



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126417** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)
A61K 35/612 (2015.01)
A61K 35/618 (2015.01)
A61P 29/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2020 04611	(72) Винахідник(и): Годжсон Чарльз (NZ), Майєрс Стефен (AU), Олівер Крістофер (AU)
(22) Дата подання заявки: 21.12.2018	(73) Володілець (володільці): ФАРМАЛІНК ІНТЕРНЕТШНЛ ЛІМІТЕД, C/- Third Floor, 31 C-D Wyndham Street, Central, Hong Kong, China (CN)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.09.2022	(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2017905181	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2012/231087 A1 US 2011/020316 A1 ZAWADZKI M. et al., "Perna canaliculus Lipid Complex PCSO-524 (TM) Demonstrated Pain Relief for Osteoarthritis Patients Benchmarked against Fish Oil, a Randomized Trial, without Placebo Control", Marine Drugs, vol. 11, no. 6, ZAWADZKI M. et al., "Perna canaliculus Lipid Complex PCSO-524 (TM) Demonstrated Pain Relief for Osteoarthritis Patients Benchmarked against Fish Oil, a Randomized Trial, without Placebo Control", Marine Drugs, vol. 11, no. 6, 30 June 2013 (2013-06-30), pages 1920 - 1935
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 22.12.2017	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: AU	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.11.2020, Бюл.№ 21	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.09.2022, Бюл.№ 39	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/IB2018/060482, 21.12.2018	

(54) КОМБІНАЦІЇ ЛІПІДІВ**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується комбінації або композиції ліпиду мідії і крилевого масла, яку застосовують для лікування запалення або болю. Даний винахід, крім того, стосується способу отримання крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів приблизно 50 % або більше.

UA 126417 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується, головним чином, комбінацій морських ліпідів. Зокрема, даний винахід стосується комбінацій ліпідів, отриманих з *Perna canaliculus* і крилю, композицій і препаратів, що містять вказані комбінації, і застосування вказаних комбінацій і композицій в терапії. Опис, крім того, стосується способів виготовлення крилевих масел і їх застосування в комбінаціях і композиціях.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Посилання в даному описі на будь-яку попередню публікацію (або отриману з неї інформацію), або на будь-який відомий об'єкт, не являє собою і не повинне бути прийнята як визнання або допущення, або припущення в будь-якій формі, що ця попередня публікація (або отримана з неї інформація) або відомий об'єкт формує частину загальновідомого рівня техніки в галузі, до якої належить даний опис.

Запалення є необхідною фізіологічною адаптивною відповіддю на пошкодження і інфекцію, без якої людина і тварини не могли б вижити. Її функцією є усунення первинної причини пошкодження, видалення провокуючих чинників і ініціація репарації структури і функції тканини. Його рання гостра фаза, як правило, характеризується жаром, болем, почервонінням і набряком. Звичайним виходом гострого запалення є відновлення і репарація пошкодження, однак, непропорційні гострі і тривалі хронічні запальні відповіді при таких станах, як сепсис, можуть бути небезпечними.

Важливо, що хронічне запалення в цей час зв'язали з патологією широкої множини захворювань, що вражають всі тканини і органи, включаючи остеоартрит, ревматоїдний артрит, серцево-судинне захворювання, цереброваскулярне захворювання, респіраторне захворювання, аутоімунне захворювання і саркопенію; дійсно, хронічне запалення зв'язали власне з процесом старіння.

Як відповідь на процес запалення, розроблений ряд лікарських засобів, найбільш ефективними з яких є глюкокортикоїдні стероїдні лікарські засоби, здатні супресувати надмірне запалення. Однак, терапія стероїдними лікарськими засобами обмежена в широкому поширенні клінічного застосування через значні побічні ефекти, і, як правило, обмежена тільки короточасним застосуванням. Розроблений другий клас лікарських засобів проти запалення, які називаються нестероїдними протизапальними лікарськими засобами (NSAIDs), таких як ібупрофен і т. д. - див. таблицю 1. Відомо, що аспірин має протизапальну активність, і що він був частиною цього другого класу протизапальних лікарських засобів. Ці лікарські засоби були більш безпечними, ніж стероїдні лікарські засоби, і могли бути використані для більш хронічних запальних станів, таких як остеоартрит.

Таблиця 1

Список загальноприйнятих нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID)

Родове найменування	Торгове найменування(найменування)
целекоксиб	Целебрекс
диклофенак	Камбіа, катафлам, дилоджект, флєктор, пеннсейд, солараз, вольтарен, вольтарен-XR, зипсор, зорволекс, артротек (комбінація з мізопростолом)
дифлунізал	В даний час немає торгового найменування на ринку
етодолак	В даний час немає торгового найменування на ринку
фенопрофен	Налфон
флубипрофен	Ансейд
ібупрофен	Адвіл, калолор, дитячий адвіл, дитячий еліксшур ІВ, дитячий мотрин, ібу-таб, ібупром, мотрин ІВ, мотрин від мігренозного болю, профен, таб-профен, дуексис (комбінація з фамотидином), репрексаїн ((комбінація з гідрокодоном), вікопрофен ((комбінація з гідрокодоном)
індометацин	Індоцин, тиворбекс
кетопрофен	В даний час немає торгового найменування на ринку
кеторолак	Сприкс
мефенамова кислота	Понстел
мелоксикам	Мобік

набуметон	В даний час немає торгового найменування на ринку
напроксен	Алеве, анапрокс, анапрокс DS, ЕС-напросин, напрелан, напросин, трексимет ((комбінація з суматриптаном), вимово ((комбінація з езомепразолом)
оксапрозин	Дейпро
піроксикам	Фелден
суліндак	Клінорил
толметин	В даний час немає торгового найменування на ринку

Простагландини відіграють ключову роль в запальній відповіді, де їх присутність значно збільшена в ураженій запаленням тканині, вносячи внесок в біль і пропасницю за допомогою підвищення температури і розширення кровоносних судин, що викликає червоність і набряк в тому місці, де вони вивільняються. NSAID є конкурентними інгібіторами активної ділянки як циклооксигенази-1 (COX-1), так і циклооксигенази-2 (COX-2), і таким чином, зменшують синтез простагландинів. За допомогою зменшення продукції простагландинів, NSAID допомагають полегшувати дискомфорт від пропасниці і зменшувати запалення і асоційований біль. NSAIDS звичайно використовують для лікування гострих і хронічних станів, що характеризуються болем і запаленням, таких як остеоартрит, ревматоїдний артрит, головний біль і мігрень, і пропасниця. Однак, NSAIDS також представляють значні проблеми відносно безпеки, і можуть мати токсичність для шлунково-кишкового тракту, нирок і серцево-судинної системи. Наприклад, аспірин може викликати шлункову кровотечу при використанні протягом декількох днів, і в липні 2015 р., FDA повторно висунуло попереднє застереження відносно небезпеки для серця загальноприйнятих NSAID знеболюючих, виключаючи аспірин. Вони включають ібупрофен (адвил, мотрин) і напроксен (алеве) і відпускаються тільки по рецептах NSAID.

Відповідно, існує необхідність в додаткових альтернативних видах протизапальної терапії.

СУТЬ ВИНАХОДУ

У цей час виявлено, що конкретні комбінації ліпиду мідії і крилевого масла можуть переважним чином надавати адитивний або синергічний інгібуючий ефект проти продукції або вивільнення одного або декількох прозапальних медіаторів, залучених до процесу запалення. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можуть, таким чином, забезпечувати нові види терапевтичного лікування проти порушень, що характеризуються запаленням, або що мають запальний компонент. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можуть забезпечувати нові види терапевтичного лікування проти болю, такого як біль, асоційований із запаленням.

Таким чином, в одному аспекті, даний винахід стосується комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло. Комбінацію ліпиду мідії і крилевого масла можна адаптувати для окремого або одночасного введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення, комбінація являє собою композицію, що містить ліпід мідії і крилеве масло.

У іншому аспекті даний винахід стосується комбінації, що містить, або що в основному складається з ліпиду мідії і крилевого масла. Комбінацію ліпиду мідії і крилевого масла можна адаптувати для окремого або одночасного введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення, комбінація являє собою композицію, яка складається або в основному складається з ліпиду мідії і крилевого масла.

У іншому аспекті, даний винахід стосується комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло, для використання в терапії. У деяких варіантах здійснення, даний винахід стосується комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло, для використання в лікуванні запалення у суб'єкта. Даний винахід стосується також комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло, для використання в лікуванні болю у суб'єкта. Комбінацію ліпиду мідії і крилевого масла можна адаптувати для окремого або одночасного введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення, комбінація являє собою композицію, що містить ліпід мідії і крилеве масло.

У іншому аспекті, даний винахід стосується способу лікування запалення у потребуючого цього суб'єкта, який включає введення вказаного суб'єкта комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло. Даний винахід стосується також способу лікування болю у потребуючого цього суб'єкта, який включає введення вказаному суб'єкту комбінації, що містить ліпід мідії і крилеве масло. Комбінацію ліпиду мідії і крилевого масла можна адаптувати для окремого або одночасного введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення, комбінація являє собою композицію, що містить ліпід мідії і крилеве масло.

У іншому аспекті даний винахід стосується використання ліпиду мідії і крилевого масла у виготовленні комбінованого лікарського засобу для лікування запалення. Даний винахід стосується також використання ліпиду мідії і крилевого масла у виготовленні комбінованого лікарського засобу для лікування болю. Лікарський засіб можна адаптувати для окремого або

5

одночасного введення. У деяких варіантах здійснення, комбінація являє собою композицію, що містить ліпід мідії і крилеве масло.

У іншому аспекті даний винахід стосується комбінованого засобу для лікування запалення, де вказана комбінація містить ліпід мідії і крилеве масло. Даний винахід стосується також комбінованого засобу для лікування болю, де вказана комбінація містить ліпід мідії і крилеве

10

масло. Ліпід мідії і крилеве масло можна адаптувати для окремого або одночасного введення суб'єкту. У деяких варіантах здійснення, комбінований засіб являє собою композицію, що містить ліпід мідії і крилеве масло.

У деяких варіантах здійснення, ліпід мідії знаходиться в формі порошку з висушених мідій. У інших варіантах здійснення, ліпід мідії знаходиться в формі екстракту ліпиду, отриманого з мідії ("екстракт ліпиду мідії"). У наступних варіантах здійснення, ліпід мідії може знаходитися в формі

15

комбінації або композиції порошку з висушених мідій і екстракту ліпиду мідії.

У деяких варіантах здійснення, крилеве масло має вміст фосфоліпідів в діапазоні приблизно 40-99 % мас./мас., і в наступних варіантах здійснення, вміст фосфоліпідів в діапазоні приблизний 50-99 % мас./мас., наприклад, приблизно 60-80 % мас./мас.

20

У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можна використовувати в лікуванні одного або декількох порушень у суб'єкта, де порушення має запальний компонент, і таким чином, інгібування однієї або декількох прозапальних молекул забезпечує терапевтичну перевагу. У деяких варіантах здійснення, комбінації можуть бути придатними для лікування одного або декількох хронічних порушень.

25

У деяких варіантах здійснення, наприклад, для використання в лікуванні хронічного запалення, комбінації можуть припиняти, виключати або іншим чином пом'якшувати ступінь, тяжкість або тривалість одного або декількох несприятливих ефектів, асоційованих із загальнодоступними NSAID.

30

У іншому аспекті, даний винахід стосується способу отримання крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів приблизно 50 % або більше, наприклад, приблизно 60 % або більше, що включає стадії:

(а) наведення матеріалу біомаси крилю, яка подається, в контакт зі сумішшю CO₂ і етанолу, для екстракції крилевого масла; і

35

(б) наведення вказаного крилевого масла в контакт з CO₂ для екстракції щонайменше частини неполярних ліпідних компонентів, таким чином, щоб масло мало вміст фосфоліпідів щонайменше 50 % мас./мас.

40

У деяких варіантах здійснення, крилеве масло, отримане цим способом, має вміст фосфоліпідів приблизно 60 % мас./мас. або більш, наприклад, щонайменше приблизно 65 % мас./мас., або 70 % мас./мас., або 75 % мас./мас., або 80 % мас./мас., або 85 % мас./мас. або 90 % мас./мас.

Даний винахід стосується також способу збагачення вмісту фосфоліпідів крилевого масла.

Таким чином, в наступному аспекті, даний винахід стосується способу збільшення вмісту фосфоліпідів крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів менший 50 % мас./мас., до приблизно 50 % мас./мас. або більше, що включає стадію наведення крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів менший 50 % мас./мас., в контакт з CO₂ для вибіркового видалення неполярних ліпідних компонентів.

45

У деяких варіантах здійснення, попередньо отримане крилеве масло має вміст фосфоліпідів менше приблизно 50 %, мас./мас., наприклад, менше приблизно 40 % або менше приблизно 30 % мас./мас., або 20 % мас./мас. У деяких варіантах здійснення, отриманим таким чином збагачене масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 55 % мас./мас. або щонайменше приблизно 60 % мас./мас. або щонайменше приблизно 65 % мас./мас., або щонайменше приблизно 70 % мас./мас., або щонайменше приблизно 75 % мас./мас., або щонайменше приблизно 80 % мас./мас., або щонайменше приблизно 85 % мас./мас., або щонайменше приблизно 90 % мас./мас.

50

Наступний варіант здійснення стосується крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів приблизний 50 % мас./мас. або більш, (наприклад, >60 % мас./мас.), отриманому способом за даним винаходом.

55

Наступні варіанти здійснення відносяться до крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів приблизний 50 % або 60 % мас./мас. або більше, для використання в комбінаціях і композиціях, описаних в даному описі.

60

На фігурі 9B графічно зображене вивільнення TNF α (%) в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IF γ) клітинах RAW264.7 для різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY50-LY35).

На фігурі 10 графічно зображена ізоболограма синергічного інгібування TNF α за допомогою різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY90-LY10).

На фігурі 11A графічно зображене вивільнення IL-6 (%) в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IF γ) клітинах RAW264.7 для різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY90-LY50).

На фігурі 11B графічно зображене вивільнення IL-6 (%) в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IF γ) клітинах RAW264.7 для різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY50-LY10).

На фігурі 12A графічно зображене вивільнення IL-6 (%) в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IF γ) клітинах RAW264.7 для різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY70-LY50).

На фігурі 12B графічно зображене вивільнення IL-6 (%) в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IF γ) клітинах RAW264.7 для різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY50-LY30).

