских водорослей в данных системах культур оказалось очень плохим (например, около 0,6-1,0 г/л биомассы морских водорослей за 15 дней (Rorger et al. 1996)), и даже непосредственное добавление к культурам ключевых жирных кислот лишь minimally увеличило продуцирование оксилипинов по сравнению с контрольными опытами (Rorres et al. 1997). Кроме того, в некоторых случаях добавляемые свободные жирные кислоты оказались токсичными для культур (Rorres et al. 1997). Поэтому данные системы сохранили лишь академический интерес для производства окисленных форм данных жирных кислот, и в настоящее время продолжаются исследования в отношении C18 и C20 оксилипинов в данных морских водорослях (например, Bouarab et al. 2004).

Оксилипины из длинноцепочечной омега-6 (n-6, или ω-6, или N6) жирной кислоты, ARA, хорошо изучены, и обычно считается, что они являются провоспалительными для людей. Однако было найдено, что оксилипины из длинноцепочечной омега-3 (n-3, или ω-3, или N3) обычно являются противовоспалительными. В начале 2000 годов Serhan и другие исследователи обнаружили, что гидроксилированные формы двух длинноцепочечных омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (омега-3 LCPUFAs) (т.е. эйкозапентаеновой кислоты (C20:5, n-3) (EPA) и докозагексаеновой кислоты C22:6, n-3) (DHA)) получаются в организме человека (Serhan et al. 2004a, b; Bannenberg et al. 2005a, b). Они определили маршруты, по которым омега-3 (n-3 или ω-3) LCPUFAs, EPA и DHA перерабатываются под действием циклооксигеназ, ацетилированных циклооксигеназного-2 или липоксигеназного ферментов, приводя в результате к получению новых моно-, ди- и тригидроксипроизводных данных жирных кислот. Было установлено, что получающиеся соединения, которые были названы резолвинаами (потому что они вовлечены в фазу инактивации острого воспаления) или докозатриенами (потому что они получаются из докозагексаеновой кислоты и содержат сопряженные двойные связи), обладают сильными противовоспалительными (Arita et al. 2005a, b, c; Flower & Perretti 2005; Hong et al. 2003; Marqueselli et al. 2003; Ariel et al. 2005), антипролиферативными и нейропротективными (Bazan 2005a, b; Bazan et al. 2005; Belayev et al. 2005; Butovich et al. 2005; Chen & Bazan 2005; Likiw et al. 2005; Mukherjee et al. 2004) свойствами. Было замечено также, что данные соединения имеют более длительные периоды полураспада в организме человека по сравнению с другими типами эйкозаноидов.

В последние несколько лет в различных патентах и публикациях патентных заявок описаны аналоги гидроксипроизводных ARA, DHA и EPA, маршруты, по которым они образуются, способы их синтеза в лабораторных условиях с помощью органических синтетических средств или биогенеза с использованием циклооксигеназного или липоксигеназного ферментов и применение данных гидроксипроизводных в качестве фармацевтических соединений для лечения воспалительных заболеваний. Данные патенты и публикации суммированы кратко ниже.

Патент США № 4560514 описывает получение как провоспалительного (LX-A), так и противовоспалительного тригидроксилипоксинов (LX-B), происходящих из арахидоновой кислоты (ARA). Описывается также использование данных соединений как в изучении, так и предотвращении воспаления (в качестве фармацевтических соединений).

В публикации патентной заявки США № 2003/0166716 описывается использование липоксинов (происходящих из ARA) и аспирин-запускаемых липоксинов в лечении астмы и воспалительных заболеваний дыхательных путей. Изучены также химические структуры различных противовоспалительных аналогов липоксина.

В публикации патентной заявки США № 2003/0236423 раскрываются методы синтеза, основанные на органической химии получения тригидрокси полиненасыщенных эйкозаноидов и их структурных

аналогов, включая способы получения производных данных соединений. Обсуждается также применение данных соединений и их производных в лечении воспалительных состояний или нежелательной клеточной пролиферации.

Публикация РСТ № WO 2004/078143 направлена на способы идентификации рецепторов, которые взаимодействуют с ди- и тригидрокси EPA расщепляющими аналогами.

В публикации патентной заявки США № 2004/0116408A1 раскрывается, что взаимодействие EPA или DHA в организме человека с циклооксигеназой-II (COX2) и анальгетиком, таким как аспирин, ведет к образованию ди- и тригидрокси EPA или DHA соединений с благоприятными эффектами в отношении воспаления. В ней также описываются способы применения и способы получения данных соединений.

В публикации патентной заявки США № 2005/007 53 98A1 раскрывается, что докозатриен 10,17S-докозатриен (нейропротектин D1), по-видимому, оказывает нейрозащитные действия в организме человека.

В публикации РСТ № WO 2005/089744A2 описывается, что ди- и тригидроксирезолвиновые производные EPA и DHA и их стабильные аналоги являются благоприятными в лечении заболеваний дыхательных путей и астмы.

Хотя приведенные выше ссылки описывают липоксины, происходящие из ARA и докозатриенов, и резолвины, происходящие из DHA и EPA, так же, как и различные применения таких соединений, в технике остается все еще потребность в альтернативных способах обеспечения потребителей противовоспалительными выгодами и другими выгодами от данных LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов), иных, чем обеспечение потребителей сочетаниями LCPUFA масла и аспирина или химическое синтезирование желаемых производных или их аналогов.

Кроме того, ни в одной из приведенных выше ссылок не описываются ни способы получения данных специальных соединений в микробных культурах или растениях, ни способы увеличения содержания данных желаемых гидроксипроизводных жирных кислот в съедобных маслах. В дополнение к сказанному, ни одна из данных ссылок не описывает какие-либо гидроксипроизводные из других LCPUFA и ни одна из данных ссылок не предполагает, что гидроксипроизводные каких-либо LCPUFA, иных, чем ARA, DHA и EPA, могли бы играть благоприятную роль.

Краткое содержание изобретения

Одно воплощение настоящего изобретения относится, в общем, к изолированному докозаноиду докозапентаеновой кислоты (DPAn-6).

Такой докозаноид может включать в себя, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из моногидроксипроизводных DPAn-6, дигидроксипроизводных DPAn-6 и тригидроксипроизводных DPAn-6. Такой докозаноид может, более конкретно, включать, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из 7-гидрокси DPAn-6; 8-гидрокси DPAn-6; 10-гидрокси; 11-гидрокси DPAn-6; 13-гидрокси DPAn-6; 14-гидрокси DPAn-6; 17-гидрокси DPAn-6; 7,17-дигидрокси DPAn-6; 10,17-дигидрокси DPAn-6; 13,17-дигидрокси DPAn-6; 7,14-дигидрокси DPAn-6; 8,14-дигидрокси DPAn-6; 16,17-дигидрокси DPAn-6; 4,5-дигидрокси DPAn-6; 7,16,17-тригидрокси DPAn-6 и 4,5,17-тригидрокси DPAn-6; или его аналог, производное или соль.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к изолированному докозаноиду докозапентаеновой кислоты (DPAn-3). Такой докозаноид может включать в себя, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из моногидроксипроизводных DPAn-3, дигидроксипроизводных DPAn-3 и тригидроксипроизводных DPAn-3. Такой докозаноид может более конкретно включать, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из 7-гидрокси DPAn-3; 10-гидрокси DPAn-3; 11-гидрокси DPAn-3; 13-гидрокси DPAn-3; 14-гидрокси DPAn-3; 16-гидрокси DPAn-3; 17-гидрокси DPAn-3; 7,17-дигидрокси DPAn-3; 10,17-дигидрокси DPAn-3; 8,14-дигидрокси DPAn-3; 16,17-дигидрокси DPAn-3; 13,20-дигидрокси DPAn-3; 10,20-дигидрокси DPAn-3; 13,20-дигидрокси DPAn-3 и 7,16,17-тригидрокси DPAn-3; или его аналог, производное или соль.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к изолированному докозаноиду докозатетраеновой кислоты (DTAn-6). Такой докозаноид может включать в себя, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из моногидроксипроизводных DTAn-6, дигидроксипроизводных DTAn-6 и тригидроксипроизводных DTAn-6. Такой докозаноид может более конкретно включать, но не ограничивается указанными, R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из 7-гидрокси DTAn-6; 10-гидрокси DTAn-6; 13-гидрокси DTAn-6; 17-гидрокси DTAn-6; 7,17-дигидрокси DTAn-6; 10,17-дигидрокси DTAn-6; 16,17-дигидрокси DTAn-6 и 7,16,17-тригидрокси DTAn-6; или его аналог, производное или соль.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к изолированному докозаноиду C22 полиненасыщенной жирной кислоты, где докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из 4,5-эпокси-17-гидрокси DPA; 7,8-эпокси DHA; 10,11-эпокси DHA; 13,14-эпокси DHA; 19,20-эпокси DHA; 13,14-дигидрокси DHA; 16,17-дигидрокси DTAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTAn-6; 4,5,17-тригидрокси DTAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTAn-3; 16,17-дигидрокси DTAn-3; 16,17-дигидрокси DTRAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTRAn-6; 4,5-дигидрокси DTAn-6 и 10,16,17-тригидрокси DTRAn-6; или его аналог, производное или соль.

Еще одно воплощение изобретения относится к композиции, включающей по крайней мере один из

любых описанных выше докозаноидов. Композиция включает, но не ограничивается ими, терапевтическую композицию, питательную или пищевую композицию или косметическую композицию. Согласно одному из аспектов композиция дополнительно включает аспирин. Согласно еще одному аспекту композиция дополнительно включает соединение, выбранное из DPAn-6, DPAn-3, DTAn-6, DHA, EPA, оксилипинового производного DHA и оксилипинового производного EPA. Согласно еще одному аспекту композиция дополнительно включает по крайней мере один агент, выбранный из статина, нестероидного противовоспалительного агента, антиоксиданта и нейропротекторного агента. Согласно еще одному аспекту композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. Согласно еще одному аспекту композиция включает масло, выбранное из микробного масла, масла семян растений и масла водных животных.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к маслу, включающему по крайней мере около 10 мкг докозаноида на грамм масла. Другие воплощения охватывают масло, включающее по крайней мере около 20 мкг докозаноида на грамм масла, по крайней мере около 50 мкг докозаноида на грамм масла или по крайней мере около 100 мкг докозаноида на грамм масла. Согласно одному аспекту докозаноидом в определенном выше масле является полиненасыщенная жирная кислота, выбранная из докозатетраеновой кислоты (DTAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-3), докозагексаеновой кислоты (DHA) и эйкозапентаеновой кислоты (EPA). Согласно еще одному аспекту докозаноид выбран из полиненасыщенной жирной кислоты, выбранной из докозатетраеновой кислоты (DTAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-6) и докозапентаеновой кислоты (DPAn-3). Согласно еще одному аспекту докозаноидом является любой из определенных выше докозаноидов. Масло может включать, но не ограничивается ими, микробное масло, масло семян растений и масло водных животных.

Еще одно воплощение изобретения включает композицию, включающую любое из определенных выше масел, которые могут включать, но не ограничиваются ими, терапевтическую композицию, пищевую композицию или косметическую композицию.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к композиции, включающей полиненасыщенную жирную кислоту с длинной цепью, выбранную из DPAn-6, DPAn-3 и DTAn-6, и фармацевтически или питательно приемлемый носитель. Согласно одному аспекту композиция дополнительно включает аспирин. Согласно еще одному аспекту композиция дополнительно включает фермент, который катализирует производство декозаноидов из DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу предотвращения или снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума. Способ включает в себя стадию введения лица, которое подвержено риску, или которому поставлен диагноз, или которое подозревается в наличии у него воспаления или нейродегенерации или состояния или заболевания, связанных с ними, агента, выбранного из группы, состоящей из DPAn-6, DPAn-3, оксилипинового производного DPAn-6 и оксилипинового производного DPAn-3, для снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума. Согласно одному аспекту агент является эффективным для снижения продуцирования фактора некроза опухоли- α (TNF- α) Т-лимфоцитами. Согласно еще одному аспекту агент является эффективным для снижения миграции нейтрофилов и макрофагов в участок воспаления. Согласно еще одному аспекту агент является эффективным для снижения продуцирования у индивидуума интерлейкина-1 β (IL- β). Согласно еще одному аспекту агент является эффективным для снижения у индивидуума макрофагового хемотактического протеина-1 (MCP-1). Производное оксилипина, используемое в настоящем способе, может включать любой из докозаноидов настоящего изобретения, описанных выше. В одном из предпочтительных воплощений агент выбран из 17-гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6, или его производного, или аналога, или соли. Еще в одном воплощении агент выбран из DPAn-6 и DPAn-3.

Согласно одному аспекту способ дополнительно включает введение индивидууму по крайней мере одной омега-3 жирной кислоты с длинной цепью и/или ее оксилипинового производного. Такая омега-3 жирная кислота может включать, но не ограничивается ими, DHA и/или EPA.

В одном из аспектов DPAn-6 или DPAn-3 предоставляется в одной из следующих форм: в виде триглицерида, содержащего DPAn-6 или DPAn-3, в виде фосфолипида, содержащего DPAn-6 или DPAn-3, в виде свободной жирной кислоты, в виде этилового или метилового эфира DPAn-6 или DPAn-3.

Согласно еще одному аспекту DPAn-6, или DPAn-3, или ее оксилипиновое производное предоставляется в форме микробного масла, животного масла или растительного масла, которое происходит из масла семян растений, которые были подвержены генетической модификации с получением полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью. В одном аспекте оксилипиновое производное получают с помощью ферментативного превращения DPAn-6 или DPAn-3 в ее оксилипиновое производное. Еще в одном аспекте оксилипиновое производное синтезируют химическим путем *de novo*.

Согласно любому из приведенных выше аспектов данного способа изобретения способ может дополнительно включать введение индивидууму аспирина. Согласно одному из аспектов способ дополнительно включает введение по крайней мере одного агента, выбранного из: статина, нестероидного проти-

вовоспалительного агента, антиоксиданта и нейрозащитного агента.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу получения докозаноида, включающему химический синтез любого из описанных выше докозаноидов настоящего изобретения.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу получения докозаноидов, включающему каталитическое получение докозаноидов путем контактирования DPA_n-6 субстрата, DTAn-6 субстрата или DPA_n-3 субстрата с ферментом, который катализирует получение докозаноидов из указанного DPA_n-6 субстрата, указанного DTAn-6 субстрата или указанного DPA_n-3 субстрата.

Еще одного воплощение настоящего изобретения относится к способу получения докозаноидов, включающему культивирование микроорганизмов, продуцирующих полиненасыщенную жирную кислоту с длинной цепью (LCPUFA), или выращивание LCPUFA-продуцирующих растений, которые генетически модифицированы для сверхэкспрессии фермента, который катализирует получение докозаноидов из LCPUFA с 22 углеродами, с получением указанных докозаноидов.

Еще один способ настоящего изобретения относится к способу получения докозаноидов, включающему контактирование полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью (LCPUFA), продуцируемых LCPUFA-продуцирующими микроорганизмами, LCPUFA-продуцирующими растениями или LCPUFA-продуцирующими животными, с ферментом, который катализирует превращение указанных LCPUFA в докозаноиды.

В одном аспекте описанных выше способов получения докозаноидов фермент выбирают из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохром Р450 фермента. Например, такие ферменты включают, но не ограничиваются ими, 12-липоксигеназу, 5-липоксигеназу, 15-липоксигеназу, циклооксигеназу-2, гемоглобин альфа 1, гемоглобин бета, гемоглобин гамма А, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4V2, CYP4X1, CYP41, CYP2J2, CYP2C8, тромбоксан А-синтазу 1, простагландин 12-синтазу и простациклин-синтазу. Согласно одному аспекту LCPUFA выбирается из DPA_n-6, DTAn-6 и DPA_n-3.

Согласно одному из аспектов описанных выше способов LCPUFA-продуцирующие микроорганизмы или LCPUFA-продуцирующие растения генетически модифицированы для получения LCPUFA. Согласно еще одному аспекту LCPUFA-продуцирующие микроорганизмы эндогенно продуцируют LCPUFA (например, *Thraustochytrids*).

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу обогащения масла по крайней мере одним оксилипином, происходящим из LCPUFA, или стабилизации указанного оксилипина в масле. Способ включает культивирование LCPUFA-продуцирующего микроорганизма с соединением, которое усиливает ферментативную активность фермента, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины. В одном аспекте соединение стимулирует экспрессию фермента. Еще в одном аспекте соединение усиливает или инициирует автоокисление LCPUFA. В одном из предпочтительных аспектов соединением является ацетилсалициловая кислота.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу обогащения масла по крайней мере одним оксилипином, происходящим из LCPUFA, или стабилизации указанного оксилипина в масле. Способ включает разрушение микробов или семян масличных растений в присутствии фермента, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины, согласно которому микробы и семена масличных растений продуцируют по крайней мере одну LCPUFA.

Согласно одному из аспектов описанных выше способов фермент выбирается из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохром Р450 фермента. Согласно еще одному аспекту способ дополнительно включает выделение и очистку оксилипинов. Согласно данному аспекту оксилипины могут также дополнительно перерабатываться и выделяться в виде производных оксилипинов или их солей.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу переработки масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, включающему стадии: (a) выделения или регенерации масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, производимые с помощью микробного, растительного или животного источника; и (b) переработки или рафинирования масла с использованием процесса, который сводит до минимума удаление свободных жирных кислот из масла, давая масло, которое сохраняет оксилипиновые производные LCPUFA. Согласно одному из аспектов животным является водное животное, включающее, но не ограниченное ими, рыб. Согласно одному из аспектов растением являются семена масличных растений. Согласно одному из аспектов микробным источником является *Thraustochytrid*.

В описанном выше способе в одном из аспектов стадия переработки включает экстракцию масла спиртом, смесью спирт:вода или органическим растворителем. Еще в одном аспекте стадия переработки включает экстракцию масла неполярным органическим растворителем. Еще в одном аспекте стадия переработки включает экстракцию масла спиртом или смесью спирт:вода.

В описанном выше способе стадия переработки может дополнительно включать фильтрование с охлаждением, отбеливание, дополнительное фильтрование с охлаждением и дезодорирование масла. В одном аспекте стадия переработки дополнительно включает отбеливание и дезодорирование масла в отсутствие стадий фильтрования при охлаждении. Согласно еще одному аспекту стадия переработки дополнительно включает дезодорирование масла в отсутствие стадий фильтрования при охлаждении или

отбеливания.

Описанный выше способ может дополнительно включать стадию добавления к маслу антиоксиданта.

В описанном выше способе стадия переработки может включать приготовление масла в виде эмульсии.

Согласно одному из аспектов описанного выше способа масло дополнительно обрабатывается с помощью контактирования с ферментом, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины. Такой фермент может включать, но не ограничивается ими, липоксигеназу, циклооксигеназу и цитохром Р450 фермент. В одном аспекте фермент иммобилизован на субстрате.

Описанный выше способ может дополнительно включать стадию отделения оксилипиновых производных LCPUFA от LCPUFA в масле с помощью технологического приема, включающего, но не ограниченного хроматографией. Данная стадия отделения может дополнительно включать добавление указанных отделенных LCPUFA оксилипинов к маслу или к композиции.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу переработки масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, включающему стадии: (а) регенерации масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, продуцируемые с помощью микробного, растительного или животного источника; (б) переработки масла и (с) отделения LCPUFA оксилипинов от LCPUFA в масле. Согласно одному аспекту способ дополнительно включает перед стадией (с) стадию превращения LCPUFA в масле в LCPUFA оксилипины с помощью химического или биологического процесса. В одном аспекте способ дополнительно включает добавление к продукту отделенных LCPUFA оксилипинов.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к способу предотвращения или снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума, включающему введение пациенту, который подвержен риску, или которому поставлен диагноз, или который подозревается в наличии у него воспаления или нейродегенерации или состояния или заболевания, связанных с ними, агента, выбранного из DTAn-6 и оксилипинового производного DTAn-6, для снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума. В одном аспекте агентом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DTAn-6, дигидроксипроизводных DTAn-6 и тригидроксипроизводных DTAn-6. В одном аспекте агентом является R- или S-эпимер любого из описанных выше докозаноидов из DTAn-6 или его аналога, производного или соли.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к организму, включающему PUFA PKS путь, в котором организм был генетически трансформирован для экспрессии фермента, который превращает LCPUFA в оксилипин. Согласно одному аспекту организм выбирается из группы, состоящей из растений и микроорганизмов. Согласно еще одному аспекту организмом являются семена масличных растений, которые были генетически модифицированы для экспрессии PUFA PKS траектории для производства полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью. Согласно еще одному аспекту организмом является микроорганизм, включающий, но не ограниченный им, микроорганизм, включающий эндогенную PUFA PKS траекторию. Согласно одному аспекту фермент выбирается из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохром Р450 фермента.

Краткое описание фигур изобретения

Фиг. 1 представляет график, показывающий кинетику реакций 15-липоксигеназы с DHA, DPAn-6 и DPAn-3.

Фиг. 2А показывает структуру 15-липоксигеназных продуктов DHA.

Фиг. 2В представляет масс-спектральный анализ 17-гидрокси DHA.

Фиг. 2С представляет масс-спектральный анализ 10,17-дигидрокси DHA.

Фиг. 2D представляет масс-спектральный анализ 7,17-дигидрокси DHA.

Фиг. 3А показывает структуру 15-липоксигеназных продуктов DPAn-6.

Фиг. 3В представляет масс-спектральный анализ 17-гидрокси DPAn-6.

Фиг. 3С представляет масс-спектральный анализ 10,17-дигидрокси DPAn-6.

Фиг. 3D представляет масс-спектральный анализ 7,17-дигидрокси DPAn-6.

Фиг. 4А показывает структуру 15-липоксигеназных продуктов DPAn-3.

Фиг. 4В представляет масс-спектральный анализ 17-гидрокси DPAn-3.

Фиг. 4С представляет масс-спектральный анализ 10,17-дигидрокси DPAn-3.

Фиг. 4D представляет масс-спектральный анализ 7,17-дигидрокси DPAn-3.

Фиг. 5А показывает структуру 15-липоксигеназных продуктов DTAn-6.

Фиг. 5В представляет масс-спектральный анализ 17-гидрокси DTAn-6.

Фиг. 5С представляет масс-спектральный анализ 7,17-дигидрокси DTAn-6.

Фиг. 6 показывает основные оксилипиновые продукты DPAn-6 после последовательной обработки 15-липоксигеназой с последующим гемоглобином.

Фиг. 7 показывает основные 5-липоксигеназные продукты DHA.

Фиг. 8 показывает основные 5-липоксигеназные продукты DPAn-6.

Фиг. 9 показывает основные 15-липоксигеназные продукты DPAn-3.

Фиг. 10 показывает основные 15-липоксигеназные продукты DHA.

Фиг. 11 показывает основные 15-липоксигеназные продукты DPAn-6.

Фиг. 12 показывает основные 15-липоксигеназные продукты DPAn-3.

Фиг. 13 показывает структуры происходящих из EPA оксилипинов.

Фиг. 14А и 14В показывает структуры происходящих из DHA оксилипинов.

Фиг. 15 показывает структуры происходящих из DPAn-6 оксилипинов.

Фиг. 16 показывает структуры происходящих из DPAn-3 оксилипинов.

Фиг. 17 показывает структуры происходящих из DTAn-6 оксилипинов.

Фиг. 18А представляет масс-спектральную общую ионную хроматографию моно- и дигидроксипроизводных DHA и DPAn-6 в DHA+DPAn-6 масле водорослей.

Фиг. 18В показывает MS/MS спектры моногидрокси DPAn-6 производных в DHA+DPAn-6 масле водорослей.

Фиг. 18С показывает MS/MS спектры дигидрокси DPAn-6 производных в DHA+DPAn-6 масле водорослей.

Фиг. 19 представляет график, показывающий действие кормления LCPUFA маслами на отек или эдему лапы на крысах.

Фиг. 20А представляет график, показывающий общую миграцию клеток в экссудаты воздушного дивертикула после введения докозаноидов, происходящих из DHA и DPAn-6, на модели воспаления дорзального воздушного дивертикула мышей.

Фиг. 20В представляет график, показывающий концентрации IL-16 в экссудатах воздушного дивертикула после введения происходящих из DHA и DPAn-6 докозаноидов на модели воспаления дорзального воздушного дивертикула мышей.

Фиг. 20С представляет график, показывающий концентрации макрофагового хемотактического белка (протеина) 1 (MCP-1) после введения происходящих из DHA и DPAn-6 докозаноидов на модели воспаления дорзального воздушного дивертикула мышей.

Фиг. 21 представляет график, показывающий действие докозаноидов на TNF α -индуцируемое производование IL-16 в глиальных клетках человека.

Фиг. 22 представляет график, показывающий действие докозаноидов на секрецию TNF α Т-лимфоцитами человека.

Фиг. 23 показывает структуры дополнительных новых происходящих из C22-PUFA оксилипинов.

Подробное описание изобретения

Учитывая потребность в технике в новых противовоспалительных соединениях и альтернативных способах обеспечения известными противовоспалительными соединениями, такими как липоксины, резолвины и докозатриены, описанные выше, авторы настоящего изобретения сделали несколько взаимосвязанных открытий, которые привели в результате к предоставлению новых противовоспалительных реагентов и улучшенных композиций для использования при противовоспалительных применениях.

Во-первых, настоящее изобретение относится к обнаружению его авторами того, что омега-6 жирные кислоты с длинной цепью, докозапентаеновая кислота (DPAn-6; C22:5n-6) и докозатетраеновая кислота (DTAn-6; C22:4n-6) (называемая также адреновой кислотой), так же, как и омега-3 взаимозаменяемая часть DPAn-6, докозапентаеновая кислота (DPAn-3; C22:5n-3), являются субстратами для производства новых соединений, называемых здесь обычно как LCPUFA оксилипины, и более конкретно называемых докозаноидами (включая моно-, ди-, три-, тетра- и пентагидроксипроизводные таких докозаноидов). Термины "оксилипин" и "докозаноид", используемые здесь, определены и описаны подробно ниже. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что DPAn-6, DPAn-3, DTAn-6 и их оксилипиновые производные могут служить подобно омега-3 жирным кислотам с длинной цепью DHA и EPA и их оксилипиновым производным в качестве сильных противовоспалительных агентов. Следовательно, согласно одному воплощению настоящее изобретение предоставляет новые оксилипины, происходящие из омега-6 жирных кислот DPAn-6 и DTAn-6 и/или из омега-3 жирных кислот DPAn-3 и их производных и аналогов, а также способы получения и использования таких оксилипинов в качестве противовоспалительных соединений и пищевых или питательных/сохраняющих здоровье добавок. Настоящее изобретение предоставляет также применение данных LCPUFA (DPAn-6, DTAn-6 и DPAn-3) самих по себе в качестве новых противовоспалительных соединений (например, в качестве предшественников для оксилипинов или в качестве агентов со свойственной им противовоспалительной активностью).

Первоначально авторы настоящего изобретения установили, что присутствие DPAn-6 в DHA масле существенно усиливает уменьшение воспаления у пациентов (например, усиливает уменьшение индикаторов или медиаторов воспаления, такое как производование провоспалительного цитокина и производование эйказаноида) по сравнению с DHA маслом, которое не содержит каких-либо других жирных кислот. На основании данной находки авторы настоящего изобретения обнаружили, что уникальная структура DPAn-6, DTAn-6 и DPAn-3 дает возможность данным LCPUFA служить в качестве субстрата в ферментативной реакции, сходной с реакцией, в которой происходит превращение DHA в докозатриены или резолвины, приводя в результате к удивительной находке, что DPAn-6, DTAn-6 и DPAn-3 и их оксилипиновые производные являются новыми, сильными противовоспалительными агентами.

До настоящего изобретения не было известно, что омега-6 жирная кислота с длинной цепью, DPA_n-6, может служить как субстрат для производства новых оксилипинов с противовоспалительными свойствами, аналогичными или превышающими свойства ранее описанных докозатриенов и резолвинов, происходящих из EPA и DHA. На основании доказательств, имеющихся до данного изобретения, считалось, что присутствие DPA_n-6 в масле приведет к продуцированию провоспалительных соединений и, следовательно, снизит общий противовоспалительный эффект DHA-содержащего масла. Например, DPA_n-6 может свободно ретропревращаться в арахидоновую кислоту (ARA), в отношении которой обычно считают, что она является провоспалительной, поскольку она является предшественником для разнообразного множества высокосильных провоспалительных эйкозаноидов, включая лейкотриен B₄ и простагландин E₂. Действительно, большинство эйкозаноидов, происходящих из омега-6 жирной кислоты ARA, являются провоспалительными (Gilroy et al. 2004; Meydani et al. 1990; Simopoulos 2002), и потребление ARA полностью изменяет противовоспалительные действия DHA (см. пример 14 ниже). Поэтому до настоящего изобретения обычно считалось, что DPA_n-6 будет провоспалительным, поскольку он попадает в ARA метаболический путь. Более того, до настоящего изобретения не было известно, что докозапентаеновая кислота (DPA_n-6; C₂₂:5n-6) вследствие ее уникальной структуры является важным субстратом для производства новых оксилипинов или что новые оксилипины могут также производиться из докозапентаеновой кислоты (DPA_n-3; C₂₂:5n-3) и докозатетраеновой кислоты (DTA_n-6; C₂₂:4n-6). Действительно, авторы настоящего изобретения установили, что DPA_n-6 и DPA_n-3 являются более превосходящими субстратами в оксилипин-генерирующих реакциях по сравнению с DHA, и установили, что DTA_n-6 также является субстратом в оксилипин-генерирующих реакциях. Это демонстрируется в отношении превращения каждого из DHA, DPA_n-6 и DPA_n-3 15-липоксигеназой в примере 1 ниже. Следовательно, производство докозаноидов из DPA_n-6 и DPA_n-3 является более эффективным и будет приводить в результате к более высоким уровням оксилипинового продукта, чем производство докозаноидов из DHA.

В дополнение к сказанному, не признавалось, что оксилипины, синтезируемые из DPA_n-6 и DPA_n-3, обладают уникальными свойствами, особенно в отношении воспаления. В частности, не связываясь с теорией, авторы настоящего изобретения считают, что DPA_n-6 и DPA_n-3 и их оксилипиновые производные, и особенно DPA_n-6 и ее оксилипиновые производные, являются равными по силе или даже более сильными противовоспалительными соединениями, чем DHA, EPA или оксилипиновые производные указанных LCPUFA. Не связываясь с теорией, авторы настоящего изобретения также полагают, что DTA_n-6 и ее оксилипиновые производные обладают противовоспалительными свойствами. Действительно, сочетания DPA_n-6 и DPA_n-3 и/или их оксилипиновых производных, и в частности DPA_n-6 и/или ее оксилипиновых производных, с DHA или EPA и/или их оксилипиновыми производными (и особенно с DHA и/или ее оксилипиновыми производными) обеспечивают преимущество в пищевых применениях (например, в любых применениях изобретения, направленного на предоставление питательных веществ и пищевых агентов для поддержания, стабилизации, увеличения, усиления или улучшения здоровья индивидуума или органического процесса, с помощью которого организм ассимилирует и использует пищу и жидкости для функционирования, роста и поддержания и которое включает нутрацевтические применения), терапевтических применениях (например, в любых применениях изобретения, направленного на предотвращение или профилактику, лечение, управление, заживление, облегчение и/или вылечивание от заболевания или состояния, которое является отклонением от здоровья индивидуума) и других применениях (например, в косметике) по сравнению с одной DHA, EPA и/или их оксилипиновыми производными.

Более конкретно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что потребление масла, содержащего DPA_n-6 в дополнение к омега-3 жирной кислоте, DHA, вызывает до >90% снижение продуцирования воспалительного цитокина, в то время как потребленное одной DHA в масле облегчает снижение продуцирования воспалительного цитокина только примерно на 13-29%, даже когда доза DHA приблизительно в 3 раза выше, чем в DHA+DPA_n-6 масле. Секреция воспалительного эйкозаноида также значительно снижается под действием DPA_n-6 по сравнению с одной DHA. Следовательно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что масло, содержащее DPA_n-6 и ее оксилипиновые производные, обладает значительными противовоспалительными свойствами. Кроме того, авторы настоящего изобретения утверждают, что присутствие DPA_n-6 и омега-3 жирной кислоты с длинной цепью (например, DHA) или ее оксилипиновых производных, известных также как докозаноиды, в сочетании приводит в результате к производству докозаноидов (определенных ниже), которые имеют дополнительные противовоспалительные активности. Следовательно, рецептуры композиций (рецептуры), содержащие как омега-3 жирную кислоту с длинной цепью, такую как DHA, так и DPA_n-6 или их оксилипины, являются значительно более сильными противовоспалительными рецептами, чем рецептуры, содержащие одни омега-3 жирные кислоты. Более того, DPA_n-6 и ее оксилипиновые производные представляют новые противовоспалительные агенты для использования их одних или в сочетании с множеством других агентов. DPA_n-3 и ее оксилипиновые производные и/или DTA_n-6 и ее оксилипиновые производные могут также предоставлять преимущества над использованием одной DHA.

Авторы настоящего изобретения впервые обнаружили, что DPA_n-6 обладает противовоспалительными свойствами и будет усиливать противовоспалительный эффект омега-3 жирных кислот с длинной цепью, таких как DHA. Более конкретно, авторы настоящего изобретения установили, что наиболее от-

даленная n-3 связь между атомами углерода 19 и 20 в DHA не вовлечена в образование биологически важных докозатриенов или 17S-резолвинов и, следовательно, отсутствие данной двойной связи в DPA_n-6 не препятствует метаболическому превращению данной жирной кислоты в аналогичные оксилипины под действием биологических ферментов, таких как липоксигеназы. Авторы настоящего изобретения дополнительно установили, что двойные связи, вовлекаемые во множество ферментативных превращений DHA в оксилипины, особенно соединения, известные как резолвины (т.е. двойные связи между углеродами 7 и 8, углеродами 10 и 11, углеродами 13 и 14 и углеродами 16 и 17 в DHA), также присутствуют в DPA_n-6, DTAn-6 и DPA_n-3, облегчая их использование в качестве субстрата для производства оксилипинов. Не связываясь с теорией, считается, что это объясняется различиями в данных, которые наблюдали авторы настоящего изобретения в исследованиях с использованием масел, содержащих DHA и DPA_n-6, по сравнению с одной DHA. Авторы настоящего изобретения в настоящее время продемонстрировали, что те же самые ферменты, которые превращают DHA в докозаноиды или 17S-резолвины, распознают любую (n-3) или (n-6) C-22 PUFA. Следовательно, как и DHA, DPA_n-6, DTAn-6 и DPA_n-3 являются субстратами для новых оксилипинов, которые могут служить как сильные противовоспалительные молекулы. В дополнение, данные наблюдения также говорят о том, что LCPUFA с 24 или более атомами углерода, и которые имеют двойные связи, расположенные между углеродами 7 и 8, углеродами 10 и 11, углеродами 13 и 14 и углеродами 16 и 17, также служат в качестве субстратов для производства новых оксилипинов и могут продуцироваться или усиливаться в различных маслах и композициях с использованием способов, описанных в настоящей заявке.

Авторы настоящего изобретения, следовательно, впервые установили, что ферменты, образующие оксилипины, такие как описанные ранее докозатриены и резолвины, происходящие из DHA, не различаются между (n-6) и (n-3) 22-углерод жирными кислотами в качестве субстратов вследствие присутствия определенных двойных связей в том же самом положении в данных молекулах. Фактически, авторы настоящего изобретения впервые обнаружили, что C22n-6 жирные кислоты являются предпочтительными для данных ферментов. Авторы настоящего изобретения также впервые установили, что оксилипины из DPA_n-6 обладают сильной противовоспалительной активностью и что сочетание оксилипинов как из DHA, так и из DPA_n-6 является более полезным в отношении противовоспалительной активности, чем оксилипины из одной DHA.

Согласно еще одному воплощению изобретения авторы настоящего изобретения обнаружили новые пути производства обогащенных LCPUFA масел, которые также содержат увеличенные и эффективные количества LCPUFA оксилипинов (в частности, докозаноидов), включая новые оксилипины настоящего изобретения, так же, как и оксилипины, которые были описаны ранее. Данные богатые LCPUFA масла могут использоваться в питательных или пищевых (включая нутрацевтические), косметических и/или фармацевтических (включая терапевтические) применениях, обеспечивая немедленное противовоспалительное/нейрозащитное действие гидрокси-LCPUFA производных наряду с присущими им долгосрочными эффектами самих LCPUFA.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что общепринятые источники LCPUFA, такие как масла из водорослей и масла из рыб, имеют только крайне малые количества гидроксилпроизводных LCPUFA, и, следовательно, LCPUFA оксилипинов, особенно докозаноидов (например, примерно от 1 нг/г до примерно 10 мкг/г масла). Это является частично следствием генетических факторов и факторов окружающей среды, связанных с продуцированием организмов (например, водорослей, рыбы), а также следствием способов, используемых для переработки LCPUFA масел из данных организмов. Принимая во внимание, что обеспечение маслами, обогащенными LCPUFA оксилипинами, продуктов питания могло бы принести огромную пользу человеку и его здоровью и дало бы альтернативу химическим синтезированным оксилипиновым аналогам или маслам, содержащим неадекватные количества LCPUFA оксилипинов, авторы настоящего изобретения обнаружили альтернативные пути производства данных LCPUFA масел так, чтобы они были обогащены LCPUFA оксилипинами (и, в частности, докозаноидами), так же, как и альтернативные пути переработки LCPUFA масел, чтобы дополнительно обогатить их и увеличить содержание в маслах LCPUFA оксилипина (и, в частности, докозаноида), тем самым, значительно увеличивая уровни их LCPUFA оксилипина (и, в частности, докозаноида) по сравнению с уровнями, обнаруживаемыми в обычно производимых/перерабатываемых LCPUFA маслах.