На фігурі 13 графічно зображена ізоболограма синергічного інгібування IL-6 за допомогою різних концентрацій комбінацій екстракту ліпиду мідії і крилевого масла (LY90-LY10).

ОПИС

Протягом цього опису і формули винаходу, яка йде нижче, якщо контекст не вимагає іншого, слово "містити" і його варіанти, такі як "містить" і "що містить", розуміють як такий, що передбачає включення вказаного цілого числа або стадії, або групи цілих чисел, але не виключення будь-якого іншого цілого числа або стадії, або групи цілих чисел або стадій.

Протягом цього опису і формули винаходу, яка йде нижче, якщо контекст не вимагає іншого, фразу "в основному що складається з" і варіанти, такі як "в основному складається з" розуміють як вказуючу на те, що перерахований елемент(и) є основними, тобто, необхідними елементами за винаходом. Фраза дозволяє присутність інших не перерахованих елементів, які не впливають істотним чином на характеристики винаходу, але виключає додаткові не вказані елементи, які можуть впливати на основні і нові характеристики певного винаходу.

Форми однини включають аспекти множини, якщо контекст явно не вимагає іншого.

Термін "винахід" включає всі розкриття, аспекти, варіанти здійснення і приклади, як описано в даному описі.

У рамках винаходу, "приблизно" стосується кількості, значення або параметра, які можуть змінюватися на 10 %, 5 % або 2-1 % від вказаної кількості, значення або параметра, і включає щонайменше допустимі відхилення, прийняті в даній галузі. При використанні застосовно до вказаного повного числового значення, "приблизно" може включати відхилення на одне ціле число в кожен бік від вказаного значення, наприклад, "50 %" може включати 49 % і 51 %. Коли передує перерахованому діапазону значень, воно призначене для застосування як до верхнього, так і нижньому межам діапазону.

Якщо контекст не вказує на інше, ознаки, описані нижче, можна застосовувати незалежно до будь-якого аспекту або варіанту здійснення.

У рамках винаходу, "ліпід мідії" стосується ліпідного компонента, екстрагованого або отриманого з новозеландської зеленогубої (NZGL) (або зеленої) мідії (*Perna canaliculus*). Ліпід мідії може містити одне або декілька з поліненасичених жирних кислот з довгим ланцюгом (PUFA), таких як ALA, ETA, EPA і DHA, стеролів, складних ефірів стеролів, тригліцеридів, неполярних ліпідів, каротеноїдів і інших компонентів м'яса мідії (NZGL). Ліпід мідії може знаходитися в формі порошку з висушених мідій, або ліпідної фракції, екстрагованій з м'яса мідії ("екстракт ліпиду мідії"). Передбачають також, що "ліпід мідії" включає суміш порошку мідії і екстракту ліпиду мідії, наприклад, ліпід мідії можна доповнювати за допомогою додавання порошку мідії або навпаки. У деяких варіантах здійснення, ліпід мідії являє собою виділену ліпідну фракцію.

Порошок ліпиду мідії можна отримувати зі свіжого (сирого), замороженого або обробленого нагріванням м'яса мідії NZGL за допомогою будь-яких придатних способів сушіння (наприклад, ліофілізації, сушіння розпиленням або вакуумного сушіння) і способів подрібнення в порошок. У доповнення до жирних кислот (що включають ALA, ETA, EPA і DHA), порошок мідії, отриманий з висушеного м'яса мідії, може також містити інші, потенційно забезпечуючі перевагу компоненти, включаючи мінерали, амінокислоти, пептиди, білки і глікозаміноглікани (наприклад, хондроїтин-4-сульфат і хондроїтин-6-сульфат). Способи отримання порошку мідії відомі в даній галузі.

Екстракт ліпиду мідії можна отримувати зі свіжого (сирого), замороженого, обробленого нагріванням або висушеного (наприклад, висушеного за допомогою ліофілізації, сушіння розпиленням або вакуумного сушіння) м'яса мідії NZGL (наприклад, в порошкоподібній, висушеній розпиленням або подрібненій в порошок формі) за допомогою будь-якого відповідного способу, такого як екстракція розчинником (наприклад, ацетоном або етанолом - див., наприклад, WO2005073354 A1, вміст якого наведений як посилання), обробка ферментом (див., наприклад, WO2006128244, вміст якого наведений як посилання) або надкритична флюїдна екстракція. У деяких варіантах здійснення, екстракт ліпиду мідії переважним чином отримують за допомогою екстракції з використанням надкритичного CO₂ з висушеного (наприклад, ліофілізованого) м'яса мідії (необов'язково, стабілізованого для запобігання окисненню). Ілюстративний спосіб отримання екстракту ліпиду мідії описаний в WO 97/09992 A1, вміст якого наведений як посилання. Інші способи відомі в даній галузі.

У переважних варіантах здійснення, способи здійснюють в таких умовах, щоб компоненти, які забезпечують перевагу, такі як жирні кислоти, істотно не руйнувалися і значною мірою зберігалися, наприклад, з обробкою на холоді.

Один ілюстративний екстракт ліпиду мідії, отриманий відповідно дої способом, описаним в WO 97/09992 A1, відомий також як PCSO-524[®] (Pharmalink International Limited, Hong Kong). PCSO-524[®] містить доданий вітамін Е (0,15 % мас./мас., доданий як протиокиснювальний консервант), і містить комбінацію вільних жирних кислот, тригліцеридів, складних ефірів стеролів, неполярних ліпідів і каротеноїдів (Sinclair, A. J. et al, 2000), і є джерелом омега-3-поліненасичених жирних кислот з довгим ланцюгом, ейкозапентаєнової кислоти (ЕРА) і докозагексаєнової кислоти (DHA), так само як інших жирних кислот з довгим ланцюгом, таких як 5,9,12,15-октадекатетраєноєва кислота, 5,9,12,16-нонадекатетраєноєва кислота, 7,11,14,17-ейкотетраєноєва кислота і 5,9,12,15,18-хейкозапентаєноєва кислота. PCSO-254[®] (складений разом з оливковим маслом в інкапсульованій пероральній лікарській формі), продається на ринку під найменуванням Lyprinol[®] і Omega XL[®], (для вживання людиною) і Antinol[®] (для собак і кішок).

У деяких варіантах здійснення, екстракт ліпиду мідії, використаний в комбінаціях за даним винаходом, складають з вітаміном Е (доданим, наприклад, в кількості приблизно 0,2 % мас./мас. або 0,15 % мас./мас., або 0,1 % мас./мас., або 0,05 % мас./мас., або приблизно 0,03 % мас./мас., або приблизно 0,01 % мас./мас.). У деяких варіантах здійснення, ліпід мідії використовують в формі PCSO-254[®], тобто, екстракту ліпиду мідії, що містить 0,15 % мас./мас. вітаміну Е. В деяких варіантах здійснення, ліпід мідії, необов'язково, утримуючий вітамін Е, додатково складають з маслом-носієм, таким як оливкове масло. У той час як, в деяких варіантах здійснення, ліпід мідії являє собою екстракт ліпиду мідії і містить доданий вітамін Е, додавання вітаміну Е є необов'язковим, і таким чином, в деяких варіантах здійснення, екстракт ліпиду мідії використовують без домішок, тобто, він не містить ніяких інших додаткових інгредієнтів, таких як вітамін Е.

Ліпід мідії, в різних формах, можна також закуповувати з комерційних джерел.

Крилеве масло можна отримувати з будь-якого придатного виду крилю, включаючи *Euphausia superba* (антарктичний криль), *Euphausia pacifica* (тихоокеанський криль), *Maganicitiphanes norvegica* (північний криль), *Euphausia crystallorophias* (крижаний криль), *Euphausia frigida*, *Euphausia longirostris*, *Euphausia triacantha* і *Euphausia vallentini*. У деяких переважних варіантах здійснення, крилеве масло отримують з *Euphausia superba*.

Морські ліпіди містять жирні кислоти, зокрема, омега-3-жирні кислоти, такі як ЕРА і DHA, у вільній і тригліцеридній формі. Подібним чином, крилеве масло також є багатим омега-3-жирними кислотами, однак, крилеве масло містить значні кількості фосфоліпідів, де жирні кислоти приєднані до групи фосфатної головки через групу гліцерину. Ця пов'язана з фосфоліпідом форма жирних кислот більш ефективно поглинається клітинними мембранами, ніж тригліцеридна форма, і таким чином, є більш легко біодоступною. Типові фосфоліпіди, виявлені в крилевому маслі, можуть включати: фосфатидилхолін, алкілацилфосфатидилхолін, фосфатидилінозитол, фосфатидилсерин, лізофосфатидилхолін, лізоалкілацилфосфатидилхолін, фосфатидироківаноламін, алкілацилфосфатидироківаноламін, кардіоліпін+N-ацилфосфатидироківаноламін, лізофосфатидироківаноламін, і лізоалкілацилфосфатидироківаноламін. Крилеве масло також містить помітні кількості астаксантину, антиоксиданта, відповідального також за його червоний колір.

У деяких варіантах здійснення, крилеве масло містить щонайменше приблизно 1 % мас./мас., 5 % мас./мас., 10 % мас./мас. або щонайменше приблизно 20 % мас./мас. фосфоліпідів. У наступних варіантах здійснення, масло містить щонайменше приблизно 25 % мас./мас. або щонайменше приблизно 30 % мас./мас., або щонайменше приблизно 35 %

мас./мас., або щонайменше приблизно 40 % мас./мас., або щонайменше приблизно 45 % мас./мас., або щонайменше приблизно 50 % мас./мас., або щонайменше приблизно 55 % мас./мас., або щонайменше приблизно 60 % мас./мас., або щонайменше приблизно 65 % мас./мас. або щонайменше приблизно 70 % мас./мас., або щонайменше приблизно 75 % мас./мас., або щонайменше приблизно 80 % мас./мас. або щонайменше приблизно 85 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 90 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 95 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 97 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 98 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 99 %, мас./мас. фосфоліпідів. У деяких варіантах здійснення, крилеве масло має вміст фосфоліпідів в діапазоні приблизно 40-99 % мас./мас. У деяких додаткових варіантах здійснення, крилеве масло має вміст фосфоліпідів в діапазоні приблизно 60-99 % мас./мас., наприклад, в діапазоні приблизно 65-90 % мас./мас. У рамках винаходу, "збагачене" крилеве масло стосується крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 60 % мас./мас. Вміст фосфоліпідів можна визначати будь-якими придатними в даній галузі способами, наприклад, аналізом ³¹P ЯМР.

Способи отримання крилевого масла, включаючи крилеве масло, збагачене фосфоліпідами, відомі в даній галузі. Як правило, свіжу, заморожену і/або оброблену нагріванням біомасу крилю (наприклад, *Euphasia superba* або *Euphasia pacifica*) можна піддавати екстракції з використанням розчинників (наприклад, спиртів, таких як етанол; кетонів, таких як ацетон; або диметоксietану) і/або надкритичної рідини (наприклад, CO₂). Деякі необмежувальні ілюстративні способи отримання крилевого масла описані в Патенті США No. 9028877, Патенті США No. 9375453, Патенті США No. 6800299, Патенті США No. 8828447, Патенті США No. 9150815, Патенті США No. 8383845, WO2007/123424, WO2011/050474, WO2015/104401 і WO2015/121378, зміст яких наведений в даному описі як посилання. Додаткові способи також описані в даному описі. Крилеве масло можна також закуповувати від комерційних постачальників.

У деяких переважних варіантах здійснення, крилеве масло має вміст води приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. У деяких варіантах здійснення, крилеве масло має залишковий вміст розчинника для екстракції приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. У наступних варіантах здійснення, крилеве масло має вміст води приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4 або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше, і залишковий вміст розчинника для екстракції приблизний 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. Воду і розчинник можна видаляти будь-якими придатними способами, такими як дуже коротке або обережне нагрівання (наприклад, 30 хв. або 1 година, або 2 години, або 3 години, при температурі приблизно або менше приблизно 60 °C або 50 °C, або 40 °C, і переважно, таке, щоб цілісність складових не була істотно порушена), використання потоку азоту або ліофілізація (сублимація).

Інгібуючу активність комбінацій проти одного або декількох запальних медіаторів, таких як оксид азоту (NO), цитокіни, такі як інтерлейкіни, (наприклад, IL-6), простагландини (наприклад, PG-E2) і TNFα, можна використовувати в лікуванні одного або декількох порушень або симптомів у суб'єкта, таким чином, інгібування однієї або декількох з таких молекул забезпечує терапевтичну перевагу. Зокрема, комбінації за даним винаходом можна використовувати в лікуванні надмірного гострого або хронічного запалення, і/або одного або декількох з асоційованих з ним симптомів, таких як біль, пропасниця, почервоніння і набряк. У деяких варіантах здійснення, комбінації можна використовувати в лікуванні запалення при порушеннях, патологія яких включає запальний компонент, і/або болю, асоційованого з такими порушеннями. Деякі необмежувальні приклади порушень, що включають запальний аспект, включають атеросклероз, алергію, астму, аутоімунне захворювання (наприклад, целиацію, псоріаз, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит), фіброміалгію, подагру, мігрень, остеоартрит, виразковий коліт, злоякісну пухлину, погіршення когнітивної діяльності, включаючи хворобу Альцгеймера, діабет типу 2, синдром відстроченої м'язової хворобливості (DOMS), хворобу Крона і анкілозивний спондиліт. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можна використовувати в лікуванні болю в суглобах або в поліпшенні рухливості суглобів в зв'язку з остеоартритом або ревматоїдним артритом. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можна використовувати в лікуванні порушення, при якому інгібування PGE2 може забезпечувати перевагу, такого як ревматоїдний артрит, мігрень і біль (який може являти собою ноцицептивний (соматичний або вісцеральний) біль, і/або нейропатичний біль).

Зрозуміло, що комбінації, описані в даному описі, можна адаптувати для окремого або одночасного введення. При адаптації для одночасного введення, комбінацію можна надавати і/або вводити в формі однорідної композиції або суміші, що містить як екстракт ліпиду мідії, так і

крилеве масло, або у вигляді дискретних лікарських форм кожного компонента комбінації. Коли кожен з екстрактів ліпиду мідії і крилевого масла надають і/або вводять окремо, їх можна вводити одночасно, один за одним або кожен в різний час.