Кроме того, авторы настоящего изобретения открыли оксилипины, которые производятся из DPA_n-6, DTAn-6 и DPA_n-3, и данные оксилипины могут теперь производиться химическим или биогенетическим образом и использоваться в качестве неочищенных, полу纯净ных или чистых соединений во множестве композиций и их готовых форм или даже добавляться к маслам, таким как LCPUFA- или LCPUFA-оксилипинсодержащие масла для увеличения или дополнения природных оксилипинов в таких маслах. Такие соединения могут также служить в качестве ведущих соединений для производства дополнительных активных аналогов данных оксилипинов в проектировании и производстве питательных агентов и терапевтических лекарств.

Общие определения

Для целей данной заявки полиненасыщенные жирные кислоты с длинной цепью (LCPUFA) определяются как жирные кислоты с длиной цепи из 18 или более атомов углерода, и предпочтительными явля-

ются жирные кислоты с длиной цепи из 20 или более атомов углерода, содержащие 3 или более двойных связей. LCPUFA омега-6 ряда включают дигомогаммалиновую кислоту (C20:3n-6), арахидоновую кислоту (C20:4n-6), докозатетраеновую кислоту или ареновую кислоту (C22:4n-6) и докозапентаеновую кислоту (C22:5n-6). LCPUFA омега-3 ряда включают эйкозатриеновую кислоту (C20:3n-3), эйкозатетраеновую кислоту (C20:4n-3), эйкозапентаеновую кислоту (C20:5n-3), докозапентаеновую кислоту (C22:5n-3) и докозагексаеновую кислоту (C22:6n-3). LCPUFA включают также жирные кислоты с более чем 22 атомами углерода и 4 или более двойными связями, включающие, но не ограниченные ими, (C24:6n-3) и (C28:8n-3).

Термины "полиненасыщенная жирная кислота" и "PUFA" включают не только форму свободной жирной кислоты, но также и другие формы, такие как форма триацилглицерин (TAG), фосфолипидную (PL) форму и другие этиерифицированные формы.

Используемый здесь термин "липид" включает фосфолипиды; свободные жирные кислоты; эфиры жирных кислот; триацилглицериды; диацилглицериды; моноацилглицериды; лизофосфолипиды; мыла; фосфатиды; стерины и сложные эфиры стерина; каротеноиды; ксантофилы (например, оксикаротеноиды); углеводороды и другие липиды, известные специалистам в данной области.

Для целей данной заявки "оксилипины" определяются как биологически активные, окисленные производные полиненасыщенных жирных кислот, образованных с помощью окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. Оксилипины, которые получаются липоксигеназным способом, называются липоксинами. Оксилипины, которые получаются циклооксигеназным способом, называются простаноидами. Оксилипины, образованные из жирных кислот с 20 углеродами (арахидоновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты), называются эйкозаноидами.

Эйкозаноиды включают в себя простагландини, лейкотриены и тромбоксаны. Они получаются или липоксигеназным способом (лейкотриены), или циклооксигеназным способом (простагландини, простациклин, тромбоксаны). Оксилипины, образованные из жирных кислот с 22 углеродами (докозапентаеновая кислота n-6 или n-3, докозагексаеновая кислота и докозатетраеновая кислота), называются докозаноидами. Конкретные примеры данных соединений описаны ниже. Имеется в виду, что общая ссылка на оксилипин, описываемый здесь, охватывает производные и аналоги конкретных оксилипиновых соединений.

Используемый здесь термин "аналог" относится к химическому соединению, которое в структурном отношении сходно с другим соединением, но слегка отличается по составу (как в случае замещения 1 атома атомом, отличным от первого элемента, или в случае присутствия определенной функциональной группы, или замены одной функциональной группы другой функциональной группой) (см. подробное обсуждение аналогов настоящего изобретения ниже).

Используемый здесь термин "производное", когда он используется для описания соединения настоящего изобретения, означает, что по крайней мере один водород, связанный с ненасыщенным соединением, заменен отличным от него атомом или химическим фрагментом (см. подробное обсуждение производных настоящего изобретения ниже).

Обычно термин "биологически активное" указывает, что соединение обладает по крайней мере одной заметной активностью, которая оказывает действие на метаболический или иные процессы клетки или организма, измеряемое или наблюдаемое *in vivo* (т.е. в условиях естественной физиологической окружающей среды) или *in vitro* (т.е. в лабораторных условиях).

Окисленные производные полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью (LCPUFA) включают моно-, ди-, три-, тетра- и пентагидроксипроизводные LCPUFA, а также включают свободные, этиерифицированные, перокси- и эпокси-формы данных производных. Данные моно-, ди-, три-, тетра- и пентагидроксипроизводные LCPUFA являются производными, которые содержат 3, 4 или более двойных связей, обычно по крайней мере 2 из которых являются сопряженными, и 1 или более некарбоксигидроксильных групп. Предпочтительно данные производные содержат 4-6 двойных связей и по крайней мере 1-3 некарбоксигидроксильных групп, и более предпочтительно 2 или более некарбоксигидроксильных групп.

Окисленные производные омега-3 жирных кислот EPA и DHA, катализируемые липоксигеназным или циклооксигеназным ферментами, включая ацетилированные формы циклооксигеназы 2 (COX2), которые способны снижать или устранять воспалительные процессы, обычно называют "резолвинами", что является созданным новым термином (неологизмом), который является функциональным по природе. "Докозатриены" представляют подкласс оксилипинов, происходящих из DHA, и содержат три сопряженные двойные связи. "Протектин" является еще одним впервые созданным функциональным термином для гидроксипроизводных омега-3 жирной кислоты DHA, которые оказывают нейропротективное действие.

Согласно настоящему изобретению термин "докозаноид" относится, в частности, к любым окисленным производным (оксилипинам) любой 22-углеродной LCPUFA (например, DHA, DPAn-6, DPAn-3 или DTAn-6). Структуры таких производных описаны подробно ниже. Отмечается, что, хотя авторы настоящего изобретения признают, что новые оксилипиновые производные (докозаноиды) настоящего изобретения, которые происходят из DPAn-6, DPAn-3, или DTAn-6, также можно было бы считать "резолвинами" или "протектинами" на основе сходных функциональных характерных признаков таких оксилипинов, для целей настоящего изобретения предпочтительно, чтобы новые оксилипины настоящего

изобретения назывались обычно с использованием термина "докозаноид", что дает ясное структурное определение таких соединений. Докозаноиды из DPA_n-6, DPA_n-3 и DTAn-6, насколько известно авторам настоящего изобретения, никогда не были описаны ранее.

Оксилипины, раскрытые в настоящем изобретении

Одно воплощение настоящего изобретения относится к новым оксилипинам, происходящим из DPA_n-6, DPA_n-3 или DTAn-6, и любым аналогам или производным таких оксилипинов, включая любые композиции, или рецептуры, или продукты, содержащие такие оксилипины или их аналоги, а также масла или другие композиции, или рецептуры, или продукты, которые обогащены любым способом любым LCPUFA оксилипином или его аналогами или производными, и особенно любым оксилипином, происходящим из DHA, EPA, DPA_n-6, DPA_n-3 или DTAn-6, и более конкретно любым докозаноидом, и еще более конкретно любым оксилипином, происходящим из DPA_n-6, DPA_n-3 или DTAn-6. Настоящее изобретение относится также к любым маслам, или композициям, или рецептограм, или продуктам, в которых такие оксилипины (любой оксилипин, происходящий из DHA, EPA, DPA_n-6, DPA_n-3 или DTAn-6, и более конкретно любой докозаноид) стабилизируются или сохраняются в маслах и композициях, улучшая количество, качество или стабильность оксилипина в масле или композиции и/или улучшая абсорбцию, биодоступность и/или эффективность оксилипинов, содержащихся в маслах или композициях.

Как описывалось выше, известно множество происходящих из DHA и EPA оксилипинов, обладающих противовоспалительной активностью, антипролиферативной активностью, противооксидантной активностью, нейрозащитной или вазорегуляторной активностью (Ye et al. 2002), которые, как правило, называют резолвинами или протектинами. Такие оксилипины считаются охватываемыми настоящим изобретением, особенно в воплощениях, в которых такие оксилипины обогащены в маслах и композициях, предпочтительно с использованием способов и стадий переработки по настоящему изобретению. В дополнение к сказанному, настоящее изобретение предоставляет новые оксилипины, происходящие из DPA_n-6, DPA_n-3 или DTAn-6, включая их аналоги или производные, которые также обогащены в различных маслах и композициях, предпочтительно с использованием способов и процессов изобретения, или которые могут получаться и, при желании, отделяться или очищаться множеством биологических или химических методов, включая de novo производство, для использования в любом терапевтическом, пищевом (включая нутрацевтическое), косметическом или другом применении, описанном здесь. Следовательно настоящее изобретение охватывает отделенные, полуочищенные и очищенные оксилипины, описанные здесь, а также источники оксилипинов, включая синтезированные и природные источники (например, масла или растения и их части), и включает любой источник, который обогащен присутствием оксилипина, раскрытоого в настоящем изобретении генетическим, биологическим или химическим методом, или с помощью стадий переработки, описанных здесь.

Обычно оксилипины могут иметь или провоспалительные, или противовоспалительные свойства. Согласно настоящему изобретению провоспалительные свойства представляют свойства (характерные признаки, активности, функции), которые усиливают воспаление в клетках, тканях или в организме, а противовоспалительные свойства представляют свойства, которые ингибируют такое воспаление. Воспаление в клетках, тканях и/или организмах может определяться по множеству характерных признаков, включающих, но не ограниченных ими, продуцирование "проводоспалительных" цитокинов (например, интерлейкина-1 α (IL-1 α), IL-1 β , фактора некроза опухоли- α (TNF α), IL-6, IL-8, IL-12, макрофагового воспалительного протеина-1 α (MIP-1 α), макрофагового хемотактического протеина-1 (MCP-1, известного также как макрофаг/моноцит хемотактический и активирующий фактор или моноцит хемоаттрактантный протеин-1) и интерферона- γ (IFN- γ), продуцирование эйкозаноида, продуцирование гистамина, продуцирование брадикинина, продуцирование простагландина, продуцирование лейкотриена, лихорадку, отек или другую припухлость и аккумулирование или накопление клеточных медиаторов (например, нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и др.) в участке воспаления.

Согласно одному воплощению оксилипины, раскрытые в настоящем изобретении, представляют оксилипины, обладающие противовоспалительными свойствами, такие как оксилипины, происходящие из DHA, EPA, DPA_n-6, DPA_n-3 и DTAn-6 (подробно описанных ниже). Другие важные биоактивные свойства оксилипинов включают, но не ограничиваются ими, антипролиферативную активность, антиоксидантную активность, нейрозащитную и/или вазорегуляторную активность. Данные свойства также являются предпочтительными свойствами оксилипинов, раскрытых в настоящем изобретении, и предпочтительно являются характерными для оксилипинов, происходящих из DHA, EPA, DPA_n-6, DTAn-6 и DPA_n-3. Согласно еще одному воплощению оксилипины настоящего изобретения включают любые оксилипины, происходящие из DPA_n-6, или DPA_n-3, или DTAn-6, независимо от конкретных функциональных свойств оксилипина. Предпочтительные оксилипины, происходящие из DPA_n-6, или DPA_n-3, или DTAn-6, включают оксилипины, которые дают питательную и/или терапевтическую пользу, и более предпочтительно имеют противовоспалительную активность, противопролиферативную активность, антиоксидантную активность и/или нейрозащитную активность.

Оксилипины, происходящие из EPA

Оксилипины, происходящие из EPA, раскрытые в настоящем изобретении, включают, но не огра-

ничиваются ими, 15-эпилипоксин A4 (5S,6R,15R-тригидроксийкозатетраеновая кислота) и его промежуточная 15R-гидроксийкозапентаеновая кислота (15R-НЕРЕ); резолвин E1 (5,12,18-тригидрокси EPA) и его промежуточные соединения 5,6-эпокси,18R-гидрокси-EPE, и 5S-гидро(перокси),18R-гидрокси-EPE, и 18R-гидрокси-EPE (18R-НЕРЕ); и резолвин E2 (5S,18R-дигидрокси-EPE или 5S,18R-диНЕРЕ) и его промежуточные соединения. См. фиг. 13 ниже в отношении структур данных EPA производных. Происходящие из EPA оксилипины описываются подробно в работе Serhan (2005), которая целиком включена в данное описание в качестве ссылки.

Происходящие из DHA оксилипины

Оксилипины, происходящие из DHA, которые раскрыты в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, резолвин D1 (7,8,17R-тригидрокси DHA) и резолвин D2 (7,16,17R-тригидрокси DHA) наряду с их S-эпимерами и их промежуточными соединениями, включающими 17S/R-гидрокси-перокси DHA, и 7S-гидроперокси,17S/R-OH-DHA, и 7(8)-эпокси-17S/R-OH-DHA; резолвин D4 (4,5,17R-тригидрокси DHA) и резолвин D3 (4,11,17R-тригидрокси DHA) наряду с их S-эпимерами и их промежуточными соединениями, включающими 17S/R-гидроперокси DHA, и 4S-гидроперокси,17S/R-OH DHA, и 4(5)-эпокси-17S/R-OH DHA; и нейропротектин D1 (10,17S-докозатриен, протектин D1) наряду с его R-эпимером и их промежуточными соединениями, включающими дигидроксипродукт 16,17-эпоксидокозатриен (16,17-эпокси DT) и гидропероксипродукт 17S-гидроперокси DHA; резолвин D5 (7S,17S-дигидрокси DHA) и резолвин D6 и их гидроксилсодержащие промежуточные соединения; и эпоксипроизводные 7,8-эпокси DPA, 10,11-эпокси DPA, 13,14-эпокси DPA и 19,20-эпокси DPA и дигидроксипроизводное 13,14-дигидроксидокозапентаеновую кислоту; другие моногидрокси DHA производные, включая R- и S-эпимеры 7-гидрокси DHA, 10-гидрокси DHA, 11-гидрокси DHA, 13-гидрокси DHA, 14-гидрокси DHA, 16-гидрокси DHA и 17-гидрокси DHA; и другие дигидрокси DHA производные, включая R- и S-эпимеры 10,20-дигидрокси DHA, 7,14-дигидрокси DHA и 8,14-дигидрокси DHA. См. примеры 2, 7 и 10 и фиг. 2A-2D, 7, 10 и 14A и В ниже, что касается описаний и структур данных DHA производных. Происходящие из DHA оксилипины описаны подробно в работах Serhan (2005) и Ye et al. (2002), которые целиком включены в данное описание в качестве ссылки.

Происходящие из DPAn-6, DTAn-6 или PPAn-3 оксилипины

и другие новые докозаноиды из C22 жирных кислот

Одно из воплощений настоящего изобретения относится к новым оксилипинам, которые происходят из DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3. Еще одно воплощение изобретения относится к новым докозаноидам, которые могут производиться из C22 PUFA. В частности, авторы настоящего изобретения описывают здесь новые докозаноиды, структуры которых конструируются de novo из структур C22 жирной кислоты. Оксилипины, охватываемые настоящим изобретением, включают любые оксилипины, происходящие из DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3 или обычно из C22 жирных кислот, и более конкретно описываются здесь как докозаноиды. Новые докозаноиды включают любые окисленные производные DPAn-6, DTAn-6, DPAn-3 или любые другие новые окисленные производные C22 жирных кислот (например, см. фиг. 23), включая любые их производные или аналоги. В частности, докозаноиды настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, любой R- или S-эпимер любого моногидрокси-, дигидрокси- или тригидроксипроизводного любой из DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3 или C22 жирных кислот и могут включать производные по любому углероду, который образует углерод-углеродную двойную связь в LCPUFA. Докозаноиды настоящего изобретения включают также любой продукт ферментативной реакции, которая использует DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3 в качестве субстрата и которая катализируется оксилипин-генерирующим ферментом, включающим, но не ограниченным ими, липоксигеназы, циклооксигеназы, цитохром P450 ферменты и другие гемсодержащие ферменты, такие как ферменты, описанные в табл. 1 (см. ниже). Табл. 1 дает достаточную информацию для идентификации перечисленных известных ферментов, включая официальные наименования, официальные символические обозначения, вымышленные наименования, организмы и/или номера последовательности для ферментов, присвоенные в базе данных.

Таблица 1. Липоксигеназа (LOX), циклооксигеназа (COX), цитохром P450 (CYP) ферменты и другие гемсодержащие ферменты, которые могут использоваться для переработки LCPUFA масел и жирных кислот с получением их гидроксил-жирно-кислотных производных с помощью описанных здесь способов.

А) Ферменты типа липоксигеназы.

ALOX12.

Официальный символ: ALOX12; и наименование: арахидонат 12-липоксигеназа [Homo sapiens].

Другие вымышленные наименования: HGNC:429, LOG12.

Другие обозначения: 12(S)-липоксигеназа; 12-липоксигеназа/арахидонат 12-липоксигеназа тромбоцитного типа.

Хромосома: 17; положение: 17p13.1GeneID: 239.

Alox5.

Официальный символ: Alox5; и наименование: арахидонат 5-липоксигеназа [Rattus norvegicus].

Другие вымышленные наименования: RGD:2096, LOX5A.

Другие обозначения: 5-Липоксигеназа; 5-липоксигеназа.

Хромосома: 4; положение: 4q42GeneID: 25290.
ALOXE3.

Официальный символ: ALOXE3; и наименование: арахидонат липоксигеназа 3 [Homo sapiens].
Другие вымышленные наименования: HGNC:13743.

Другие обозначения: эпидермальная липоксигеназа; липоксигеназа-3.
Хромосома: 17; положение: 17p13.GeneID: 59344.
LOC425997.

Аналогичный арахидонат липоксигеназе 3; эпидермальной липоксигеназе; липоксигеназе-3 [Gallus gallus].

Хромосома: UnGeneID: 425997.
LOC489486.

Аналогичный арахидонат 12-липоксигеназе, 12R тип (липоксигеназа 12 типа эпидермиса) (12R-липоксигеназа) (12R-LOX) [Canis familiaris].

Хромосома: 5GeneID: 489486.
LOC584973.

Аналогичный арахидонат 12-липоксигеназе, 12R тип (липоксигеназа 12 типа эпидермиса) (12R-липоксигеназа) (12R-LOX) [Strongylocentrotus purpuratus].

Хромосома: 5GeneID: 584973.
LOC583202.

Аналогичный арахидонат 12-липоксигеназе, 12R тип (липоксигеназа 12 типа эпидермиса) (12R-липоксигеназа) (12R-LOX) [Strongylocentrotus purpuratus].

Хромосома: UnGeneID: 583202.
LOC579368.

Аналогичный арахидонат 12-липоксигеназе, 12R тип (липоксигеназа 12 типа эпидермиса) (12R-липоксигеназа) (12R-LOX) [Strongylocentrotus purpuratus].

Хромосома: UnGeneID: 579368.
LOC504803.

Аналогичный арахидонат 12-липоксигеназе, 12R тип (липоксигеназа 12 типа эпидермиса) (12R-липоксигеназа) (12R-LOX) [Bos taurus].

Хромосома: UnGeneID: 504803.
ALOX5.

Официальный символ: ALOX5; и наименование: арахидонат 5-липоксигеназа [Homo sapiens].
Другие вымышленные наименования: HGNC:435, 5-LO, 5LPG, LOG5.

Другие обозначения: арахидоновая кислота 5-липоксигеназа; лейкотриен A4 синтаза.
Хромосома: 10; положение: 10q11.2GeneID:240.
OSJNBa0057GO7.

15 Липоксигеназа L-2; липоксигеназа [Oryza sativa (japonica cultivar-group)].
GeneID: 3044798.

Alox15b.
Официальный символ: Alox 15b; и наименование: арахидонат 15-липоксигеназа, второй тип [Mus musculus].

Другие вымышленные наименования: MGI:1098228, 8-LOX, 8S-LOX, Alox8.
Другие обозначения: 8S-липоксигеназа.

Хромосома: 11; положение: 11 B4GeneID: 11688.
ALOX5AP.

Официальный символ: ALOX5AP; и наименование: арахидонат 5-липоксигеназа-активирующий белок [Homo sapiens].

Другие вымышленные наименования: HGNC:436, FLAP.
Другие обозначения: MK-886-связывающий белок; пять-липоксигеназа-активирующий белок.

Хромосома: 13; положение: 13q12GeneID: 241.
LOC489485.

Аналогичный арахидонат 15-липоксигеназе, тип II (15-LOX-2) (8S-липоксигеназа) (8S-LOX) [Canis familiaris].

Хромосома: 5GeneID: 489485.
LOC557523.

Аналогичный арахидонат 5-липоксигеназе (5-липоксигеназа) (5L0) [Danio rerio].
Хромосома: 15GeneID: 557523.

Alox5ap.
Официальный символ: Alox5ap; и наименование: арахидонат 5-липоксигеназа-активирующий белок [Mus musculus].

Другие вымышленные наименования: MGI:107505, Flap.

Другие обозначения: арахидонат 5-липоксигеназа-активирующий белок.

Хромосома: 5GeneID: 11690.
 LOC562561.
 Аналогичный арахидонат 5-липоксигеназе (5-липоксигеназа) (5LO) [Danio rerio].
 Хромосома: UnGeneID: 562561.
 LOC423769.
 Аналогичный арахидонат 5-липоксигеназе (5-липоксигеназа) (5LO) [Gallus gallus].
 Хромосома: 6GeneID: 423769.
 LOC573013.
 Аналогичный арахидонат 5-липоксигеназе (5-липоксигеназа) (5LO) [Danio rerio].
 Хромосома: UnGeneID: 573013.
 LOC584481.
 Аналогичный арахидонат 5-липоксигеназе (5-липоксигеназа) (5LO) [Strongylocentrotus purpuratus].
 Хромосома: UnGeneID: 584481.
 5LOX-картофеля.
 AAD04258. Сообщения 5-липоксигеназа S... [gi: 2789652].
 15-LOX-соевых бобов.
 P08170. Сообщения липоксигеназа семян... [gi: 126398].
 12-LOX-свиньи.
 D10621. Сообщения Sus scrofa ген f... [gi: 60391233].
 В) Циклооксигеназные ферменты.
 COX2-человека.
 AAN87129. Сообщения простагландин syn... [gi: 27151898].
 С) Гемоглобинсодержащие ферменты HBA1.
 Официальный символ: HBA1; и наименование: гемоглобин, альфа 1 [Homo sapiens].
 Другие вымышленные наименования: HGNC:4823, CD31.
 Другие обозначения: альфа 1 глобин; альфа один глобин; альфа-1 глобин; альфа-1-глобин; альфа-2 глобин; альфа-2-глобин; гемоглобин альфа 1 цепь; гемоглобин альфа 2; гемоглобин альфа-1 цепь; гемоглобин альфа-2.
 Хромосома: 16; положение 16p13.3GeneID: 3039.
 HBB.
 Официальный символ: HBB; и наименование: гемоглобин, бета [Homo sapiens].
 Другие вымышленные наименования: HGNC:4827, CD113t-C, HBD, гемоглобин.
 Другие обозначения: бетаглобин; бетаглобин цепь; гемоглобин А бета цепь; гемоглобин бета цепь; гемоглобин дельта Etolia вариант.
 Хромосома: 11; положение 11p15.5GeneID: 3043.
 HBG1.
 Официальный символ: HBG1; и наименование: гемоглобин, гамма А [Homo sapiens].
 Другие вымышленные наименования: HGNC:4831, HBGA, HBGR, HSGGL1, PRO2979.
 Другие обозначения: А-гамма глобин; гамма А гемоглобин; гамма глобин; гемоглобин гамма-α цепь; гемоглобин, гамма, регулятор.
 Хромосома: 11; положение 11p15.5GeneID: 3047.
 D) Ферменты цитохром P450 типа (Ген, Организм, Ген База данных: SwissProt, Ген база данных: EMBb/Генбанк/DDBJ).
 CYP4A11, Homo sapiens, CP4AB ЧЕЛОВЕКА, L04751 D26481 S67580 S67581 AF525488 AY369778 X71480
 CYP4A4, Oryctolagus cuniculus, CP4A4 RABIT, L04758 J02818
 CYP4A5, Oryctolagus cuniculus, CP4A5 RABIT, M28655 X57209
 CYP4A6, Oryctolagus cuniculus, CP4A6 RABIT, M28656 M29531
 CYP4A7, Oryctolagus cuniculus, CP4A7 RABIT, M28657 M29530
 CYP4B1, Homo sapiens, CP4B1 HUMAN, J02871 X16699 AF491285 AY064485 AY064486
 CYP4B1, Oryctolagus cuniculus, CP4B1 RABIT, M29852 AF176914 AF332576
 CYP4C1, Blaberus discoidalis, CP4C1 BLADI, M63798
 CYP4C21, Blattella germanica, CP4CU BLAG, AF275641
 CYP4E4, Drosophila melanogaster, C4AE1 DROME, AE003423 AL009194 AY058450 U34331
 CYP4F11, Homo sapiens, CP4FB HUMAN, AF236085 BC016853 AC005336
 CYP4F12, Homo sapiens, CP4FC HUMAN, AY008841 AB035130 AB035131 AY358977
 CYP4F2, Homo sapiens, CP4F2 HUMAN, D26480 U02388 AB015306 AF467894 AC005336 BC067437
 BC067439 BC067440 AF221943
 CYP4F3, Homo sapiens, CP4F3 HUMAN, D12620 D12621 AB002454 AB002461 AF054821 AY792513
 CYP4F8, Homo sapiens, CP4F8 HUMAN, AF133298
 CYP4V2, Homo sapiens, CP4V2 HUMAN, AY422002 AK122600 AK126473 BC060857
 CYP4V2, Pongo pygmaeus, CP4V2 PQNPY, CR858234
 CYP4X1, Homo sapiens, CP4X1 HUMAN, AY358537 AK098065 BC028102

CYP4Z1, Homo sapiens, CP4Z1 HUMAN, AY262056 AY358631
 Cyp4a1, Rattus norvegicus, CP4A1 RAT, M14972 X07259 M57718
 Cyp4a2, Rattus norvegicus, CP4A2 RAT, M57719 BC078684
 Cyp4a3, Rattus norvegicus, CP4A3 RAT, M33936
 Cyp4a8, Rattus norvegicus, CP4A8 RAT, M37828
 Cyp4aa1, Drosophila melanogaster, C4AA1 DROME AE003808
 Cyp4ac1, Drosophila melanogaster, C4AC1 DROME AE003609 AY0516Q2
 Cyp4ac2, Drosophila melanogaster, C4AC2 DROME, AE003609
 Cyp4ac3, Drosophila melanogaster, C4AC3 DROME, AE003609 AY061002
 Cyp4ad1, Drosophila melanogaster, C4AD1 DROME, AE003837 AY061058
 Cyp4b1, Mus musculus, CP4B1 MOUSE, D50834 BC008996
 Cyp4b1, Rattus norvegicus, CP4B1 RAT, M29853 BC074012
 Cyp4c3, Drosophila melanogaster, CP4C3 DROME, AE003775 BT010108 U34323
 Cyp4d1, Drosophila melanogaster, CP4D1 DROME, X67645 AF016992 AF016993 AF016994 AF016995
 AF016996 AF016997 AF016998 AF016999 AF017000 AF017001 AF017002 AF017003 AF017004 AE003423
 AE003423 Z98269
 Cyp4d1, Drosophila simulans, CP4D1 PROSI, AF017005
 Cyp4d10, Drosophila mettleri, C4D10 PROMT, U91634
 Cyp4d14, Drosophila melanogaster, C4D14 DROME, AE003423 AL009194
 Cyp4d2, Drosophila melanogaster, CP4D2 DROME, X75955 Z23005 AE003423 AL009194 AY118763
 AF017006 AF017007 AF017008 AF017009 AF017010 AF017011 AF017012 AF017013 AF017014 AF017015
 AF017016 AF017017 AF017018
 Cyp4d20, Drosophila melanogaster, C4D20 DROME, AE003475
 Cyp4d21, Drosophila melanogaster, C4D21 DROME, AE003618
 Cyp4d8, Drosophila melanogaster, CP4D8 DROME, AE003558 AY058442 U34329
 Cyp4e1, Drosophila melanogaster, CP4E1 DROME, AE003837 AY118793
 Cyp4e2, Drosophila melanogaster, CP4E2 DROME, U56957 AE003837 AY058518 X86076 U34332
 Cyp4e3, Drosophila melanogaster, CP4E3 DROME, AE003626 U34330
 Cyp4e5, Drosophila mettleri, CP4E5 PROMT, U78486
 Cyp4f1, Rattus norvegicus, CP4F1 RAT, M94548 AF200361
 Cyp4f14, Mus musculus, CP4FE MOUSE, AB037541 AB037540 AF233644 AK005007 AK018676
 BC011228
 Cyp4f4, Rattus norvegicus, CP4F4 RAT, U39206
 Cyp4f5, Rattus norvegicus, CP4F5 RAT, U39207
 Cyp4f6, Rattus norvegicus, CP4F6 RAT, U39208
 Cyp4g1, Drosophila melanogaster, CP4G1 DROME, AE003417 AL009188 U34328
 Cyp4g15, Drosophila melanogaster, C4G15 DROME, AF159624 AE003486 AY060719
 Cyp4p1, Drosophila melanogaster, CP4P1 DROME, AE003834 AY071584 U34327
 Cyp4p2, Drosophila melanogaster, CP4P2 DROME, AE003834 AY051564
 Cyp4p3, Drosophila melanogaster, CP4P3 DROME, AE003834 AY075201
 Cyp4s3, Drosophila melanogaster, CP4S3 DROME AE003498
 Cyp4v3, Mus musculus, CP4V3 MOUSE, AB056457 AK004724
 Cyp4x1, Rattus norvegicus, CP4X1 RAT, AF439343

Семейство ферментов цитохром P450 (последовательности из Генбанка)

CYP2J2 последовательности из ГенБанка.

NM_000775.

Homo sapiens цитохром P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 2 (CYP2J2)

gi|18491007|ref|NM_000775.2| [18491007]

NM_000770.

Homo sapiens цитохром P450, семейство 2, подсемейство C, полипептид 8 (CYP2C8), вариант копии

Hp1-1, мРНК

gi|13787188|ref|NM_000770.2| [13787188]

NM_030878.

Homo sapiens цитохром P450, семейство 2, подсемейство C, полипептид 8 (CYP2C8), вариант копии

Hp1-2, мРНК

gi|13787186|ref|NM_030878.1| [13787186]

NM_023025.

Ratus norvegicus цитохром P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 4 (Cyp2j4), мРНК

gi|61889087|ref|NM_023025.2| [61889087]

DN992115.

TC119679 целый мозг взрослого человека, крупная вставка, pCMV библиотека экспрессии Homo sapiens кДНК клон TC119679 5', аналогичный Homo sapiens цитохрому P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 2 (CYP2J2), мРНК последовательность

gi|66251946|gb|DN992115.1|| [66251946]

Z84061.

SSZ84061 токий свиной кишечник, кДНК библиотека Sus scrofa кДНК клон c13d09 5', аналогичный цитохром P450 монооксигеназе CYP2J2, мРНК последовательность

gi|1806390|emb|Z84061.1|| [1806390]

BC091149.

Ratus norvegicus цитохром P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 4, мРНК (кДНК клон MGC:108684 IMAGE:7323516), полный cds

gi|60688166|gb|BC091149.1|| [60688166]

NW_380169.

Bos Taurus хромосома Un геномно непрерывная, механически фрагментированная последовательность целого генома

gi|61630302|ref|NW_380169.1||BtUn_WGA215002_1 [61630302]

BC032594.

Homo sapiens цитохром P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 2, мРНК (кДНК клон MGC:44831 IMAGE: 5527808) полный cds

gi|21595666|gb|BC032594.1|| [21595666]

NT_086582.

Homo sapiens хромосома 1 геномно непрерывная, чередующаяся сборка

gi|51460368|ref|NT_086582.1||Hs1_86277 [51460368]

NT_032977.

Homo sapiens хромосома 1 геномно непрерывная

gi|51458674|ref|NT_032977.7||Hs1_33153 [51458674]

C0581852.

ILLUMIGEN_MCQ_4 6633 Katze_MMJJ Macaca mulatta кДНК клон IBIUW:17960 5', аналогичный основаниям 384-953, очень сходный с CYP2J2 человека (Hs.152096), мРНК последовательность

gi|50413382|gb|CO581852.1|| [50413382]

AY410198.

Mus musculus CYP2J2 ген, VIRTUAL TRANSCRIPT, частичная последовательность, геномная надзорная последовательность

gi|39766166|gb|AY410198.1|| [39766166]

AY410197.

Pan troglodytes CYP2J2 ген, VIRTUAL TRANSCRIPT, частичная последовательность, геномная надзорная последовательность

gi|39766165|gb|AY410197.1|| [39766165]

AY410196.

Homo sapiens CYP2J2 ген, VIRTUAL TRANSCRIPT, частичная последовательность, геномная надзорная последовательность

gi|39766164|gb|AY410196.1|| [39766164]

AY426985.

Homo sapiens цитохром P450, семейство 2, подсемейство J, полипептид 2 (CYP2J2) ген, полный cds

gi|37574503|gb|AY426985.1|| [37574503]

AB080265.

Homo sapiens CYP2J2 мРНК для цитохрома P450 2J2, полный cds

gi|18874076|dbj|AB080265.1|| [18874076]

AF272142.

Homo sapiens цитохром P450 (CYP2J2) ген, полный cds

gi|21262185|gb|AF272142.1|| [21262185]

U37143.

Homo sapiens цитохром P450 монооксигеназа CYP2J2 мРНК, полный cds

gi|18254512|gb|U37143.2||HSU37143 [18254512]

AF039089.

Homo sapiens цитохром P450 (CYP2J2) ген, частичный cds

gi|14486567|gb|AF039089.1|AF039089 [14486567]

CYP5 семейство цитохром P450 ферментов (последовательности из Генбанка)
NM_011539.

Mus musculus тромбоксан А синтаза 1, тромбоцит (Tbxas 1), мРНК

gi|31981465|ref|NM_011539.2|[31981465]

NM_030984.

Homo sapiens тромбоксан А синтаза 1 (тромбоцит, цитохром P450, семейство 5, подсемейство A) (TBXAS1), вариант копии TXS-II, мРНК

gi|13699839|ref|NM_030984.1|[13699839]

NM_001061.

Homo sapiens тромбоксан А синтаза 1 (тромбоцит, цитохром P450, семейство 5, подсемейство A) (TBXAS1), вариант копии TXS-I, мРНК

gi|13699838|ref|NM_001061.2|[13699838]

BC041157.

Homo sapiens тромбоксан А синтаза 1 (тромбоцит, цитохром P450, семейство 5, подсемейство A), вариант копии TXS-I, мРНК (кДНК клон MGC:48726 IMAGE:5755195), полный cds

gi|27371225|gb|BC041157.1|[27371225]

CYP8 семейство цитохром P450 ферментов (последовательности из Генбанка)
NM_000961.

Homo sapiens простагландин 12 (простациклин) синтаза (PTGIS), мРНК

gi|61676177|ref|NM_000961.3|[61676177]

NM_008968.

Mus musculus простагландин 12 (простациклин) синтаза (Ptgis), мРНК

gi|31982083|ref|NM_008968.2|[31982083]

D83402.

Homo sapiens PTGIS (CYP8) ген для простациклинсинтазы, полный cds

gi|60683846|dbj|D83402.2|[60683846]

BC062151.

Mus musculus простагландин 12 (простациклин) синтаза, мРНК (кДНК клон MGC:70035 IMAGE:6512164), полный cds

gi|38328177|gb|BC062151.1|[38328177]

a) Происходящие из DPAn-6 оксилипиды.