У наступних варіантах здійснення, ліпід мідії і крилеве масло можна, необов'язково, складати, або разом, або індивідуально, в комбінації з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями і/або добавками. Деякі приклади придатних носіїв являють собою харчові масла, такі як оливкове масло, рицинова олія, льняне масло, виноградне масло, риб'ячий жир (наприклад, тунцевий жир), олія каноли, рослинна олія, соняшникова олія, олія чіа, соєва олія, кунжутна олія, водоростева олія і їх суміші. Одну або декілька необов'язкових добавок, таких як антиокисники, вітаміни (такі як жиророзчинні вітаміни (A, D, E і K) або водорозчинні вітаміни (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C), харчові мінеральні речовини, амінокислоти, засоби, які маскують запах і смак, емульгатори, фармацевтично прийнятні спирти, (наприклад, етанол, гліцерин, пропіленгліколь і поліетиленгліколь) або інші модифікатори в'язкості, поверхнево-активні речовини (наприклад, полісорбати), суспендуючі засоби, лактоза, декстроза, сахароза, маніт, сорбіт, глюкоза, мастильні засоби, зв'язувальні засоби, крохмаль, підсилювачі абсорбції і консерванти, і т. д., також можна включати. Носій або добавка може здійснювати одну або декілька функцій. Ліпід мідії і/або крилеве масло можна, необов'язково, далі доповнювати або комбінувати з використанням одного або декількох додаткових очищених або частково очищених компонентів мідії і крилевого масла, таких як астаксанти і його складні ефіри, жирні кислоти (наприклад, EPA, DHA), в формі вільної кислоти, складного ефіру кислоти, тригліцериду або фосфоліпиду, стероли, складні ефіри стеролів, амінокислоти, пептиди і білки, і глікозаміноглікани (наприклад, хондроїтинсульфати). Інші протизапальні харчові продукти, наприклад, їх цільномелену форму або екстракти, наприклад, куркуму (куркумін), імбир, часник, гвоздику і т. д., також можна, необов'язково, включати.

Склади комбінацій можна отримувати відповідно до способів, відомих в даній галузі. Такі способи включають стадію однорідного змішування екстракту ліпиду мідії і/або крилевого масла з носієм, необов'язково, разом з одним або декількома додатковими інгредієнтами. Зрозуміло, що будь-який носій або добавка повинні бути фармацевтично прийнятними.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення, ліпід мідії і крилеве масло складають, або окремо, або разом, з маслом-носієм, таким як оливкове масло. У деяких варіантах здійснення, масло-носій складає від приблизно 10 % мас./мас. до приблизно 90 % мас./мас., наприклад, від приблизно 20 % мас./мас. до приблизно 80 % мас./мас. комбінації або композиції. У наступних варіантах здійснення, масло-носій становить приблизно 25 % мас./мас. або приблизно 30 % мас./мас., або приблизно 35 % мас./мас., або приблизно 40 % мас./мас., або приблизно 45 % мас./мас., або приблизно 50 % мас./мас., або приблизно 55 % мас./мас., або приблизно 60 % мас./мас., або приблизно 65 % мас./мас., або приблизно 70 % мас./мас., або приблизно 75 % мас./мас. комбінації або композиції. У деяких варіантах здійснення, співвідношення маси масла-носія і об'єднаної кількості ліпиду мідії і крилевого масла становить приблизно 3:1 або приблизно 2,5:1, або приблизно 2:1, або приблизно 1,5:1, або приблизно 1:1, або приблизно 1:1,5, або приблизно 1:2, або приблизно 1:2,5, або приблизно 1:3.

У той час як будь-яка форма введення передбачена за даним винаходом, наприклад, пероральна, парентеральна, місцева, черезшкірна або підшкірна, переважним чином, в деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можна надавати і/або вводити в пероральній лікарській формі. У деяких варіантах здійснення, комбінації можна представляти в нерозфасованій формі, наприклад, в формі рідин, сиропів, паст, напівтвердих воску, дисперсій, суспензій, емульсій (наприклад, вода-в-маслі або масло-у-воді), тонко подрібнених порошків або мікроінкапсульованих порошків, з яких можна відмірювати індивідуальні дози. Відмірювання і/або введення можна здійснювати за допомогою будь-яких засобів, таких як ложка або лопатка, шприц, піпетка або мірна склянка. Відміряні дози можна вводити безпосередньо суб'єкту або змішувати з харчовими продуктами або напоями, наливати в них або обприскувати їх.

У інших варіантах здійснення, комбінації переважним чином представляють в одиничних пероральних дозованих формах, тобто, в фіксованих дозованих формах. Деякі приклади придатних одиничних пероральних дозованих форм включають індивідуально упаковані ампули, пробірки, заповнені шприци, саше, жувальні табірочки і капсули (включаючи тверді і м'які желатинові капсули).

Одним прикладом придатної одиничної пероральної дозованої форми є капсула, в формі твердої або м'якої оболонки. Оболонка може містити одне або декілька з желатину, пулулану, гіпромелози, співполімера PVA, карагану або іншого сахаридного компонента, такого як крохмаль або целюлоза, або їх суміші, і можуть додатково включати барвники, замутнювальні засоби, пластифікатори (наприклад, сорбіт, ксилізу, мальтит і гліцерин) і т.д. Способи

інкапсуляції морських масел і ліпідів, таких як ліпід мідії і крилеве масло, відомі в даній галузі. Див., наприклад, WO2015/121378, вміст якого наведений в даному описі як посилання. У деяких варіантах здійснення, коли крилеве масло інкапсулюють окремо, крилеве масло можна інкапсулювати при відсутності необов'язкових додаткових засобів, таких як модифікуючі

5 в'язкість засоби, іншими словами, наповнення капсули в основному складається з крилевого масла.

У деяких переважних варіантах здійснення, комбінації ліпиду мідії і крилевого масла за даним винаходом представлені в формі м'якої желатинової капсули, наприклад, м'якої желатинової капсули, що містить як ліпід мідії, так і крилеве масло, або індивідуальних м'яких желатинових капсул, де ліпід мідії і крилеве масло інкапсульовані окремо, необов'язково, разом з придатними носіями і/або добавками. Придатні м'які желатинові капсули можна отримувати з желатину (або альтернативних джерел сахариду, таких як пулунан і гіпромелоза), необов'язково, з одним або декількома пластифікаторами, такими як сорбіт і гліцерин (гліцерол), і добавками, такими як забарвлюючі і замутнювальні засоби. У одному прикладі,

15 оболонка м'якої желатинової капсули може містити желатин, і одне або обидва з сорбіту і гліцерину.

Мікроінкапсуляція являє собою спосіб, за допомогою якого невеликі крапельки або частинки оточують покриваючою стінкою або занурюють в матрикс для формування порошку, де покриття або матрикс формує функціональний бар'єр, який виключає або зменшує схильність

20 хімічним реакціям, таким як окиснення. Крім того, вони можуть грати потенційну роль маскування смаку або запаху. Таким чином, в деяких варіантах здійснення, ліпід мідії і/або крилеве масло можна мікроінкапсулювати, або окремо, або спільно, для формування порошку. Загальноприйняті способи мікроінкапсуляції включають емульгацію, сушіння розпиленням, сублімацію, коаксіальне електророзпилення, екструзію, коацервацію, надкритичну флюїдну технологію і полімеризацію *in situ*. Матеріали покриття включають природні і синтетичні полімери, вуглеводи (наприклад, крохмаль, глюкозу), білки (наприклад, казеїн, желатин) і їх суміші. (Див., наприклад, Bakry, A. M., et al, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15, 143, 2016, і процитовані в цьому документі посилання, WO2014/170464 і WO2014/169315, вміст яких наведений в даному описі як посилання). Ліпід мідії і/або крилеве

30 масло можна мікроінкапсулювати з одним або декількома носіями або добавками, як описано вище. Порошок мікроінкапсульованого ліпиду мідії і/або крилевого масла можна далі інкапсулювати, наприклад, в одиничній дозованій формі капсули з твердою оболонкою. Порошкоподібні мікроінкапсульовані ліпід або масло можна, необов'язково, комбінувати з одним або декількома носіями або добавками.

У деяких варіантах здійснення комбінації за даним винаходом можна приймати з харчовими продуктами або напоями, наприклад, за допомогою обприскування, перемішування, змішування або інших способів нанесення або введення комбінації екстракту ліпиду мідії і крилевого масла на або в харчовий продукт або напій. Таким чином, комбінації можна надавати в форматі для включення в або нанесення на напій або харчовий продукт. У деяких варіантах здійснення,

40 комбінацію можна також вносити в склад при отриманні харчових продуктів і напоїв для отримання функціональних харчових продуктів.

У деяких варіантах здійснення, ліпід мідії і крилеве масло складають, або окремо, або спільно, з маслом-носієм, таким як оливкове масло, необов'язково, з антиоксидантом (наприклад, вітаміном Е).

Суб'єкти, що підлягають лікуванню за допомогою комбінацій за даним винаходом, включають суб'єктів-ссавців, таких як люди, примати, котяті, собачі, бичачі, кінські, свині, великі кажани, овець і козячі, і включають сільськогосподарських тварин (наприклад, корів, коней, овець, свиней і кіз), домашніх тварин (наприклад, собак, кішок, кроликів, морських свинок) і диких тварин, що утримуються в неволі. Лабораторні тварини, такі як кролики, миші, щури, морські свинки і хом'яки, також передбачені, оскільки вони можуть забезпечувати зручну систему тестування.

50 Будь-яка з лікарських форм, описаних вище, може бути застосовною для людини або для ветеринарного використання, при необхідності.

Ефективна для лікування кількість призначена для включення кількості комбінації, яке, при введенні відповідно до бажаного режиму дозування, є спільно ефективним для щонайменше часткового досягнення бажаного терапевтичного ефекту, включаючи одне або декілька з: полегшення, припинення або зменшення тривалості, тяжкості і/або частот запалення, і/або одного або декількох симптомів запалення (наприклад, жару, болю, набряку, почервоніння), запобігання або затримкам початку, інгібування прогресування, або зупинки або повернення

55

(часткового або повного) початку або прогресування конкретного порушення або стану, що піддається лікуванню.

Придатні рівні дози і режими дозування може визначати лікуючий терапевт або ветеринар, і вони можуть залежати від конкретного стану/симптому, що піддається лікуванню, тяжкості стану, так само як загальних параметрів віку, стану здоров'я і маси суб'єкта. Придатні щодобові рівні дози ліпиду мідії і/або крилевого масла можуть незалежно лежати в діапазоні від приблизно 10 мг до приблизно 10 г, наприклад, приблизно 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г або приблизно 9,5 г. У деяких додаткових варіантах здійснення, щодобові дози комбінації можуть лежати в діапазоні від приблизно 20 мг до приблизно 15 г, наприклад, приблизно 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г, 9,5 г, 10,0 г, 10,5 г, 11,0 г, 11,5 г, 12,0 г, 12,5 г, 13,0 г, 13,5 г, 14,0 г або 14,5 г.

У деяких варіантах здійснення, індивідуальні одиничні дози (наприклад, м'яка желатинова капсула) можуть містити приблизно 10 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 275 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 310 мг, 320 мг, 325 мг, 330 мг, 340 мг, 350 мг, 360 мг, 365 мг, 370 мг, 375 мг, 380 мг, 390 мг, 400 мг, 410 мг, 420 мг, 425 мг, 430 мг, 440 мг, 450 мг, 460 мг, 465 мг, 470 мг, 475 мг, 480 мг, 490 мг або приблизно 500 мг комбінації, необов'язково, складені разом з маслом-носієм (наприклад, оливковим маслом). У деяких додаткових варіантах її здійснення, комбінація додатково містить вітамін Е. В деяких додаткових варіантах їх здійснення, комбінації містять ліпід мідії (наприклад, такий як PCSO-524) в кількості в діапазоні від приблизно 10 % до приблизно 90 % мас./мас. від загальної сумарної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, і містять крилеве масло в кількості в діапазоні від приблизно 90 % до приблизно 10 % мас./мас. від загальної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, тобто, співвідношення маси ліпиду мідії і крилевого масла від приблизно 10:90 до 90:10, наприклад, ліпід мідії і крилеве масло в співвідношенні маси приблизно 15:85 або приблизно 20:80, або приблизно 25:75, або приблизно 30:70, або приблизно 35:65, або приблизно 40:60, або приблизно 45:55, або приблизно 50:50, або приблизно 55:45, або приблизно 60:40, або приблизно 65:35, або приблизно 70:30, або приблизно 75:25, або приблизно 80:20, або приблизно 85:15.

Дози можна зручним чином вводити один раз на добу, або щодобові дози можна дробити і вводити множинну разів (наприклад, два, три або чотири рази) щодобово. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можна вводити один, два, три або більше разів щотижня, наприклад, на добу, яка чергується. У деяких варіантах здійснення, лікування може бути безперервним або довгостроковим, наприклад, протягом періоду щонайменше 6-12 місяців або щонайменше 2-3 років, або поточним.

Комбінації за даним винаходом, наприклад, в будь-якому з щодобових рівнях дозування, можуть містити ліпід мідії в кількості в діапазоні від приблизно 1 % до приблизно 99 % мас./мас. від загальної сумарної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, і містять крилеве масло в кількості в діапазоні від приблизно 99 % до приблизно 1 % від загальної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, тобто, співвідношення маси ліпиду мідії і крилевого масла від приблизно 1:99 до 99:1. У деяких варіантах здійснення, комбінації містять ліпід мідії в кількості в діапазоні від приблизно 5 % до приблизно 95 % мас./мас. від загальної сумарної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, і містять крилеве масло в кількості в діапазоні від приблизно 95 % до приблизно 5 % від загальної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, тобто, співвідношення маси ліпиду мідії і крилевого масла від приблизно 5:95 до 95:5. У деяких варіантах здійснення, комбінації містять ліпід мідії в кількості в діапазоні від приблизно 10 % до приблизно 90 % мас./мас. від загальної сумарної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, і містять крилеве масло в кількості в діапазоні від приблизно 90 % до приблизно 10 % мас./мас. від загальної кількості ліпиду мідії і крилевого масла, тобто, співвідношення маси ліпиду мідії і крилевого масла від приблизно 10:90 до 90:10. У наступних варіантах здійснення, комбінації містять ліпід мідії і крилеве масло в співвідношенні маси приблизно 15:85 або приблизно 20:80, або приблизно 25:75, або приблизно 30:70, або приблизно 35:65, або приблизно 40:60, або приблизно 45:55, або приблизно 50:50, або приблизно 55:45, або приблизно 60:40, або приблизно 65:35, або приблизно 70:30, або приблизно 75:25, або приблизно 80:20, або приблизно 85:15.

У той час як комбінації за даним винаходом можна вводити як єдину протизапальну терапію проти будь-якого одного або декількох порушень, їх можна також вводити в поєднанні з режимом введення одного або декількох NSAID, таких як целекоксиб, диклофенак, дифлунізал, етодолак, фенпрофен, флупіпрофен, ібупрофен, індометацин, кетопрофен, телороллак, мефенамік, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксапрозин, піроксикам, суліндак і толметин. У деяких варіантах здійснення, комбінації за даним винаходом можуть припиняти або зменшувати потенційні несприятливі ефекти, асоційовані з NSAID, наприклад, за допомогою усунення або в основному усунення необхідності додаткової терапії NSAID, або за допомогою зменшення рівнів доз і/або частоти дозування NSAID, необхідних для досягнення переважного терапевтичного ефекту

Як обговорювали вище, в одному або декількох варіантах здійснення, крилеве масло, що використовується в комбінаціях, описаних в даному описі, може переважним чином мати вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас., або вище, переважно, щонайменше приблизно 60 % мас./мас., або вище. У багатьох способах попереднього рівня техніки, для екстракції крилевого масла з високим вмістом фосфоліпідів (наприклад, більш приблизно 50 % або 60 % мас./мас.) з м'яса крилю використовують комбінацію CO₂ і CO₂/етанолу. Однак, добре відомо, що чим вище вміст фосфоліпідів крилевого масла, тим більше в'язким є крилеве масло, де крилеві масла, що мають вміст приблизно 60 % або більше, як правило, присутні в формі в'язкої пасти при температурі навколишнього середовища. Це представляє складності для виготовлення, зокрема, в промисловому або комерційному масштабі отримання масла, оскільки більш високі температури є необхідними для випаровування розчинників, що використовуються в способі екстракції, з в'язкого матеріалу, з більш вірогідним виникненням пов'язаного з нагріванням руйнуванням масла. Крім того, потім необхідні більш високі рівні тиску для перенесення масла з баків для екстракції в баки для упакування.

Один ілюстративний спосіб попереднього рівня техніки описаний в WO2007123424. У цьому документі описаний двостадійний спосіб, за допомогою якого матеріал, що подається, спочатку піддають екстракції з використанням чистого CO₂ для видалення за допомогою екстракції тільки нейтральних ліпідів (тобто, неполярних тригліцеридів), залишаючи матеріал, який є, завдяки видаленню неполярних тригліцеридів, збагаченим фосфоліпідами. Потім цей збагачений фосфоліпідами матеріал піддають екстракції з використанням CO₂+ ≥10 % співрозчинника етанолу для спільної екстракції полярних фосфоліпідів і неполярних тригліцеридів, що залишилися, з біомаси крилю, що подається. У цьому способі неефективно використовують потужність підприємства в комерційному масштабі, оскільки в ході обох стадій способу велика частина об'єму в екстракторах високого тиску заповнена компонентами білків, що не піддаються екстракції, вуглеводів і золи в біомасі, що подається. Він також являє собою принципово менш ефективний періодичний режим (порівняно з більш ефективним безперервним режимом), який може несприятливим чином впливати на вартість процесу. Ефективним є те, що збагачення для досягнення кінцевого вмісту полярних фосфоліпідів в кінцевому маслі досягають на першій стадії, безпосередньо в нерозфасованому неомогенному твердому сирому матеріалі в промисловому масштабі. Точне попереднє знання вмісту полярних і неполярних ліпідів в твердій речовині, що подається, і того, наскільки добре кожний з них можна згодом екстрагувати, необхідно для точного збагачення кінцевого масла. На практиці, невизначеність в комерційному масштабі може перейти в надмірне збагачення, що дорого коштує, яке потім вимагає змішування для повернення до специфікацій, з потреби. І знов, це впливає несприятливим чином на економіку процесу.

У US 9735453, US 9078905, US 9028877, US 9320765 і US 9072752 описана екстракція крилю з використанням CO₂ або CO₂ плюс приблизно 5 % етанолу для екстракції нейтральних ліпідів (неполярних тригліцеридів), з подальшим CO₂/~20 % етанолом для екстракції з нерозфасованого неомогенного твердого матеріалу крилевого масла з високими кількостями фосфоліпідів, складних ефірів астаксантину і/або омега-3-жирних кислот. Ці способи розділяють недоліки, описані вище.

У даному описі в цей час описаний спосіб, який, в деяких варіантах здійснення, може зменшувати, мінімізувати або усувати один або декілька з недоліків, що обговорюються вище, при отриманні крилевого масла з високим або збагаченим вмістом фосфоліпідів, відповідно до способів попереднього рівня техніки, зокрема, в промисловому або комерційному масштабі (наприклад, при виготовленні партій масла близько щонайменше приблизно 50, 100, 200, 300 або 500 кг і більше). Таким чином, даний винахід стосується також способу отримання крилевого масла із вмістом фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас. або вище, переважно, на рівні щонайменше приблизно 60 % мас./мас. або вище, і до способу збагачення масла з більш низьким вмістом фосфоліпідів (менше приблизно 50 % мас./мас.) до рівня

щонайменше приблизно 50 % мас./мас. або вище, переважно, до рівня щонайменше приблизно 60 % мас./мас. або вище.

У деяких варіантах здійснення, даний винахід стосується 2-стадійного способу отримання крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас., де перша стадія включає екстракцію першого крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів менше приблизно 50 % мас./мас., з біомаси крилю і потім видалення щонайменше частини неполярних ліпідних компонентів (наприклад, тригліцеридів) з першого крилевого масла для отримання другого крилевого масла, яке є збагаченим фосфоліпідами (тобто, має більш високий вміст фосфоліпідів), порівняно з першим крилевим маслом.

На відміну від способів попереднього рівня техніки, що обговорюються вище, деякі варіанти здійснення цього способу починають з невибіркової екстракції масла з матеріалу біомаси крилю, що подається. Екстракцію як полярних (наприклад, фосфоліпідів), так і неполярних (наприклад, тригліцеридів) ліпідів з твердого м'яса, що подається, можна здійснювати з використанням суміші CO₂ і етанолу (наприклад, азеотропного етанолу - суміші вода-етанол, що містить приблизно 95 % етанолу).

У деяких переважних варіантах здійснення, можна використовувати співвідношення маси щонайменше приблизно 15 % мас./мас. або приблизно 20 % мас./мас. етанолу в CO₂, наприклад, в діапазоні приблизно 17-22 % мас./мас. У наступних варіантах здійснення, можна використовувати співвідношення маси щонайменше приблизно 25 % мас./мас. етанолу в CO₂, наприклад, використовують щонайменше приблизно 26 % мас./мас. етанолу або щонайменше приблизно 27 % мас./мас. етанолу, або щонайменше приблизно 28 % мас./мас. етанолу, або щонайменше приблизно 29 % мас./мас. етанолу, або щонайменше приблизно 30 % мас./мас. етанолу в CO₂.

У деяких варіантах здійснення, включаючи будь-який з інших варіантів здійснення, описаних в цьому розділі, температури екстракції дорівнюють або нижчі приблизно 60 °C, наприклад, дорівнюють або нижчі приблизно 55 °C, або дорівнюють або нижчі приблизно 50 °C, або дорівнюють або нижчі приблизно 45 °C, або дорівнюють або нижчі 40 °C, або дорівнюють або нижчі 35 °C, або дорівнюють або нижчі 30 °C, для зменшення або мінімізації переважним чином ризику деградації продукту. Тиск екстракції можна встановлювати для забезпечення надкритичних, субкритичних і/або близьких до критичних умов для вибраних температури і співвідношення CO₂ і етанолу. У деяких варіантах здійснення, тиск лежить в діапазоні приблизно 200-350 бар (20-35 МПа), наприклад, приблизно 250-300 бар (25-30 МПа), хоча більш високий тиск наприклад, 400 бар (40 МПа) і більше, є технічно ефективним і також може бути використаний. У деяких варіантах здійснення, значення або діапазон тиску приводить до адекватної щільності розчинника для забезпечення того, що екстракція неполярних ліпідів не стає такою, що обмежує швидкість процесу. У деяких варіантах здійснення, умови тиску екстракції можна коректувати протягом процесу екстракції для переміщення між надкритичними, субкритичними або близькими до критичних умовами. У деяких варіантах здійснення, використовують субкритичні і/або близькі до критичних умови, умови яких можуть змінюватися залежно від співвідношення подвійної суміші CO₂ і етанолу (або співвідношення потрійної суміші, у випадку азеотропного етанолу, який також містить воду). Періоди часу екстракції може визначати фахівець в даній галузі, і вони можуть залежати, серед іншого, від умов екстракції і бажаної економічної оптимізації. У деяких варіантах здійснення, періоди часу екстракції, як правило, лежать в діапазоні приблизно 1-15 годин, наприклад, приблизно 2-10 годин, наприклад, приблизно 2-5 годин або приблизно 3-6 годин, або приблизно 4-5 годин. Це, в свою чергу, може залежати, серед іншого, від кількості і розміру частинок матеріалу біомаси, що подається. Більш великі частинки можуть дозволяти використання більш високих швидкостей потоку розчинника, в той же час зберігаючи статичну біомасу і рівномірний контакт з розчинником. Однак, більш великі частинки, також представляють підвищені вимоги до дифузії розчинника для досягнення центра частинок, коли необхідна більша кількість розчинника. Таким чином, в деяких варіантах здійснення, розмір частинок матеріалу, що подається, становить приблизно 1-5 мм, наприклад, приблизно 2-3 мм.

У деяких додаткових варіантах здійснення, тиск екстракції становить приблизно 300 бар (30 МПа), і температура екстракції становить приблизно 60 °C.

Розділення масла можна здійснювати при більш низьких температурі (наприклад, приблизно 25-35 °C) і тиску (наприклад, приблизно 25-60 бар (2,5-6,0 МПа))

Отримане екстраговане масло містить як полярні (наприклад, фосфоліпіди), так і неполярні (наприклад, тригліцериди) ліпіди, і може мати вміст фосфоліпідів менший приблизно 50 %, мас./мас. або менший приблизно 45 % мас./мас., або менший приблизно 40 % мас./мас., або менший приблизно 35 % мас./мас., або менший приблизно 30 % мас./мас., або менший

приблизно 25 % мас./мас., або менший приблизно 20 % мас./мас., або менший приблизно 10 % мас./мас.

У деяких переважних варіантах здійснення, воду і етанол, присутню в маслі, можна потім видаляти з використанням будь-якого придатного способу, такого як випаровування у вакуумі (необов'язково, з обережним нагріванням, наприклад, при приблизно 65 °С або менше), використання потоку азоту або ліофілізація. У деяких варіантах здійснення, масло піддають випаровуванню у вакуумі, необов'язково з обережним нагріванням. За цим може йти короткий час утримування (наприклад, 1-3 секунд) при більш високій температурі, (наприклад, приблизно 70 °С, приблизно 75 °С або приблизно 80 °С) для видалення води і співрозчинника етанолу з суміші полярних і неполярних ліпідів з низькою в'язкістю, де висока частка неполярних ліпідів забезпечує низьку в'язкість. У деяких переважних варіантах здійснення, температура переважно не перевищує приблизно 60 °С протягом обережного нагрівання у вакуумі, щоб виключати або мінімізувати деградацію компонентів екстрагованого масла. У наступних варіантах здійснення, температура протягом обережного нагрівання у вакуумі переважно не перевищує приблизно 55 °С або приблизно 50 °С, або приблизно 45 °С, або приблизно 40 °С, або приблизно 35 °С, або приблизно 30 °С, або приблизно 25 °С.

У деяких варіантах здійснення, залишковий вміст рокових речовин (води і етанолу) після випаровування становить приблизно або менше приблизно 3 % мас./мас., оскільки це може мінімізувати можливість несприятливого впливу залишкового етанолу і води на розділення ліпідів на більш пізній стадії збагачення. У наступних варіантах здійснення, залишковий вміст рокових речовин становить приблизно або менше приблизно 2,5 % мас./мас., або приблизно або менше приблизно 2,0 % мас./мас., або приблизно або менше приблизно 1,5 % мас./мас., або приблизно або менше приблизно 1,0 % мас./мас., або менш приблизно 0,5 % мас./мас., або менше приблизно 0,3 % мас./мас., або менше приблизно 0,1 % мас./мас.

На цій стадії, після випаровування, через присутність неполярних ліпідних компонентів, масло все ще є рідким і може бути легко проаналізоване, наприклад, за вмістом фосфоліпідів і/або омега-3-жирних кислот. Це є важливим, оскільки точний аналіз необхідний для розрахунку бажаного ступеня збагачення, і таким чином, вмісту фосфоліпідів в кінцевому маслі, що отримується на наступній стадії. Зокрема, коли бажаний високий кінцевий вміст фосфоліпідів, надзбагачення (тобто додаткове видалення неполярних ліпідів), навіть в невеликій мірі, може приводити до проблем з переробкою через надмірну в'язкість. Масло після випаровування можна ретельно перемішувати для забезпечення гомогенності, необов'язково, після перенесення в проміжні баки для продуктів. Необов'язково, масло можна обережно нагрівати (наприклад, при температурі менше або приблизно 60 °С, 55 °С або приблизно 50 °С, або приблизно 45 °С, або приблизно 40 °С, або приблизно 35 °С, або приблизно 30 °С, або приблизно 25 °С), щоб сприяти підтримці рідкого і гомогенного матеріалу для аналізу. Менш в'язкий характер незбагаченого масла, отриманого на першій стадії екстракції CO₂/EtOH, порівняно з нерозфасованою твердою біомасою з першої стадії, що використовується в способах попередньої галузі техніки, що обговорюються вище, може, в деяких варіантах здійснення, переважним чином забезпечувати більш точний аналіз складу, оскільки об'ємну однорідність можна досягати більш просто. У деяких варіантах здійснення це може переважним чином виключати, мінімізувати або іншим чином зменшувати надзбагачення фосфоліпідів при подальшій вибірковій екстракції неполярних ліпідів, яке може в іншому випадку приводити до небажано в'язкого або нерухомого твердого продукту.

Друга стадія способу включає переважну або вибіркву екстракцію неполярних (тригліцеридів) ліпідів з масла, отриманого на першій стадії. Якщо незбагачене масло, отримане на першій стадії екстракції, переносили в проміжні баки, його повертають в установку для екстракції. Масло далі піддають екстракції з використанням CO₂, в деяких переважних варіантах здійснення, в надкритичних умовах, наприклад, при або більш приблизно 300 бар (30 МПа) і при приблизно 60 °С, для вибіркової екстракції неполярних (тригліцеридів) ліпідів. У деяких варіантах здійснення, екстракцію можна починати з більш низького тиску і потім поступово збільшувати до бажаного рівня (наприклад, приблизно 300 бар (30 МПа)). Неполярні (тригліцериди) ліпіди можна екстрагувати в збільшуваному ступені, чином, збагачуючи рафінат, що залишився, до досягнення необхідного цільового складу, наприклад, вмісту фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас. або щонайменше приблизно 55 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 60 % мас./мас., фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 65 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 70 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 75 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 80 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 85 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 90 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше

приблизно 95 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 97 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 98 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 99 % мас./мас. фосфоліпідів.