Происходящие из DPAn-6 оксилипиды (называемые также оксилипидами или, более конкретно, докозаноидами, из DPAn-6) включают, но не ограничиваются ими, любой R- или S-эпимер любого моно-гидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси- или полигидроксипроизводного DPAn-6 и могут включать гидроксипроизводные по любому углероду, который образует углерод-углеродную двойную связь в DPAn-6. Некоторые примеры новых происходящих из DPAn-6 оксилипидов настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, R- и S-эпимеры моно-гидроксипроизводных DPAn-6, включая 7-гидрокси DPAn-6, 8-гидрокси DPAn-6, 10-гидрокси DPAn-6, 11-гидрокси DPAn-6, 13-гидрокси DPAn-6 и 17-гидрокси DPAn-6 (предпочтительно 17-гидрокси DPAn-6); R- и S-эпимеры дигидроксипроизводных DPAn-6, включая 7,17-дигидрокси DPAn-6, 10,17-дигидрокси DPAn-6, 13,17-дигидрокси DPAn-6, 7,14-дигидрокси DPAn-6, 8,14-дигидрокси DPAn-6, 16,17-дигидрокси DPAn-6 и 4,5-дигидрокси DPAn-6 (предпочтительно 10,17-дигидрокси DPAn-6); и тригидроксипроизводные DPAn-6, включая R- и S-эпимеры 7,16,17-тригидрокси DPAn-6 и 4,5,17-тригидрокси DPAn-6. Структуры DPAn-6 оксилипидов описаны и/или показаны в примерах 3, 6, 8 и 11 и на фиг. 3A-3D, 6, 8, 11 и 15.

Структуры различных докозаноидных продуктов ферментативного (15-липоксигеназа, 5-липоксигеназа, 12-липоксигеназа и гемоглобин) превращения DPAn-6 показаны в примерах 3, 6, 8 и 11. Данные DPAn-6 производные в структурном отношении аналогичны производным, получаемым из DHA (примеры 2, 7 и 10) и DPAn-3 (примеры 4, 9 и 12), когда используются те же ферменты.

Примеры 3-12 демонстрируют производство докозаноидных продуктов из DPAn-6, так же, как и DHA, DPAn-3, DTAn-6, и пример 13 описывает оксилипидовые (докозаноидные) продукты, найденные в DHA/DPAn-6 LCPUFA масле.

b) Происходящие из DPAn-3 оксилипиды.

Происходящие из DPAn-3 оксилипиды (называемые также оксилипидами или, более конкретно, докозаноидами, из DPAn-3) включают, но не ограничиваются ими, любой R- или S-эпимер любого моно-гидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси- или полигидроксипроизводного DPAn-3 и могут включать гидроксипроизводные по любому углероду, который образует углерод-углеродную двойную связь в DPAn-3. Некоторые примеры новых происходящих из DPAn-3 оксилипидов настоящего изобретения включают,

но не ограничиваются ими, R- и S-эпимеры моногидроксипродуктов DPAn-3, включая 7-гидрокси DPAn-3, 10-гидрокси DPAn-3, 11-гидрокси DPAn-3, 13-гидрокси DPAn-3, 14-гидрокси DPAn-3, 16-гидрокси DPAn-3 и 17-гидрокси DPAn-3; R- и S-эпимеры дигидроксипроизводных DPAn-3, включая 7,17-дигидрокси DPAn-3, 10,17-дигидрокси DPAn-3, 8,14-дигидрокси DPAn-3, 16,17-дигидрокси DPAn-3, 13,20-дигидрокси DPAn-3 и 10,20-дигидрокси DPAn-3; и тригидроксипроизводные DPAn-3, включая R- и S-эпимеры 7,16,17-тригидрокси DPAn-3. Структуры DPAn-3 оксилипинов описаны и/или показаны в примерах 4, 9 и 12 и на фиг. 4A-4D, 9, 12 и 16.

с) Происходящие из DPAn-6 оксилипины.

Происходящие из DTAn-6 оксилипины (называемые также оксилипинами или, более конкретно, докозаноидами, из DTAn-6) включают, но не ограничиваются ими, любой R- или S-эпимер любого моногидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси- или полигидроксипроизводного DTAn-6 и могут включать гидроксипроизводные по любому углероду, который образует углерод-углеродную двойную связь в DTAn-6. Некоторые примеры новых происходящих из DTAn-6 оксилипинов настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, R- и S-эпимеры моногидроксипродуктов DTAn-6, включая 7-гидрокси DTAn-6, 10-гидрокси DTAn-6, 13-гидрокси DTAn-6 и 17-гидрокси DTAn-3; R- и S-эпимеры дигидроксипроизводных DTAn-6, включая 7,17-дигидрокси DTAn-6, 10,17-дигидрокси DTAn-6 и 16,17-дигидрокси DTAn-6; и тригидроксипроизводные DTAn-6, включая R- и S-эпимеры 7,16,17-тригидрокси DTAn-6. Структуры DTAn-6 оксилипинов описаны и/или показаны в примере 5 и на фиг. 5A-5C и 17.

д) Новые происходящие из C22-PUFA оксилипины.

Другие новые происходящие из C22-PUFA оксилипины (называемые также оксилипинами или, более конкретно, докозаноидами, из C22-PUFA) включают, но не ограничиваются ими, любой R- или S-эпимер любого моногидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси- или полигидроксипроизводного C22-PUFAS и могут включать гидрокси производные по любому углероду, который образует углерод-углеродную двойную связь в C22-PUFA. Некоторые примеры новых докозаноидов, которые охватываются настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются ими, 4,5-эпокси-17-гидрокси DPA, 7,8-эпокси DHA, 10,11-эпокси DHA, 13,14-эпокси DHA, 19,20-эпокси DHA, 13,14-дигидрокси DHA, 16,17-дигидрокси DTAn-6, 7,16,17-тригидрокси DTAn-6, 4,5,17-тригидрокси DTAn-6, 7,16,17-тригидрокси DTAn-3, 16,17-дигидрокси DTAn-3, 16,17-дигидрокси DTRAn-6, 7, 16,17-тригидрокси DTRAn-6, 4,5-дигидрокси DTAn-6 и 10,16,17-тригидрокси DTRAn-6. Структуры данных происходящих из C22-PUFA докозаноидов показаны на фиг. 23.

Происходящие из DPAn-6, DTAn-6 и DPAn-3 оксилипины или другие происходящие из C22-PUFA оксилипины настоящего изобретения, так же, как и аналоги или производные любых таких оксилипинов настоящего изобретения, могут быть получены с помощью химического синтеза или биологического синтеза, включая de novo синтез или ферментативное превращение субстрата. Альтернативно, такие оксилипины могут быть получены путем отделения, обогащения и/или превращения субстратов из природных источников (описанных ниже). Согласно настоящему изобретению ссылка на оксилипин, "происходящий из" конкретной LCPUFA, такой как "происходящий из DPAn-6 оксилипин", или "DPAn-6 оксилипиновое производное", или "DPAn-6 оксилипиновый аналог", например, относится к оксилипину, который был получен любым способом, с использованием знания структуры оксилипина, который может быть получен с использованием DPAn-6 в качестве субстрата. Такой оксилипин необязательно получается с помощью ферментативной реакции или биологической системы, а, как упоминалось выше, может альтернативно синтезироваться химическим путем de novo. В дополнение к сказанному, аналоги или производные встречающихся в природе DPAn-6 оксилипинов могут конструироваться на основе структуры встречающихся в природе DPAn-6 оксилипинов, которые отличаются от природного DPAn-6 оксилипина по крайней мере одной модификацией. Такие аналоги могут также синтезироваться de novo с использованием методов химического синтеза или с использованием видоизменений методов биологического производства (например, ферментативных реакций). Способы получения оксилипинов согласно настоящему изобретению, включая способы обогащения природных источников таких оксилипинов, и с помощью ферментативного превращения субстратов, раскрыты в данном описании. Способы химического синтеза соединений, таких как оксилипины, также известны в данной области техники и могут свободно применяться к новым оксилипиновым соединениям настоящего изобретения. Такие способы также описаны здесь.

Согласно настоящему изобретению имеется в виду, что термин "подобные докозаноиду соединения", или "аналоги докозаноида", или "производные докозаноида или докозаноидные производные" включают аналоги любых докозаноидов, описанных здесь, включая любой из новых докозаноидов настоящего изобретения, которые включают C₂₂ жирную кислоту, имеющую по крайней мере три олефиновые группы (углерод-углеродные двойные связи). Аналогичный термин также может использоваться для более общего описания аналогов и производных любых описанных здесь оксилипинов (например, подобных оксилипину соединений, аналогов оксилипина, производных оксилипина).

Используемый здесь термин "аналог" относится к химическому соединению, которое структурно сходно с другим соединением и отличается слегка по составу (как в случае замены 1 атома атомом иного элемента или в случае присутствия конкретной функциональной группы или замены одной функцио-

нальной группы какой-либо еще функциональной группой). Таким образом, аналогом является соединение, которое сходно или сравнимо по функции и виду, но не по структуре или происхождению ссылочного соединения. Например, соединением, на которое ссылаются, может быть ссылочный докозаонид, такой как любой докозаонид, происходящий из DHA, DPAn-6, DPAn-3 или DTAn-6, а аналогом является вещество, обладающее химической структурой или химическими свойствами, сходными со структурой или свойствами ссылочного докозаонида.

Термины "замещенный", "замещенное производное" и "производное", когда они используются для описания соединения настоящего изобретения, означают, что по крайней мере один водород, присоединенный к незамещенному соединению, заменен отличным от него атомом или химическим фрагментом. Примеры заместителей включают, но не ограничиваются ими, гидрокси, алкил, галоген, нитро, циано, гетероцикл, арил, гетероарил, амино, амид, сложный эфир, простой эфир, карбоновую кислоту, тиол, сложный тиоэфир, простой тиоэфир, сульфоксид, сульфон, карабамат, пептидил, PO_3H_2 и их смеси.

Хотя производное имеет физическую структуру, аналогичную структуре исходного соединения, производное может иметь отличные химические и/или биологические свойства от свойств исходного соединения. Такие свойства могут включать, но не ограничиваются ими, повышенную или пониженную активность исходного соединения, новую активность по сравнению с исходным соединением, увеличенную или уменьшенную биодоступность, повышенную или пониженную эффективность, повышенную или пониженную стабильность *in vitro* и/или *in vivo* и/или повышенные или пониженные свойства абсорбции.

Специалистами в данной области техники должно быть оценено, что соединения изобретения, имеющие хиральный центр, могут существовать и быть изолированы в оптически активной и рацемической формах. Некоторые соединения могут проявлять полиморфизм. Должно быть понятно, что настоящее изобретение охватывает любые рацемические, оптически-активные, полиморфные или стереоизомерные формы или их смеси соединения изобретения, которое обладает полезными свойствами, описанными здесь, в данной области техники должно быть хорошо известно, как приготавливать оптически-активные формы (например, с помощью разложения рацемической формы перекристаллизацией, с помощью синтеза из оптически-активных исходных материалов, с помощью хирального синтеза или с помощью хроматографического разделения с использованием хиральной стационарной фазы) и как определять противовоспалительную активность, например, с использованием стандартных испытаний, описанных здесь, или с использованием других аналогичных тестов, которые хорошо известны в данной области.

Пролекарства любых из оксилипинов, описанных здесь, и предпочтительно любых из докозаонидов, описанных здесь, и даже более предпочтительно любых определенных докозаонидов, показанных, например, на любой из фиг. 2A-2B, 3A-3D, 4A-4D, 5A-5C, 6-17, 18A-18C и 23, могут быть идентифицированы с использованием обычных технологий, известных в данной области. В данной области техники известны различные формы пролекарств. Что касается примеров таких пролекарственных производных, см., например: a) *Design of Prodrugs*, под редакцией H. Bundgaard (Elsevier, 1985) и *Methods in Enzymology*, Vol. 42, p. 309-396, под редакцией Widder, et al. (Academic Press, 1985); b) *Textbook of Drug Design and Development*, под редакцией Krogsgaard-Larsen и H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs, автора H. Bundgaard p. 113-191 (1991); c) H. Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8, 1-38 (1992); d) H. Bundgaard, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77: 285 (1988); и e) N. Kakeya, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 692 (1984), каждая из которых включена сюда в качестве ссылки.

Дополнительно, изобретение также включает сольваты, метаболиты и соли (предпочтительно фармацевтически приемлемые соли) соединений любых из описанных здесь оксилипинов, и в особенности любых из докозаонидов, описанных здесь, и более особенно любых конкретных докозаонидов, показанных, например, на любой из фиг. 2A-2B, 3A-3D, 4A-4D, 5A-5C, 6-17, 18A-18C и 23.

Термин "сольват" относится к совокупности молекулы с 1 или более молекулами растворителя. "Метаболит" представляет фармакологически активный продукт, производимый посредством *in vivo* метаболизма в теле или организме, определенного соединения или его соли. Такие продукты могут быть результатом, например, реакции окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, деамидирования, сложной этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления и т.п. вводимого или получаемого соединения. Соответственно, изобретение включает метаболиты соединений любых оксилипинов, описанных здесь, и в частности любых докозаонидов, описанных здесь, и еще более особенно любых конкретных докозаонидов, показанных, например, на любой из фиг. 2A-2D, 3A-3D, 4A-4D, 5A-5C, 6-17, 18A-18C и 23, включая соединения, полученные способом, включающим контактирование соединения данного изобретения с организмом в течение периода времени, достаточного для получения его метаболического продукта.

Используемая здесь "фармацевтически приемлемая соль" или "соль" включает соли, которые сохраняют биологическую эффективность свободных кислот и оснований определенного соединения и которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Соединение изобретения может обладать достаточно кислотной, достаточно щелочной или обоими функциональными группами и соответственно реагировать с любым из неорганических или органических оснований и неорганических или

органических кислот для образования фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли, получаемые взаимодействием соединений настоящего изобретения с минеральной или органической кислотами или неорганическим основанием, такие соли включают сульфаты, пиросульфаты, бисульфаты, сульфиты, бисульфиты, фосфаты, вторичные кислые фосфаты, первичные кислые фосфаты, метафосфаты, пирофосфаты, хлориды, бромиды, йодиды, ацетаты, пропионаты, деканоаты, каприлаты, акрилаты, форматы, изобутираты, капропаты, гептаноаты, пропиолаты, оксалаты, малонаты, сукцинаты, субераты, себакаты, фумараты, малеаты, бутин-1,4-диоаты, гексин-1,6-диоаты, бензоаты, хлорбензоаты, метилбензоаты, динитробензоаты, гидроксибензоаты, метоксибензоаты, фталааты, сульфонаты, ксилолсульфонаты, фенилацетаты, фенилпропионаты, фенилбутираты, цитраты, лактаты, гамма-гидроксибутираты, гликоляты, тартраты, метансульфонаты, пропансульфонаты, нафталин-1-сульфонаты, нафталин-2-сульфонаты и манделаты. Так как одно соединение настоящего изобретения может включать более чем один кислотный или щелочной фрагмент, соединения настоящего изобретения могут включать моно-, ди- или трисоли в одном соединении.

Если соединение изобретения представляет основание, желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим методом, доступным в данной области техники, например с помощью обработки свободного основания кислотным соединением, в частности такой неорганической кислотой, как соляная кислота, бромисто-водородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и аналогичные, или с такой органической кислотой, как уксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидовая кислота, такая как глюкуроновая кислота или галактуроновая кислота, альфагидроксикислота, такая как лимонная кислота или тартаровая кислота, аминокислота, такая как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматическая кислота, такая как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновая кислота, такая как п-толуолсульфоновая кислота или этансульфоновая кислота, или аналогичными.

Если соединение изобретения представляет кислоту, желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим методом, например обработкой свободной кислоты неорганическим или органическим основанием. Предпочтительными неорганическими солями являются соли, образуемые щелочными или щелочно-земельными металлами, такими как литий, натрий, калий, барий и кальций. Предпочтительные соли органических оснований включают, например, аммониевую соль, дibenзиламмониевую, бензиламмониевую, 2-гидроксиэтиламмониевую, бис(2-гидроксиэтил)аммониевую соль, фенилэтилбензиламин, дibenзилэтилендиамин и аналогичные соли. Другие соли кислотных фрагментов могут включать, например, соли, образуемые с прокайном, хинином и N-метилглюкозамином плюс соли, образуемые с основными аминокислотами, такими как глицин, орнитин, гистидин, фенилглицин, лизин и аргинин.

Масла, композиции, рецептуры или продукты, содержащие DPAn-6, DPAn-3, DTAn-6, другие C22-LCPUFA, другие LCPUFA и/или оксилипины, производные от них

Настоящее изобретение включает масла, композиции, рецептуры или продукты, включающие LCPUFA и/или LCPUFA оксилипины, описанные здесь. Согласно настоящему изобретению термин "продукт" может использоваться для общего или родового описания любого масла, композиции, рецептуры настоящего изобретения, хотя один термин мог бы быть предпочтительнее другого в зависимости от контекста использования продукта. В одном воплощении изобретения масла, композиции и рецептуры включают, по крайней мере, DPAn-6, DTAn-6, или DPAn-3, или оксилипины, происходящие из них, или любые их сочетания, и могут дополнительно включать любые другие LCPUFA и/или любые оксилипины, производные от них. Такие оксилипины могут быть получены любым химическим или биологическим (биогенным) методом, включающим de novo синтез, ферментативное превращение из любого источника (например, с помощью ферментов, включающих липоксигеназы, циклооксигеназы, цитохром P450 ферменты и другие гемсодержащие ферменты) с помощью очистки из любого источника и производства из любого биологического источника (например, микробных, растительных, животных источников).

В одном из воплощений изобретения масла обогащаются для наличия любого LCPUFA-производного оксилипина (также известного как LCPUFA оксилипин), включая любой оксилипин, производный от DHA, EPA, DPAn-6, DTAn-6 и/или DPAn-3, с предпочтением LCPUFA-производного докозаноидов и более предпочтительно оксилипинов, производных от DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3. В другом воплощении масла, композиции или рецептуры, содержащие любой LCPUFA-производный оксилипин, производятся, перерабатываются или обрабатываются для сохранения и/или улучшения стабильности, абсорбции, биоактивности, биодоступности или эффективности LCPUFA оксилипинов в маслах, композициях или готовых рецептурах. Ниже описаны различные способы получения, переработки и добавления масел, композиций или рецептур.

Источники LCPUFA и LCPUFA-производных оксилипинов

для использования в настоящем изобретении

Любой источник LCPUFA может использоваться для получения LCPUFA, оксилипинов, масел, композиций, готовых форм (рецептур) настоящего изобретения, включая, например, животные (беспозвоночные и позвоночные), растительные и микробные источники.

Примеры животных источников включают водных животных (например, рыб, морских млекопитающих и ракообразных, таких как криль и другие эуфазиды) и липиды, экстрагируемые из животных тканей (например, мозга, печени, глаза и т.д.).

Более предпочтительные источники включают микроорганизмы и растения. Предпочтительные микробные источники LCPUFA включают водоросли, грибки (включая дрожжи и нитевидные грибки (гифомицеты) рода *Mortierella*), протисты и бактерии.

Использование в качестве источника микроорганизмов, таких как водоросли, может обеспечить органолептические преимущества, т.е. жирные кислоты из такого источника, как микроорганизмы, могут не иметь рыбного вкуса и запаха, который могут иметь жирные кислоты рыбного происхождения. Однако рыбные масла также включены в настоящее изобретение. Поскольку рыбные масла могут естественным образом подвергаться окислительным процессам, которые дают альдегиды и кетоны, что придает неприятный запах и вкус таким рыбным маслам, настоящее изобретение обладает преимуществом "предписанного" или "целенаправленного" окисления специфических соединений для получения докозаноидов или смесей докозаноидов, что обеспечивает благоприятное качество масел, содержащих такие докозаноиды, включая рыбные масла. В предпочтительном воплощении в настоящем изобретении используются рыбные масла, содержащие DNA и/или EPA и DPA-6, DTAn-6 и/или DPAn-3.

Примеры бактериальных источников включают морские бактериальные источники, такие как представители рода *Shewanella* и *Vibiro*.

Более предпочтительно источник LCPUFA включает водоросли или протисты. Предпочтительные водоросли и род протистов являются членами царства *Stramenopila* и более предпочтительно являются членами следующих групп водорослей: динофлагелляты, диатомовые водоросли, хризофиты или траустрохитриды.

Предпочтительно динофлагелляты являются представителями рода *Cryptocodinium* и еще более предпочтительно представителями вида *Cryptocodinium cohnii*.

Разработки привели к частому пересмотру таксономии *Thraustochytrids* (траустрохитриды). Теоретики, таксономии помещают *Thraustochytrids* с морскими водорослями или подобными водорослями протистами. Однако, ввиду неопределенности таксономии, для целей настоящего изобретения должно быть лучше рассматривать штаммы, описанные в настоящем изобретении как *Thraustochytrids*, для включения следующих организмов: отряд: *Thraustochytriales*; семейство: *Thraustochytriaceae* (род: *Thraustochytrium* (который для данного примерения включает *Ulkenia*, хотя некоторые рассматривают ее как отдельный род), *Schizochytrium*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium* или *Elina*) или *Labyrinthulaceae* (род: *Labyrinthulidae*, *Labyrinthuloides* или *Labyrinthomyxa*). Также следующие рода иногда включены или в семейство *Thraustochytriaceae*, или в *Labyrinthulaceae*: *Althornia*, *Corallochytrium*, *Diplophyrys* и *Ruthosorus*), а для целей данного изобретения охватываются ссылкой на *Thraustochytrid* или представителя отряда *Thraustochytriales*. Признано, что во время данного изобретения пересмотр таксономии *Thraustochytrids* поместил род *Labyrinthuloides* в семейство *Labyrinthulaceae* и подтверждает помещение двух семейств *Thraustochytriaceae* и *Labyrinthulaceae* в линию *Stramenopile*. Отмечается, что *Labyrinthulaceae* иногда обычно называются лабиринтулами или лабиринтулами или лабиринтулами и *Thraustochytriaceae* обычно называются траустрохитридами, хотя, как обсуждалось выше, для целей ясности данного изобретения ссылка на *Thraustochytrids* охватывает любой представитель отряда *Thraustochytriales* и/или включает представителей как *Thraustochytriaceae*, так и *Labyrinthulaceae*. Информация в отношении таких водорослей может быть найдена, например, в патентах США №№ 5407957, 5130242 и 5340594, которые включены сюда в качестве ссылки.

Особенно предпочтительные источники LCPUFA и оксилипинов для использования в настоящем изобретении включают микроорганизмы из рода, включающего, но не ограниченного ими, *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, *Elina* и *Schizochytrium* в пределах *Thraustochytriaceae* и *Labyrinthula*, *Labyrinthuloides* или *Labyrinthomyxa* в пределах *Labyrinthulaceae*. Предпочтительные виды этих родов включают, но не ограничиваются ими, любые виды в пределах *Labyrinthula*, включая *Labyrinthula* sp., *Labyrinthula algeriensis*, *Labyrinthula cienkowskii*, *Labyrinthula chattonii*, *Labyrinthula coenocystis*, *Labyrinthula macrocystis*, *Labyrinthula macrocystis atlantica*, *Labyrinthula macrocystis macrocystis*, *Labyrinthula magnifica*, *Labyrinthula minuta*, *Labyrinthula roscoffensis*, *Labyrinthula valkonovii*, *Labyrinthula vitellina*, *Labyrinthula vitellina pacifica*, *Labyrinthula vitellina vitellina*, *Labyrinthula zoppii*; любые виды *Labyrinthuloides*, включая *Labyrinthuloides* sp., *Labyrinthuloides minutus*, *Labyrinthuloides schizochytrrops*; любые виды *Labyrinthomyxa*, включая *Labyrinthomyxa* sp., *Labyrinthomyxa pohlia*, *Labyrinthomyxa sauvageaui*, любые виды *Aplanochytrium*, включая *Aplanochytrium* sp. и *Aplanochytrium kerguelensis*; любые виды *Elina*, включая *Elina* sp., *Elina marisalba*, *Elina sinorifica*; любые виды *Japonochytrium*, включая *Japonochytrium* sp., *Japonochytrium marinum*; любые виды *Schizochytrium*, включая *Schizochytrium* sp., *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium octosporum*; и любые виды *Thraustochytrium*, включая *Thraustochytrium* sp., *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium motivum*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium striatum*, *Ulkenia* sp., *Ulkenia minuta*, *Ulkenia profunda*, *Ulkenia radiata*, *Ulkenia sarkariana* и *Ulkenia visurgensis*. Особенно предпочтительны водоросли, содержащие смесь докозаноидов, включая *Thraustochytrium* sp., *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium motivum*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium striatum*, *Ulkenia* sp., *Ulkenia minuta*, *Ulkenia profunda*, *Ulkenia radiata*, *Ulkenia sarkariana* и *Ulkenia visurgensis*.

тительные виды в пределах этих родов включают, но не ограничиваются ими, любые виды *Schizochytrium*, включая *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium minutum*; или любые виды *Thraustochytrium* (включая вышеупомянутые виды *Ulkenia*, такие как *U. visurgensis*, *U. amoeboida*, *U. sarkariana*, *U. profunda*, *U. radiata*, *U. minuta* и *U.sp. BP-5601*), и включающие *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum* и любые виды *Japonochytrium*. Особенно предпочтительные представители *Thraustochytriales* включают, но не ограничиваются ими, *Schizochytrium* sp. (S31) (ATCC 20888); *Schizochytrium* sp. (S8) (ATCC 20889); *Schizochytrium* sp. (LC-RM) (ATCC 18915); *Schizochytrium* sp. (SR21); *Schizochytrium aggregatum* (Goldstein et Belsky) (ATCC 28209); *Schizochytrium limacinum* (Honda et Yokochi) (IFO 32693); *Thraustochytrium* sp. (23B) (ATCC 20892); *Thraustochytrium striatum* (Schneider) (ATCC 24473); *Thraustochytrium aureum* (Goldstein) (ATCC 34304); *Thraustochytrium roseum* (Goldstein) (ATCC 28210); *Japonochytrium* sp. (L1) (ATCC 28207); *Thraustochytrium* sp. 12B (ATCC 20890); *Thraustochytrium* sp. U42-2 (ATCC 20891); и *Labyrinthula* (лабиринтуллы) штамм L59 (Kumon) (IPOD AIST No. FERM P-19897).

В одном аспекте организмы-источники масел разрабатываются генетическим путем для увеличения продуцирования LCPUFA и/или LCPUFA оксилипинов. Более предпочтительными источниками являются микроорганизмы (которые могут выращиваться в ферментах) или семена масличных культур. Например, микроорганизмы и растения могут генетически проектироваться для экспрессии генов, которые продуцируют LCPUFA. Такие гены могут включать гены, кодирующие белки, вовлеченные в классические пути синтазы жирной кислоты, или гены, кодирующие белки, вовлеченные в путь PUFA поликетид синтазы (PKS). Гены и белки, вовлеченные в классические пути синтазы жирной кислоты, и генетически модифицированные организмы, такие как растения, трансформируемые такими генами, описаны, например, в Napier и Sayanova, Proceedings of the Nutrition Society (2005), 64: 387-393; Robert et al., Functional Plant Biology (2005) 32: 473-479; или публикации патентной заявки США 2004/0172682. PUFA PKS путь, гены и белки, включенные в данный путь, и генетически модифицируемые микроорганизмы и растения, трансформируемые такими генами для экспрессии и продуцирования PUFA, в деталях описаны в патенте США № 6566583; публикации патентной заявки США № 20020194641, публикации патентной заявки США № 20040235127A1 и публикации патентной заявки США № 20050100995A1, каждая из которых включена сюда целиком в качестве ссылки.

Предпочтительные масличные культуры включают сою, кукурузу, сафлор, подсолнечник, канолу, лен, или рапс, лен и табак, которые генетически модифицированы для выработки LCPUFA, как описано выше. Более предпочтительно семена масличных культур также обладают или могут модифицироваться для обладания (например, с помощью генетической разработки) ферментными системами для преобразования LCPUFA в ее гидроксипроизводные формы (т.е. оксилипин). Такие ферменты хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в табл. 1.

Приемы генетического преобразования (трансформации) микроорганизмов и растений хорошо известны в данной области техники. Воплощением настоящего изобретения является то, что молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любой один или более ферментов для превращения LCPUFA в его гидроксипроизводную форму (и, если требуется, его кофактор), могут использоваться для преобразования растений или микроорганизмов для инициации, улучшения и/или изменения (модификации) способности к продуцированию оксилипинов таких растений или микроорганизмов. Технологии преобразования для микроорганизмов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press. Общие технологии преобразования динофлагеллятов, которые могут быть приспособлены для применения с *Cryptocodinium cohnii*, в деталях описаны в Lohuis and Miller, The Plant Journal (1998) 13 (3): 427-435. Общая технология генетического преобразования *Thraustochytrids* подробно описана в публикации патентной заявки США № 20030166207 опубликованной 4 сентября 2003г.

Способы генетической разработки растений также хорошо известны в данной области. Например, были разработаны многочисленные способы преобразования растений, включая биологические и физические протоколы преобразования. См., например, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), стр. 67-68. В дополнение, доступными являются векторы и методы культивирования *in vitro* клеток растений или преобразования и регенерации тканей растений. См., например, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" в публикации Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Click, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pp. 89-119. См. также Horsch et al., Science 227: 1229 (1985); Kado, C.I., Crit. Rev. Plant. Sci. 10: 1 (1991); Moloney et al., Plant Cell Reports 8: 238 (1989); патент США № 4940838; патент США № 5464763; Sanford et al., Part. Sci. Technol. 5: 27 (1987); Sanford, J.C., Trends Biotech. 6: 299 (1988); Sanford, J.C., Physiol. Plant 79: 206 (1990); Klein et al., Biotechnology 10: 268 (1992); Zhang et al., Bio/Technology 9: 996 (1991); Deshayes et al., EMBO J., 4: 2731 (1985); Christou et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 84: 3962 (1987); Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199: 161 (1985); Draper et al., Plant Cell Physiol. 23: 451 (1982); Bonn et al., в публикации Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p. 53 (1990); D'Halluin et al., Plant Cell 4: 1495-1505 (1992) and Spencer et al., Plant Mol. Biol. 24: 51-61 (1994).

Предпочтительно микроорганизмами или масличными культурами растений, используемыми в качестве источника LCPUFA и оксилипинов, происходящих из них, являются микроорганизмы и растения, которые продуцируют PUFA (или естественным путем, или с помощью генной инженерии), имеющие C20, или высшие полиненасыщенные жирные кислоты.

Предпочтительно LCPUFA, продуцируемые микроорганизмами или растениями, имеют 3, 4 или более двойных связей. Еще более предпочтительно микроорганизмы или растения продуцируют C20 или высшие LCPUFA с 5 или более двойными связями. Еще более предпочтительно микроорганизмы или растения продуцируют C20 или высшие LCPUFA, включающие, но не ограниченные ими, EPA (20:5n-3), DHA (C22:6n-3), DPAn-3 (22:5n-3), DPAn-6 (22:5n-6), DTAn-6 (22:4n-6) или сочетания этих LCPUFA.

В другом воплощении предпочтительно, чтобы микроорганизмы или растительные источники LCPUFA естественным образом экспрессировали ферменты, такие как циклооксигеназы, липоксигеназы, цитохром Р450 ферменты (включая гидроксилазы, пероксидазы и оксигеназы) и/или другие гемсодержащие ферменты, для биохимического превращения LCPUFA в оксилипины (например, в гидрокси, пероксидные или эпоксидные производные LCPUFA). Изобретение также включает организмы (например, растения или микроорганизмы), которые выбраны в природе или генетически разработаны для экспрессии данных ферментов и/или для обладания усиленной активностью этих ферментов в организмах. Организмы могут быть генетически разработаны для экспрессии или нацеливания любого фермента, который катализирует биохимическое превращение LCPUFA в оксилипины, такие как циклооксигеназы, липоксигеназы, цитохром Р450 ферменты (включая гидроксилазы, пероксидазы, и оксигеназы) и/или другие гемсодержащие ферменты, для биохимического превращения LCPUFA в оксилипины.

Многочисленные примеры таких ферментов известны в данной области техники и перечислены в табл. 1, хотя изобретение не ограничивается данными конкретными ферментами. Ферменты в табл. 1 описываются по их названиям, официальным символам, вымышленным наименованиям, организмам и/или ссылкой на входящий номер базы данных в Национальном Центре информационной биотехнологии, который содержит информацию последовательности для ферментов и генов, кодирующую такие ферменты. Вся информация, включенная во входящие номера базы данных, включена сюда в качестве ссылки. Эти ферменты и гены, кодирующие такие ферменты, или их гомологи (включая натуральные (естественные) варианты), могут использоваться для того, чтобы генетически спроектировать организм, который вырабатывает LCPUFA для экспрессии фермента, или чтобы иметь целью эндогенную форму фермента для инициирования, прироста или увеличения активности этих ферментов в организме. Необходимо, данные ферменты могут быть предназначены в особый отдел (например, пластиды в растениях), который отделен от отделов, содержащих LCPUFA, регулирующих потенциал для образования и разложения оксилипинов, продуцируемых *in vivo*. Ферменты (эндогенные или рекомбинантные) могут помещаться под контролем индуцируемого промотора, так чтобы продуцирование оксилипинов из LCPUFAs могло контролироваться в организме. Например, в растениях оксилипины могут образовываться во время обработки после сбора урожая, при которой масличное семя размалывается для обеспечения возможности контакта LCPUFA и ферментов оксигеназы.

Источники микробных или растительных клеток LCPUFA, используемые в настоящем изобретении, предпочтительно включают те клетки микроорганизмов или растений, которые могут выращиваться в ферментере или фотобиореакторе. Более предпочтительно источники микробных или растительных клеток LCPUFA, используемые в настоящем изобретении, предпочтительно включают те клетки микроорганизмов или растений, которые могут выращиваться в ферментерах гетеротрофно.

Уникальные характеристики масел, производимых по настоящему изобретению

Масла, содержащие оксилипины LCPUFA, раскрытие в данном описании, обладают уникальными характеристиками по сравнению с оксилипинами, которые синтезируются химическим путем или получаются с помощью ферментативного превращения *in vitro*, как описано до настоящего изобретения. LCPUFA оксилипины, и в частности докозаноиды, присутствуют в маслах в своих свободных и/или сложноэтерифицированных формах. В сложноэтерифицированной форме LCPUFA оксилипины, и в частности докозаноиды, могут присутствовать в триглицериде, диглицериде, моноглицериде, фосфолипиде, сложном эфире стерина и/или сложноэфирных формах воска. Поскольку оксилипины ранее были описаны только в форме свободной жирной кислоты, (сложно)этерифицированные формы представляют новые формы оксилипинов, присутствие которых может усиливаться, стабилизироваться или сохраняться в маслах или композициях настоящего изобретения. Вне связи с какой-либо теорией авторы настоящего изобретения считают, что, коль скоро LCPUFA оксилипины, и в частности докозаноиды, образуются в форме свободной жирной кислоты, они могут переэтерифицироваться в одну из этерифицированных форм. Альтернативно, молекулы жирной кислоты могут превращаться в оксилипины, хотя они находятся все еще в этерифицированной форме.

LCPUFA масла, обрабатываемые по способам, описанным согласно настоящему изобретению (см. ниже), будут иметь общие концентрации LCPUFA оксилипина, и в частности общие концентрации докозаноидов, которые составляют по крайней мере 2X, по крайней мере 3X, по крайней мере 4X, по крайней мере 5X, по крайней мере 10X, по крайней мере 20X, по крайней мере 50X, по крайней мере 100X, по крайней мере 200X, по крайней мере 400X, по крайней мере 1000X или по крайней мере 5000X и выше

(включая наращивание 1X, например, 20X, 21X, 22X и т.д.), чем концентрации в виде следов, обычно обнаруживаемые в LCPUFA маслах, которые были получены с помощью стандартного процесса рафирования, отбеливания и дезодорирования, обычно используемого для съедобных масел. LCPUFA масла, производимые с помощью процессов, описанных в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно содержат по крайней мере 1 мкг, по крайней мере 5 мкг, по крайней мере 10 мкг, по крайней мере 15 мкг, по крайней мере 20 мкг, по крайней мере 30 мкг, по крайней мере 50 мкг, по крайней мере 100 мкг, по крайней мере 200 мкг, по крайней мере 500 мкг, по крайней мере 1000 мкг, по крайней мере 2000 мкг, по крайней мере 5000 мкг, по крайней мере 10000 мкг или по крайней мере 50000 мкг по крайней мере одного или более LCPUFA оксилипинов, и в частности докозаноидов, на грамм масла (включая любое другое наращивание по 0,1 мкг приростам). Отмечается, что с помощью обработки и очистки масел или композиций концентрации LCPUFA оксилипина могли бы фактически быть гораздо выше (например, приблизительно 100%) во время фазы производства, хотя масла и композиции обычно разбавляются или титруются до количеств, описанных выше, перед тем, как они используются в пищевом, терапевтическом или другом процессе.

Масла, производимые согласно настоящему изобретению, обогащаются предпочтительно гидроксильными формами DHA, и/или EPA, и/или DPAn-3, и/или DPAn-6, и/или DTAn-6. Богатые LCPUFA гидроксипроизводными масла данного изобретения могут обогащаться гидроксiformами LCPUFA, включая производные только одной LCPUFA (например, DHA, или EPA, или DPAn-6, или DPAn-3, или DTAn-6) или сочетания LCPUFAs (например, DHA плюс DPA (n-6 и/или n-3), DTAn-6 или EPA).

DPAn-6, или DPAn-3, или DTAn-6 масла, композиции и рецептуры

Одно воплощение настоящего изобретения включает применение самих LCPUFA, и особенно DPAn-6 и/или DPAn-3 в качестве противовоспалительных или нейрозащитных агентов (т.е. предоставляются LCPUFA одни или в сочетании с их метаболитами оксилипина). DPAn-6 и/или DPAn-3 могут предоставляться по одной или в сочетании с другими LCPUFA, и предпочтительно DHA и/или EPA. DTAn-6, обладающая противовоспалительными или нейрозащитными свойствами, также охватывается настоящим изобретением. Предпочтительно DPAn-6, DPAn-3 или DTAn-6, используемые в настоящем изобретении, предоставляются в одной из следующих форм: в виде триглицерида, содержащего DPAn-6, DTAn-6 и/или DPAn-3, в виде фосфолипида, содержащего DPAn-6, DTAn-6 и/или DPAn-3, в виде свободной жирной кислоты, в виде этилового или метилового эфира DPAn-6, DTAn-6 и/или DPAn-3.

В предпочтительном воплощении DPAn-6, DTAn-6 и/или DPAn-3 представляется в форме масла, и предпочтительно микробного масла (дикого типа или генетически модифицированного) или растительного масла из семян масличной культуры, которая была модифицирована генами, которые катализируют производство LCPUFA. Предпочтительные микробные источники и источники из культур масличных семян описаны подробно выше. Предпочтительно DPAn-6, DTAn-6 или DPAn-3, используемая в настоящем изобретении, включая масла и композиции, содержащие такие LCPUFA и/или их оксилипиновые производные, содержит одну или более из следующих дополнительных LCPUFA или их оксилипиновых производных: DHA или EPA. Наиболее предпочтительно дополнительной LCPUFA является DHA.

DPAn-6 представляет жирную кислоту омега-6 ряда с наименее длинной цепью. Докозапентаеновая кислота (n-6) находится в многочисленных видах пищи человека и в грудном молоке человека при уровнях от 0,0 до 2,4% (Taber et al. 1998) и составляет приблизительно 0,1% всех жирных кислот (Koletzko et al. 1992), соответственно. Главными источниками DPAn-6 в пище взрослых и детей являются домашняя птица (мясо и яйца) и морепродукты (Taber et al. 1998, Nichols et al. 1998). DPAn-6 является типично компонентом тканей тела человека, включая сердце (Rocquelin et al. 1989), головной мозг (Swennerholm et al. 1978, O'Brien et al. 1965), печень (Salem 1989), красные кровяные клетки (Sanders et al. 1978, Sanders et al. 1979) и адипозную ткань (Clandinin et al. 1981).

Масла, композиции или рецептуры композиций (или любые продукты), раскрытие в настоящем изобретении, предпочтительно включают DPAn-6, DPAn-3 и/или DTAn-6 в количестве, которое составляет по крайней мере около 2 вес.%, или по крайней мере около 5 вес.%, или по крайней мере около 10 вес.%, или по крайней мере около 15 вес.%, или по крайней мере около 20 вес.%, или по крайней мере около 25 вес.%, или по крайней мере около 30 вес.%, или по крайней мере около 35 вес.%, или по крайней мере около 40 вес.%, или по крайней мере около 45 вес.%, или по крайней мере около 50 вес.% и т.д., с наращиванием по 1 вес.% (т.е. 2, 3, 4, 5,..) и вплоть до или по крайней мере около 95 вес.% или выше всех липидов в масле, композиции рецептуры. DHA и/или EPA также может быть включена в количестве, которое составляет по крайней мере около 2 вес.%, или по крайней мере около 5 вес.%, или по крайней мере около 10 вес.%, или по крайней мере около 15 вес.%, или по крайней мере около 20 вес.%, или по крайней мере около 25 вес.%, или по крайней мере около 30 вес.%, или по крайней мере около 35 вес.%, или по крайней мере около 40 вес.%, или по крайней мере около 45 вес.%, или по крайней мере около 50 вес.% и т.д., с наращиванием по 1 вес.% (т.е. 2, 3, 4, 5,..) и вплоть до или по крайней мере около 95 вес.% или выше всех липидов в масле, композиции, готовой форме или другом продукте.

Согласно еще одному воплощению масло, композиция, готовая форма или другой продукт включает около 30 вес.% или более, около 35 вес.% или более, около 40 вес.% или более, около 45 вес.% или более, около 50 вес.% или более, около 55 вес.% или более, около 60 вес.% или более, около 65 вес.% или

более, около 70 вес.% или более, около 75 вес.% или более, около 80 вес.% или более, около 85 вес.% или более, около 90 вес.% или более или около 95 вес.% или более сочетания DPA_n-6 и DHA. Предпочтительно соотношение DHA и DPA_n-6 в масле, композиции, готовой форме или другом продукте составляет между примерно 1:10 до около 10:1 или любое соотношение между 1:10 и 10:1.

Формы предоставления LCPUFA и оксилипинов

В соответствии с настоящим изобретением LCPUFA и/или их оксилипиновые производные, которые используются в маслах, добавках, косметических средствах, терапевтических композициях и других готовых формах или продуктах, описанные здесь, предоставляются во множестве форм. Например, такие формы включают, но не ограничиваются ими, масло водорослей, включающее LCPUFA и/или их оксилипиновые производные, предпочтительно получаемые, как описано здесь; растительное масло, включающее PUFA и/или ее оксилипиновые производные, предпочтительно получаемые, как описано здесь; триглицеридное масло, включающее PUFA; фосфолипиды, включающие PUFA; сочетание белка, триглицерида и/или фосфолипида, включающих PUFA; высушенные морские микроводоросли, включающие PUFA; сфинголипиды, включающие PUFA; сложные эфиры PUFA; свободную жирную кислоту; конъюгат PUFA еще с одной биоактивной молекулой; и их сочетания. Жирные кислоты с длинной цепью могут предоставляться в количествах и/или соотношениях, которые отличаются от количеств или соотношений, которые находятся в случае природных средств получения жирных кислот, таких как смешение, очистка, обогащение (например, с помощью приемов культивирования и/или переработки) и методы генной инженерии источника. Биоактивные молекулы могут включать любые подходящие молекулы, включая, но не ограничиваясь ими, белок, аминокислоту (например, встречающиеся в природе аминокислоты, такие как DHA-глицин, DHA-лизин, или аналоги аминокислот), лекарства и карбогидраты. Формы, описанные здесь, позволяют обеспечить гибкость при формировании пищевых продуктов высокого сенсорного качества, диетические или питательные добавки и фармацевтические агенты.

Согласно одному воплощению изобретения источник желаемых фосфолипидов включает очищенные фосфолипиды из яиц, растительных масел и животных органов, получаемые процессом экстракции полярными растворителями (включающими спирт или ацетон), таким как процесс Friolex, и процесс экстракции фосфолипидов (PEP) (или родственных процессов) для получения масел или композиций (питательные добавки, косметические средства, терапевтические рецептуры композиций), богатых DPA_n-6, и/или DPA_n-6, или происходящими из них докозаноидами, одними или в сочетании с DHA, и/или EPA, и/или происходящими из них оксилипинами. Процесс Friolex и родственные процессы описаны более подробно в патенте PCT/IB01/00841, озаглавленном "Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials" (Способ фракционирования масла и содержащих полярный липид нативных сырьевых материалов), заявлении 12 апреля 2001г., опубликованном как WO 01.76715 18 октября 2001г.; PCT/IB/00963, озаглавленном "Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials Using Alcohol and Centrifugation" (Способ фракционирования масла и содержащих полярный липид нативных сырьевых материалов с использованием спирта и центрифугирования), заявлении 12 апреля 2001г., опубликованном как WO 01/76385 18 октября 2001г.; и PCT/DE95/01065, озаглавленном, "Process for Extracting Native Products Which are not Water-Sluble From Native Substance Mixtures by Centrifugal Force" (Способ экстрагирования нативных продуктов, которые не являются водорастворимыми из смесей нативных веществ с помощью центробежной силы), заявлении 12 августа 1995г., опубликованном как WO 96/05278 22 февраля 1996г.; каждого из которых включен в данное описание в качестве ссылки.

Любые биологически приемлемые дозированные формы и их сочетания охватываются существом изобретения. Примеры таких дозированных форм включают без ограничения жевательные таблетки, быстрорастворяющиеся таблетки, шипучие таблетки, реконституируемые или воссоздаваемые порошки, эликсиры, жидкости, растворы, суппозитории, эмульсии, таблетки, многослойные таблетки, двуслойные таблетки, капсулы, мягкие желатиновые капсулы, твердые желатиновые капсулы, каплеты, ромбовидные таблетки (подушечки), жевательные подушечки, шарики, порошки, гранулы, частицы, микрочастицы, диспергируемые гранулы, каше, душе, суппозитории, кремы, местные средства, ингалянты, аэрозольные ингалянты, пластиры, ингалянты в виде частиц, имплантаты, хранилище имплантатов, перевариваемые средства, инъецируемые препараты, инфузии, средства здравоохранения, сладости, крупы, злаковые покрытия, пищевые продукты, питательные пищевые продукты, функциональные пищевые продукты и их сочетания. Препараты упомянутых выше дозированных форм хорошо известны специалистам в данной области. Предпочтительно пища (пищевой продукт), которая обогащена желаемыми LCPUFA и/или их оксилипиновыми производными, выбирается из группы, включающей, но не ограниченной ими, подвергнутые термической обработке продукты и смеси; жевательную резинку; злаки на завтрак; сырные продукты; орехи и продукты на основе орехов; желатины, пудинг и наполнители; мороженые продукты молочного производства; аналоги молочных продуктов; твердые и мягкие леденцы; мыла и смеси мыл; закуски; переработанный фруктовый сок; переработанный овощной сок; жиры и масла; рыбные продукты; растительно-белковые продукты; продукты из домашней птицы и мясные продукты.

Более конкретно, масла, содержащие LCPUFA и их оксилипиновые производные, и особенно с повышенными уровнями LCPUFA оксилипинов (и особенно докозаноидов), полезны в качестве диетиче-

ских или пищевых добавок в форме заполненных маслом капсул или обогащенных пищевых продуктов, напитков или детского питания (молочных смесей для младенцев) для усиления противовоспалительных свойств данных продуктов и/или для того, чтобы способствовать более сбалансированной иммунной функции по сравнению с достигаемой с помощью LCPUFA масла с низким содержанием или без LCPUFA оксилипина (и особенно докозаноида). Например, капсулы с LCPUFA маслами, обогащенными LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), и предпочтительно желатиновые капсулы для защиты от окисления, предоставляются для доставки как LCPUFA, так и содержимого, обогащенного LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), в пищевой добавке. При других применениях пищевые продукты и напитки, включающие, но не ограниченные ими, продукты молочного производства и молочные аналоги, подвергнутые термической обработке продукты и кондитерские изделия, переработанные мясные изделия и аналоги мяса, зерновые продукты и крупы или злаковые продукты, жидкие и энергетические напитки, включающие соки и напитки на основе сока, продукты на основе газированных или переработанных напитков или молочные смеси для младенцев, обогащаются LCPUFA маслами с повышенными уровнями LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов), увеличивая, тем самым, всасывание LCPUFA оксилипина (и, в частности, докозаноида) по сравнению с одними LCPUFA маслами, не обогащенными LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом). Еще в одном примере LCPUFA масла, обогащенные LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), могли микроинкапсулироваться перед обогащением пищевых продуктов, напитков или молочных смесей, снижая окисление/разложение LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов) и/или LCPUFA и улучшая органолептические свойства и срок службы обогащенного пищевого продукта/напитка или детской молочной смеси. Еще в одном примере масла, обогащенные LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), могли формулироваться в крем или эмульсию для топических применений для снижения воспаления или LCPUFA масла, обогащенные LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), могли формулироваться в фотозащитные или косметические средства, такие как кремы для лица или рук, увлажнятели, основы, глазные гели или кремы для бритья, снижая раздражение кожи или покраснение, аллергические реакции или отечность/эдему. Еще в одном примере более высокообогащенные или очищенные формы LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноида) или масла, богатые LCPUFA оксилипином (и, в частности, докозаноидом), могли использоваться в фармацевтических рецептурах для предотвращения или снижения симптомов состояний или заболеваний, ассоциированных с местными, системными, хроническими или острыми воспалительными реакциями или процессами.

Дополнительные компоненты

Согласно одному воплощению настоящего изобретения любые из источников LCPUFA и/или их оксилипиновых производных, включая любые масла или композиции, или рецептуры, содержащие такие LCPUFA или их оксилипиновые производные, могут предоставляться с одним или более дополнительными компонентами, которые могут быть применены в способе изобретения. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничиваются ими, любой дополнительный противовоспалительный агент, питательную добавку (например, витамины, минералы и другие питательные агенты, включающие нутрацевтические агенты), терапевтический агент или фармацевтический или питательный носитель (например, любой экспириент, разбавитель, средство доставки или соединения носителя и рецептуры, которые могут использоваться в соединении с фармацевтическими (включая терапевтические) композициями или питательными композициями).

Согласно одному предпочтительному воплощению LCPUFA и/или их оксилипиновые производные предоставляются наряду, с ацетилсалициловой кислотой (ASA), или аспирином, или любым другим противовоспалительным агентом.

Способы получения и оптимизации производства LCPUFA и происходящих из LCPUFA оксилипинов

Способы получения масел, содержащих LCPUFA (включая DHA и DPAn-6) с использованием микробной технологии описаны в технике. Патент США № 5130242 и патент США № 5340594 описывают способы получения богатых DHA и DPA липидов с помощью ферментации с использованием *Schizochytrium* spp. или *Thraustochytrium* spp. Публикация патентной заявки США № 2003/0161866 раскрывает процесс получения масел, содержащих DHA и DPAn-6, с помощью культивирования микроорганизма, принадлежащего к предположительному роду *Ullkenia*.

Способы получения содержащих LCPUFA масел растений и семян растений описываются, например, в патенте США № 6566583; публикации патентной заявки США № 2002/0194641, публикации патентной заявки США № 20040235127A1 и публикации патентной заявки США № 20050100995A1, так же, как и публикации Napier и Sayanova *Proceedings of the Nutrition Society* (2005), 64: 387-393; Robert et al., *Functional Plant Biology* (2005) 32: 473-479; или публикации патентной заявки США 2004/0172682.

Как обсуждалось выше, оксилипины, раскрытие в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью химического синтеза с использованием LCPUFA предшественников или могут синтезироваться полностью *de novo*. Способы химического синтеза оксилипиновых соединений известны в технике (например, см. Rodriguez and Spur (2004); Rodriguez and Spur, 2005; Guilford et al. (2004)). Кроме того, общие химические способы синтеза также известны в технике. Например, соединения настоящего изо-

бретения могут получаться с помощью как общепринятых приемов, так и приемов твердофазного синтеза, известных специалистам в данной области техники. Общепринятые приемы включают те, что описаны в патентах США №№ 5569769 и 5242940 и РСТ публикации № WO 96/37476, причем все указанные источники целиком включены в данное описание в качестве ссылки. Комбинаторные приемы синтеза могут, однако, быть особенно приемлемы для синтеза соединений настоящего изобретения. См., например, Brown, *Contemporary Organic Synthesis*, 1997, 216; Felder and Poppinger, *Adv. Drug Res.*, 1997, 30, 111; Balkenhohl et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, 35, 2288; Hermkens et al., *Tetrahedron*, 1996, 52, 4527; Hermkens et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 5643; Thompson et al., *Chem. Rev.*, 1996, 96, 555; и Nefzi et al., *Chem. Rev.*, 1997, 2, 449-472.

Соединения настоящего изобретения могут синтезироваться из легкодоступных исходных материалов. Различные заместители, имеющиеся в соединениях настоящего изобретения, могут присутствовать в исходных соединениях, заместители могут добавляться к любому из промежуточных соединений или добавляться после образования конечных продуктов с помощью известных методов по реакциям замещения или превращения. Если заместители сами по себе являются реакционноспособными, тогда сами заместители могут быть защищены согласно известным в технике приемам. В технике известно и применяется широкое разнообразие защитных групп. Примеры многих возможных групп можно найти в "Protective Groups in Organic Synthesis" by T.W. Green, John Wiley and Sons, 1981, содержание которой целиком включено в описание. Например, нитрогруппы могут вводиться нитрованием и нитрогруппа может превращаться в другие группы, такие как амино, восстановлением, и галоген, диазотированием амино-группы и ее заменой галогеном. Ацильные группы могут вводиться ацилированием по Фриделю-Крафтсу. Ацильные группы могут затем трансформироваться в соответствующие алкильные группы различными методами, включающими восстановление по Wolff-Kishner и восстановление по Клеменсону. Аминогруппы могут алкилироваться, образуя моно- и диялкиламиногруппы; а меркапто- и гидрокси-группы могут алкилироваться с образованием соответствующих простых эфиров. Первичные спирты могут окисляться окислителями, известными в технике, с образованием карбоновых кислот или альдегидов, а вторичные спирты могут окисляться с образованием кетонов. Таким образом, для предоставления широкого разнообразия заместителей по всей молекуле исходного материала, промежуточных соединений или конечного продукта, включая отделенные продукты, могут применяться реакции замещения или замены.

Поскольку соединения настоящего изобретения могут иметь некоторые заместители, которым необходимо присутствовать, производится введение каждого заместителя, конечно, в зависимости от конкретных заместителей и химических условий, необходимых для их образования. Таким образом, рассмотрение того, как один заместитель мог бы оказывать воздействие при химической реакции, когда образуется еще один заместитель, повлечет за собой соответствующие приемы, известные специалистам в данной области. Это будет дополнительно зависеть от вовлеченного в процесс кольца.

Альтернативно, оксилипины получаются каталитическим путем с помощью основанных на ферментах приемов с использованием LCPUFA в качестве субстрата. Согласно одному воплощению ферменты, такие как липоксигеназа, циклооксигеназы, цитохром Р450 ферменты и другие гемсодержащие ферменты, такие как описаны в табл. 1 (например, предоставляемые в виде рекомбинантных или изолированных/иммобилизованных ферментных препаратов), контактируются *in vitro* с LCPUFA, продуцируемыми организмом, во время экстракции или обработки после сбора биомассы микроорганизма, или растения, или масла семян, посредством чего LCPUFA, продуцируемые организмом, превращаются в оксилипины. Оксилипиновые производные LCPUFA могут также продуцироваться микроорганизмами в ферментере и выделяться и очищаться для использования. Предпочтительные методы производства и выделения оксилипинов, которые, как считают, увеличивают количество, качество и стабильность соединений, описаны ниже. Оксилипины, производимые с помощью любого из приведенных выше приемов производства, могут дополнительно перерабатываться и выделяться в виде производных оксилипинов или их солей для того, чтобы усиливать склонность к выделению, стабильности, абсорбции, биодоступности и/или эффективности, при желании. В дополнение к сказанному, оксилипины, производимые любым из описанных здесь приемов, могут использоваться для добавления других источников оксилипинов (например, очищенного LCPUFA масла) или предоставляться в виде любой композиции или рецептуры для использования в любых применениях, описанных здесь.

**Способы оптимизации производства концентраций LCPUFA оксилипина,
продуцируемого организмами, в маслах**

Условия производства или ферментации могут оптимизироваться для увеличения производства LCPUFA оксилипинов (и, в частности, доказаноидов) и/или для стабилизации после того, как они были получены. Эти методы включают выбор условий для культуры, которые увеличивают активность и/или экспрессию ферментов, продуцирующих данные соединения. Например, клеточный состав потенциально может изменять любое условие культивирования, которое изменяет концентрацию клеток и/или удельную скорость роста культуры. Условия культивирования, о которых известно, что они модифицируют продуцирование метаболитов или вторичных метаболитов в микроорганизмах, включают, но не ограничиваются ими, следующие: стресс от гипоосмотической или гиперосмотической солености, стресс от

ограничения питания (такого, как азот, фосфор, углерод и/или следы металлов), температурный стресс (более высокая или более низкая температура, чем обычно), повышенный или пониженный уровень кислорода и/или диоксида углерода и физические стрессы, такие как сдвиг. Кроме того, уровень метаболитов или вторичных метаболитов в клетках может меняться с фазой роста (по экспоненте против стационарной) и обеспечением различных предшествующих молекул для биопревращения микроорганизмом.

Данные методы включают также использование добавок, как органических, так и неорганических, которые увеличивают данную ферментативную активность или альтернативно непосредственно усиливают аутоокисление LCPUFA в данные соединения и/или стабилизируют LCPUFA оксилипины (и, в частности, докозаноиды), когда они получены. Например, к среде для культивирования могут добавляться соединения, которые модифицируют или ацетилируют COX2 (такие, как одна из многих форм ацетилсалициловой кислоты), или соединения, которые стимулируют экспрессию или активность COX2, липоксигеназы, цитохромом P450 ферментов (включая гидроксилазы, пероксидазы и оксигеназы) и/или других гемсодержащих ферментов. Примеры соединений, которые могут увеличивать экспрессию или активность липоксигеназ, циклооксигеназ, цитохрома P450 и других гемсодержащих ферментов в культуре, включают, но не ограничиваются ими, АТР, цитокины (например, интерлейкин-4, интерлейкин-13 или фактор, стимулирующий гранулоцитмакрофаг колонию), гормоны (например, брадикинин или 1,25-дигидроксивитамин D₃), катионные металлы (например, Ca²⁺), фосфолипиды (например, фосфатидилсерин), жирные кислоты (например, DHA), предварительно образованные гидропероксиды, глюокортикоиды (например, дексаметазон), нестероидные и противовоспалительные соединения (например, ацетилсалициловую кислоту или аспирин) и другие индукторы активностей цитохрома P450 (например, этанол, фибраты и другие пролифераторы пероксисма, феобарбитал, стероиды и рифампицин). Кроме того, предпочтитаются также соединения или условия, которые ведут к аутоокислению LCPUFA в микроорганизме, приводя в результате к образованию от моно- до пентагидроксипроизводных данных LCPUFA. Например, такие соединения или условия, которые могут промотировать аутоокисление LCPUFA, включают, но не ограничиваются ими, металлы (включая переходные металлы, такие как железо, медь или цинк, и щелочно-земельные металлы, такие как магний), перекиси, липидные радикалы и высококислородные условия.

Усовершенствованные процессы экстракции масла,
которые увеличивают содержание или сохранение LCPUFA оксилипина

Ферменты играют важную роль в образовании гидроксипроизводных LCPUFA, имеются предпочтительные способы усиления контакта между данными ферментами и LCPUFA для увеличения образования гидроксипроизводных. В одном предпочтительном процессе микробные клетки или семена масличной культуры разрушаются (например, с помощью гомогенизации для микробных клеток или с помощью дробления для семян масличных культур) и получающееся масло и смесь биомассы оставляются инкубироваться в течение какого-то периода времени в оптимальных условиях (например, температуры, pH, остаточной активности воды, концентрации ионов и присутствия любых необходимых совместных факторов), чтобы позволить ферментам высвободиться в биомассе для реакции непосредственно с LCPUFA. Аналогично, данным образом могут облегчаться процессы аутоокисления.

Модификация условий обработки масла

Предпочтительные способы обработки или переработки масла включают способы, которые сконцентрированы на минимальной обработке масла. С помощью процессов, используемых в общепринятой переработке семян масличных культур, стремятся удалить свободные жирные кислоты или соединения, подобные свободной жирной кислоте, и, тем самым, удалить подобные жирной кислоте гидроксипроизводные LCPUFA. В частности, следует избегать обработки масел каустической содой, сконцентрированной на удалении свободных жирных кислот (обычно называемой очисткой или рафинированием масла). Предпочтительно масло экстрагируется спиртом (например, изопропиловым спиртом), или другим органическим растворителем (например, гексаном), или их смесью, или сверхкритическими жидкостями (например, двуокисью углерода), и получающееся в результате масло фильтруется при охлаждении, отбеливается или осветляется, снова фильтруется при охлаждении, а затем дезодорируется. В более предпочтительном способе стадии фильтрования при охлаждении устраняются и масло просто отбеливается и дезодорируется после экстракции. И в еще более предпочтительном способе после экстракции масла ограничиваются единственной стадией обработки, а именно дезодорированием масла. В указанных выше способах экстракции для использования при экстрагировании масел предпочтительны спирты или спиртоводные смеси, а не использование таких органических растворителей, как гексан. В качестве альтернативы химической экстракции масло может отделяться от биомассы винтовым прессом или разрушением с последующим центрифугированием с использованием разделяющих вспомогательных средств переработки, таких как первичный спирт или носитель масла. Данные грубые масла могут очищаться и стабилизироваться с помощью одного или более методов, описанных выше.

Способы дополнительной обработки LCPUFA масла (микробного, растительного, рыбного)
для увеличения и/или стабилизации содержания LCPUFA оксилипина

Согласно одному предпочтительному способу после того, как масло экстрагировано и обработано по способу, описанному выше, или по любому подходящему способу, к маслу для того, чтобы способст-

вовать стабилизации LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов) в масле, могут добавляться антиоксиданты. Согласно еще одному предпочтительному способу антиоксиданты могут добавляться в один или более моментов в процессе экстракции и очистки, чтобы снизить до предела потенциальное окислительное разложение оксилипинов и/или LCPUFA. В дополнение к этому, оксилипины становятся более полярными молекулами, так как в них включается больше гидроксильных групп, масло может получаться в виде эмульсии для увеличения содержания/растворимости/стабильности как полярных, так и менее полярных форм LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов) и для облегчения их использования, например, в широком многообразии пищевых и фармацевтических применений по сравнению с формами, доступными для использования с одной формой ингредиента масла.

В предпочтительном поточном процессе богатое LCPIFA масло (на основе микробного, растительного или животного (включая рыбное)) или гидролизованная или омыленная форма масла может обрабатываться в реакционной системе на основе ферментов (например, на колонке или в реакторе с мешалкой) для облегчения ферментативного производства LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов) в масле. Ферменты могут присутствовать или в свободной, или иммобилизованной форме в данных системах. Примеры ферментов (включая липоксигеназы, циклооксигеназы, цитохром Р450 ферменты и другие гемсодержащие ферменты), которые могут использоваться в данных системах, перечислены в табл. 1. Реакционные условия, такие как температура, pH, активность остаточной воды, концентрация ионов и присутствие кофакторов, могут выбираться для максимизации скорости и степени превращения PUFA в липоксины. Масло может обрабатываться с помощью колонки/реактора или в масляной форме, или в виде гидролизованных свободных жирных кислот, которые получаются с помощью гидролиза PUFA-содержащих триглицеридов в масле с превращением PUFA из сложноэтерицированной формы в форму свободной кислоты.

В одном воплощении изобретения любое из масел, производимых с помощью любого из описанных здесь способов, может далее обрабатываться для отделения или очистки LCPUFA оксилипинов от LCPUFA в масле. Данный процесс может проводиться на маслах, которые были уже обработаны с помощью любого процесса рафинирования, включая масла или их продукты, которые были обработаны для превращения LCPUFA в масле в оксилипиновые производные. Например, LCPUFA оксилипины могут отделяться от LCPUFA с помощью любого подходящего приема, такого как прием любой хроматографии, включая, но не ограничиваясь ею, жидкостную хроматографию на силикагеле. В одном воплощении производимые LCPUFA оксилипины, обогащенные или очищенные с помощью процессов настоящего изобретения (включая любой из способов производства/обработки, описанных здесь, и/или синтез de novo), могут снова добавляться к (титрованному) еще одному маслу, такому как LCPUFA масло, производимое любым методом, и/или могут добавляться к любой композиции, или рецептуре, или другому продукту.

После того, как масла/жирные кислоты обработаны данным образом, масло/жирные кислоты могут использоваться непосредственно в областях пищевого, фармацевтического или косметического применения или могут использоваться для добавления (смещением) к LCPUFA- или не-LCPUFA-содержащим маслам для увеличения содержания в них LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов). Данным способом можно достичь стойкого содержания LCPUFA оксилипина (и, в частности, докозаноида) в конечном масляном продукте.

При использовании липоксигеназных ферментов в данных типах систем вплоть до 100% целевых LCPUFA может трансформироваться в их гидроксипроизводные. Примером такой системы является колонка с иммобилизованным ферментом, содержащая иммобилизованную 15-липоксигеназу. Когда DPA_n-6 обрабатывается в данной системе, DPA_n-6 трансформируется в гидропероксиды 17-гидроперокси DPA_n-6 и 10,17-дигидроперокси DPA_n-6, которые могут затем трансформироваться в гидроксипроизводные 17-гидрокси DPA_n-6 и 10,17-дигидрокси DPA_n-6, после восстановления таким агентом, как NaBH₄. Данная концентрированная форма LCPUFA оксилипинов (и, в частности, докозаноидов) может затем титроваться в соответствующее съедобное масло с достижением желаемого содержания LCPUFA оксилипина (и, в частности, докозаноида) в конечном масле.

Применение DPA_n-6, DPA_n-3 и/или DTAn-6 LCPUFA оксилипинов и масел или композиций, включающих DPA_n-6, DPA_n-3 и/или DTAn-6 и/или любых других LCPUFA оксилипинов

Настоящее изобретение основывается на применении LCPUFA, включающих DPA_n-6, DTAn-6 и/или DPA_n-3 и/или их оксилипиновых производных и/или различных масел, которые обогащены оксилипиновыми производными C20 и более высших PUFA, и особенно докозаноидами, для обеспечения противовоспалительного, антипролиферативного, нейропротекторного и/или вазорегуляторного эффектов у людей и других животных. Такие эффекты улучшают общее состояние здоровья индивидуума, так же, как и состояние при лечении или профилактике множества заболеваний и состояний индивидуума. Например, изобретение включает способы лечения метаболического дисбаланса и болезненных состояний, которые могли бы способствовать модуляции воспаления, обеспечиваемой композициями и маслами, содержащими LCPUFA и оксилипин, и особенно докозаноид, описанными здесь.

Дополнительные виды применения, охватываемые настоящим изобретением для применения любых LCPUFA и/или оксилипинсодержащих масел, композиций или рецептур, описанных в данном опи-

сании (предпочтительно включая DPA_n-6, DPA_n-3 или их оксилипиновые производные и применимую DTAn-6 или ее оксилипиновые производные, так же, как и масла и продукты, производимые с такими маслами, которые обогащены производными оксилипина), включают, но не ограничиваются следующими: (1) Rh⁺ несовместимость во время беременности; (2) воспалительные заболевания кишечника и желудочно-кишечного тракта (например, болезнь Крона, воспалительное заболевание пищеварительного тракта, колит и некротизирующий энтероколит у младенцев); (3) аутоиммунные заболевания (например, инсулинзависимый сахарный диабет (диабет типа I), рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, хроническую прогрессирующую миастению, болезнь, обусловленную чувствительностью к недостаточности глютена, аутоиммунный тироидит, болезнь Адисона, болезнь Трейва и ревматический кардит); (4) хронические болезни связанные с возрастом, которые вовлекают воспаление (например, сердечно-сосудистую болезнь, диабет типа II, связанную с возрастом макулярную дегенерацию, атопические заболевания, метаболический синдром, болезнь Альцгеймера, цистический фиброз, рак ободочной кишки и др.); (5) воспалительные заболевания кожи (например, дерматит (любую форму), экзему, псориаз, розовые угри, акне, гангренозную пиодермию, крапивницу и др.); (6) воспалительные заболевания глаз и (7) воспаление вследствие инфекционных болезней (бактериальных, грибковых, вирусных, паразитических и др.). Многие из них являются болезнями, при которых пациенты не хотят быть на стероидах или неспецифических противовоспалительных лекарствах вследствие негативных побочных эффектов.

Соответственно, одно воплощение настоящего изобретения относится к применению: (1) DPA_n-6, DPA_n-3 и/или их оксилипинового производного (докозаноида) и, в некоторых воплощениях, DTAn-6 и/или ее оксилипинового производного, по одному или в сочетании друг с другом и/или с другими LCPUFA и/или их оксилипиновыми производными (предпочтительно DHA или EPA и наиболее предпочтительно DHA); и/или (2) масла или продукта, производимого с использованием такого масла, в котором масло обогащено по количеству, качеству и/или стабильности содержащихся в нем LCPUFA оксилипина и предпочтительно докозаноидов. Применение данных композиций обычно обеспечивается маслом или продуктом с использованием такого масла, питательной добавки, косметической рецептуры или фармацевтической композиции (медикамента или лекарства). Такие масла, добавки, композиции и рецептуры могут применяться для уменьшения воспаления у пациента, у которого есть воспаление или который рискует развитием у него воспаления, или болезни, или состояния, связанного с воспалением. Такие масла, добавки, композиции и рецептуры могут также использоваться для снижения любых симптомов, относящихся к нейродегенерации, или болезни, связанной с нейродегенерацией у пациента, который имеет или рискует развитием у него нейродегенеративного состояния или болезни. В частности, пациент, подвергаемый лечению с использованием композиции изобретения, имеет воспаление, связанное с продуцированием эйкозаноидов и/или того, что обычно называют в технике "проводоспалительными" цитокинами. Такие цитокины включают, но не ограничиваются ими, интерлейкин-1 α (IL-1 α), IL-1 β , фактор некроза опухоли- α (TNF α), IL-6, IL-8, IL-12, макрофаг воспалительный протеин-1 α (MIP-1 α), макрофаг хемотактический протеин-1 (MCP-1) и интерферон- γ (IFN- γ). Пациенту вводят композицию, включающую какое-то количество таких LCPUFA и/или их оксилипиновых производных в количестве, эффективном для уменьшения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у пациента.

Симптомы воспаления включают как физиологические, так и биологические симптомы, включая, но не ограничиваясь ими, продуцирование цитокинов, продуцирование эйкозаноидов, продуцирование гистамина, брадикинина, простагландина, лейкотриена, лихорадку, отек или эдему или другие припухлости, боль (например, головные боли, мышечные боли, крампи (болезненные спазмы), боли суставов), озноб, усталость/утрату энергии, потерю аппетита, скованность мышц или суставов, красноту тканей, удержание жидкости и накопление клеточных медиаторов (например, нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и др.) в участке воспаления. Заболевания, связанные с воспалением, включают, но не ограничиваются ими, состояния, связанные с заражением инфицирующими агентами (например, бактериями, вирусами), шок, ишемию, сердечно-легочные заболевания, аутоиммунные заболевания, нейродегенеративные состояния, и аллергические воспалительные состояния, и различные другие заболевания, подробно описанные здесь. Примеры описывают применение докозаноидов настоящего изобретения для снижения воспаления *in vivo* и *in vitro*, измеряемого по многим параметрам воспалительной ответной реакции.

Симптомы, связанные с нейродегенерацией, включают как физиологические, так и биологические симптомы, включая, но не ограничиваясь ими, нейродегенерацию, интеллектуальные отклонения, расстройства поведения, нарушения сна, общие медицинские осложнения, деменцию, психоз, беспокойство, депрессию, воспаление, боль и дисфагию (расстройство глотания). Нейродегенеративные болезни, которые можно лечить с использованием оксилипиновых производных и композиций изобретения, включают, но не ограничиваются ими, шизофрению, биполярное расстройство, дислексию (способность к чтению заметно ниже ожидаемой), диспраксию (повреждение или патологическое функционирование какого-либо органа), расстройство гиперактивности в связи с дефицитом внимания (ADHD), эпилепсию, аутизм, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, старческое слабоумие, расстройство активации пероксисомно-

го пролифератора (PRAR), рассеянный склероз, нейропатию, вызываемую диабетом, нейропатию, макулярную дегенерацию, ретинопатию предсозревания, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS), пигментный ретинит, церебральный паралич, мышечную дистрофию, рак, цистический фиброз, пороки неврального канала, депрессию, синдром Zellweger, Lissencephaly, синдром Дауна, заболеваний мышц-глаз-головного мозга, синдром Walker-Warburg, болезнь Charcot-Marie-Tooth, миозит цитоплазматических телец (IBM) и аниридию.