У деяких варіантах здійснення, після екстракції необхідної кількості неполярного ліпиду для досягнення бажаного рівня збагачення фосфоліпиду, часткове зниження тиску в посудині для екстракції дозволяє тиску, що залишився, сприяти вивантаженню в цей час збагаченого (і більш в'язкого) рафінату, за потреби. Можна отримувати більш високий ступінь стійкості до дренажу збагаченого масла з високою в'язкістю за допомогою дренажу з екстрактора, все ще частково що знаходиться під тиском. Цим способом, надзвичайно в'язкі матеріали можна перенести для подальшого змішування і включення в склад.

У одному або декількох варіантах здійснення, спосіб може дозволяти напівбезперервну переробку, де індивідуальні посудини для екстракції замінюють при безперервному обороті, але по одному за один раз, в той час як інші посудини для екстракції продовжують функціонувати. За цьому способом, зупинку для заміни множини партій в екстракторі можна виключати.

У інших варіантах здійснення, другу стадію, описану в даному описі, можна використовувати для збагачення вмісту фосфоліпідів в будь-якому крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів менший приблизно 50 %, мас./мас., для отримання крилевого масла, що має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас.

У деяких варіантах здійснення, початкове крилеве масло має вміст фосфоліпідів приблизно 45 % мас./мас. або менше, або приблизно 40 % мас./мас. або менше, або приблизно 35 % мас./мас. або менше, або приблизно 30 % мас./мас. або менше, або приблизно 25 % мас./мас. або менше, або приблизно 20 % мас./мас. або менше, або приблизно 10 % мас./мас., або менше. У деяких варіантах здійснення, кінцеве збагачене масло може мати вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 55 % мас./мас. фосфоліпідів або щонайменше приблизно 60 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 65 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 70 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 75 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 80 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 85 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 90 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 95 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 97 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 98 % мас./мас. фосфоліпідів, або щонайменше приблизно 99 % мас./мас. фосфоліпідів.

У деяких варіантах здійснення, збагачене крилеве масло має кінцевий вміст води приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. У деяких варіантах здійснення, крилеве масло має залишковий вміст розчинника для екстракції приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. У наступних варіантах здійснення, крилеве масло має вміст води приблизно 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше, і залишковий вміст розчинника для екстракції приблизний 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1, або 0,5 % мас./мас., або менше. У наступних варіантах здійснення, збагачений криль має залишковий вміст розчинника (води і етанолу) 5 % мас./мас. або менше, або приблизно 4, або 3, або 2, або 1,5, або 1, або 0,5, або 0,3, або 0,1 % мас./мас., або менше.

У інших варіантах здійснення, кінцеве збагачене крилеве масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 60 % мас./мас. фосфоліпідів, і залишковий вміст розчинника приблизно 3 % мас./мас. або менше.

Інші варіанти здійснення, які стосуються крилевого масла, як описано в даному описі, можна також, при необхідності, застосовувати до крилевого масла, отриманого способом за даним винаходом.

Наступні приклади представлені з метою ілюстрації деяких варіантів здійснення даного винаходу і не призначені для обмеження загальних принципів, описаних вище в даному описі.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Отримання крилевого масла з 62 % мас./мас. фосфоліпідів

1. Екстракція крилевого масла з м'яса крилю

М'ясо крилю піддавали екстракції з використанням CO₂/етанолу (співвідношення подачі етанолу і м'яса крилю приблизно 3,0-3,5:1 мас./мас.), з масою фракції етанолу в діапазоні приблизно 17-22 % мас./мас., при температурі 60 °C і тиску 300 бар (30 МПа). Стадія екстракції з використанням етанолу/CO₂ мала тривалість між 10 і 15 годинами. Екстраговану суміш масла/CO₂/EtOH відділяли при тиску 45 бар (4,5 МПа) і 25 °C.

Декілька партій масла, отриманих цим способом, змішували для отримання крилевого масла, що містить як полярні, так і неполярні компоненти, і що має вміст фосфоліпідів приблизно 42 % (див. таблицю 1-1 нижче).

Таблиця 1-1

Аналіз ^{31}P ЯМР PL в зразку крилевого масла

Фосфоліпід (PL)		% мас. від загального вмісту PL	г/100 г зразка
Фосфатидилхолін	PC	76,0	32,3
Алкілацилфосфатидилхолін	AAPC	9,6	4,1
Фосфатидилінозитол	PI	0,6	0,3
Фосфатидилсерин	PS	0,3	0,1
Лізофосфатидилхолін	LPC	7,4	3,1
Лізоалкілацилфосфатидилхолін	LAAPC	0,5	0,2
Фосфатидироківаноламін	PE	1,3	0,5
Алкілацилфосфатидироківаноламін	AAPE	0,9	0,4
Кардіоліпін+N-ацилфосфатидироківаноламін	CL/NAPE	2,6	1,1
Лізофосфатидироківаноламін	LPE	0,9	0,4
Лізоалкілацилфосфатидироківаноламін	LAPE	<0,1	<0,1
Загальний вміст PL			42,5

5

2. Вибіркова екстракція тригліцеридів з крилевого масла, отриманого зі стадії 1.

5,9 кг крилевого масла, що подається (що має склад, як указано в таблиці 1-1 вище), завантажували безпосередньо в одну 10,7 л посудину для екстракції (діаметр 155 мм). Матеріал, що подається, піддавали екстракції з використанням CO_2 при температурі 60 °C і тиску 300 бар (30 МПа).

10

Екстракти, що містять здебільшого тригліцериди, виділяли, і вони були значно менш в'язкими, ніж крилеве масло, що подається, завантажене в посудину для екстракції.

Процес зниження тиску в посудині для екстракції починали, коли загальна маса екстрагованого матеріалу досягала 97 % від теоретичної кількості матеріалу, яку можна екстрагувати. Установку піддавали зниженню тиску з постійною швидкістю лінійної зміни протягом періоду 15 хвилин, від 300 до 100 бар (від 30 до 10 МПа) з продовжуваною циркуляцією CO_2 , хоча і при 50 % від швидкості потоку при екстракції. Протягом цього часу, виміряна температура на виході з екстрактора зменшувалася від робочої температури 60 °C до 50 °C. Потім екстрактор далі піддавав зниженню тиску від 100 до 75 бар (від 10 до 7,5 МПа), протягом періоду наступних 15 хвилин без роботи насоса. Після цього, посудину для розділення звільняли від її вмісту.

15

20

У той час як посудина для екстракції все ще знаходилася при робочій температурі і тиску 75 бар (7,5 МПа), посудину звільняли від вмісту її збагаченого крилевого масла з основи посудини для екстракції, сильно нижче за рівень поверхні рафінату, таким чином, виключаючи втрату CO_2 високого тиску з дренажним рафінованим маслом. Виділення збагаченого масла займало приблизно годину, і в цей час тиск в посудині зменшувався від 75 до 54 бар (від 7,5 до 5,4 МПа), по мірі того, як CO_2 , що залишився в посудині для екстракції, розширювався, займаючи простір, раніше зайнятий рафінованим маслом.

25

По закінченню вивантаження збагаченого масла, спостерігали, що деяка кількість збагаченого крилевого масла залишалася в посудині для екстракції на розподільній і нижній поверхні посудини, як оцінено, 2 %, що складало менше від загальної маси збагаченого масла. У комерційному масштабі, будь-яке таке масло, що залишилося, виділяють в наступній партії крилевого масла в цьому екстракторі.

30

Перед аналізом атаксантину і фосфоліпиду, збагаченим масло нагрівали в печі протягом 55 °C протягом 1 години. Це дозволяло зразку бути досить рідким для перемішування для отримання гомогенного зразка для аналізу.

35

У таблиці 1-2 узагальнена маса і вміст фосфоліпиду (PL) і атаксантину (Аста) для, екстрагованого і збагаченого масла, що подається. Дуже невелика кількість фосфоліпиду (<1 г/100 г екстракту) і атаксантину (<2 мг/100 г екстракту) піддавались спільній екстракції. Усього, маса екстракту, отримана після процесу збагачення, становила 98 % від теоретичного екстракту, необхідного для збагачення до 62 % фосфоліпиду.

40

Таблиця 1-2

Узагальнення вмісту фосфоліпиду (PL) і астаксантину (Аста)

	Маса (г)	Маса (% від подачі)	%PL (г/100 г)	PL, маса (г)	PL (% від подачі)	Аста (мг/100 г)	Аста, маса (мг)	Аста (% від подачі)
Подача	5870,0	100	42,5	2494,8	100	21	1232,7	100
Екстракт	1939,0	33	1,0	19,4	0,8	1,7	32,3	2,6
Збагачене	3835,6	65,3	62,0	2378,1	95,3	24	902,5	74,7
Всього з	5774,6	98,4		2397,5	96,1		952,9	77,3

У таблицях 1-3 і 1-4 узагальнений композиційний склад збагаченого масла

Таблиця 1-3

Аналіз ³¹P ЯМР PL в зразку крилевого масла

Фосфоліпід (PL)		% мас. від загального вмісту PL	г/100 г зразка
Фосфатидилхолін	PC	72,9	45,2
Алкілацилфосфатидилхолін	AAPC	10,0	6,2
Фосфатидилінозитол	PI	1,3	0,8
Фосфатидилсерин	PS	0,7	0,4
Лізофосфатидилхолін	LPC	7,6	4,7
Лізоалкілацилфосфатидилхолін	LAAPC	0,6	0,4
Фосфатидироковіаноламін	PE	1,1	0,7
Алкіл ацил фосфатидироковіаноламін	AAPE	1,3	0,8
Кардіоліпін+N-ацилфосфатидироковіаноламін	CL/NAPE	3,8	2,4
Лізофосфатидироковіаноламін	LPE	0,5	0,3
Лізоалкілацилфосфатидироковіаноламін	LAAPC	0,2	0,1
Загальний вміст PL			62,0

5

Таблиця 1-4

Аналіз GC жирних кислот

Жирна кислота	г/100 г зразка (виражено як FFA)
14:0	4,3
15:0	0,3
16:0	14,9
16:1 n-9	0,3
16:1 n-7	2,4
16:1 n-5	0,4
i17:0	0,2
16:2	0,7
17:1	0,2
i18:0	0,3
16:4 n-1	0,3
18:0	0,8
18:1 n-9	6,2
18:1 n-7	4,4
18:1 n-5	0,2
18:2 n-6	1,3
18:3 n-3	0,9
18:4 n-3	2,2

Продовження Таблиці 1-4

20:1 n-9	0,5
20:1 n-7	0,2
20:4 n-6	0,3
20:4 n-3	0,3
20:5 n-3 (EPA)	13,6
22:1 n-11	0,6
21:5 n-3	0,4
22:5 n-3	0,4
22:6 n-3 DHA	8,2
Решта	1,1
Загальний вміст n-3	26,0
Загальний вміст жирних кислот	66,5

Приклад 2

Екстракт ліпиду мідії отримували відповідно до WO97/09992 і використовували в формі PCSO-524® (Pharmalink International Limited, Hong Kong). Способом з прикладу 1 отримували крилеве масло, що має композиційний склад, як указано в таблицях 1-3 і 1-4 вище.

Отримання зразків

Свіжі зразки отримували щодобово. Зразки перемішували перевертанням перед відбором зразків. Зразки зважували в 1,5 мл пробірки для центрифугування і доводили до 100 мг/мл етанолом для отримання розчину для зберігання. Суміші для зберігання отримували за допомогою зважування масел в правильному співвідношенні і потім доведення концентрації з використанням етанолу. Отримували серійне розведення розчину для зберігання в етанолі. Потім серійне розведення розводило (1 до 100) в культуральному середовищі до додавання до клітин (в трьох повторях) в кінцевому розведенні 1 до 10. Це приводило до концентрації етанової кислоти 0,1 % для всіх доз і видів контролю. Крилеве масло містило приблизно 62 % мас./мас. фосфоліпідів. Екстракт ліпиду мідії використали в формі PCSO-524®.

Скорочені позначення, використані при представленні результатів, наведені в таблиці 2-1 нижче:

Таблиця 2-1

Скорочені позначення

Скорочене позначення	Опис
LY	PCSO-524®
Криль	Збагачене крилеве масло (62 %PL)
90 %	Суміш, яка містить 90 % мас./мас. LY і 10 % мас./мас. крилю.
75 %	Суміш, яка містить 75 % LY мас./мас. і 25 % мас./мас. крилю
50 %	Суміш, яка містить 50 % LY мас./мас. і 50 % мас./мас. крилю
Оливк.	Оливкова олія харчової кваліфікації
1400W	CAS No 214358-33-5
Декса	Дексаметазон
Дикло	Диклофенак

Аналізи

Протизапальну активність визначали в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IFN γ)-мишачих макрофагах, клітинах RAW264.7, культивованих в стандартних культуральних середовищах і інкубованих з LPS і IFN γ в присутності або у відсутності різних тестованих сполук/екстрактів і позитивного контролю. Продукцію запальних медіаторів, включаючи NO, PGE2 і LTB4, цитокіни TNF α і IL-6, вимірювали розробленими способами з використанням комерційних наборів. Кожний зразок тестували з використанням щонайменше 3 концентрацій (з використанням 3 повторів, максимальна концентрація становила 100 мкг/мл)(n=9), з відповідним внутрішнім контролем (таблиця 2-2). Цитотоксичність для кожного

зразка також визначали за допомогою аналізу МТТ. Цитотоксичності не детектували для жодної тестованої концентрації.

Параметри аналізу для кожного аналізу узагальнені в таблиці 2-2. Стисло, для проведення протизапального аналізу, культивовані клітини RAW264.7 підраховували і розсівали ($0,8 \times 10^5$ клітин/ямку) в 96-ямковій планшети і інкубували протягом вказаного часу розсівання. Потім середовище відбирали і замінювали на свіже середовище, з подальшим додаванням тестованих сполук. Сполуки інкубували протягом 1 години перед додаванням стимулятора. Потім планшети інкубували протягом між 4-18 годинами, і супернатант аналізували по медіатору, який представляє інтерес, життєздатність клітин, що залишилися, визначали за допомогою МТТ.