В одном воплощении настоящего изобретения новые докозаноиды изобретения, и/или масла, или композиции, содержащие такие докозаноиды, используются для селективного нацеливания на особые провоспалительные цитокины и состояния или болезни, связанные с продуцированием данных цитокинов. На основе наблюдений авторов настоящего изобретения того, что конкретные докозаноиды изобретения могут селективно ингибировать некоторые цитокины, авторы настоящего изобретения предполагают, что такие докозаноиды могут использоваться при особых состояниях или заболеваниях для обеспечения более селективного лечения индивидуума и во избежание побочных эффектов, которые могут быть связаны с более глобальным ингибированием воспалительных процессов. Например, авторы настоящего изобретения показали, что DPAn-6 докозаноиды, 17-гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6, значительно снижают секрецию сильного провоспалительного цитокина IL-1 β , причем снижение, даваемой соединением 10,17-дигидрокси DPAn-6, является значительно большим, чем снижение, обеспечиваемой или DHA оксилипиновым производным, или обычным противовоспалительным агентом, индометацином. Еще более поразительными оказались наблюдаемые различия между активностями двух различных оксилипиновых производных DPAn-6. Как показано в примерах 20 и 21, хотя продемонстрировано, что и 17-HDPAn-6, и 10,17-дигидрокси DPAn-6 являются сильными противовоспалительными агентами, имеются различия между активностью данных двух DPAn-6 оксилипинов в их действии на продуцирование цитокина (например, IL-1 β), указывая на то, что одно соединение может быть более подходящим, чем другое, для конкретных применений (например, сепсис в сравнении с набуханием). В частности, 17-HDPAn-6 оказалась более сильной, чем происходящий из DHA оксилипин для ингибирования миграции клеток, а 10,17-дигидрокси DPAn-6 была более сильной, чем DHA оксилипин, для снижения секреции IL-1 β . Следовательно, специалисты в данной области могут выбирать докозаноиды настоящего изобретения для конкретных использований и снижать возможные побочные эффекты от лечения по сравнению с использованием более пан-специфических или общих противовоспалительных агентов.

Композиции и способ настоящего изобретения предпочтительно защищают пациентов от воспаления, или от состояния, или заболевания, связанного с воспалением. Используемое здесь выражение "защитить от заболевания" (или симптома, или состояния) относится к уменьшению симптомов заболевания; снижению числа случаев заболевания и/или снижению тяжести заболевания. Защита пациента может относиться к способности питательной или терапевтической композиции настоящего изобретения при введении пациенту предотвращать воспаление, и/или излечивать, или снимать воспаление и/или симптомы, признаки или причины болезни/состояния. Как таковая, защита пациента от болезни или состояния включает как предотвращение случаев заболевания или состояния (профилактическое лечение), так и лечение пациента, у которого уже есть заболевание или состояние или который испытывает первоначальные симптомы болезни или состояния (терапевтическое лечение). Термин "заболевание или болезнь" или "состояние" относится к любому отклонению от нормального здоровья животного и включает состояние, когда присутствуют симптомы болезни, так же, как и состояния, при которых произошло отклонение (например, заражение, генная мутация, генетический порок, и др.), но симптомы еще не проявляются.

Согласно настоящему изобретению оксилипины (или их аналоги или производные), композиции, включающие такие оксилипины, и способы изобретения являются подходящими для использования на любом индивидууме (субъекте), который является представителем класса позвоночных, млекопитающих, включая, без ограничения, приматов, домашний скот и домашних любимых животных (например, животное компаньон). Наиболее типично индивидуумом является человек. Согласно настоящему изобретению термины "пациент", "индивидуум" и "субъект" могут использоваться взаимозаменяющими и необязательно относятся к животному или лицу, которое является больным (т.е. термины могут означать здорового индивидуума или индивидуума, который не испытывает каких-либо симптомов болезни или состояния). В одном воплощении индивидуум, которому могут вводить или назначать оксилипин(ы), или композицию, или рецептуру, или масло настоящего изобретения, включает индивидуума, который рискует, у которого диагностировано или подозревается наличие воспаления или нейродегенерации или состояния или заболевания, относящихся к ним. Индивидуумами могут быть также здоровые особи, для которых оксилипины или композиции изобретения используются для усиления, поддержания или стабилизации здоровья индивидуума.

Количество LCPUFA или ее оксилипинового производного, вводимое индивидууму, может быть любым количеством, подходящим для предоставления желаемого результата снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации или защиты индивидуума от состояния или заболевания, связанного с таким воспалением или нейродегенерацией. В одном воплощении LCPUFA, такая как

DPA_n-6, вводится в дозе от примерно 0,5 до примерно 200 мг PUFA на кг веса тела индивидуума, хотя дозы не ограничиваются данными количествами. LCPUFA оксилипиновое производное или смесь оксилипиновых производных вводится в дозе от примерно 0,2 мкг до примерно 50 мг оксилипина на кг веса тела индивидуума, хотя дозы не ограничиваются данными количествами.

Хотя композиции и рецептуры изобретения могут вводиться топически или в виде инъецируемого препарата, наилучшим способом введения является оральное введение. Предпочтительно используемые здесь композиции и рецептуры вводятся субъектам в виде питательных добавок, и/или продуктов (включая пищевые продукты), и/или фармацевтических рецептур, и/или напитков, более предпочтительно пищевых продуктов, напитков и/или питательных добавок, более предпочтительно пищевых продуктов и напитков, более предпочтительно пищевых продуктов.

Как обсуждалось выше, в композиции, когда они вводятся или предназначаются субъекту, могут включаться дополнительные агенты, такие как противовоспалительные агенты, витамины, минералы, носители, эксципиенты и другие терапевтические агенты. Предпочтительным дополнительным агентом является аспирин или какой-либо другой подходящий противовоспалительный агент.

Оксилипины (или их аналоги, или производные, или соли), композиции, включающие такие оксилипины, и способы изобретения являются также подходящими для использования в качестве пищевых ингредиентов, питательных добавок или терапевтических агентов при применении аквакультуры на любом индивидууме (субъекте), который является представителем класса позвоночных, таких как рыба, или беспозвоночных, таких как креветки.

Следующие результаты экспериментов предоставляются с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема притязаний изобретения.

Примеры

Пример 1.

Следующий пример демонстрирует, что DPA_n-6 может полностью превращаться в моногидрокси-диеновое производное с помощью 15-липоксигеназы и превращается более эффективно, чем или DPA_n-3, или DHA.

15-Липоксигеназа соевых бобов (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) при конечной концентрации 4 мкг/мл примешивалась к 100 мкл растворам DHA, DPA_n-6 или DPA_n-3 (NuChek Prep, Elision, MN) в 0,05М натрийбогратном буфере, pH 9,0, и реакционные смеси инкубировались при 0°C. Появление моногидрокси-сопряженных диеновых производных жирной кислоты контролировалось с помощью абсорбции при 238 нм. Сопряженные диеновые продукты определялись количественно с использованием коэффициента экстинкции 28000 M⁻¹cm⁻¹ (Shimizu et al.; Methods in Enzymology, 1990, Vol. 187, 296-306). Как показано в примере 1, в данных условиях 100% DPA_n-6 эффективно превращалось в ее сопряженное диеновое производное, тогда как около 85% DPA_n-3 и 50% DHA превращались в их соответствующие сопряженные диеновые (моногидрокси) производные с помощью 15-липоксигеназы. В данных условиях реакции не происходило никакого заметного накопления дигидроксипроизводных.

Пример 2.

Следующий пример описывает основные 15-липоксигеназные продукты DHA.

DHA (100 мкМ, NuChek Prep, Elision, MN) инкубировалась с 15-LOX (4 мкг/мл) в 0,05М натрийбогратном буфере, pH 9,0, при 4°C при энергичном перемешивании в течение 30 мин. Реакционные продукты восстанавливались NaBH₄ (0,45 мг/мл), а затем экстрагировались на твердофазном C-18 картридже (Supelco Discovery DSC-19) с использованием для элюирования безводного этанола. Реакционные продукты анализировались с помощью LC/MS/MS с использованием инструмента высокоэффективной (или высокой разрешающей способности) жидкостной хроматографии (HPLC) Agilent 1100 серии (San Paulo, CA США), соединенного с масс-спектрометром с ионной ловушкой Esquire 3000, снабженным источником электрораспылительной ионизации (Bruker Daltonics, Billerica MA США). HPLC осуществлялась на LUNA C18(2) колонке (250×4,6 мм, 5 мкм, Phenomenex, Torrance CA, США) с использованием подвижной фазы, состоящей из 100 мМ ацетата аммония в 30% метаноле в воде с градиентом ацетонитрила, повышающимся с 48 до 90% на протяжении 50 мин (скорость потока 0,4 мл/мин). Масс-спектрометр эксплуатировался отрицательным ионодетекционным образом. В качестве распыляющего и осушающего газа использовался азот с давлением распылителя 20 фунт/кв.дюйм (1,406 кг/кв.см) и скоростью потока осушающего газа 7 л/мин. Температура поверхности раздела поддерживалась при 330°C.

На фиг. 2A изображены структуры моно- и дигидроксипродуктов данной реакции DHA. На фиг. 2B изображен MS/MS спектр моногидроксипродукта, показывающий молекулярный ион (m/z 343) и характерные фрагменты 17-гидрокси DHA. Вставка показывает УФ спектр данного соединения с ожидаемым пиком при 237 нм, характеристика сопряженного диена. На фиг. 2C и 2D изображены MS/MS спектры двух дигидроксипродуктов с показанными молекулярными ионами (m/z 359) и характерными фрагментами 10,17-гидрокси DHA (2C) и 7,17-дигидрокси DHA (2D). Вставки УФ спектра показывают ожидаемые триплетные пики при 270 нм, характеристика сопряженного триена для 10,17-дигидрокси DHA, и один пик при 242, характеристика двух пар сопряженных диенов, разделенных метиленовой группой, для 7,17-дигидрокси DHA.

Пример 3.

Следующий пример показывает основные 15-липоксигеназные продукты DPAn-6 и демонстрирует получение моно- и дигидроксипроизводных аналогично продуктам, получаемым из DHA (см. пример 2).

DPAn-6 обрабатывался 15-липоксигеназой и анализировался с помощью LC/MS/MS в условиях, описанных в примере 2. На фиг. 3А изображены структуры моно- и дигидроксиреакционных продуктов данной реакции DPAn-6/15-LOX. На фиг. 3В изображен MS/MS спектр моногидроксипродукта, показывающий молекулярный ион (m/z 345) и фрагменты, характерные для 17-гидрокси DPAn-6. Вставка показывает УФ спектр данного соединения с ожидаемым пиком при 237 нм, характерным для сопряженного диена. На фиг. 3С и 3Д изображены MS/MS спектры двух дигидроксипродуктов с молекулярными ионами (m/z 361) и указаны фрагменты, характерные для 10,17-дигидрокси DPAn-6 (3С) и 7,17-дигидрокси DPAn-6 (3Д). Вставки УФ спектра показывают ожидаемые триплетные пики при 270 нм, характеристика сопряженного триена для 10,17-дигидрокси DPAn-6, и один пик при 242, характеристика двух пар сопряженных диенов, разделенных метиленовой группой для 7,17-дигидрокси DPAn-6.

Пример 4.

Следующий пример показывает основные 15-липоксигеназные продукты DPAn-3 и демонстрирует получение моно- и дигидроксипроизводных аналогично продуктам, получаемым из DHA (см. пример 2) и DPAn-6 (пример 3).

DPAn-3 обрабатывался 15-липоксигеназой и анализировался с помощью LC/MS/MS в условиях, описанных в примере 2. На фиг. 4А изображены структуры моно- и дигидроксиреакционных продуктов данной реакции DPAn-3/15-LOX. На фиг. 4В изображен LC/MS спектр моногидроксипродукта, показывающий молекулярный ион (m/z 345) и фрагменты, характерные для 17-гидрокси DPAn-3. Вставка показывает УФ спектр данного соединения с ожидаемым пиком при 237 нм, характерным для сопряженного диена. На фиг. 4С и 4Д изображены MS/MS спектры двух дигидроксипродуктов с молекулярными ионами (m/z 361) и указаны фрагменты, характерные для 10,17-гидрокси DPAn-3 (4С) и 7,17-дигидрокси DPAn-3 (4Д).

Вставки УФ спектра показывают ожидаемые триплетные пики при 270 нм, характеристика сопряженного триена для 10,17-дигидрокси DPAn-3, и один пик при 242, характеристика двух пар сопряженных диенов, разделенных метиленовой группой, для 7,17-дигидрокси DPAn-3.

Пример 5.

Следующий пример показывает основные 15-липоксигеназные продукты DTAn-6 и демонстрирует получение моногидрокси и дигидроксипроизводных аналогично продуктам, получаемым из DHA (пример 2), DPAn-6 (пример 3) и DPAn-3 (пример 4).

DTAn-6 смешивался с 15-липоксигеназой и анализировался с помощью LC/MS/MS в условиях, описанных в примере 2. На фиг. 5А изображена структура моногидроксиреакционного продукта. На фиг. 5В изображен MS/MS спектр моногидроксипродукта, показывающий молекулярный ион (m/z 347) и фрагменты, характерные для 17-гидрокси DTAn-6. Вставка показывает УФ спектр, указывающий ожидаемый пик при 237 нм, характерный для сопряженного диена. На фиг. 5С изображены LC/MS спектры дигидроксипродукта с молекулярным ионом (m/z 361) и указаны фрагменты, характерные для 7,17-дигидрокси DTAn-6. Вставка УФ спектра показывает ожидаемый пик при 242 нм, характеристика двух пар сопряженных диенов, разделенных метиленовой группой.

Пример 6.

Следующий пример показывает структуру ферментативных продуктов, получаемых из DPAn-6 после последовательной обработки 15-липоксигеназой с последующей обработкой гемоглобином.

DPAn-6 (в концентрации 100 мкМ) смешивалась с 15-липоксигеназой соевых бобов (20 мкг/мл, конечная концентрация) с энергичным перемешиванием при 4°C. Продукты сразу же экстрагировались на Supelco Discovery DSC-19 картриджах с использованием для конечного элюирования безводного этанола. Полученные таким образом гидропероксипроизводные концентрировались до 1,5 мМ и использовались для последующих катализируемых гемоглобином реакций. Гидропероксипроизводные (конечная реакционная концентрация, 30 мкг/мл) смешивались с гемоглобином человека (300 мкг/мл, Sigma-Aldrich) в солевом растворе, буферируемом фосфатом Дульбекко при 37°C в течение 15 мин. Реакционная смесь подкислялась до pH 3 ледяной уксусной кислотой, и продукты очищались твердофазной экстракцией. Реакционные продукты анализировались с помощью LC-MS/MS. Фиг. 6 иллюстрирует докозаноидные продукты ферментативной реакции, о чем судят по масс-спектрам (не показаны).

Пример 7.

Следующий пример показывает основные 5-липоксигеназные продукты DHA.

К 10 мл реакционной смеси, содержащей 100 мкМ DHA (NuChek Prep, Elysian, MN) в 0,05M NaMES буфере, pH 6,3, 100 мкМ SDS и 0,02% C₁₂E₁₀, добавлялось 200 мкл 10 ед./мкл картофельной 5-липоксигеназы (Cayugaen Chemocals, Minneapolis, MN). Реакция протекала в течение 30 мин при 4°C, и реакционные продукты восстанавливались добавлением 1 мл 0,5 мг/мл NaBH₄. Реакционные продукты экстрагировались с использованием C-18 картриджей и анализировались с помощью LC/MS/MS, как описано в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определенные по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 7).

Пример 8.

Следующий пример показывает основной 5-липоксигеназный продукт DPAn-6 и показывает получение моногидроксипроизводного аналогично 5-LOX продуктам DHA (пример 7).

DPAn-6 (100 мкМ) обрабатывалась 55-липоксигеназой, как описано в примере 7. Реакционные продукты анализировались с помощью LC/MS/MS, как в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определенные по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 8).

Пример 9.

Следующий пример показывает основные 5-липоксигеназные продукты DPAn-3 и показывает получение моно- и дигидроксипроизводных аналогично 5-LOX продуктам DHA (пример 7).

DPAn-3 (100 мкМ) обрабатывалась 5-липоксигеназой, как описано в примере 7. Реакционные продукты анализировались с помощью LC/MS/MS, как в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определенные по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 9).

Пример 10.

Следующий пример показывает основные 12-липоксигеназные продукты DHA.

Для ферментной реакции 100 мкл 0,75 ед./мкл 12-липоксигеназы, происходящей из лейкоцитов свиньи (Caymen Chemicals, Minneapolis, MN), добавлялось к 10 мл раствора, содержащим 100 мкМ DHA (NuChek Prep, Elysian, MN) в 0,1М Трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ EDTA и 0,03% Твин-20. Реакция продолжалась на протяжении 30 мин при 4° С, и реакционные продукты восстанавливались добавлением 1 мл 0,5 мг/мл NaBH₄. Реакционные продукты экстрагировались с использованием C-18 картриджей в твердой фазе и анализировались с помощью LC/MS/MS, как описано в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определяемые по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 10).

Пример 11.

Следующий пример показывает основные 12-липоксигеназные продукты DPAn-6 и показывает получение моно- и дигидроксипроизводных аналогично производным, получаемым по реакции DHA/12-LOX (пример 10).

DPAn-6 (100 мкМ) обрабатывалась 12-липоксигеназой, как описано в примере 10. Реакционные продукты анализировались с помощью LC/MS/MS, как в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определенные по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 11).

Пример 12.

Следующий пример показывает основные 12-липоксигеназные продукты DPAn-3 и показывает получение моно- и дигидроксипроизводных аналогично производным, получаемым по реакции DHA/12-LOX (пример 10) и по реакции DPAn-6/12-LOX (пример 11).

DPAn-3 (100 мкМ) обрабатывалась 12-липоксигеназой, как описано в примере 10. Реакционные продукты анализировались с помощью LC/MS/MS, как в примере 2. Показаны основные продукты реакции, определяемые по тандемной масс-спектроскопии наряду с диагностическим молекулярным ионом и фрагменты (фиг. 12).

Пример 13.

Следующий пример описывает масс-спектральный анализ оксилипинов в DHA/DPAn-6 LCPUFA масле водорослей.

Получаемое из водорослей DHA+DPAn-6 масло (0,5 г), разбавленное 1,5 мл гексана, пропускалось через 15 мм×200 мм силикагельную колонку с использованием увеличивающихся концентраций этилацетата в гексане для элюирования различных классов липидов. Фракции, содержащие липиды, идентифицировались с помощью тонкослойной хроматографии (TCX) с использованием смеси петролейный эфир: этиловый эфир: уксусная кислота (80:20:1) в качестве подвижной фазы, а затем дополнительно сортировались на моно- и дигидроксидокозаноиды (*m/z* 343, 345, 359 или 361) с использованием LC/MS на жидкостном хроматографе модели 1100 Hewlett Packard, оборудованном ионизацией с электрораспылением (ESI) и масс-селективным детектором модели 1100 Hewlett Packard (MSD). Фракции, содержащие гидроксилдокозаноидные продукты, сливались, концентрировались и далее анализировались с помощью тандемной масс-спектроскопии (MS/MS) на приборе API QSTAR® Pulsar i Hybrid (с тройным квадрупольным временем гибридизации в потоке) LC/MS/MS (устройство для масс-спектроскопии Colorado University). Образец вводился с использованием непосредственного вливания в источник ESI (ионизация с электрораспылением), использующий отрицательную ионизацию.

На фиг. 18А изображена MS общая ионная хроматограмма (TIC) докозаноидной фракции, показывающая присутствие моногидрокси DPA (HDPA), и дигидрокси DPA (ди-HDPA) (*[M-H]* 345 и 361 *m/z*, соответственно), и моногидрокси DHA (HDHA, *[M-H]* 343 *m/z*) наряду с фрагментами, соответствующими *[M-H]-H₂O*, *[M-H]-CO₂* и *[M-H]-H₂O/CO₂*, которые являются характерными фрагментами данных соединений.

На фиг. 18В изображены MS/MS спектры моногидрокси DPAn-6 (*[M-H]* 345 *m/z*), показывающие

характерные $[M-H] \cdot H_2O$, $[M-H] \cdot CO_2$ и $[M-H] \cdot H_2O/CO_2$ фрагменты наряду с m/z 245 и 201 фрагментами, указывающими на присутствие 17-HDPA-6 в масле.

На фиг. 18С изображен MS/MS дигидрокси DPAn-6 с характерными фрагментами, соответствующими $[M-H] \cdot H_2O$ (m/z 343), $[M-H] \cdot CO_2$ (m/z 317) и $[M-H] \cdot H_2O/CO_2$ (m/z 299), $[M-H] \cdot 2 H_2O/CO_2$ (m/z 281), и фрагментами, указывающими на присутствие 10,17-дигидрокси DPAn-6 (m/z 261- H_2O/CO_2 ; 153).

Пример 14.

Следующий пример показывает результаты исследования отека на лапе крысы, при котором животным давали при кормлении различные сочетания LCPUFA.

Взрослым самцам крыс Sprague Dawley ($n=10$ /группа обработки или лечения) скармливали модифицированные AIN-76 корма, составленные так, что они включали 1,2% DHA, 1,2% DHA+0/44% DPAn-6 или 1,2% DHA+0,46% арахидоновой кислоты (ARA), в течение 4 недель. Чтобы вызвать отек задних лап, использовался каррагенан (1%) на 14 день кормления (левая лапа) и на 28 день (правая лапа). Отек изменился плетизмографически с использованием замены водой через 3 ч после инъекции. Значения 28 дня (\pm ст.откл.) показаны на фиг. 19. Аналогичные результаты получены на 14 день. $*p\leq 0,05$.

Фиг. 19 показывает, что масло, содержащее сочетание DHA и DPAn-6, давало статистически значительно лучшее уменьшение объема отека, чем одна DHA или DHA и ARA. На данной модели омега-6 жирная кислота ARA полностью изменяла противовоспалительную активность DHA.

Пример 15.

Следующий пример демонстрирует сильное противовоспалительное действие DPAn-6-производных оксилипинов 17-гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6 на модели мышей с дорзальным воздушным дивертикулом. Чистый 17R-гидрокси DHA (17R-HDHA) закупали у фирмы Caymen Chemicals (Ann Arbor, MI). Докозаноиды 17-гидрокси DPAn-6 (17-HDPA-6) и 10,17-дигидрокси DPAn-6 (10,17-HDPA-6) синтезировали биогенно из DPAn-6 (NuChek Prep, Elysian, MN) с использованием соевой липоксигеназы (Sigma-Aldrich) и очищали с помощью HPLC, как описано в примере 2. Органические растворители выпаривались, и соединения повторно растворялись в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), стерилизовались на фильтре, и концентрации доводились до 1000 нг/мл с использованием коэффициентов молярной экстинкции 28000 и 40000 $M^{-1}cm^{-1}$, соответственное для моно- и дигидроксидокозаноидов. Самкам мышей C57/B16 ($n=10$ мышей на группу) инъектировали подкожно стерильный воздух в области спины для инициирования дорзальных воздушных дивертикулов. Спустя 6 дней с помощью инъекции внутрь дивертикула вводили 0,9 мл стерильного PBS с последующим введением 100 нг докозаноида в 0,1 мл PBS или одного PBS. Данная инъекция сопровождалась в пределах 5 мин инъекцией внутрь дивертикула 100 нг мышного рекомбинантного TNF α (Peprotech, Inc, NJ, США) в 0,1 мл PBS. Контрольные животные не получали никакого TNF α . В качестве положительного контроля за 30 мин до введения TNF α интраперitoneально вводили 2 мг/кг индометацина (Calbiochem, San Diego, CA). Спустя 4 ч после введения TNF α экссудаты воздушного дивертикула удалялись и клетки окрашивались раствором Turk'a и подсчитывались. Экссудаты замораживались для более поздних анализов цитокина с использованием промышленных наборов или комплектов ELISA. Коридор ошибок представляет значения (\pm ст.откл.) группы ($n=10$). Группы сравнивали с использованием теста Стьюдента, p величины указаны.

Фиг. 20А показывает общую миграцию клеток в экссудаты воздушного дивертикула. 17-Гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6 приводили в результате к значительным снижениям общего числа клеток в дивертикуле вследствие уменьшения как числа нейтрофилов, так и макрофагов (не показано). 17-гидрокси DPAn-6 была более сильной, чем как 17R-гидрокси DHA, так и индометацин, по снижению клеточной инфильтрации.

Фиг. 20В показывает концентрации IL-1 β в экссудатах воздушного дивертикула. Как 17-гидрокси DPAn-6, так и 10,17-дигидрокси DPAn-6 приводили в результате к значительным снижениям секреции сильного провоспалительного цитокина IL-1 β , при этом снижение, даваемое 10,17-гидрокси DPAn-6, было значительно больше, чем снижение, даваемое или оксилипиновым производным DHA, или индометацином.

Фиг. 20С показывает концентрации макрофагового хемотактического протеина-1 (MCP-1) в экссудатах воздушного дивертикула. Как 17-гидрокси DPAn-6, так и 10,17-дигидрокси DPAn-6 приводили в результате к значительным снижениям секреции данного хемоаттрактантного цитокина, и оба соединения приводили в результате к большему ингибированию MCP-1, чем индометацин.

Фиг. 20А-С показывают, что два оксилипиновых производных DPAn-6 17-гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6 являются сильными противовоспалительными агентами, приводящими к пониженной иммунной клеточной миграции на данной модели воспаления. Снижение ключевых провоспалительных цитокинов может способствовать данной противовоспалительной активности.

Примечательно, существуют различия между активностью данных двух DPAn-6 оксилипинов в отношении их действия на продуцирование цитокина (например, IL-1 β), что говорит о том, что одно соединение может быть более подходящим, чем другое, для конкретных применений (например, сепсис в сравнении с отечностью). 17-Гидрокси DPAn-6 является более сильной, чем DHA-производный оксилипин в отношении ингибирования клеточной миграции, а 10,17-дигидрокси DPAn-6 является более силь-

ной, чем DHA оксилипин, в отношении снижения секреции IL-1 β .

Пример 16.

Следующий пример показывает противовоспалительное действие DHA- и DPAn-6-производных докозаноидов на культуре клеток.

Действие докозаноидов на продуцирование TNF α -индуцируемого IL-1 β глиальными клетками: глиальные клетки человека (DBGTRG-05MG, ATCC, Manassas, VA) культивировались в течение 24 ч в 96-луночных чашках для культуры (10^5 клеток на лунку) в 0,2 мл RPMI-среды, содержащей добавки и сыворотку (как, описывается ATCC), после чего среда заменялась свежей средой, содержащей докозаноиды или носитель (PBS), с последующим в пределах 5 мин добавлением человеческого рекомбинантного TNF α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в конечной концентрации 100 нг/мл. Клетки инкубировались в течение 17 ч перед тем, как супернатанты удалялись, и клетки лизировались 0,2% Тритоном-X100 в PBS. Клеточные лизаты анализировались на IL-1 β с использованием промышленного комплекта ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) (фиг. 21). Коридор ошибок представляет значения ($n=3$) \pm ст.откл. * $p=0,06$ в сравнении с контролем с использованием t-теста Стьюдента. 17-HDHA: 17R-гидрокси DHA; 17HDPAn-6: 17-гидрокси DPAn-6; 10, 17-диHDPAn-6: 10,17-дигидрокси DPAn-6.

Пример 17.

Следующий пример дополнительно иллюстрирует противовоспалительное действие 10,17-дигидрокси DPAn-6 на лимфоциты человека в культуре и демонстрирует, что дигидрокси DPAn-6 соединение является более сильным, чем DHA аналог (10,17-дигидрокси DHA) по снижению секреции TNF α Т лимфоцитами, стимулируемыми анти-CD3/анти-CD28 антителами.

Фиг. 22А: действие докозаноидов на секрецию TNF α Т лимфоцитами человека. Анализ проводился, по существу, как описано в публикации Ariel et al., 2005. Вкратце, моноядерные клетки периферической крови человека отделялись от венозной крови с использованием градиента Ficoll-Paque™ Плюс (Amersham biosciences). Т лимфоциты отделялись с использованием колонки для обогащения Т клетками человека (R&D Systems) согласно инструкциям производителя. Очищенные Т клетки обрабатывались 10,17-дигидрокси DPAn-6, или 10,17-дигидрокси DHA, или носителем (0,05% этанол) в RPMI-1640 средах, содержащих 10% инактивируемую теплом плодную бычью сыворотку, в течение 6 ч при 37°C. Лимфоциты (200000 клеток в 200 мкл средах на лунку) затем переносились на 96-луночные планшеты, покрытые как анти-CD3 антителами, так и анти-CD28 антителами (100 мкл 2 мкг/мл каждого из антител на протяжении ночи для покрытия лунок), и инкубировались в течение 41 ч. Концентрации TNF α определялись в клеточных супернатантах с помощью ELISA (R&D Systems). Значения группы \pm ст.откл. ($n=4$) сравнивались с помощью t-теста Стьюдента. * $p<0,05$ и ** $p<0,01$ в сравнении с контролем; # указывает на статистическое различие ($p=0,037$) между группами, обрабатываемыми 10,17-дигидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DHA при 10 нМ концентрациях.

Фиг. 22В показывает концентрации TNF α в супернатантах от лимфоцитов, не обрабатываемых докозаноидами, которые культивировались в непокрытых лунках или в лунках, покрытых только анти-CD3 антителами, только анти-CD28 антителами или сочетанием двух видов антител.

Ссылки

Ariel et al. (2005). The docosoatriene prototectin D1 is produced by Th2-skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid-raft clustering. JBC Papers in Press, Manuscript M509796200.

Arita et al. (2005a). The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: Novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 (in press).

Arita et al. (2005b). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 (21): 7671-6.

Arita et al. (2005c). Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. J. Exp. Med. 201 (5): 713-22.

Bannenberg et al. (2005a). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J. Immunol. 174 (7): 4345-55. Erratum in: J. Immunol. 2005 May 1; 174 (9): 5884.

Bannenberg et al. (2005b). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J. Immunol. 174 (7): 4345-55.

Bazan (2005a). Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. Mol. Neurobiol. 32 (1): 89-103.

Bazan (2005b). Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. Brain Pathol. (2): 159-66.

Bazan et al. (2005). Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. Ann. NY Acad. Sci. 1053: 137-47.

Belayev et al. (2005). Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. Stroke. 36 (1): 118-23.

Bouarab et al. (2004). The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid

and octadecanoid pathways. *Plant. Physiol.* 135: 1838-1848.

Butovich et al. 2005. On the structure, synthesis and mechanism of formation of neuroprotectin D1-a novel antiinflammatory compound of docosahexaenoic acid family. *J. Lipid Res.* 2005 (in press).

Chen & Bazan (2005). Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77 (1-4): 65-76.

Flower and Perretti (2005). Controlling inflammation: a fat chance? *J. Exp. Med.* 201 (5): 671-4.

Gerwick (1994). Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1221: 243-255.

Gerwick & Bernart (1993). Eicosanoids and related compounds from marine algae. Pages 101-150 in Zaborski and Attaway (eds) *Marine Biotechnology Vol. 1: Pharmaceutical and bioactive products*. Plenum Press, NY.

Gerwick et al. 1993. Biologically active oxylipins from seaweeds. *Hydrobiologia* 260/261: 653-665. Gilroy et al. (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Reviews* 3: 401-416.

Guilford et al. (2004). Novel 3-oxa lipoxin A4 analogues with enhanced chemical and metabolic stability have antiinflammatory activity in vivo. *J. Med. Chem.* 2004 Apr. 8;47 (8): 2157-65.

Hong et al. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *Autacoids in anti-inflammation. J. Biol. Chem.*, 278 (17): 14677-87.

Lukiw et al. (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 2005 (in press).

Marcjeselli et al. (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and proinflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 278 (44): 43807-17.

Meydani (1990). Dietary modulation of cytokines and biological functions. *Nutrition Reviews* 48: 361-367.

Mukherjee et al. (2004). Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (22): 8491-6.

Rodriguez and Spur (2004). First total synthesis of 7(S),16(R),17(S)-Resolvin D2, a potent anti-inflammatory lipid mediator. *Tetrahedron Letters* 45: 8717-8720.

Rodriguez and Spur (2005). First total synthesis of 7(s),17(S)-Resolvin D5, a potent anti-inflammatory docosanoid. *Tetrahedron Letters* 46 (21): 3623-7.

Rorrer et al. (1996). Development and bioreactor cultivation of a novel semidifferentiated tissue suspension derived from the marine plant *Acrosiphonia coalita*. *Biotechnology and Bioengineering* 49: 559-567.

Rorrer et al. (1997). Production of hydroxyl fatty acids by cell suspension cultures of the marine brown alga *Laminaria saccharina*. *Phytochemistry* 46 (5): 871-877.

Serhan et al. (2004a). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids.* 39 (11): 1125-32.

Serhan et al. (2004b). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73 (3-4): 155-72.

Simopoulos (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (6): 495-505.

Ye et al. (2002). Cytochrome P-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels. *J. Pharmacol. Therapeut.* 303 (2): 768-76.

Каждый из литературных источников, описанных или цитированных здесь, включен целиком в описание в качестве ссылки.

Хотя подробно описаны различные воплощения настоящего изобретения, специалистам в данной области очевидно, что могут иметь место модификации и адаптации данных воплощений. Следует четко понимать, однако, что такие модификации и адаптации охватываются рамками объема настоящего изобретения, представленного в следующих пунктах формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный докозаноид докозапентаеновой кислоты (DPA_n-6).

2. Изолированный докозаноид по п.1, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DPA_n-6, дигидроксипроизводных DPA_n-6 и тригидроксипроизводных DPA_n-6.

3. Изолированный докозаноид по п.1, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPA_n-6; 8-гидрокси DPA_n-6; 10-гидрокси DPA_n-6; 11-гидрокси DPA_n-6; 13-гидрокси DPA_n-6; 14-гидрокси DPA_n-6; 17-гидрокси DPA_n-6; 7,17-дигидрокси DPA_n-6; 10,17-дигидрокси DPA_n-6; 13,17-дигидрокси DPA_n-6; 7,14-дигидрокси DPA_n-6; 8,14-дигидрокси DPA_n-6; 16,17-дигидрокси DPA_n-6; 4,5-дигидрокси DPA_n-6; 7,16,17-тригидрокси DPA_n-6 и 4,5,17-тригидрокси DPA_n-6 или ее аналога, производного или соли.

4. Изолированный докозаноид докозапентаеновой кислоты (DPA_n-3).

5. Изолированный докозаноид по п.4, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докоза-

ноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DPAn-3, дигидроксипроизводных DPAn-3 и тригидроксипроизводных DPAn-3.

6. Изолированный докозаноид по п.5, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPAn-3; 10-гидрокси DPAn-3; 11-гидрокси DPAn-3; 13-гидрокси DPAn-3; 14-гидрокси DPAn-3; 16-гидрокси DPAn-3; 17-гидрокси DPAn-3; 7,17-дигидрокси DPAn-3; 10,17-дигидрокси DPAn-3; 8,14-дигидрокси DPAn-3; 16,17-дигидрокси DPAn-3; 13,20-дигидрокси DPAn-3; 10,20-дигидрокси DPAn-3 и 7,16,17-тригидрокси DPAn-3 или ее аналога, производного или соли.

7. Изолированный докозаноид докозатетраеновой кислоты (DTAn-6).

8. Изолированный докозаноид по п.7, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DTAn-6, дигидроксипроизводных DTAn-6 и тригидроксипроизводных DTAn-6.

9. Изолированный докозаноид по п.8, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DTAn-6; 10-гидрокси DTAn-6; 13-гидрокси DTAn-6; 17-гидрокси DTAn-6; 7,17-дигидрокси DTAn-6; 10,17-дигидрокси DTAn-6; 16,17-дигидрокси DTAn-6 и 7,16,17-тригидрокси DTAn-6 или ее аналога, производного или соли.

10. Изолированный докозаноид C22 полиненасыщенной жирной кислоты, в котором докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 4,5-эпокси-17-гидрокси DPA; 7,8-эпокси DHA; 10,11-эпокси DHA; 13,14-эпокси DHA; 19,20-эпокси DHA; 13,14-дигидрокси DHA; 16,17-дигидрокси DTAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTAn-6; 4,5,17-тригидрокси DTAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTAn-3; 16,17-дигидрокси DTAn-3; 16,17-дигидрокси DTRAn-6; 7,16,17-тригидрокси DTRAn-6; 4,5-дигидрокси DTAn-6 и 10,16,17-тригидрокси DTRAn-6 или ее аналога, производного или соли.

11. Композиция, включающая по крайней мере один докозаноид, заявленный в любом одном из пп.1-10.

12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что композиция является терапевтической композицией.

13. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что композиция является питательной композицией.

14. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что композиция является косметической композицией.

15. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она дополнительно включает аспирин.

16. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она дополнительно включает соединение, выбранное из группы, состоящей из DPAn-6, DPAn-3, DTAn-6, DHA, EPA, оксилипинового производного DHA и оксилипинового производного EPA.

17. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она дополнительно включает по крайней мере один агент, выбранный из группы, состоящей из статина, нестериоидного противовоспалительного агента, антиоксиданта и нейропротекторного агента.

18. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

19. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она включает масло, выбранное из группы, состоящей из микробного масла, масла семян растений и масла водных животных.

20. Масло, включающее по крайней мере около 10 мкг докозаноида на грамм масла.

21. Масло по п.20, отличающееся тем, что оно включает по крайней мере около 20 мкг докозаноида на грамм масла.

22. Масло по п.20, отличающееся тем, что оно включает по крайней мере около 50 мкг докозаноида на грамм масла.

23. Масло по п.20, отличающееся тем, что оно включает по крайней мере около 100 мкг докозаноида на грамм масла.

24. Масло по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что докозаноид выбран из полиненасыщенной жирной кислоты, выбранной из группы, состоящей из докозатетраеновой кислоты (DTAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-3), докозагексаеновой кислоты (DHA) и эйкозапентаеновой кислоты (EPA).

25. Масло по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что докозаноид выбран из полиненасыщенной жирной кислоты, выбранной из группы, состоящей из докозатетраеновой кислоты (DTAn-6), докозапентаеновой кислоты (DPAn-6) и докозапентаеновой кислоты (DPAn-3).

26. Масло по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что докозаноид выбран из докозапентаеновой кислоты (DPAn-6).

27. Масло по п.26, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DPAn-6, дигидроксипроизводных DPAn-6 и тригидроксипроизводных DPAn-6.

28. Масло по п.26, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPAn-6; 8-гидрокси DPAn-6; 10-гидрокси DPAn-6; 11-гидрокси DPAn-6; 13-гидрокси DPAn-6; 14-гидрокси DPAn-6; 17-гидрокси DPAn-6; 7,17-дигидрокси

DPA_n-6; 10,17-дигидрокси DPA_n-6; 13,17-дигидрокси DPA_n-6; 7,14-дигидрокси DPA_n-6; 8,14-дигидрокси DPA_n-6; 16,17-дигидрокси DPA_n-6; 4,5-дигидрокси DPA_n-6; 7,16,17-тригидрокси DPA_n-6 и 4,5,17-тригидрокси DPA_n-6 или ее аналога, производного или соли.

29. Масло по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что докозаноид выбран из докозапентаеновой кислоты (DPA_n-3).

30. Масло по п.29, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DPA_n-3, дигидроксипроизводных DPA_n-3 и тригидроксипроизводных DPA_n-3.

31. Масло по п.29, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPA_n-3; 10-гидрокси DPA_n-3; 11-гидрокси DPA_n-3; 13-гидрокси DPA_n-3; 14-гидрокси DPA_n-3; 16-гидрокси DPA_n-3; 17-гидрокси DPA_n-3; 7,17-дигидрокси DPA_n-3; 10,17-дигидрокси DPA_n-3; 8,14-дигидрокси DPA_n-3; 16,17-дигидрокси DPA_n-3; 13,20-дигидрокси DPA_n-3; 10,20-дигидрокси DPA_n-3 и 7,16,17-тригидрокси DPA_n-3 или ее аналога, производного или соли.

32. Масло по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что докозаноид выбран из докозатетраеновой кислоты (DTA_n-6).

33. Масло по п.32, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DTA_n-6, дигидроксипроизводных DTA_n-6 и тригидроксипроизводных DTA_n-6.

34. Масло по п.32, отличающееся тем, что докозаноидом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DTA_n-6; 10-гидрокси DTA_n-6; 13-гидрокси DTA_n-6; 17-гидрокси DTA_n-6; 7,17-дигидрокси DTA_n-6; 10,17-дигидрокси DTA_n-6; 16,17-дигидрокси DTA_n-6 и 7,16,17-тригидрокси DTA_n-6 или ее аналога, производного или соли.

35. Масло по любому из пп.20-34, отличающееся тем, что масло выбрано из группы, состоящей из микробного масла, масла семян растений и масла водных животных.

36. Композиция, включающая масло, заявленное в любом из пп.20-35.

37. Композиция по п.36, отличающаяся тем, что она является терапевтической композицией.

38. Композиция по п.36, отличающаяся тем, что она является питательной композицией.

39. Композиция по п.36, отличающаяся тем, что она является косметической композицией.

40. Композиция, включающая полиненасыщенную жирную кислоту с длинной цепью, выбранную из группы, состоящей из DPA_n-6, DPA_n-3, и DTA_n-6, и фармацевтически или питательно приемлемого носителя.

41. Композиция по п.40, отличающаяся тем, что она дополнительно включает аспирин.

42. Композиция по п.40, отличающаяся тем, что она дополнительно включает фермент, который катализирует получение докозаноидов из указанной DPA_n-6, DTA_n-6 или DPA_n-3.

43. Способ предотвращения или снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума, включающий введение индивидууму, который подвержен риску, или которому поставлен диагноз, или который подозревается в наличии у него воспаления или нейродегенерации или состояния или заболевания, связанных с ними, агента, выбранного из группы, состоящей из DPA_n-6, DPA_n-3, оксилипинового производного DPA_n-6 и оксилипинового производного DPA_n-3, для снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума.

44. Способ по п.43, отличающийся тем, что агент является эффективным для снижения продуцирования фактора некроза опухоли- α (TNF- α) Т лимфоцитами.

45. Способ по п.43, отличающийся тем, что агент является эффективным для снижения миграции нейтрофилов и макрофагов в участок воспаления.

46. Способ по п.43, отличающийся тем, что агент является эффективным для снижения продуцирования у индивидуума интерлейкина-1 β (IL- β).

47. Способ по п.43, отличающийся тем, что агент является эффективным для снижения у индивидуума макрофагового хемотактического протеина-1 (MCP-1).

48. Способ по п.43, отличающийся тем, что он включает дополнительно введение индивидууму по крайней мере одной омега-3 жирной кислоты с длинной цепью и/или ее оксилипинового производного.

49. Способ по п.48, отличающийся тем, что омега-3 жирная кислота выбрана из группы, состоящей из DHA и EPA.

50. Способ по п.43, отличающийся тем, что DPA_n-6 или DPA_n-3 предоставляется в одной из следующих форм: в виде триглицерида, содержащего DPA_n-6 или DPA_n-3, в виде фосфолипида, содержащего DPA_n-6 или DPA_n-3, в виде свободной жирной кислоты, в виде этилового или метилового эфира DPA_n-6 или DPA_n-3.

51. Способ по п.43, отличающийся тем, что DPA_n-6, или DPA_n-3, или ее оксилипиновое производное предоставляется в форме микробного масла, животного масла или растительного масла, которое происходит из масла семян растений, которое было подвержено генетической модификации с получением полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью.

52. Способ по п.43, отличающийся тем, что оксилипиновое производное получают с помощью ферментативного превращения DPAn-6 или DPAn-3 в ее оксилипиновое производное.

53. Способ по п.43, отличающийся тем, что оксилипиновое производное синтезируют химическим путем *de novo*.

54. Способ по п.43, отличающийся тем, что оксилипиновое производное выбирают из группы, состоящей из R-эпимеров моногидроксипродуктов DPAn-6, S-эпимеров моногидроксипродуктов DPAn-6, R-эпимеров моногидроксипродуктов DPAn-3, S-эпимеров моногидроксипродуктов DPAn-3, R-эпимеров дигидроксипродуктов DPAn-6, S-эпимеров дигидроксипродуктов DPAn-6, R-эпимеров дигидроксипродуктов DPAn-3, S-эпимеров дигидроксипродуктов DPAn-3, R-эпимеров тригидроксипродуктов DPAn-6, S-эпимеров тригидроксипродуктов DPAn-6, R-эпимеров тригидроксипродуктов DPAn-3 и S-эпимеров тригидроксипродуктов DPAn-3.

55. Способ по п.43, отличающийся тем, что оксилипиновым производным является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPAn-6; 8-гидрокси DPAn-6; 10-гидрокси DPAn-6; 11-гидрокси DPAn-6; 13-гидрокси DPAn-6; 14-гидрокси DPAn-6; 17-гидрокси DPAn-6; 7,17-дигидрокси DPAn-6; 10,17-дигидрокси DPAn-6; 13,17-дигидрокси DPAn-6; 7,14-дигидрокси DPAn-6; 8,14-дигидрокси DPAn-6; 16,17-дигидрокси DPAn-6; 4,5-дигидрокси DPAn-6; 7,16,17-тригидрокси DPAn-6 и 4,5,17-тригидрокси DPAn-6, или ее аналога, производного или соли.

56. Способ по п.43, отличающийся тем, что оксилипиновым производным является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из 7-гидрокси DPAn-3; 10-гидрокси DPAn-3; 11-гидрокси DPAn-3; 13-гидрокси DPAn-3; 14-гидрокси DPAn-3; 16-гидрокси DPAn-3; 17-гидрокси DPAn-3; 7,17-дигидрокси DPAn-3; 10,17-дигидрокси DPAn-3; 8,14-дигидрокси DPAn-3; 16,17-дигидрокси DPAn-3; 13,20-дигидрокси DPAn-3; 10,20-дигидрокси DPAn-3 и 7,16,17-тригидрокси DPAn-3 или ее аналога, производного или соли.

57. Способ по п.43, отличающийся тем, что агент выбран из группы, состоящей из 17-гидрокси DPAn-6 и 10,17-дигидрокси DPAn-6, или ее производного или аналога.

58. Способ по п.43, отличающийся тем, что агентом является 17-гидрокси DPAn-6 или ее производное или аналог.

59. Способ по п.43, отличающийся тем, что агентом является 10,17-дигидрокси DPAn-6 или ее производное или аналог.

60. Способ по п.43, отличающийся тем, что агентом является DPAn-6.

61. Способ по п.43, отличающийся тем, что агентом является DPAn-3.

62. Способ по любому из пп.43-61, отличающийся тем, что он включает дополнительно введение индивидууму аспирина.

63. Способ по любому из пп.43-61, отличающийся тем, что он включает дополнительно введение по крайней мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из статина, нестериоидного противовоспалительного агента, антиоксиданта и нейрозащитного агента.

64. Способ получения докозаноидов, отличающийся тем, что он включает химический синтез докозаноида, заявленного в любом из пп.1-10.

65. Способ получения докозаноидов, отличающийся тем, что он включает каталитическое получение докозаноидов путем контактирования DPAn-6 субстрата, DTAn-6 субстрата или DPAn-3 субстрата с ферментом, который катализирует получение докозаноидов из указанного DPAn-6 субстрата, указанного DTAn-6 субстрата или указанного DPAn-3 субстрата.

66. Способ получения докозаноидов, отличающийся тем, что он включает культивирование микроорганизмов, продуцирующих полиненасыщенную жирную кислоту с длинной цепью (LCPUFA), или выращивание LCPUFA-продуцирующих растений, которые генетически модифицированы для сверхэкспрессии фермента, который катализирует получение докозаноидов из LCPUFA с 22 углеродами, с получением указанных докозаноидов.

67. Способ получения докозаноидов, отличающийся тем, что он включает контактирование полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью (LCPUFA), продуцируемых LCPUFA-продуцирующими микроорганизмами, LCPUFA-продуцирующими растениями или LCPUFA-продуцирующими животными, с ферментом, который катализирует превращение указанных LCPUFA в докозаноиды.

68. Способ по любому из пп.65-67, отличающийся тем, что фермент выбирают из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохром Р450 фермента.

69. Способ по любому из пп.65-67, отличающийся тем, что фермент выбирают из группы, состоящей из 12-липоксигеназы, 5-липоксигеназы, 15-липоксигеназы, циклооксигеназы-2, гемоглобина альфа 1, гемоглобина бета, гемоглобина гамма А, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4V2, CYP4X1, CYP41, CYP2J2, CYP2C8, тромбоксан А синтазы 1, простагландин 12 синтазы и простациклин синтазы.

70. Способ по п.66 или 67, отличающийся тем, что LCPUFA выбирают из группы, состоящей из DPAn-6, DTAn-6 и DPAn-3.

71. Способ по п.66 или 67, отличающийся тем, что LCPUFA-продуцирующие микроорганизмы или LCPUFA-продуцирующие растения генетически модифицированы для получения LCPUFA.

72. Способ по п.66 или 67, отличающийся тем, что LCPUFA-продуцирующие микроорганизмы эндогенно продуцируют LCPUFAs.

73. Способ по п.72, отличающийся тем, что LCPUFA-продуцирующими микроорганизмами являются Thraustochytrids.

74. Способ обогащения масла по крайней мере одним оксилипином, происходящим из LCPUFA, или стабилизации указанного оксилипина в масле, отличающийся тем, что включает культивирование LCPUFA-продуцирующего микроорганизма с соединением, которое усиливает ферментативную активность фермента, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины.

75. Способ по п.74, отличающийся тем, что соединение стимулирует экспрессию фермента.

76. Способ по п.74, отличающийся тем, что соединение усиливает или инициирует автоокисление LCPUFA.

77. Способ по п.74, отличающийся тем, что соединением является ацетилсалициловая кислота.

78. Способ обогащения масла в отношении присутствия по крайней мере одного оксилипина, происходящего из LCPUFA, или стабилизации указанного оксилипина в масле, отличающийся тем, что включает разрушение микробов или семян масличных растений в присутствии фермента, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины, согласно которому микробы и семена масличных растений продуцируют по крайней мере одну LCPUFA.

79. Способ по п.78, отличающийся тем, что фермент выбирают из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохромом Р450 фермента.

80. Способ по любому из пп.74-79, отличающийся тем, что дополнительно включает выделение и очистку оксилипинов.

81. Способ по п.80, отличающийся тем, что оксилипины также дополнительно перерабатывают и выделяют в виде производных оксилипинов или их солей.

82. Способ переработки масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, отличающийся тем, что он включает:

а) выделение или регенерацию масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, производимые микробным, растительным или животным источником; и

б) рафинирование масла с использованием процесса, который сводит до минимума удаление свободных жирных кислот из масла, давая масло, которое сохраняет оксилипиновые производные LCPUFAs.

83. Способ по п.82, отличающийся тем, что животным является водное животное.

84. Способ по п.82, отличающийся тем, что животным является рыба.

85. Способ по п.82, отличающийся тем, что растением является растение с масличными семенами (масличные культуры растений).

86. Способ по п.82, отличающийся тем, что микробным источником является Thraustochyrid.

87. Способ по любому из пп.82-86, отличающийся тем, что стадия рафинирования включает экстракцию масла спиртом, смесью спирт:вода или органическим растворителем.

88. Способ по любому из пп.82-86, отличающийся тем, что стадия рафинирования включает экстракцию масла неполярным органическим растворителем.

89. Способ по любому из пп.82-86, отличающийся тем, что стадия рафинирования включает экстракцию масла спиртом или смесью спирт:вода.

90. Способ по любому из пп.82-89, отличающийся тем, что стадия рафинирования дополнительно включает фильтрование с охлаждением, отбеливание, дополнительное фильтрование с охлаждением и дезодорирование масла.

91. Способ по любому из пп.82-89, отличающийся тем, что стадия рафинирования дополнительно включает отбеливание и дезодорирование масла в отсутствие стадий фильтрования при охлаждении.

92. Способ по любому из пп.82-89, отличающийся тем, что стадия рафинирования дополнительно включает дезодорирование масла в отсутствие стадий фильтрования при охлаждении или отбеливании.

93. Способ по любому из пп.82-86, отличающийся тем, что дополнительно включает добавление к маслу антиоксиданта.

94. Способ по любому из пп.82-86, отличающийся тем, что стадия рафинирования может включать приготовление масла в виде эмульсии.

95. Способ по любому из пп.82-89, отличающийся тем, что масло дополнительно обрабатывают с помощью контактирования с ферментом, который катализирует превращение LCPUFA в оксилипины.

96. Способ по п.95, отличающийся тем, что фермент выбран из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохромом Р450 фермента.

97. Способ по п.95, отличающийся тем, что фермент иммобилизован на субстрате.

98. Способ по любому из пп.82-97, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию отделения оксилипиновых производных LCPUFA в масле от LCPUFA.

99. Способ по п.98, отличающийся тем, что стадию отделения осуществляют с помощью хроматографии.

100. Способ по п.98, отличающийся тем, что он дополнительно включает добавление указанных от-

деленных LCPUFA оксилипинов к маслу или к композиции.

101. Способ переработки масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, отличающийся тем, что он включает:

- регенерацию масла, содержащего оксилипиновые производные LCPUFA, продуцируемые с помощью микробного, растительного или животного источника;
- рафинирование масла;
- отделение LCPUFA оксилипинов от LCPUFA в масле.

102. Способ по п.101, отличающийся тем, что дополнительно включает, перед стадией (с), стадию превращения LCPUFAs в масле в LCPUFA оксилипины с помощью химического или биологического процесса.

103. Способ по п.101 или 102, отличающийся тем, что способ дополнительно включает добавление к продукту указанных отделенных LCPUFA оксилипинов.

104. Способ предотвращения или снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума, отличающийся тем, что он включает введение пациенту, который подвержен риску, или которому поставлен диагноз, или который подозревается в наличии у него воспаления или нейродегенерации или состояния или заболевания, связанных с ними, агента, выбранного из группы, состоящей из DTAn-6 и оксилипинового производного DTAn-6, для снижения по крайней мере одного симптома воспаления или нейродегенерации у индивидуума.

105. Способ по п.104, отличающийся тем, что агентом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранного из группы, состоящей из моногидроксипроизводных DTAn-6, дигидроксипроизводных DTAn-6 и тригидроксипроизводных DTAn-6.

106. Способ по п.104, отличающийся тем, что агентом является R- или S-эпимер докозаноида, выбранный из группы, состоящей из 7-гидрокси DTAn-6; 10-гидрокси DTAn-6; 13-гидрокси DTAn-6; 17-гидрокси DTAn-6; 7,17-дигидрокси DTAn-6; 10,17-дигидрокси DTAn-6; 16,17-дигидрокси DTAn-6 и 7,16,17-тригидрокси DTAn-6 или ее аналога, производного или соли.

107. Организм, включающий PUFA PKS путь или траекторию, в котором(ой) организм генетически трансформирован для экспрессии фермента, который превращает LCPUFA в оксилипин.

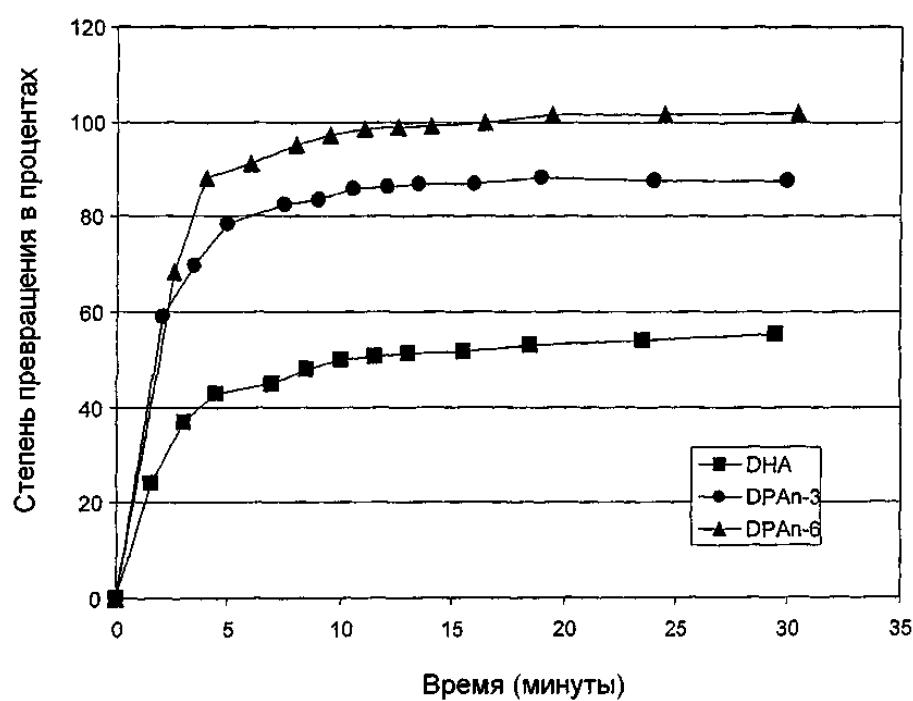
108. Организм по п.107, отличающийся тем, что организм выбран из группы, состоящей из растений и микроорганизмов.

109. Организм по п.107, отличающийся тем, что организмом являются семена масличных растений, которые генетически модифицированы для экспрессии PUFA PKS траектории для производства полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью.

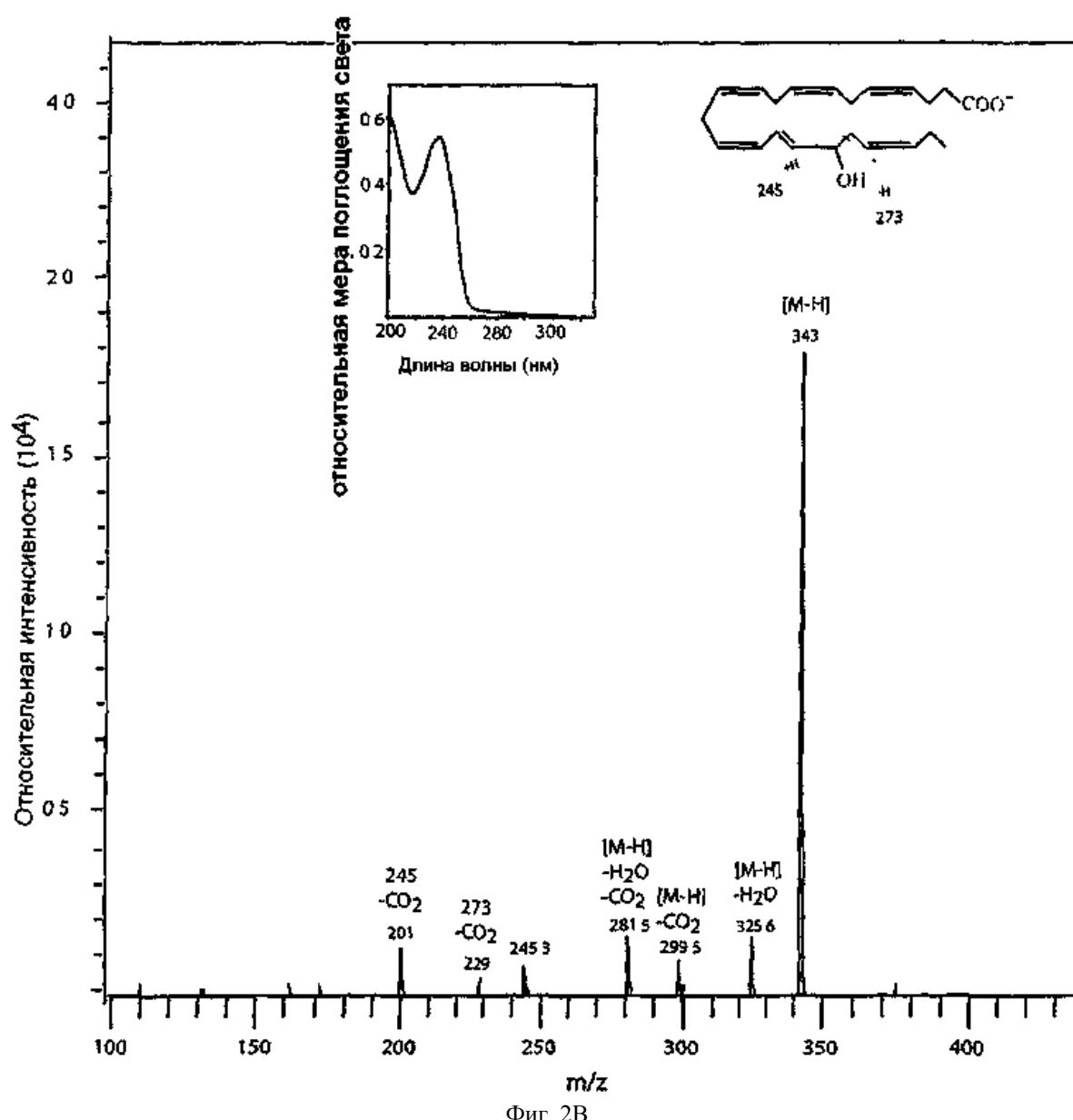
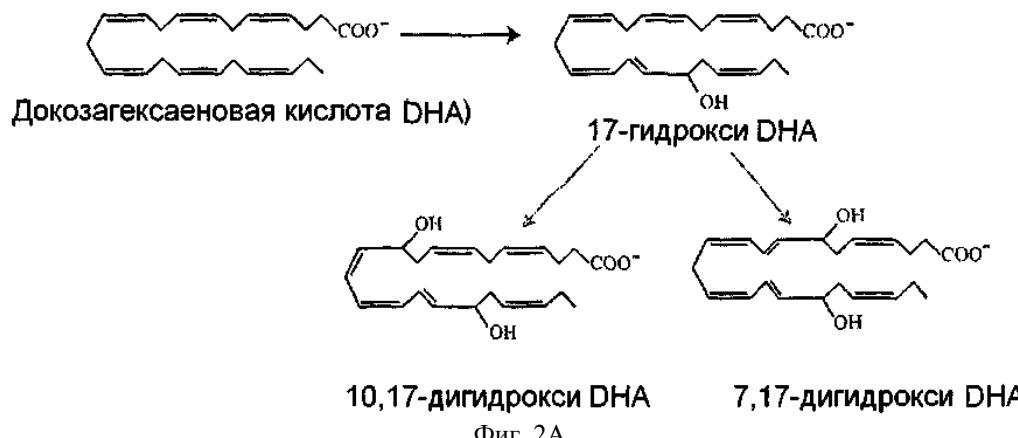
110. Организм по п.107, отличающийся тем, что организмом является микроорганизм.

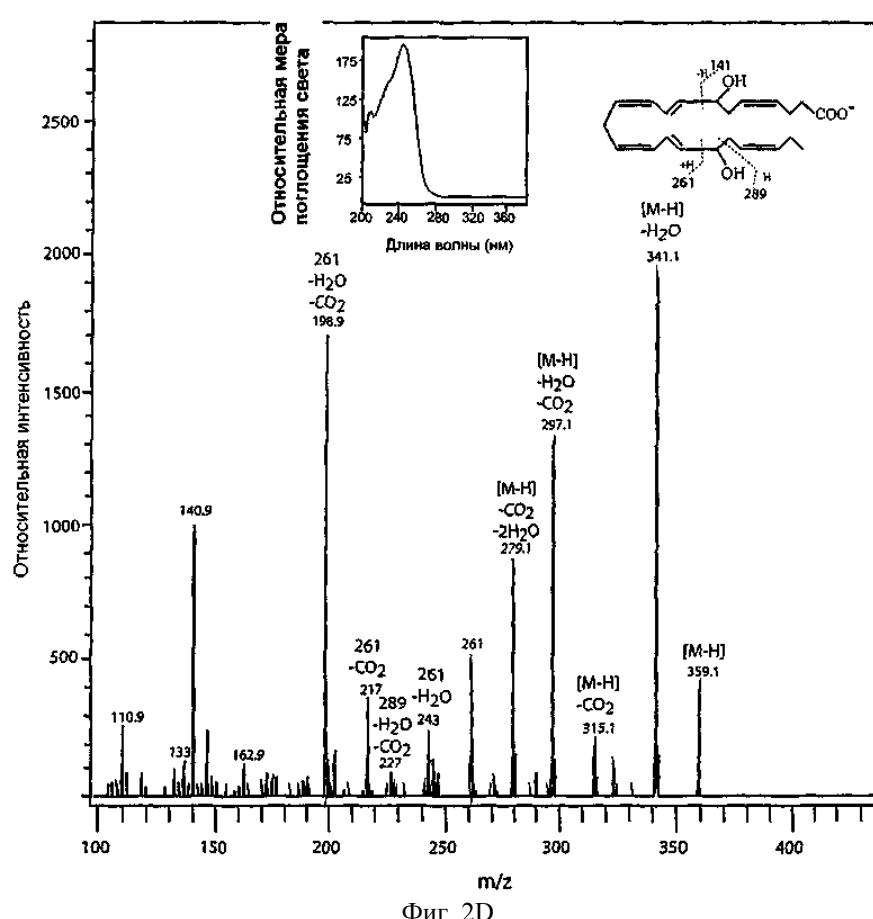
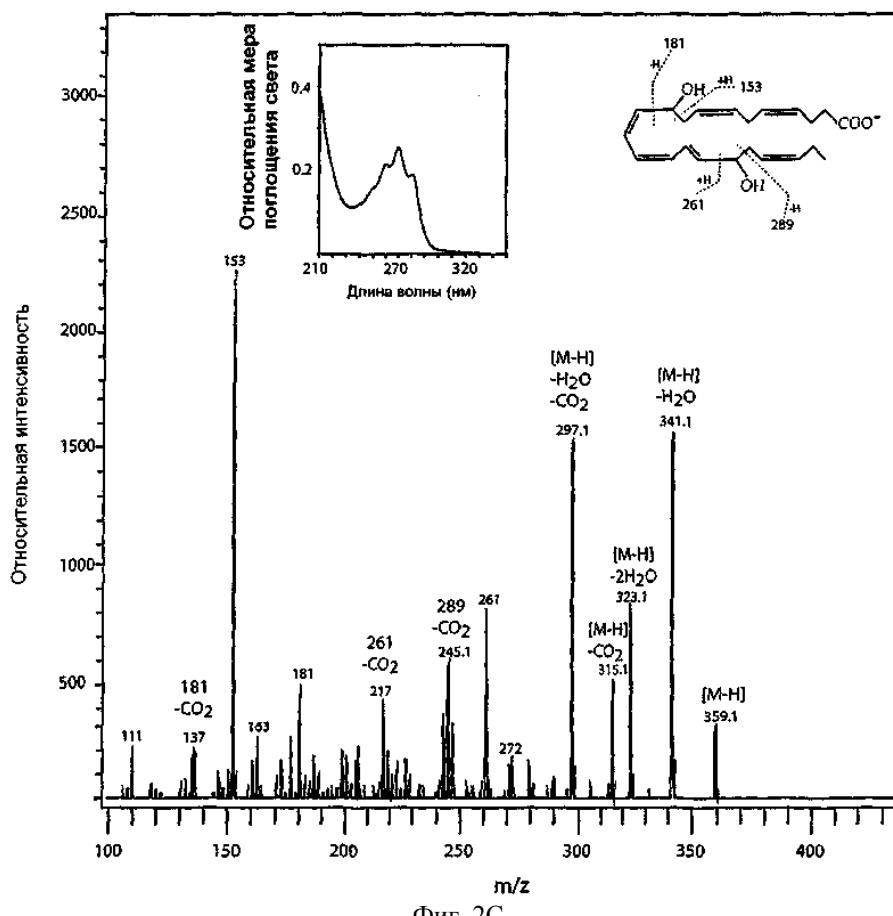
111. Организм по п.110, отличающийся тем, что микроорганизм включает эндогенную PUFA PKS траекторию.

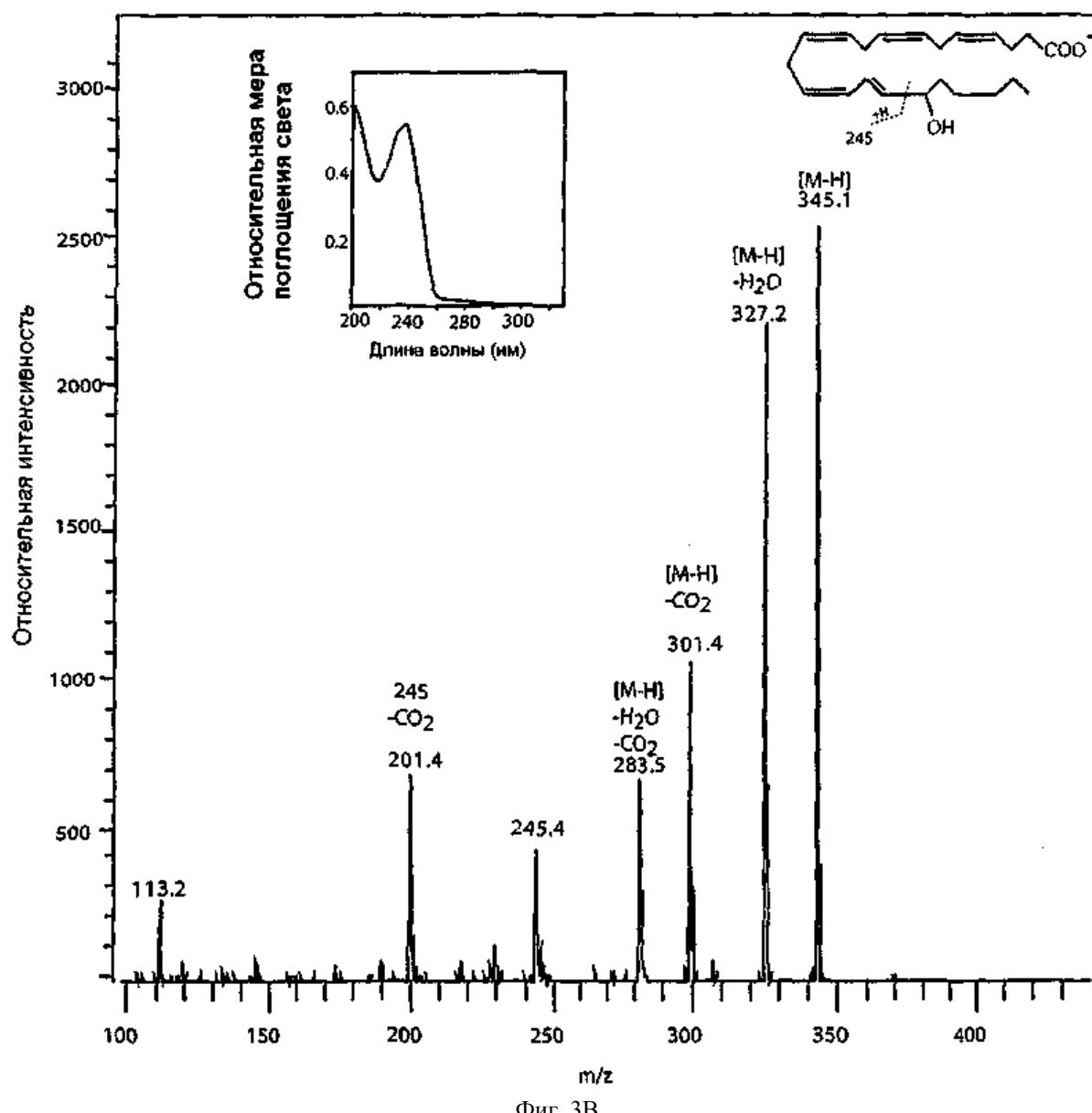
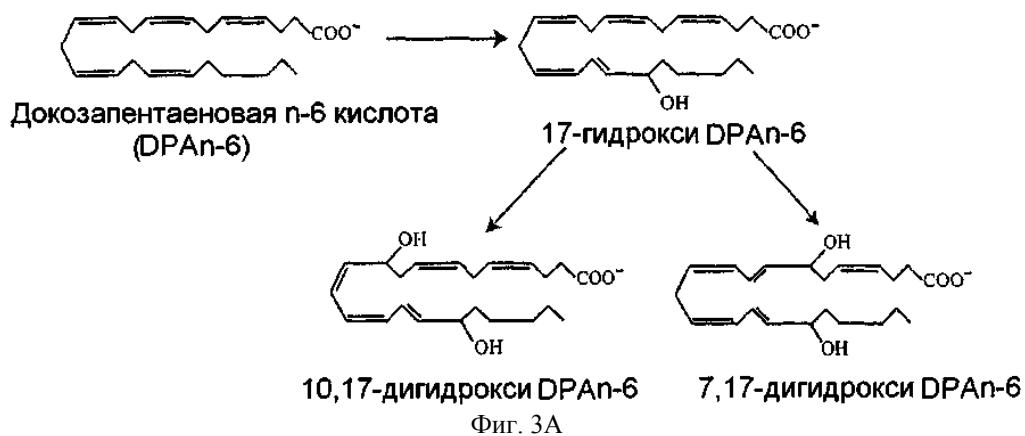
112. Организм по п.107, отличающийся тем, что фермент выбран из группы, состоящей из липоксигеназы, циклооксигеназы и цитохромом P450 фермента.