Види позитивного контролю вибирали на основі їх широкого застосування в схожих аналізах, включаючи N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин (1400W), повільно, що міцно зв'язується інгібітор індукованої синтази оксиду азоту (iNOS) (Garvey, E. P., et al, J Biol Chem, 1997,21:272(8):4959-63, і дексаметазон, загальноприйнятий інгібітор цитокінів. Диклофенак є загальноприйнятим нестероїдним протизапальним засобом і відомим інгібітором циклооксигенази (COX), що утворює PGE₂.

Таблиця 2-2

Параметри аналізу					
Аналіз	Час розсівання	Стимуляція	Час інкубації	Постачальник набору	Використовуваний контроль
NO	48 год.	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Peagent Грісса	1400W (Cayman)
TNF α	48 год.	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Peptotech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
IL-6	48 год.	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Peptotech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
PGE ₂	24 год.	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Cayman Chemical (USA)	Диклофенак (Sigma)

Результати

1. Аналіз оксиду азоту

NO являє собою радикальний метаболіт, як показано, що має численні фізіологічні функції як молекула, яка передає сигнали, так і як токсичний агент при запаленні (Coleman, 2001). NO утворюється при окисненні L-аргініну трьома типами синтаз оксиду азоту (NOS); конститутивними формами, нейрональною NOS і ендотеліальною NOS, і індукованою формою iNOS, спочатку описаною в мишачих макрофагах (Nathan & Xie, 1994; Stuehr & Marletta, 1985). Індукована форма весь час піддається активації після експресії, і таким чином, піддається регуляції на рівні транскрипції за допомогою NF- κ B, стимульованого запальними молекулами, подібними до LPS і IFN- γ . Продукція NO за допомогою iNOS має латентний період декілька годин до продукції NO на набагато більш високих (нМ) постійних рівнях (Nathan & Xie, 1994). Індукована форма NOS найбільш ймовірно залучена до запалення, і через більш високі рівні продукovanого NO, її більш просто оцінювати in vitro.

NO є незвичайною передаючою сигнали молекулою. Оскільки не існує специфічного рецептора поверхні клітин для NO, він входить в клітини не роблячи відмінностей, де ефект залежить від типу клітини і концентрації NO, таким чином, викликаючи широкий діапазон фізіологічних відповідей. NO викликає збільшену проникність судин, розширення судин і утворення радикалів, що викликає пошкодження тканин і знищення патогенів (Guzik, Korbut, & Adamek-Guzik, 2003). Ці фізіологічні зміни асоційовані із запаленням зі збільшеним кровотоком, що дозволяє більшій кількості імуніцитів проникати в уражену тканину, таким чином, руйнуючи патоген.

[0128] Результати аналізу інгібування NO показані на фігурах 1A і 1B і в таблиці 2-3

Таблиця 2-3

IC₅₀ для інгібування NO

	LY	Криль	90 %LY	75 %LY	Оливкова олія	1400W
IC ₅₀	~107	~286	44,8	40,9	Не активна	1,6

2. Фактор некрозу пухлин альфа

- 5 TNF α являє собою білок (цитокін), який передає клітинні сигнали, залучений в основному у запальну відповідь гострої фази. Макрофаги є головним джерелом TNF α , хоч він може вивільнятися багатьма іншими типами клітин, такими як CD4⁺ лімфоцити, клітини природні кілери (NK), нейтрофіли, тучні клітини, еозинофіли і нейрони. TNF α продукується за допомогою активації MAPK і NF- κ B. Він діє для збільшення своєї власної продукції і продукції інших запальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1 бета (IL-1 β). TNF α індукуює пропасницю, апоптотичну
- 10 загибель клітин, кахексію, запалення і інгібує утворення пухлин і реплікацію вірусів. TNF α залучений у множинну станів захворювання, включаючи сепсис, травматичне пошкодження, ішемію, астму, опіки, синдром подразненої кишки, хворобу Альцгеймера, злоякісну пухлину, глибоку депресію, артрит і розсіяний склероз (Cairns, Panacek, Harken, & Banerjee, 2000; Dowlati et al., 2010; Swardfager et al., 2010).

- 15 Результати аналізу інгібування TNF α показані на фігурах 2A і 2B і в таблиці 2-4.

Таблиця 2-4

IC₅₀ для інгібування TNF α

	LY	Криль	90 %LY	75 %LY	Оливкова олія	Декса
IC ₅₀	~238,7	~103,3	89	57	DNF*	3,328e-005
* Не відповідав математичній моделі кривої залежності відповіді від дози						

3. Інтерлейкін-6

- 20 Подібно до TNF α , IL-6 вважають прозапальним цитокіном. IL-6 секретується Т-клітинами і макрофагами, що стимулює імунну відповідь. IL-6 є відповідальним за збільшену продукцію нейтрофілів в кістковому мозку. Він підтримує ріст В-клітин і є антагоністом диференціювання Т-клітин в регуляторні Т-клітини. Він є здатним перетинати гематоенцефалічний бар'єр і ініціювати синтез PGE2 в гіпоталамусі, таким чином, змінюючи встановлювальну точку температури тіла (Banks, Kastin, & Gutierrez, 1994).

- 25 Результати аналізу інгібування IL-6 показані на фігурах 3A і 3B і в таблиці 2-5

Таблиця 2-5

IC₅₀ для інгібування IL-6

	LY	Криль	90 %LY	75 %LY	Оливкова олія	Декса
IC ₅₀	22,4	13,4	11,5	10,4	~106,8	1,19

4. Простагландин E2

- 30 Простагландин E2 (PGE2) є одним з ліпідних медіаторів, що утворюються з арахідонової кислоти (AA) під дією ферменту циклооксигенази (COX), і залучений до індукції пірексії, відчуттів болю і запалення. Аспірин і нестероїдні протизапальні лікарські засоби (NSAID) інгібують біосинтез простаноїдів (включаючи PGE2), приводячи до жарознижувальних, анагетичних і протизапальних ефектів (Kawahara, K., et al, 2015, і Kawabata, A., 2011).

Результати показані на фігурах 4A і 4B і в таблиці 2-6.

35

Таблиця 2-6

IC₅₀ для інгібування PG-E2

	LY	Криль	90 %LY	75 %Ly	50 %LY	Диклофенак	Оливкова олія
	Не активний	Не активний	~112	~118	55,3	0,12	DNF*

* Не відповідав математичній моделі кривої залежності відповіді від дози

Узагальнення результатів

У цій системі аналізу було показано, що екстракт ліпиду мідії і крилеве масло в тестованих концентраціях індивідуально інгібують NO, TNF α і IL-6, але не PGE2.

Комбінація екстракту ліпиду мідії і крилевого масла була більш ефективною, ніж будь-який з екстракту ліпиду мідії або крилевого масла окремо, для інгібування NO, TNF α і IL-6. У аналізі PGE2, ні для екстракту ліпиду мідії, ні для крилевого масла окремо, не показано інгібуючої активності, але в комбінації показане інгібування.

Приклад 3 - Синергізм

Екстракт ліпиду мідії отримували відповідно до WO97/09992 і використовували в формі PCSO-524®. Способом з прикладу 1 отримували крилеве масло, що має композиційний склад, як указано в таблиці 1-3 і 1-4 вище.

Зразки, отримання і комбінація

Зразки для зберігання PCSO-524® і крилевого масла з високим вмістом фосфоліпідів перемішували перевертанням перед відбором експериментальних зразків. Зразки зважували в 15 мл пробірки для центрифугування і доводили до 100 мг/мл етанолом для отримання розчину для зберігання. Суміші отримували за допомогою змішування розведених масел в правильному співвідношенні. Серійне розведення отримувало в етанолі. Потім серійне розведення розводило (1 до 100) в культуральному середовищі до додавання до клітин (в трьох повторях) в кінцевому розведенні 1 до 10. Це приводило до концентрації етанової кислоти 0,1 % для всіх доз і видів контролю. Ці дози були свіжоприготованими щодобово. У таблиці 3-1 показані скорочені позначення, використані для кожного зразка.

Таблиця 3-1

Скорочені найменування зразків

Скорочене позначення	Опис
LY	PCSO-524®
Криль	Збагачене крилеве масло (62 %PL)
LY90	Суміш, яка містить 90 % мас./мас. LY і 10 % мас./мас. крилю.
LY80	Суміш, яка містить 80 % LY мас./мас. і 20 % мас./мас. крилю
LY70	Суміш, яка містить 70 % LY мас./мас. і 30 % мас./мас. крилю
LY65	Суміш, яка містить 65 % LY мас./мас. і 35 % мас./мас. крилю
LY60	Суміш, яка містить 60 % LY мас./мас. і 40 % мас./мас. крилю
LY55	Суміш, яка містить 55 % LY мас./мас. і 45 % мас./мас. крилю
LY50	Суміш, яка містить 50 % LY мас./мас. і 50 % мас./мас. крилю
LY45	Суміш, яка містить 45 % LY мас./мас. і 55 % мас./мас. крилю
LY40	Суміш, яка містить 40 % LY мас./мас. і 60 % мас./мас. крилю
LY35	Суміш, яка містить 35 % LY мас./мас. і 65 % мас./мас. крилю
LY30	Суміш, яка містить 30 % LY мас./мас. і 70 % мас./мас. крилю
LY20	Суміш, яка містить 20 % LY мас./мас. і 80 % мас./мас. крилю
LY10	Суміш, яка містить 10 % LY мас./мас. і 90 % мас./мас. крилю
Оливк.	Оливкова олія харчової кваліфікації

Продовження Таблиці 3-1

1400W	CAS No 214358-33-5
Декса	Дексаметазон
CI	Довірчий інтервал

Аналізи

Протизапальну активність визначали в стимульованих ліпополісахаридом (LPS) і інтерфероном γ (IFN γ) мишачих макрофагах, клітинах RAW264.7, культивованих в стандартних культуральних середовищах (DMEM, ембріональна бичача сироватка 5 %) і інкубованих в присутності або відсутності різних тестованих сполук/екстрактів і позитивного контролю. Продукцію запальних медіаторів, включаючи NO, цитокіни TNF α і IL-6, вимірювали розробленими способами з використанням комерційних наборів для ELISA (постачальники перераховані в таблиці 3-2).

Кожний зразок тестували з використанням щонайменше 6 концентрацій (з використанням 3 повторів, максимальна концентрація становила 100 мкг/мл) (n=9), з відповідним внутрішнім контролем (показаним в таблиці 3-2). Цитотоксичність для кожного тестованого зразка визначали за допомогою аналізу МТТ. Цитотоксичності не детектували для жодної тестованої концентрації.

Параметри аналізу для кожного аналізу узагальнені в таблиці 3-2. Стисло, для аналізів NO, TNF α і IL-6, культивовані клітини RAW264.7 підраховували і розсівали ($0,8 \times 10^5$ клітин/ямку) в 96-ямкові планшети, і інкубували протягом 48 годин. Потім середовище відбирали і замінювали на свіже середовище, з подальшим додаванням тестованих сполук. Сполуки інкубували протягом 1 години перед додаванням стимулятора. Потім планшети інкубували протягом 18 годину, і супернатант аналізували по медіатору, який представляє інтерес, життєздатність клітин, що залишилися, визначали за допомогою МТТ.

Види позитивного контролю вибирали на основі їх широкого застосування в схожих аналізах, включаючи N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин (1400W), повільно, що міцно зв'язується інгібітор індукованої синтази оксиду азоту (iNOS) (Garvey et al., 1997), і дексаметазон, загальноприйнятий інгібітор цитокінів.

Таблиця 3-2

Протизапальні аналізи і види позитивного контролю

Аналіз	Час розсівання	Стимуляція	Час інкубації	Постачальник набору	Позитивний контроль
NO	48 год.	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Реагент Грісса	1400W (Cayman)
TNF α	48 год.	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Peprtech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
IL-6	48 год.	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 одиниць/мл)	18 год.	Biogems (USA)	Дексаметазон (sigma)

Розрахунки синергізму

Синергізм виражали як комбінаторний індекс. Комбінаторний індекс (CI) синергізму і зважування IC₅₀ для ізоболограми розраховували з використанням програмного забезпечення Compsyn. Криву залежності відповіді від дози, отриману в Graphpad Prism, трансформували в 10 точок, що представляють криву. Потім ці 10 точок вводили в програму Compsyn, яка будувала криву для відповідності точкам даних. Цей спосіб був переважнішим за близьке відтворення повної кривої залежності відповіді від дози в програмі для розрахунку синергізму. Підібрану за допомогою Compsyn криву потім використовували для розрахунків синергізму. Патерн синергізму протягом тестованого діапазону можна спостерігати з допомогою

ізоболограми, на яку нанесений відносний внесок кожного компонента в активність при IC_{50} . На ній присутня пряма лінія, побудована між двома змішуваними лікарськими засобами (Biavatti, 2009). Значення нижчі лінії вказують на синергізм, значення на лінії вважають адитивними, і значення вище лінії є антагоністичними.

5 Результати

1. Аналіз оксиду азоту

Комбінації аналізували, щоб визначити, чи показано для них синергічне інгібування молекули NO, яка передає сигнали запалення. Спочатку комбінації тестували з кроком збільшення на 10 %. Найбільш активною спостережуваною комбінацією була LY60. Потім тестували додаткові збільшення на 5 % близько LY60.

Крива залежності відповіді від дози для тестованих комбінацій LY90-LY10 показана на фігурах 5A, 5B, 6A і 6B. Значення IC_{50} для інгібування NO і комбінаторний індекс представлені в таблицях 3-3 і 3-4. Комбінаторний індекс менший 1 вказує на синергізм. Ізоболограма для збільшення з кроком 10 % показана на фігурі 7.

Таблиця 3-3

Значення IC_{50} для інгібування NO для комбінацій LY90-LY10

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10	1400W
IC_{50} (мкг/мл)	204	265	105	109	74	67	83	85	111	125	134	25
95 % CI (мкг/мл)	136-392	144-1108	87-136	88-144	63-90	59-77	64-117	68-115	81-183	98-194	98-248	21-32

Таблиця 3-4

 IC_{50} (CI) і комбінаторний індекс для інгібування NO для комбінацій LY75-LY45

	LY75	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45
IC_{50} (мкг/мл)	123	68	84	65	86	79	84
95 % CI для IC_{50} (мкг/мл)	97-160	65-85	69-96	60-73	70-90	69-89	73-100
Комбінаторний індекс	0,80	0,50	0,55	0,48	0,54	0,77	0,61

2. Аналіз TNF α

Комбінації аналізували, щоб визначити, чи показано для них синергічне інгібування прозапального цитокіну TNF α . Спочатку комбінації тестували з кроком збільшення на 10 %. Найбільш активною спостережуваною комбінацією була LY50. Потім тестували додаткові збільшення на 5 % близько LY50.

Крива залежності відповіді від дози для тестованих комбінацій LY90-LY10 показана на фігурах 8A, 8B, 8C, 9A і 9B. Значення IC_{50} для інгібування TNF α і комбінаторний індекс представлені в таблицях 3-5 і 3-6. Комбінаторний індекс менший 1 вказує на синергізм. Ізоболограма для збільшення з кроком 10 % показана на фігурі 10.

Таблиця 3-5

Значення IC_{50} для інгібування TNF

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10
IC_{50}	~606	~966	-	56	64	53	43	48	64	61	77
95 % CI	-	-	-	49-67	--75	44-64	35-50	37-58	--71	39-90	56-134

* - неможливо провести оцінку

Таблиця 3-6

IC₅₀ і CI для LY70-LY35 (n=9)

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35
IC ₅₀	91	80	78	68	69	90	70	73
95 % CI	64-189	60-137	64-98	54-87	60-80	68-128	57-89	59-92
Комбінаторний індекс	0,14	0,12	0,114	0,097	0,096	0,123	0,094	0,095

3. Аналіз IL-6

- 5 Комбінації аналізували, щоб визначити, чи показано для них синергічне інгібування прозапального цитокіну IL-6. Спочатку комбінації тестували з кроком збільшення на 10 %. Найбільш активно спостережуваною комбінацією була LY60. Потім тестували додаткові збільшення на 5 % близько LY60.

- 10 Крива залежність відповіді від дози для тестованих комбінацій LY90-LY10 показана на фігурах 11A, 11B, 12A і 12B. Значення IC₅₀ для інгібування IL-6 і комбінаторний індекс представлені в таблицях 3-7 і 3-8. Комбінаторний індекс менший 1 вказує на синергізм. Ізоболограма для збільшення з кроком 10 % показана на фігурі 13.

Таблиця 3-7

IC₅₀ для інгібування IL-6 (n=3)

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10	Декса
IC ₅₀ (мкг/мл)	173	114	~100	53	36	34	37	52	41	60	~60	0,010
95 % CI (мкг/мл)	104-1311	92-191		41-61	29-45	27-42	30-44	44-60	32-51	50-72		0,004-0,03

Таблиця 3-8

IC₅₀ і комбінаторний індекс для інгібування IL-6

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35	LY30
IC ₅₀	36	39	34	43	37	49	52	41	41
95 % CI	29-45	33-45	27-42	37--	30-44	40-58	44-60	30-54	32-51
Комбінаторний індекс		0,27	0,23	0,31	0,27	0,37	0,4	0,32	0,32

- 15 Узагальнення результатів

У цій системі аналізу показано, що екстракт ліпиду мідії і крилеве масло, використані в комбінації, задовольняють математичним критеріям синергізму для інгібування NO, TNFα і IL-6.

Приклад 4 - Дослідження для пацієнтів

- 20 Пацієнтам, які страждають на множину видів болю/запальних станів, вводили комбінацію екстракту ліпиду мідії (в формі PCSO-542) і крилевого масла (61 % PL), в співвідношенні PCSO-542 і крилевого масла 75:25, в формі капсул. Склад вказаних капсул представлений в таблиці 4-1.

Таблиця 4-1

Склад 150 мг капсул із сумішшю масел

Інгредієнт	Маса %
Компонент наповнення	
Оливкова олія	66,67 %
PCSO-542*, масло мідії (<i>Perna canaliculus</i>)	25 % (37,5 мг)
Масло крилю* (<i>Euphausia superba</i>)	8,33 % (12,5 мг)
Компонент оболонки	(до сушіння)
Желатин (бичачий)	46,5
Гліцерин	12,6
Сорбіт	6,00
вода	34,9

*містить 0,15 % мас./мас. вітаміну Е (тобто, приблизно 0,056 мг/капсула)

5 Доза, як правило, лежала в діапазоні 2-8 капсул на добу, за одне, два або три дозування. До початку лікування з використанням цієї комбінації, пацієнти, як правило, приймали один або декілька NSAID, включаючи парацетамол або ібупрофен, для керування плинном болю. Результати показані в таблиці 4-2.

Таблиця 4-2

Узагальнення результатів для пацієнтів

Пацієнт (стать/вік)	Стан	Рівень болю до лікування (1-10)	Рівень болю після лікування (1-10)	Інші коментарі
Ж, 80-84	Тяжкий біль в коліні і плечах	8	4	Стани присутні протягом 3-12 років. Покращення після 2-3 тижнів лікування (2 капсули на добу).
Ч, 60-64	Стеноз поперекового відділу хребта	6-8	0	Стан присутній протягом 2-3 років. Покращення після 4-5 діб лікування (6- 8 капсул/добу).
Ч, 40-44	Біль в попереку	7	4	Стан присутній протягом 15 років. Покращення після 7 діб лікування (3 капсули/добу).
Ж, 45-49	Хронічний біль в спині	8	4-5	Стан присутній протягом 2 років. Покращення після 2-3 тижнів лікування (3 капсули/добу).
Ч, 50-54	Біль в суглобах рук - пошкодження нерва/роздутість суглобів пальців кисті	6	2	Стан присутній протягом 2 років. Покращення після 1 тижня лікування (3 капсули/добу).

Продовження Таблиці 4-2

Ч, 50-54	Хронічний біль в спині - грижа міжхребцевого диска	2-8, залежно від активності	2-3	Стан присутній протягом 25 років. Покращення після 3 діб лікування (4 капсули/добу).
Ж, 65-69	Хронічний біль в коліні і плечі	10	5	Стан присутній протягом 5 років. Покращення після 2 тижнів лікування (4 капсули/добу).
Ч, 20-24	Тяжка алергія - кашель, запалення носового каналу і витікання слизу з носа	8	5	Стан присутній протягом 4 років. Покращення після 3 тижнів лікування (4 капсули/добу).
Ч, 40-44	Біль в спині - грижа міжхребцевого диска	9	5	Стан присутній протягом 8 років. Покращення після 3 тижнів лікування
Ж, 50-54	Біль в спині	7	01-1	Стан присутній протягом 1 місяця. Покращення після 1 тижня лікування
Ж, 55-59	Остеопороз - біль змінюється з активністю	7-8	1-3	Стан присутній протягом 15 років. Покращення після 1½ тижнів лікування (4 капсули/добу).
Ч, 65-69	Біль в коліні	8-10	2-3	Стан присутній протягом 14 років. Покращення після 1½ тижнів лікування (4 капсули/добу).
Ч, 50-54	Біль в шії, скутість в коліні	5	3	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 3 тижнів лікування (3 капсули/добу).
Ч, 50-54	Біль в тілі і біль в колінах і лікті після хірургічної операції	7-8	2-3	Покращення після декількох діб лікування
Ж, 65-69	Артрит/тендиніт в суглобах пальців	6	2	Стан присутній протягом декількох місяців. Покращення після декількох діб лікування (6 капсул/добу).
Ж	Ревматоїдний артрит	7	Ломота і біль в суглобах різко зменшились	Стан присутній протягом 10+ років. Покращення після декількох діб лікування (4 капсули/добу)
Ж, 50-54	Вовчак/фіброміалгія	8	4	Стан присутній протягом 10+ років. Покращення після 7-8 діб лікування
Ч, 30-34	Біль в плечі, який збільшується після фізичних вправ	7	4	Покращення після 2 тижнів лікування (4 капсули/добу)

Продовження Таблиці 4-2

Ж	Попереднє пошкодження коліна і щиколотки	5	3	Покращення після 2-3 тижнів лікування (4 капсули/добу)
Ч, 45-49	Грижі міжхребцевих дисків, пошкодження плеча і руки	10	Загальне покращення	Стан присутній протягом декількох місяців. Покращення після 1 тижня лікування (2 капсули/добу).
Ж, 40-44	Дискомфорт в коліні (відчуття хрусту)	4	0	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 2 тижнів лікування (2 капсули/добу)
Ж	Скутість суглоба і біль в спині	Змінюється щодобово	5, покращена рухливість руки	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 1 тижнів лікування (2 капсули/добу)
Ж, 55-59	Біль в спині	6	4	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 2 тижнів лікування (3 капсули/добу)
Ч (похилий)	Біль в суглобах	6	2	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 4 тижнів лікування (2 капсули/добу)
М	Біль в плечі і коліні	8	4	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після 1 тижня лікування (2 капсули/добу)
М	Біль в коліні	8	0	Покращення після 1 тижня лікування (4 капсули/добу).
Ж	Артрит	8	5	Покращення після лікування (4 капсули/добу)
М	Артрит	8	5	Стан присутній протягом декількох років. Покращення після лікування (пацієнт відмічав збільшене покращення, порівняно з використанням Omega XL) (4 капсули/добу)
Ж	Артрит	6	3	Покращення після лікування (пацієнт відмічав збільшене покращення, порівняно з використанням Omega XL) (4 капсули/добу)

Джерела інформації:

5 Biavatti, Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(3), 371-378.

Cairns, C. B., Panacek, E. A., Harken, A. H., & Banerjee, A. (2000). Bench to bedside: Tumor necrosis factor- α : From inflammation to resuscitation. *Academic Emergency Medicine*, 7(8), 930-941.

Coleman, Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8), 1397-1406.

5 Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, A. Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 67(5), 446-457. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033

Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R., & Knowles, 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4959-4963.

10 Guzik, T. J., Korbut, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54(4), 469-487.

Kawabata, A., (2011). Prostaglandin E2 and Pain-An Update. *Biol Pharm Bull*, 34(8), 1170-1173

15 Kawahara, K. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (4), 414-421

Nathan, C., & Xie, Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-918.

Sinclair, A. J., Murphy, K. J. and Li, D. (2000) Marine lipids overview "news insights and lipid composition of Lyprinol". *Allerg Immunol (Paris)* 32(7), 261-271

20 Stuehr, D. J., & Marletta, Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(22), 7738-7742.

Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 68(10), 930-941.

25

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Комбінація, яка містить екстракт ліпиду мідії і крилеве масло, де екстракт ліпиду мідії отриманий з *Perna canaliculus*, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить від приблизно 5:95 до приблизно 99:1, і де комбінація адаптована для окремого або одночасного введення.

30

2. Комбінація за п. 1, де крилеве масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 40 % мас./мас.

3. Комбінація за п. 2, де крилеве масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 50 % мас./мас.

35

4. Комбінація за п. 3, де крилеве масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 60 % мас./мас.

5. Комбінація за будь-яким з пп. 1-4, де крилеве масло має вміст води приблизно 5 % мас./мас. або менше.

6. Комбінація за п. 5, де крилеве масло має вміст води приблизно 3 % мас./мас. або менше.

40

7. Комбінація за п. 5, де крилеве масло має вміст води приблизно 1 % мас./мас. або менше.

8. Комбінація за будь-яким з пп. 1-7, де крилеве масло має вміст розчинника для екстракції приблизно 5 % мас./мас. або менше.

9. Комбінація за п. 8, де крилеве масло має вміст розчинника для екстракції приблизно 3 % мас./мас. або менше.

45

10. Комбінація за п. 8, де крилеве масло має вміст розчинника для екстракції приблизно 1 % мас./мас. або менше.

11. Комбінація за будь-яким з пп. 1-10, де екстракт ліпиду мідії містить вітамін Е.

12. Комбінація за будь-яким з пп. 1-11, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить від приблизно 5:95 до приблизно 95:5.

50

13. Комбінація за п. 12, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить приблизно 10:90 або приблизно 15:85, або приблизно 20:80, або приблизно 25:75, або приблизно 30:70, або приблизно 35:65, або приблизно 40:60, або приблизно 45:55, або приблизно 50:50, або приблизно 55:45, або приблизно 60:40, або приблизно 65:35, або приблизно 70:30, або приблизно 75:25, або приблизно 80:20, або приблизно 85:15, або приблизно 90:10.

55

14. Комбінація за будь-яким з пп. 1-13 в одиничній пероральній дозованій формі, необов'язково у вигляді окремих дозованих форм кожного з компонентів ліпідного екстракту мідії і крилевого масла.

60

15. Комбінація за п. 14, де одинична пероральна дозована форма являє собою м'яку желатинову капсулу.

16. Комбінація за п. 14 або 15, де одинична пероральна дозована форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 1,0 г екстракту ліпиду мідії.
17. Комбінація за п. 16, де одинична пероральна дозована форма містить приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 мг або 1 г екстракту ліпиду мідії.
18. Комбінація за будь-яким з пп. 14-17, де одинична пероральна дозована форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 10 г крилевого масла.
19. Комбінація за п. 18, де одинична пероральна дозована форма містить приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 мг або 1 г крилевого масла.
20. Комбінація за будь-яким з пп. 14-19, де одинична пероральна дозована форма містить приблизно 10-500 мг від загальної маси екстракту ліпиду мідії і крилевого масла.
21. Комбінація за п. 20, де одинична пероральна дозована форма містить приблизно 50-300 мг від загальної маси екстракту ліпиду мідії і крилевого масла.
22. Комбінація за будь-яким з пп. 1-21, яка додатково містить один або більше фармацевтично прийнятних носіїв і/або добавки.
23. Комбінація за будь-яким з пп. 1-22, яка складається або яка складається по суті з екстракту ліпиду мідії і крилевого масла.
24. Композиція, яка містить екстракт ліпиду мідії і крилеве масло, де екстракт ліпиду мідії отриманий з *Perna canaliculus*, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить від приблизно 5:95 до приблизно 99:1.
25. Композиція за п. 24, де крилеве масло має вміст фосфоліпідів щонайменше приблизно 40 % мас./мас. або щонайменше приблизно 50 % мас./мас., або щонайменше приблизно 60 % мас./мас.
26. Композиція за п. 24 або 25, де екстракт ліпиду мідії, необов'язково, містить вітамін Е.
27. Композиція за будь-яким з пп. 24-26, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить від приблизно 5:95 до приблизно 95:5.
28. Композиція за будь-яким з пп. 24-26, де масове співвідношення екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить приблизно 10:90 або приблизно 15:85, або приблизно 20:80, або приблизно 25:75, або приблизно 30:70, або приблизно 35:65, або приблизно 40:60, або приблизно 45:55, або приблизно 50:50, або приблизно 55:45, або приблизно 60:40, або приблизно 65:35, або приблизно 70:30, або приблизно 75:25, або приблизно 80:20, або приблизно 85:15, або приблизно 90:10.
29. Композиція за будь-яким з пп. 24-28, яка додатково містить один або більше фармацевтично прийнятних носіїв і/або добавок.
30. Композиція за п. 29, де одна або більше добавок вибрані з антиоксиданту і вітамінів А, D, Е і К.
31. Композиція за будь-яким з пп. 24-30, що додатково містить масло-носіє.
32. Композиція за п. 31, де масло-носіє становить від приблизно 10 % мас./мас. до приблизно 90 % мас./мас. від загальної маси композиції.
33. Композиція за п. 31, де масове співвідношення масла-носія і об'єднаної кількості екстракту ліпиду мідії і крилевого масла становить від приблизно 3:1 до приблизно 1:3.
34. Композиція за будь-яким з пп. 24-33 в одиничній пероральній дозованій формі.
35. Композиція за п. 34, яка інкапсульована в м'якій желатиновій капсулі.
36. Композиція за п. 34 або 35, де одинична пероральна лікарська форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 1,0 г екстракту ліпиду мідії.
37. Композиція за п. 36, де одинична пероральна лікарська форма містить приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 мг або 1,0 г екстракту ліпиду мідії.
38. Композиція за п. 37, де одинична пероральна дозована форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 500 мг екстракту ліпиду мідії.
39. Композиція за будь-яким з пп. 34-38, де одинична пероральна дозована форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 1,0 г крилевого масла.
40. Композиція за п. 39, де одинична пероральна лікарська форма містить приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 мг або 1,0 г крилевого масла.
41. Композиція за п. 40, де одинична пероральна дозована форма містить від приблизно 10 мг до приблизно 500 мг крилевого масла.
42. Композиція за п. 34 або 35, яка містить приблизно 10-500 мг від загальної маси екстракту ліпиду мідії і крилевого масла.