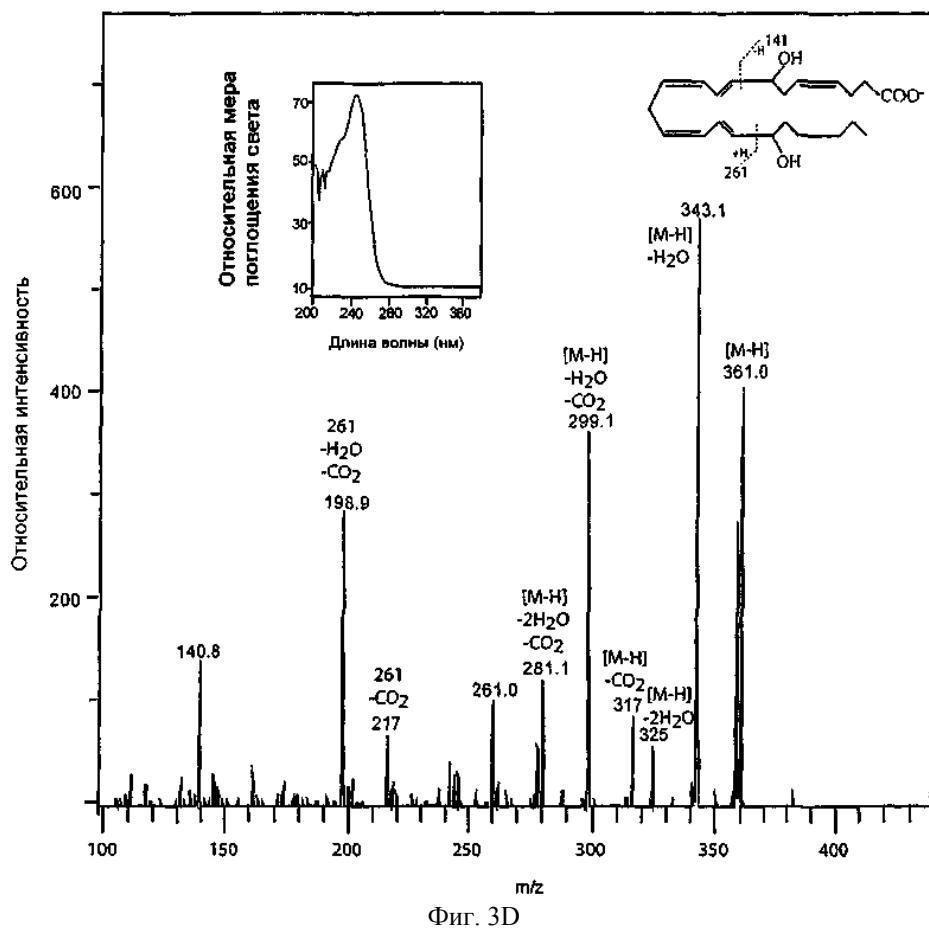
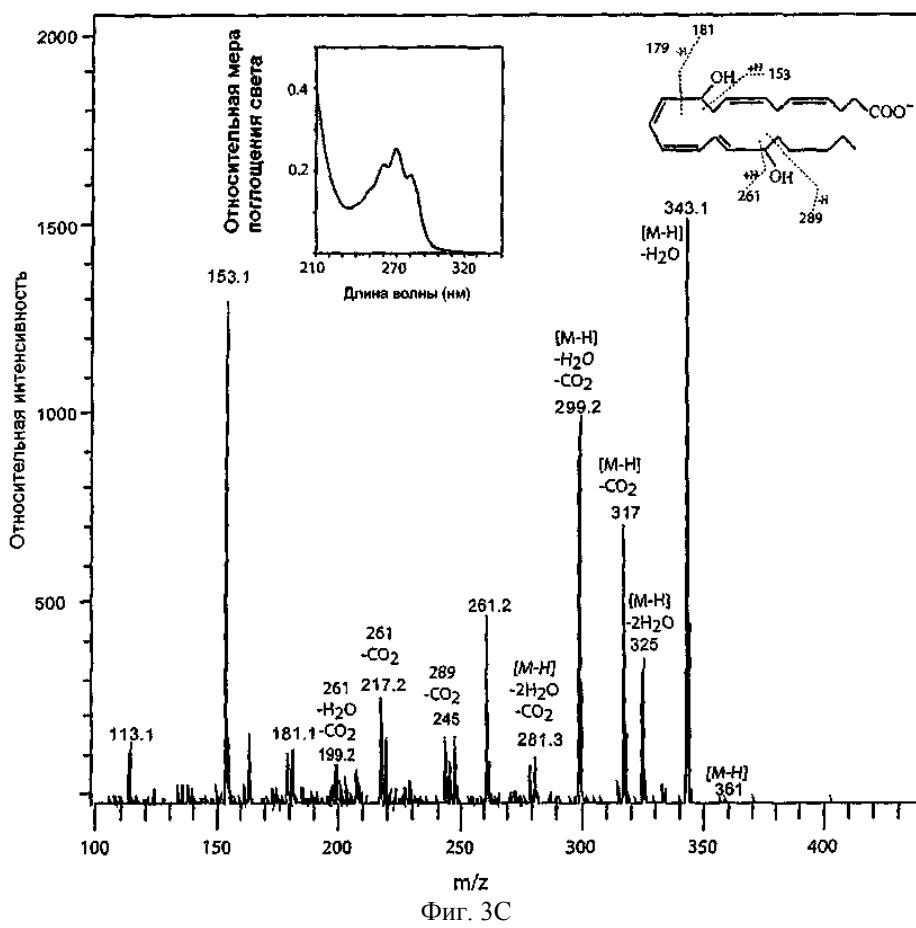


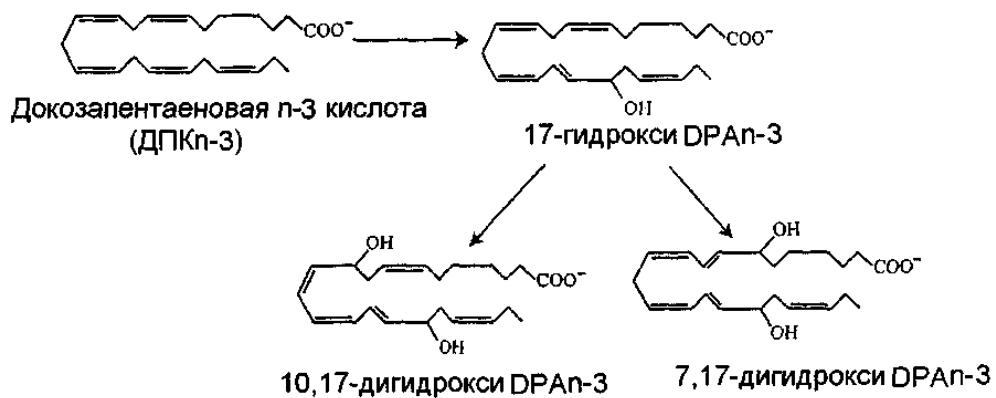
Фиг. 1





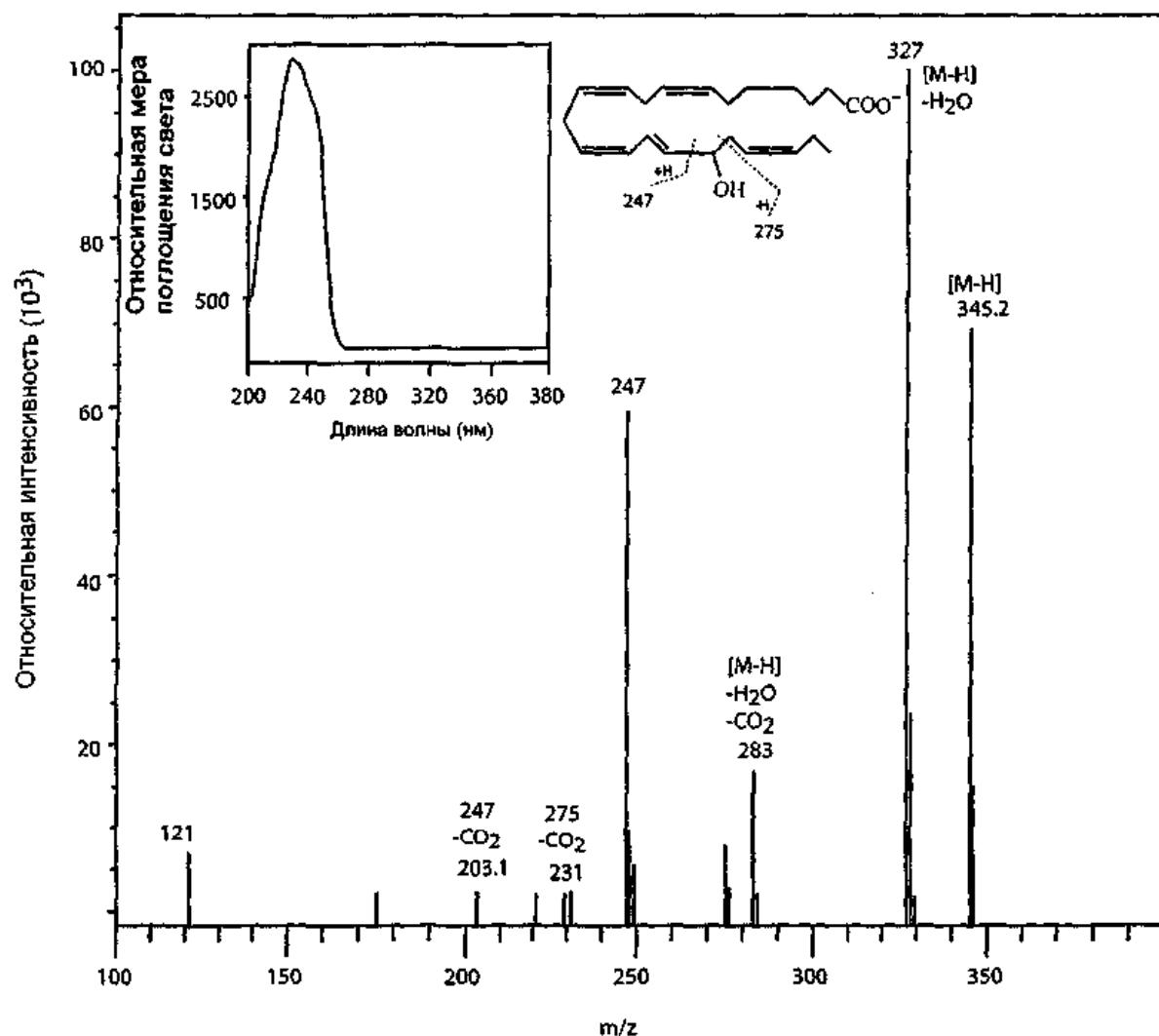




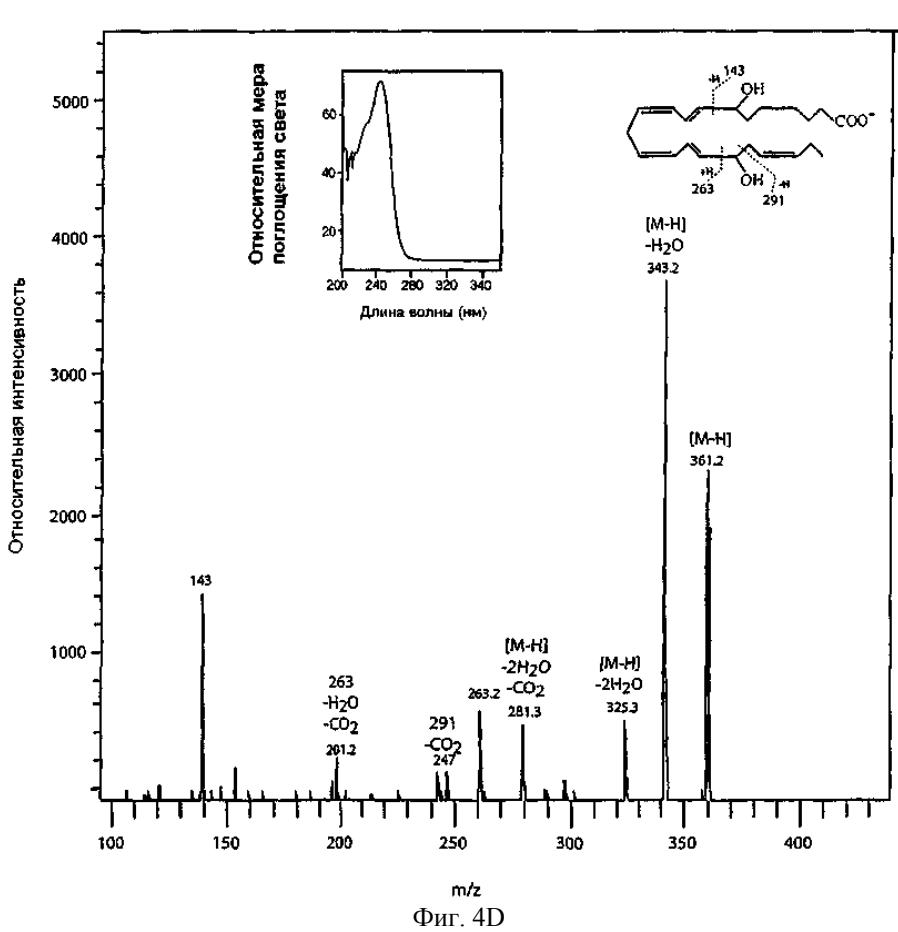
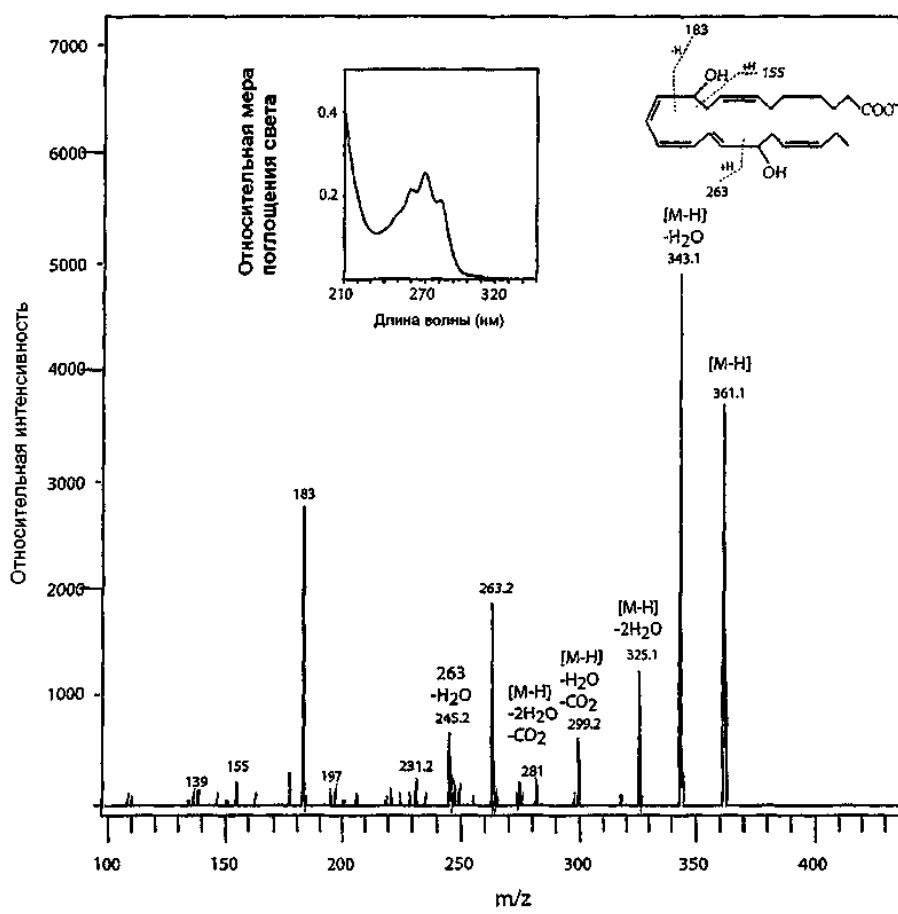


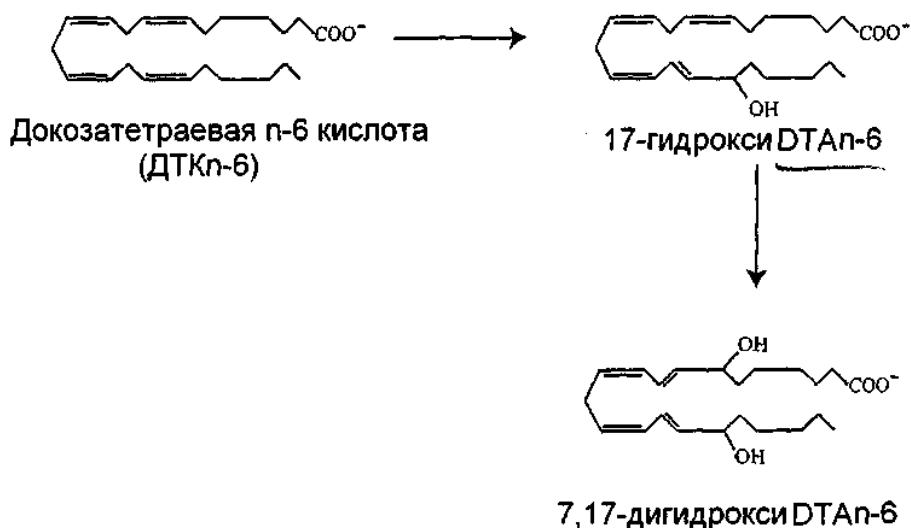
где (ДПК) = (DPA)

Фиг. 4А



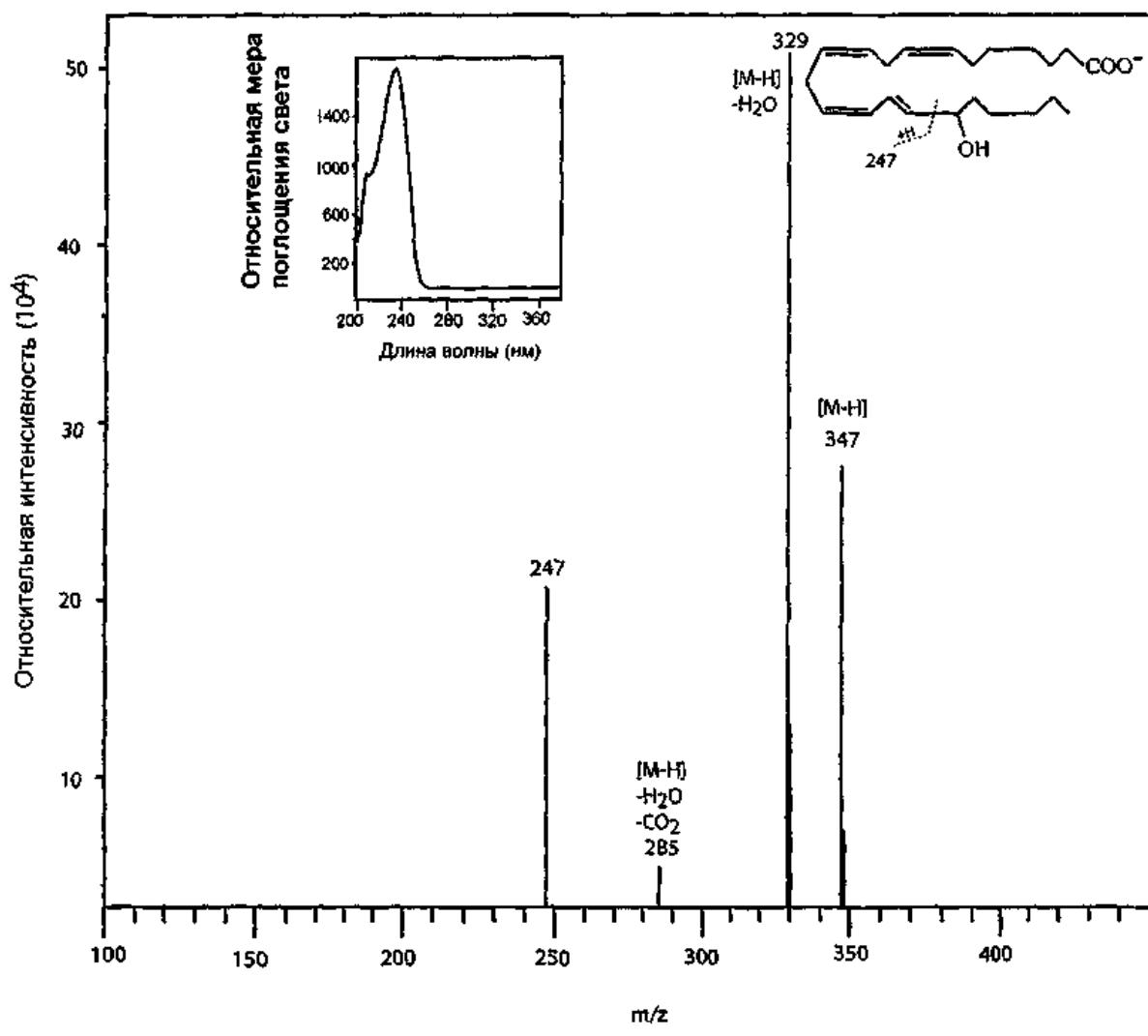
Фиг. 4В



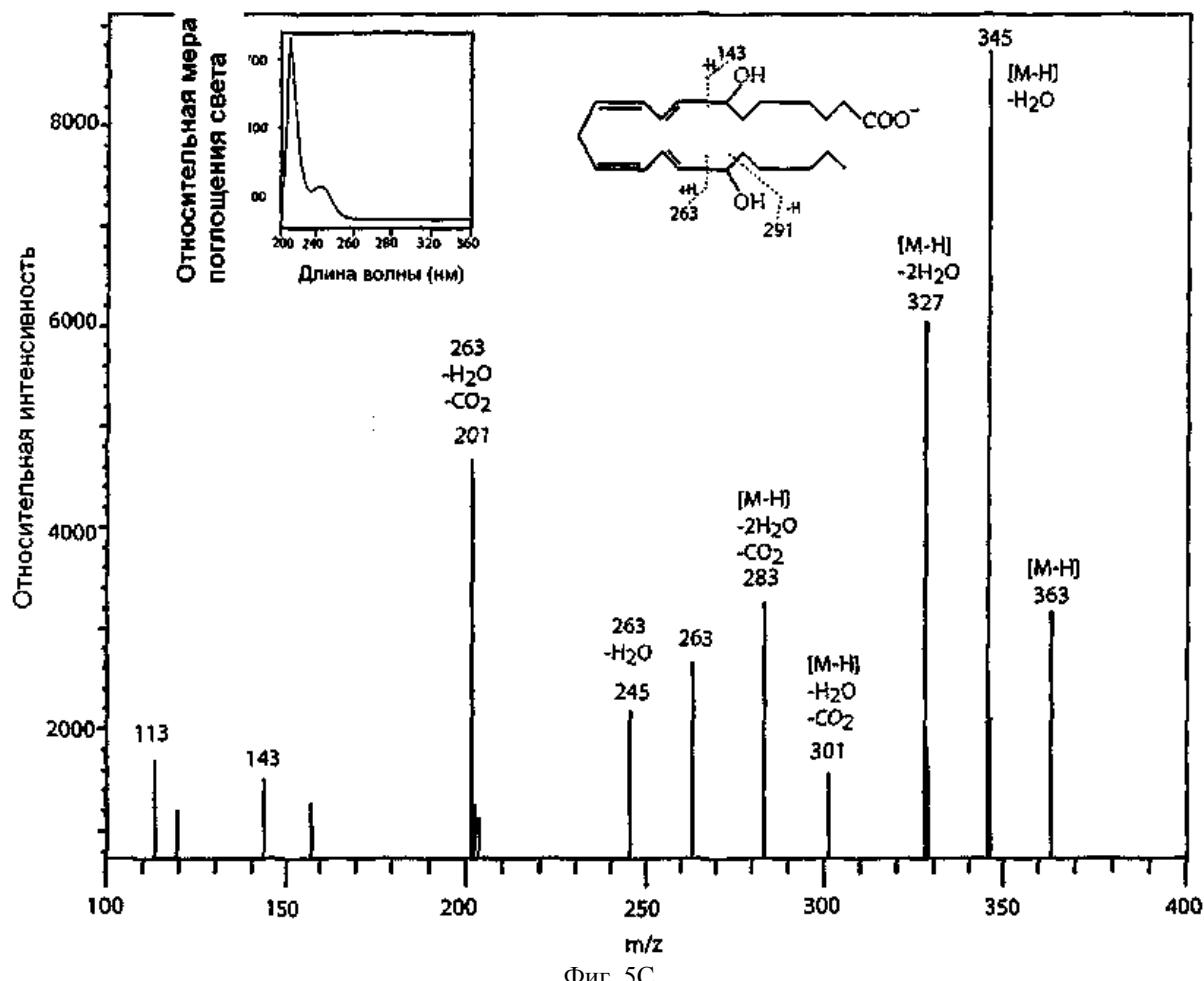


где (ДТК)=(DTA)

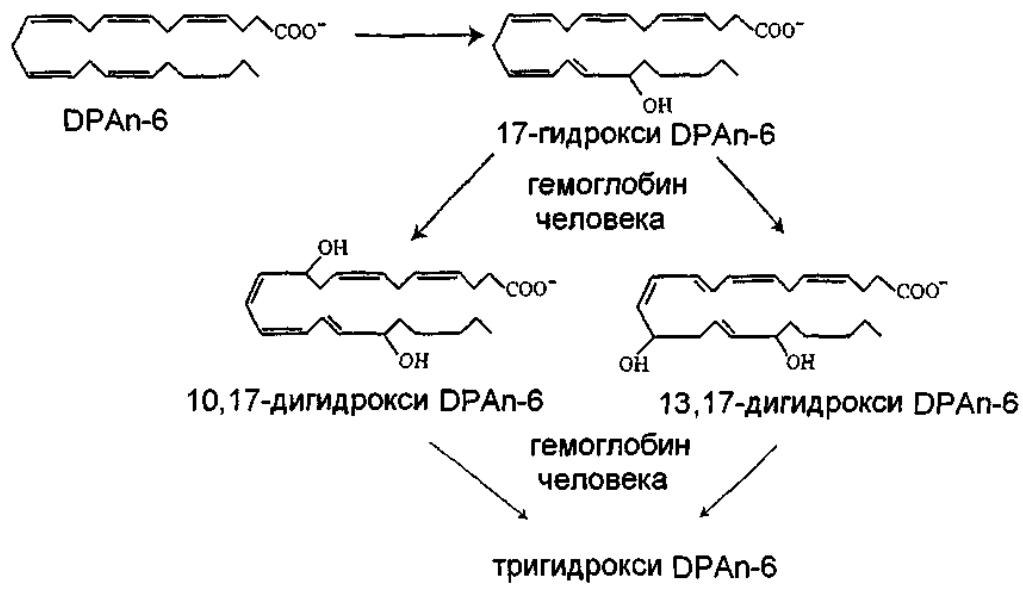
Фиг. 5А



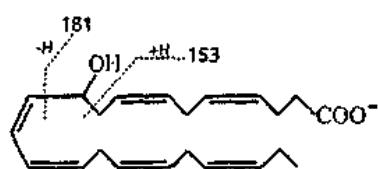
Фиг. 5В



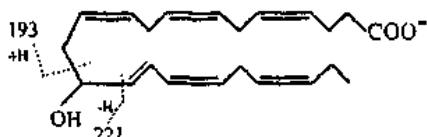
Фиг. 5С



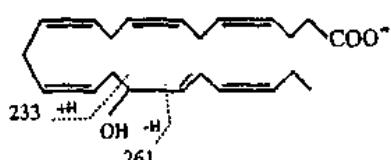
Фиг. 6



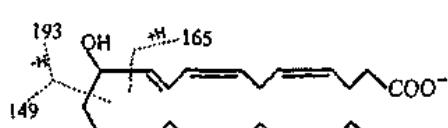
343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
181	фрагмент
153	фрагмент
137	181-CO ₂



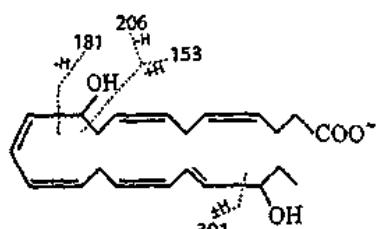
343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
193	фрагмент
221	фрагмент



343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
233	фрагмент
261	фрагмент
189	233-CO ₂

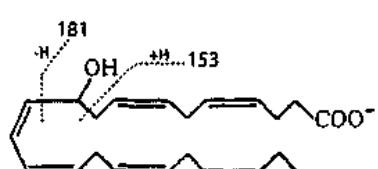


343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
193	фрагмент
149	фрагмент
165	фрагмент
121	165-CO ₂



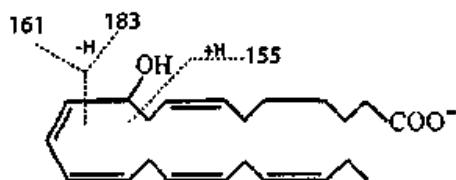
359	[M-H]
341	[M-H]-H ₂ O
315	[M-H]-CO ₂
297	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
279	[M-H]-CO ₂ -2H ₂ O
181	фрагмент
206	фрагмент
153	фрагмент
257	301-CO ₂
239	301-CO ₂ -H ₂ O
137	181-CO ₂

Фиг. 7



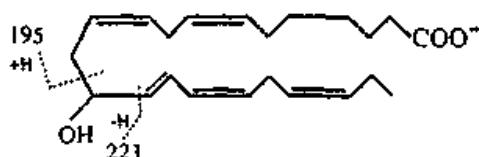
345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
181	фрагмент
153	фрагмент
137	181-CO ₂

Фиг. 8



10-гидрокси DPAn-3

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
183	фрагмент
155	фрагмент
161	фрагмент

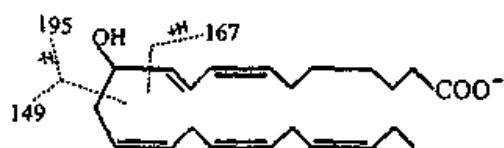


13-гидрокси DPAn-3

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
195	фрагмент
223	фрагмент

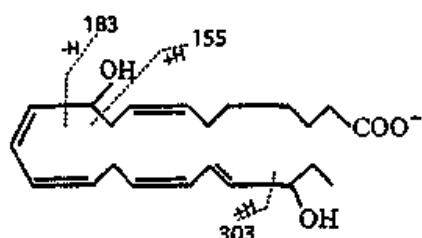


345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
235	фрагмент
263	фрагмент
191	235-CO ₂



11-гидрокси DPAn-3

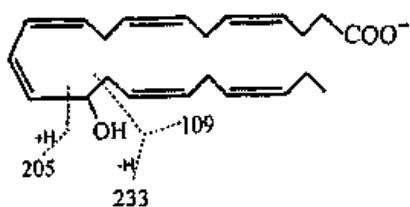
345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
195	фрагмент
149	фрагмент
167	фрагмент



10,20-дигидрокси DPAn-3

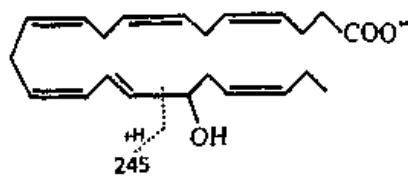
361	[M-H]
343	[M-H]-H ₂ O
317	[M-H]-CO ₂
299	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
183	фрагмент
155	фрагмент
303	фрагмент

Фиг. 9



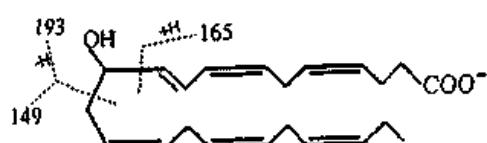
14-гидрокси DHA

343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
233	фрагмент
205	фрагмент
109	фрагмент
161	205-CO ₂
189	233-CO ₂



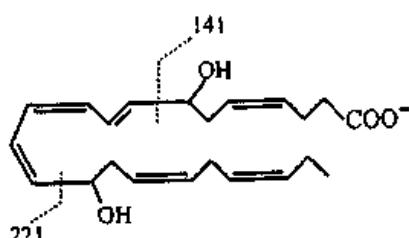
17-гидрокси DHA

343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
245	фрагмент
201	245-CO ₂



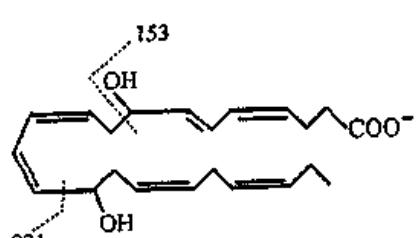
11-гидрокси DHA

343	[M-H]
325	[M-H]-H ₂ O
299	[M-H]-CO ₂
281	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
149	фрагмент
165	фрагмент
193	фрагмент
121	165-CO ₂



7,14-дигидрокси DHA

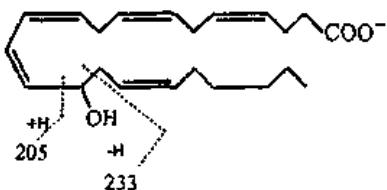
359	[M-H]
341	[M-H]-H ₂ O
315	[M-H]-CO ₂
297	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
279	[M-H]-CO ₂ -2H ₂ O
221	фрагмент
141	фрагмент
177	221-CO ₂
203	221-H ₂ O



8,14-дигидрокси DHA

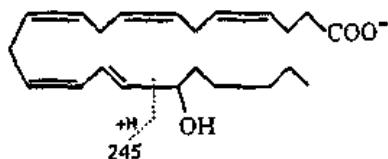
359	[M-H]
341	[M-H]-H ₂ O
315	[M-H]-CO ₂
297	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
279	[M-H]-CO ₂ -2H ₂ O
221	фрагмент
153	фрагмент

Фиг. 10



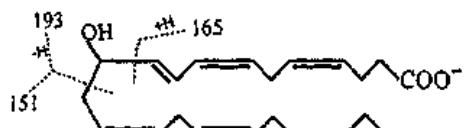
14-гидрокси DPAn-6

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
233	фрагмент
205	фрагмент
161	205-CO ₂
189	233-CO ₂



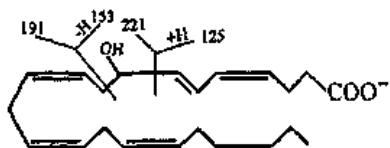
17-гидрокси DPAn-6

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
245	фрагмент
201	245-CO ₂



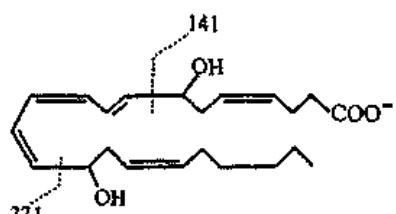
11-гидрокси DPAn-6

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
151	фрагмент
165	фрагмент
193	фрагмент
121	165-CO ₂



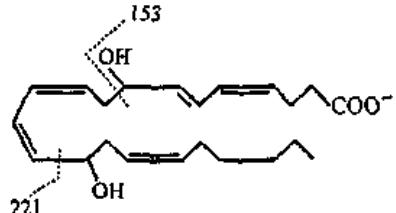
8-гидрокси DPAn-6

345	[M-H]
327	[M-H]-H ₂ O
301	[M-H]-CO ₂
283	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
153	фрагмент
191	фрагмент
135	153-H ₂ O



7,14-дигидрокси DPAn-6

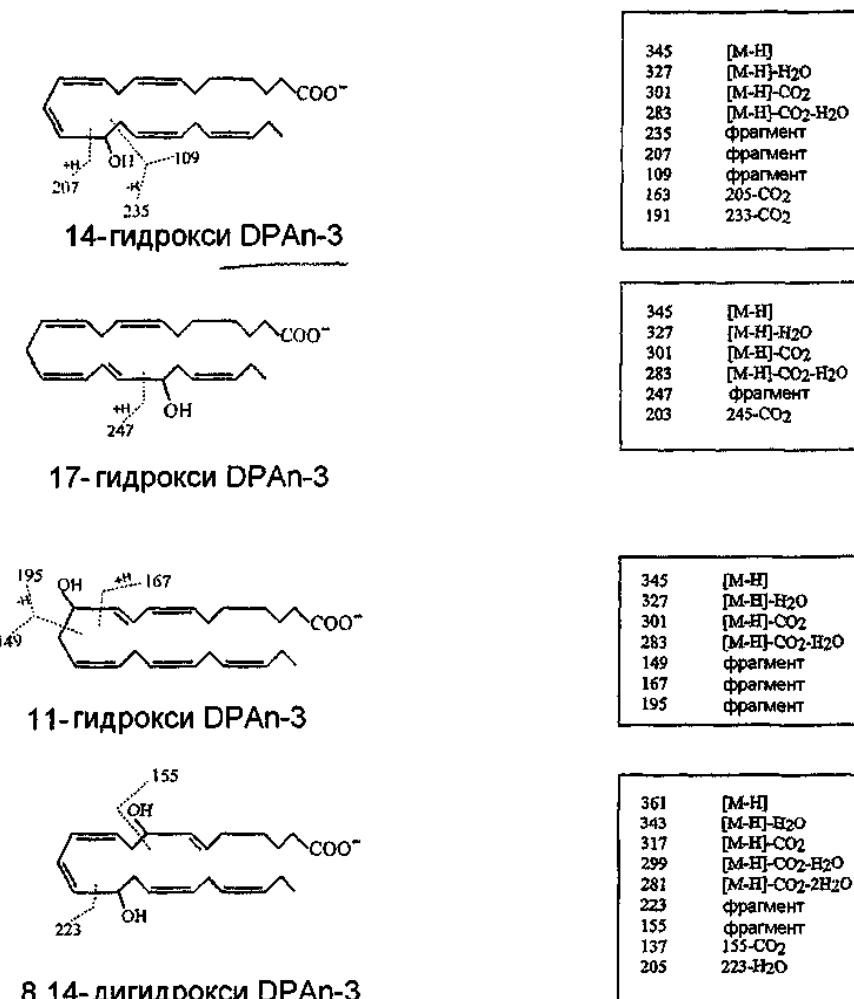
361	[M-H]
343	[M-H]-H ₂ O
317	[M-H]-CO ₂
299	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
281	[M-H]-CO ₂ -2H ₂ O
221	фрагмент
141	фрагмент
177	221-CO ₂
203	221-H ₂ O



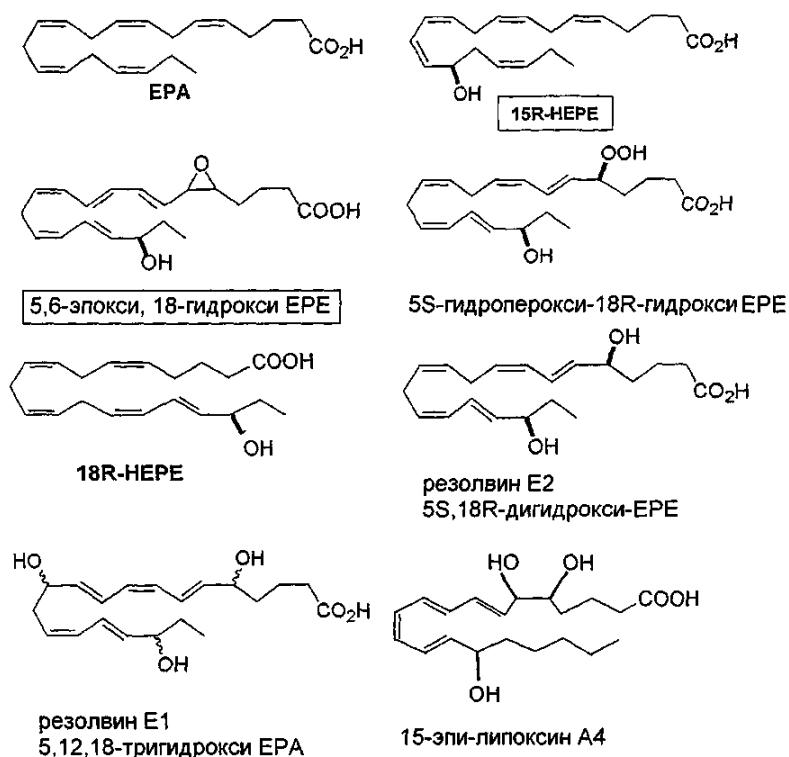
8,14-дигидрокси DPAn-6

361	[M-H]
343	[M-H]-H ₂ O
317	[M-H]-CO ₂
299	[M-H]-CO ₂ -H ₂ O
281	[M-H]-CO ₂ -2H ₂ O
221	фрагмент
153	фрагмент
203	221-H ₂ O

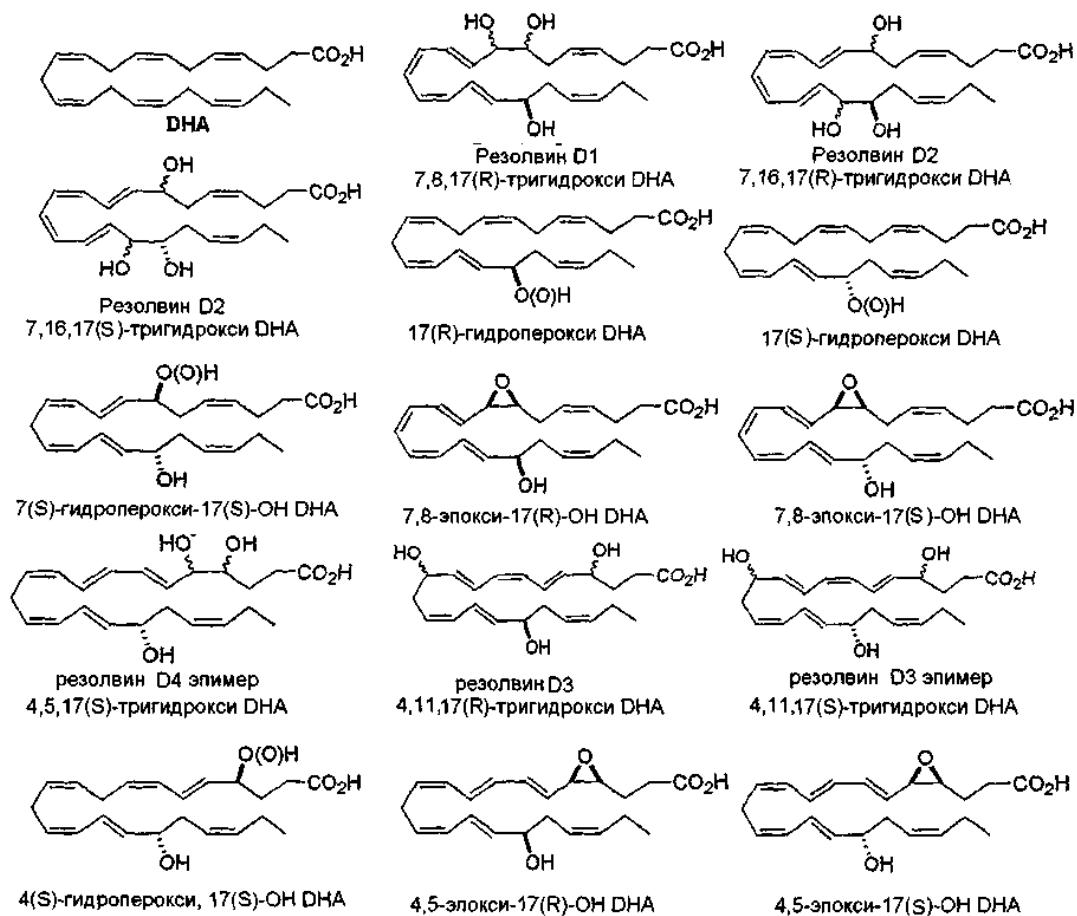
Фиг. 11



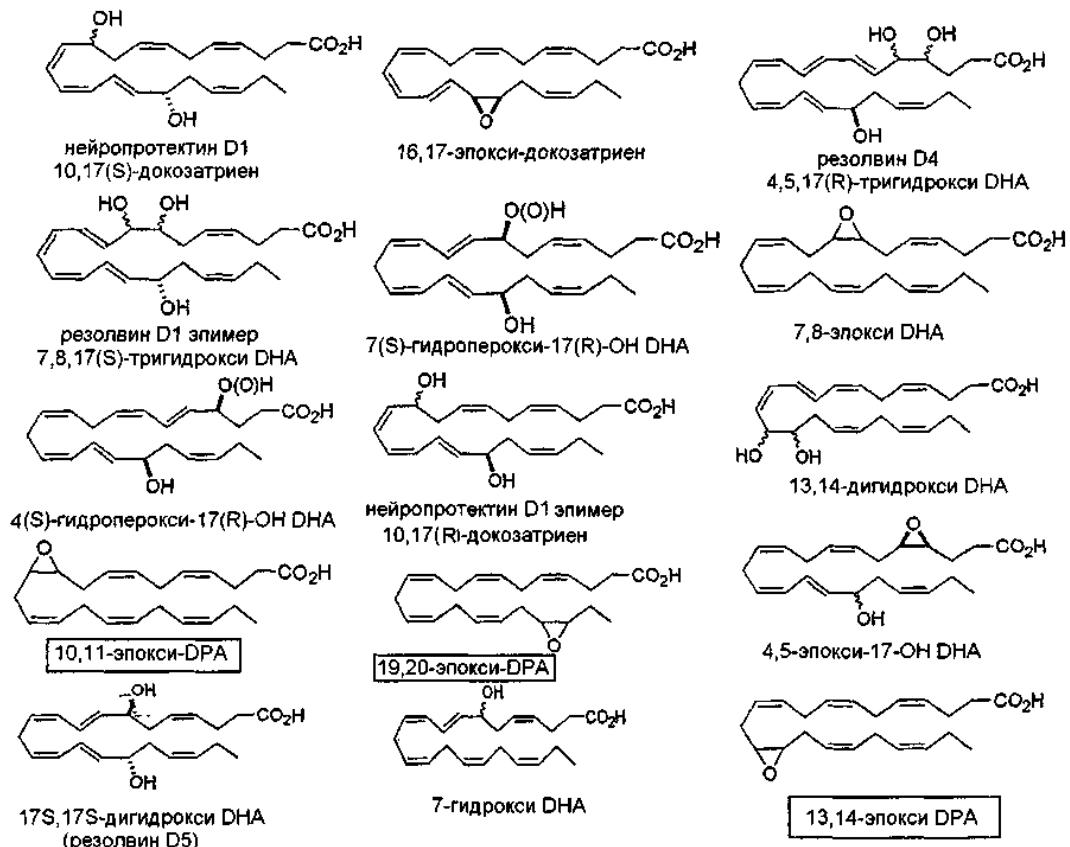
Фиг. 12



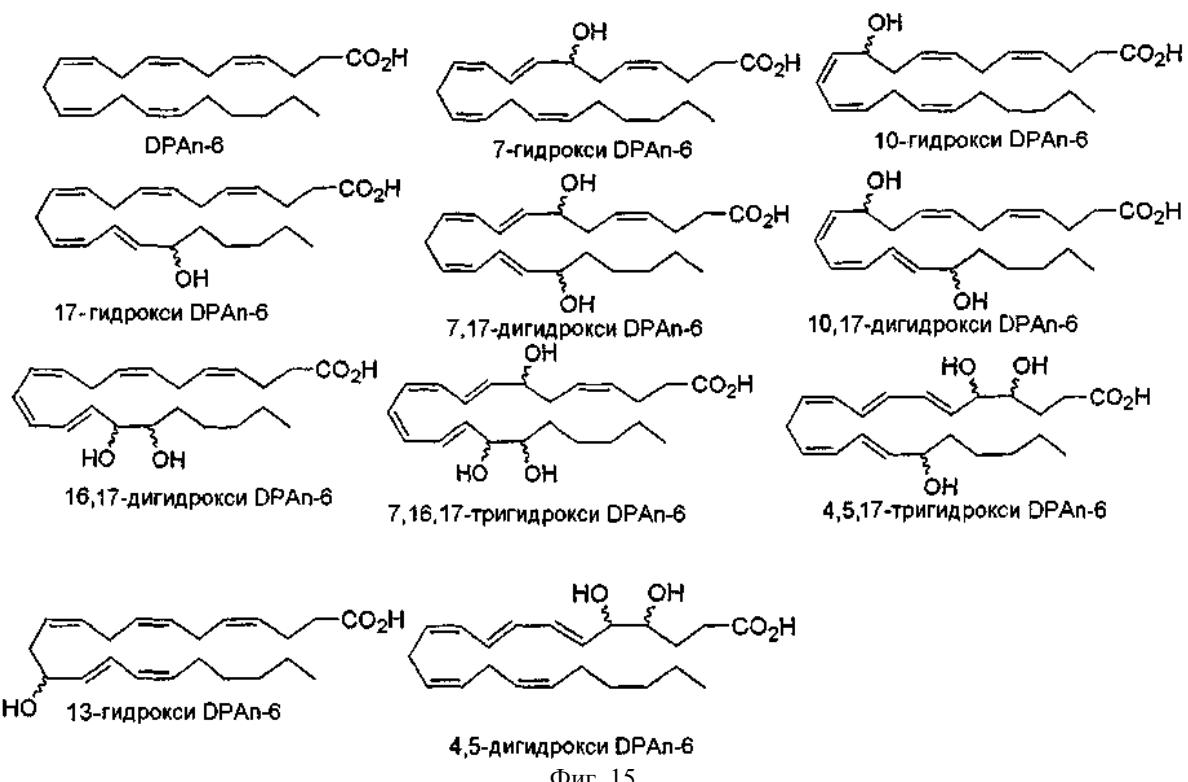
Фиг. 13



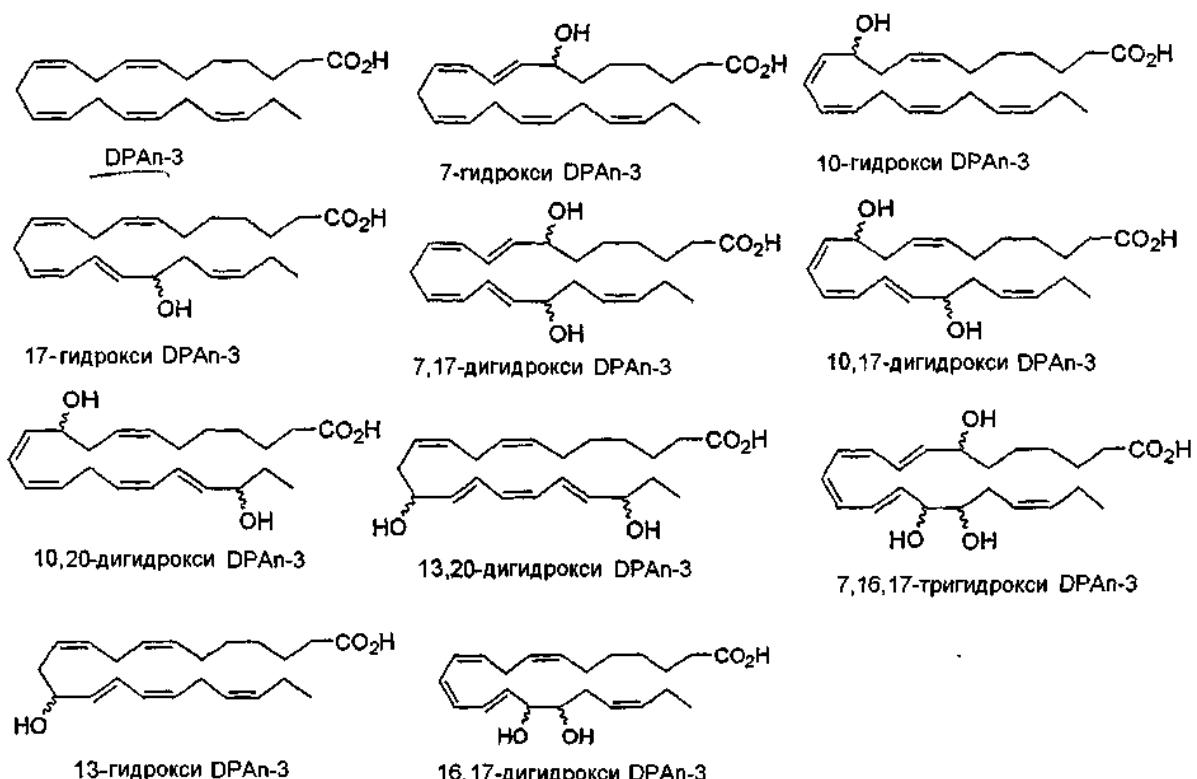
Фиг. 14А



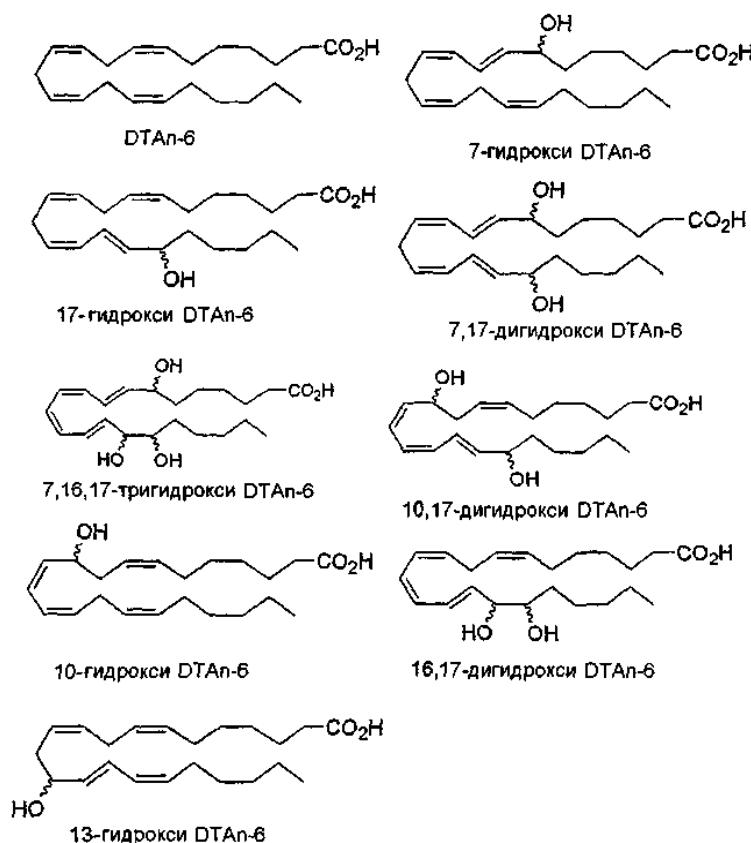
Фиг. 14В



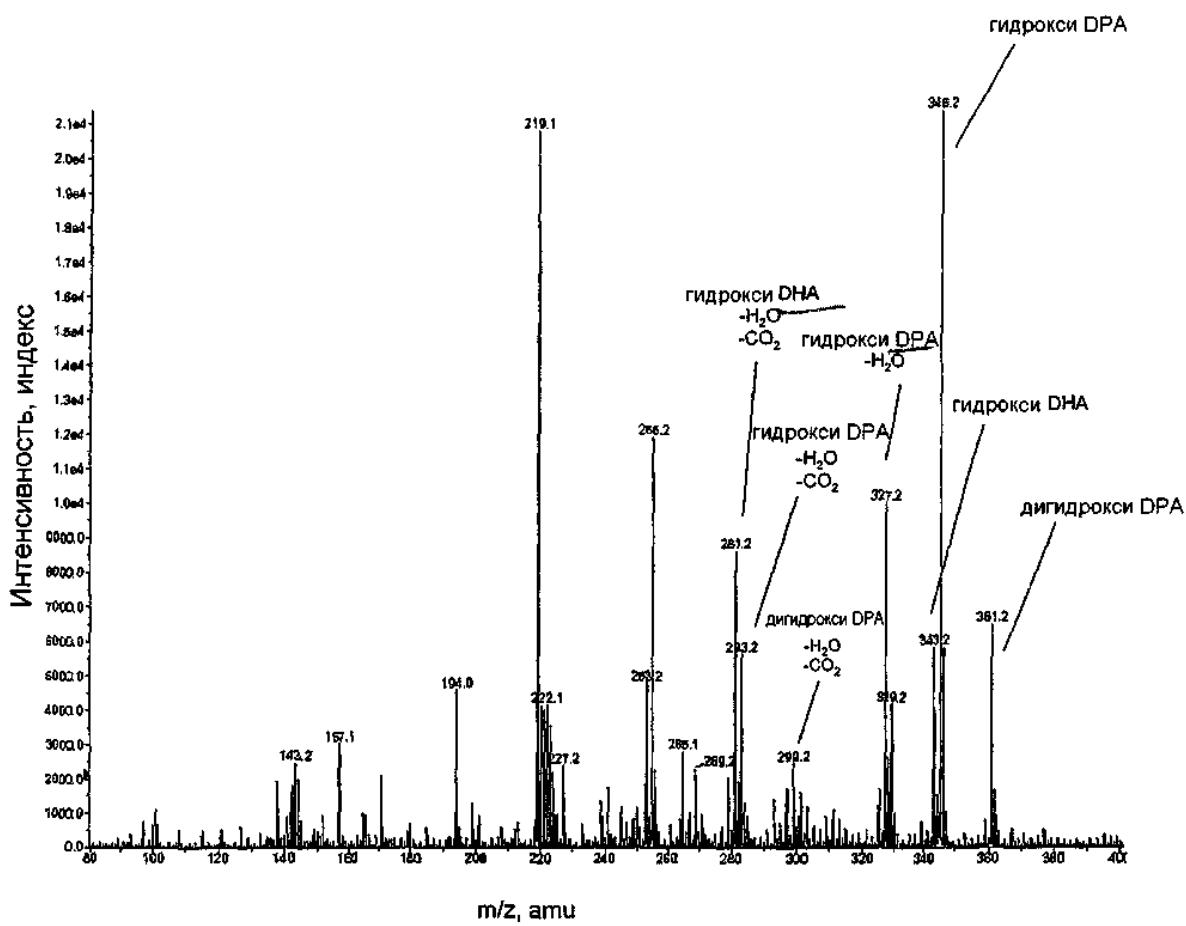
Фиг. 15



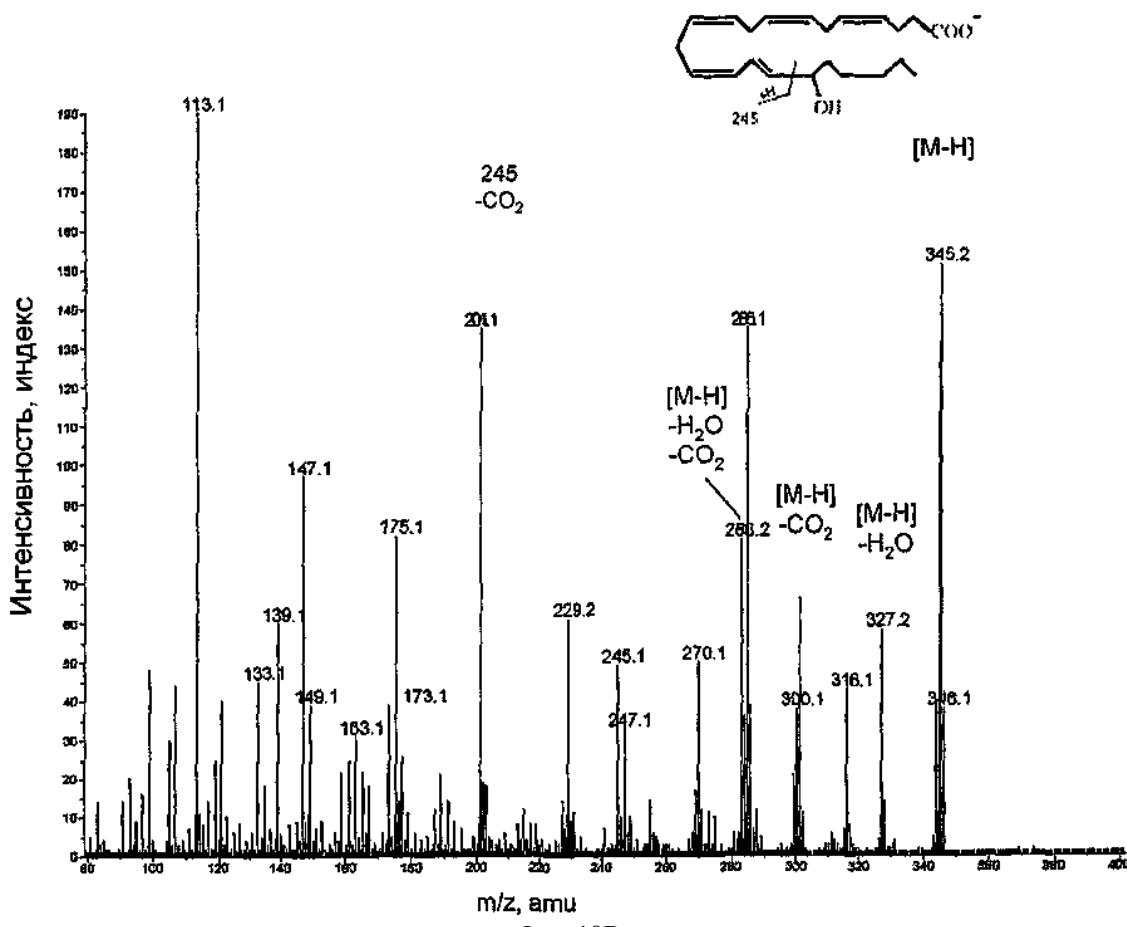
Фиг. 16



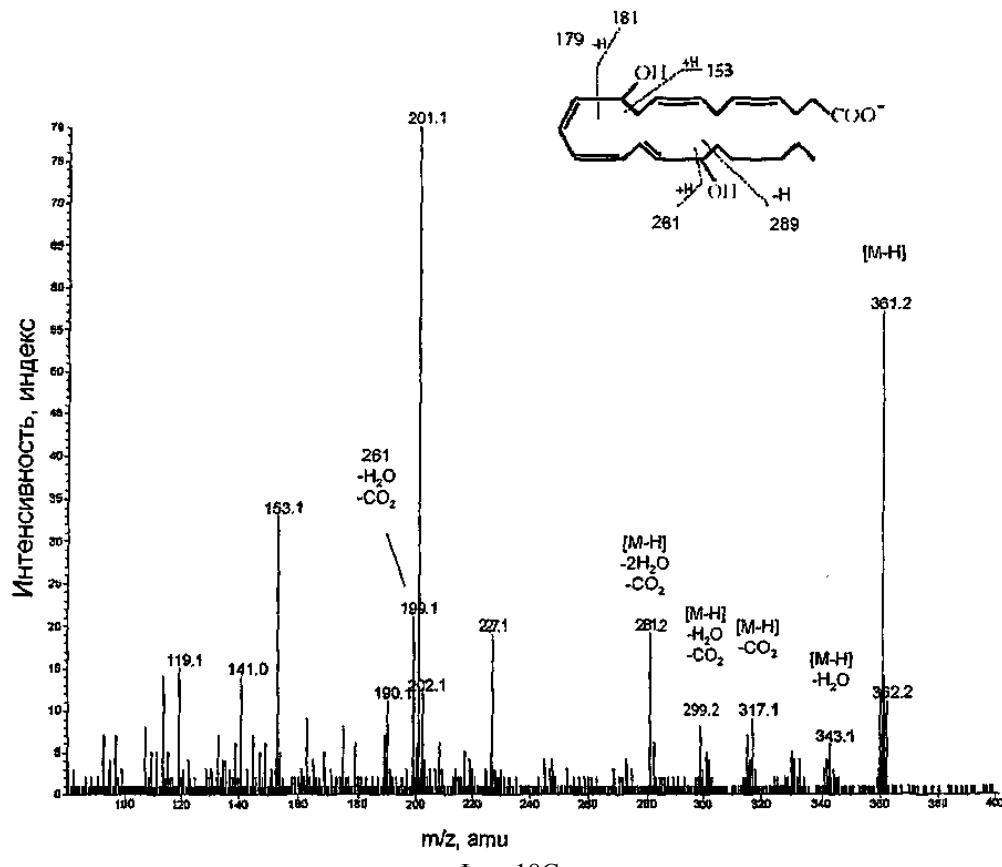
Фиг. 17



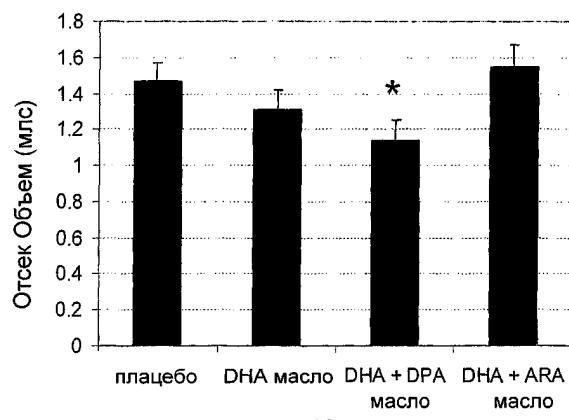
Фиг. 18А



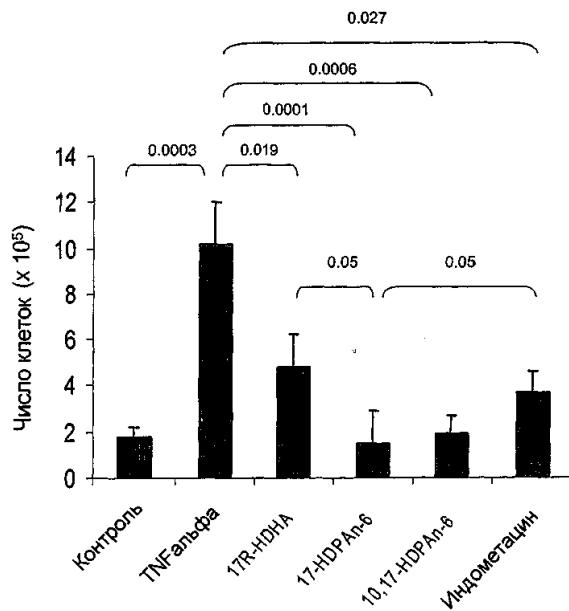
Фиг. 18В



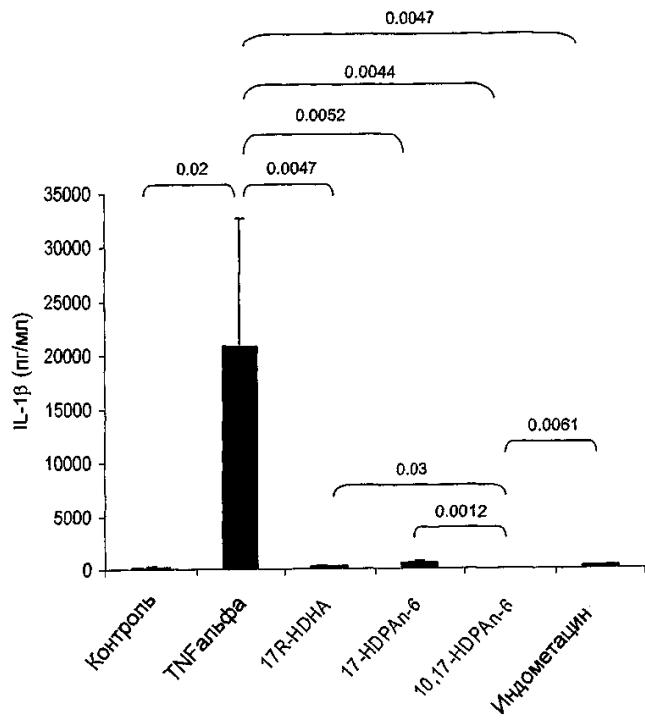
Фиг. 18С



Фиг. 19

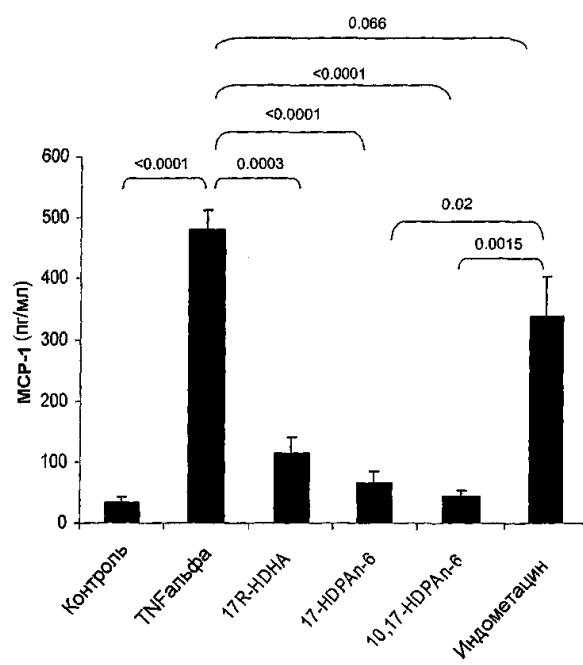


Фиг. 20А

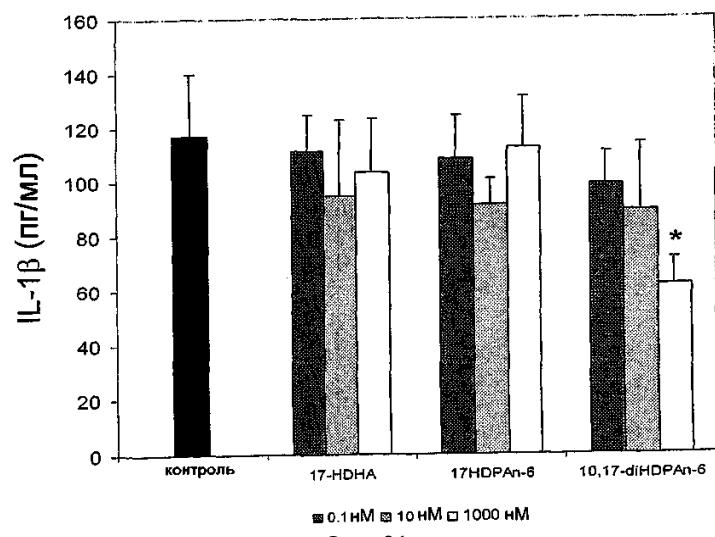


Фиг. 20В

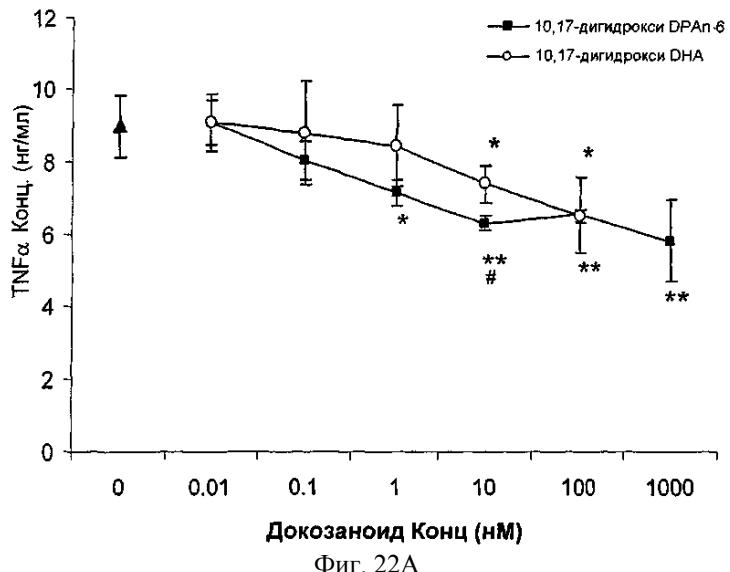
010802



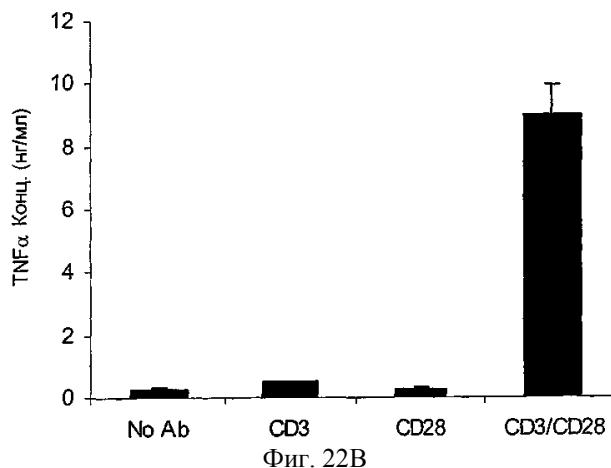
Фиг. 20С



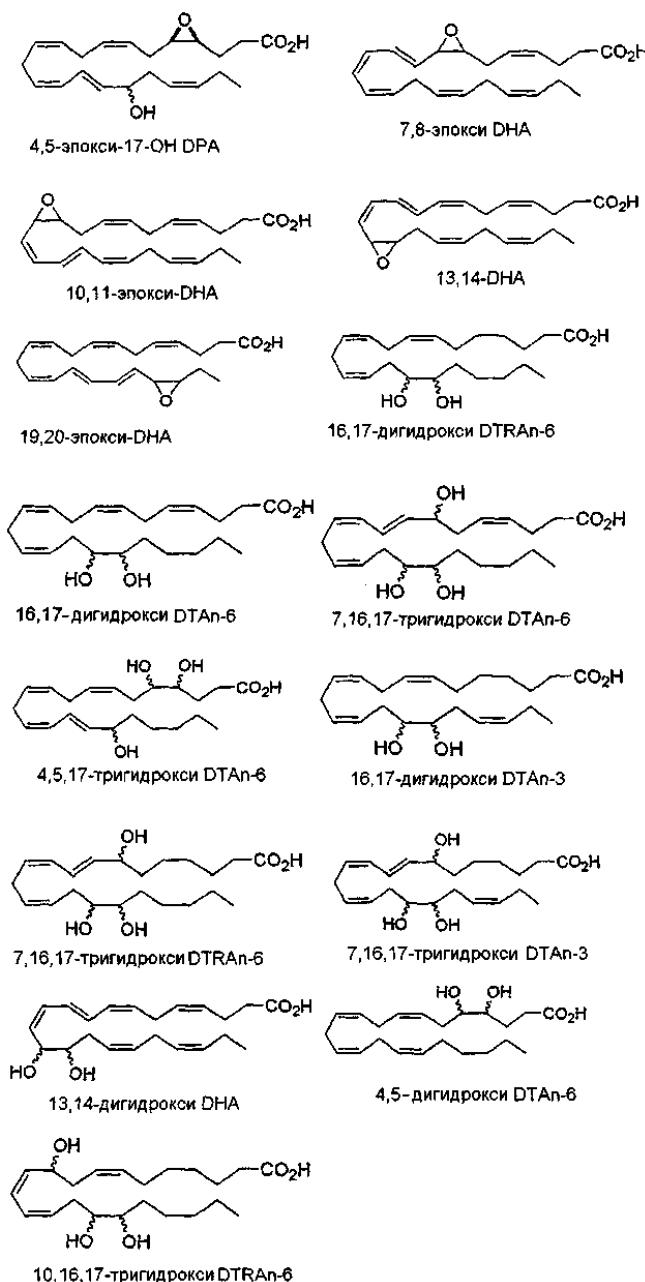
Фиг. 21



Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 23



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6