43. Композиція за п. 42, яка містить приблизно 50-300 мг від загальної маси екстракту ліпиду мідії і крилевого масла.
44. Композиція за будь-яким з пп. 24-33, яка містить приблизно 10-500 мг від загальної маси екстракту ліпиду мідії і крилевого масла;
при цьому композиція необов'язково містить оливкову олію в кількості від приблизно 10 % мас./мас. до приблизно 90 % мас./мас. від загальної маси композиції;
де композиція необов'язково містить одну або кілька добавок, вибраних з антиоксиданту і вітамінів А, D, Е і К; і
де композиція поміщена в м'яку гелеву капсулу.
45. Застосування комбінації за будь-яким з пп. 1-23 або композиції за будь-яким з пп. 24-44 для лікування запалення у суб'єкта.
46. Застосування екстракту ліпиду мідії і крилевого масла для виготовлення лікарського засобу для лікування запалення, де лікарський засіб містить комбінацію за будь-яким з пп. 1-23 або композицію за будь-яким з пп. 24-44.
47. Застосування комбінації за будь-яким з пп. 1-23 або композиції за будь-яким з пп. 24-44 для лікування болю у суб'єкта.
48. Застосування екстракту ліпиду мідії і крилевого масла для виготовлення лікарського засобу для лікування болю, де лікарський засіб містить комбінацію за будь-яким з пп. 1-23 або композицію за будь-яким з пп. 24-44.
49. Застосування комбінації за будь-яким з пп. 1-23 або композиції за будь-яким з пп. 24-44 для лікування болю в суглобах або покращення рухливості суглобів, пов'язаного з остеоартритом або ревматоїдним артритом у суб'єкта.
50. Застосування екстракту ліпиду мідії і крилевого масла для виготовлення лікарського засобу для лікування болю в суглобах або покращення рухливості суглобів, пов'язаного з остеоартритом або ревматоїдним артритом, де лікарський засіб містить комбінацію за будь-яким з пп. 1-23 або композицію за будь-яким з пп. 24-44.

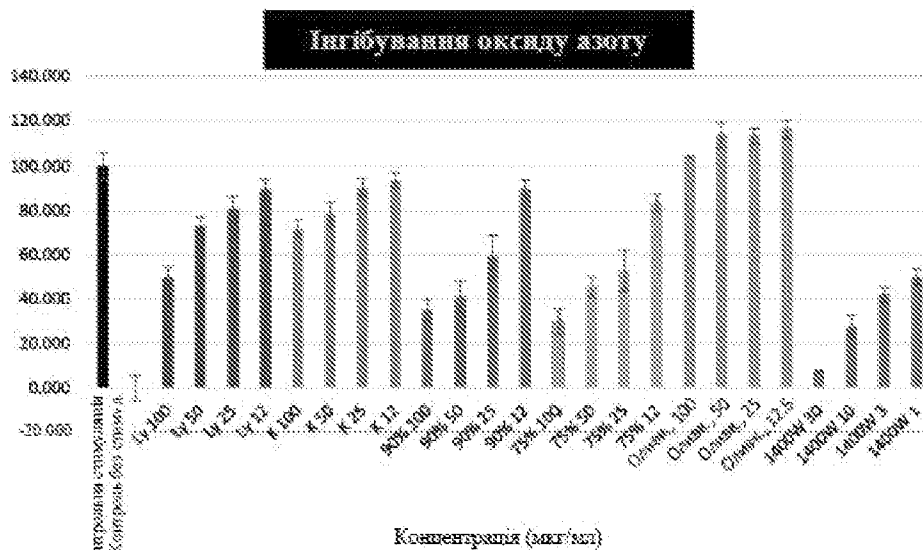


Fig. 1A

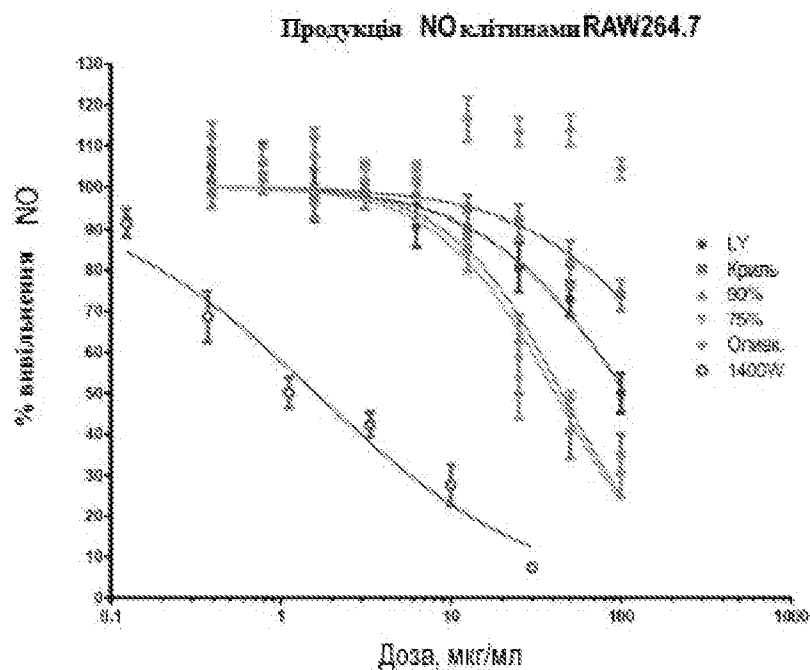


Fig. 1B

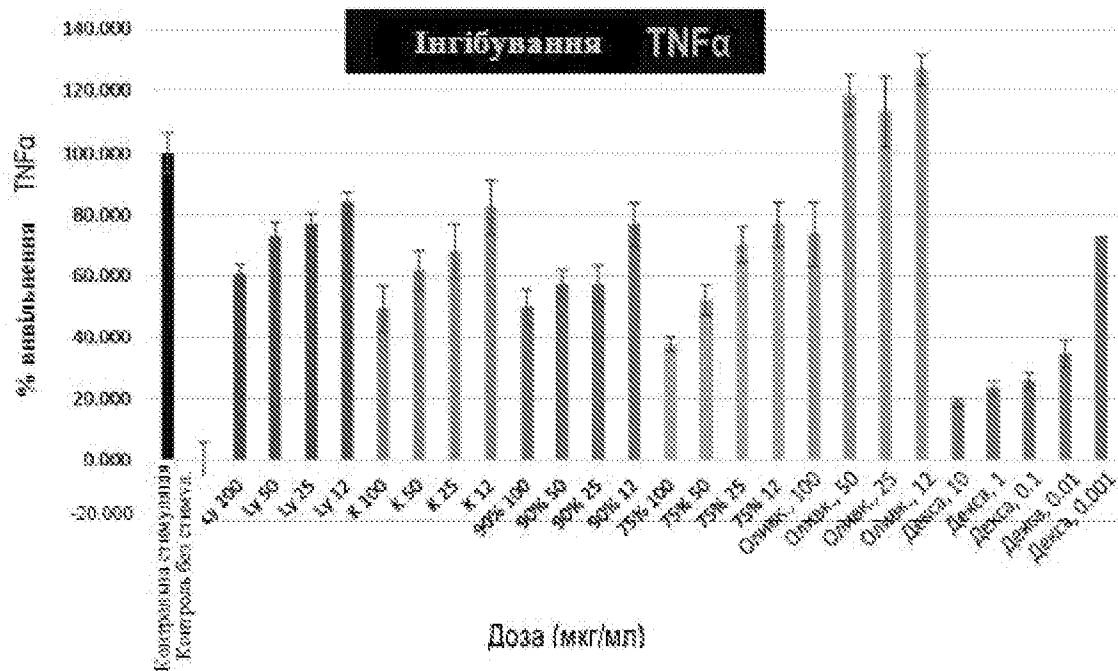
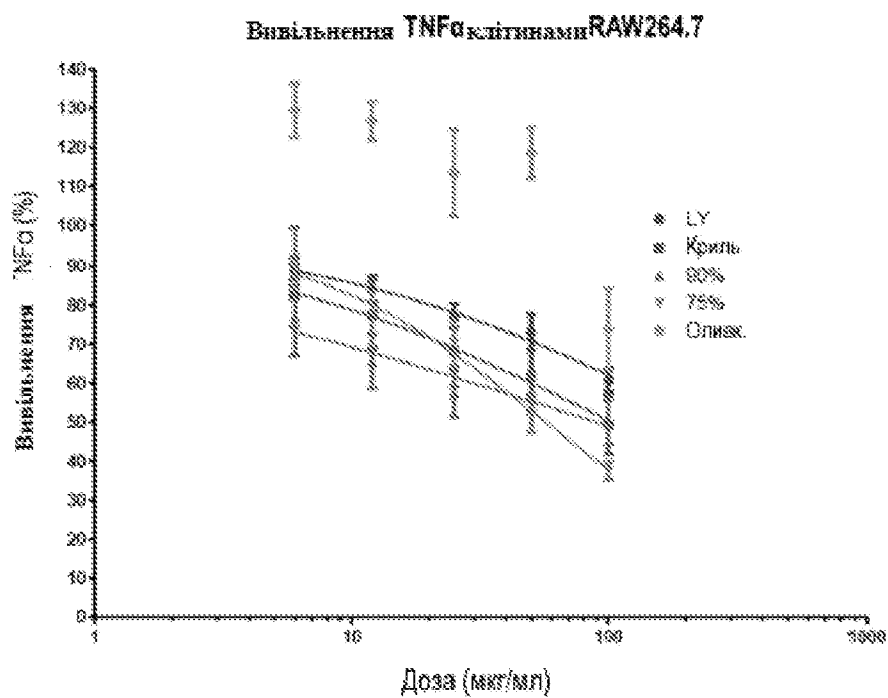
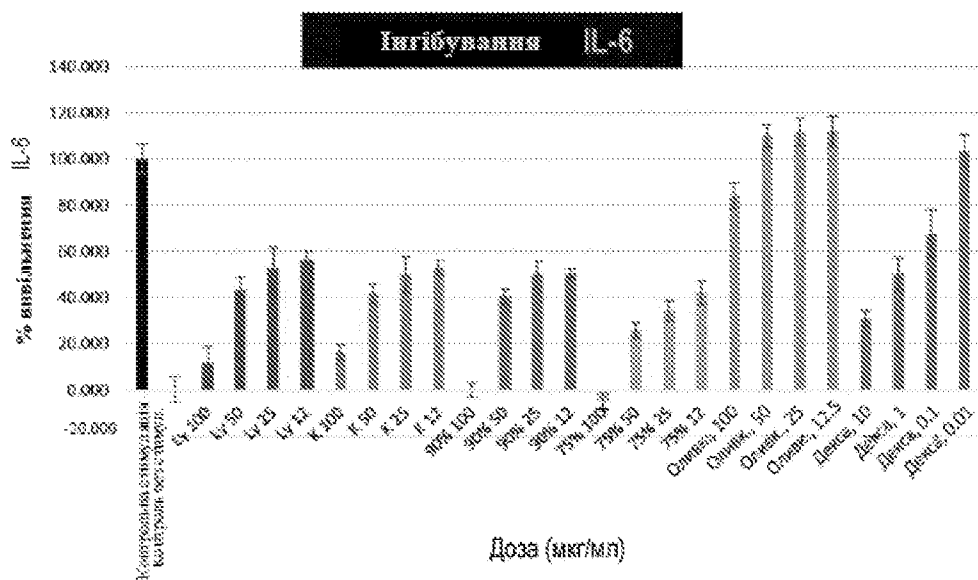


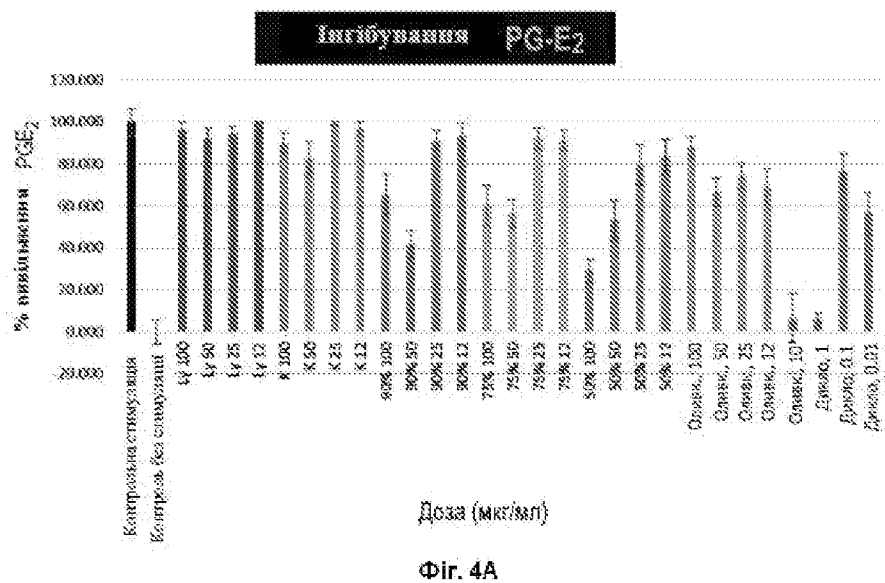
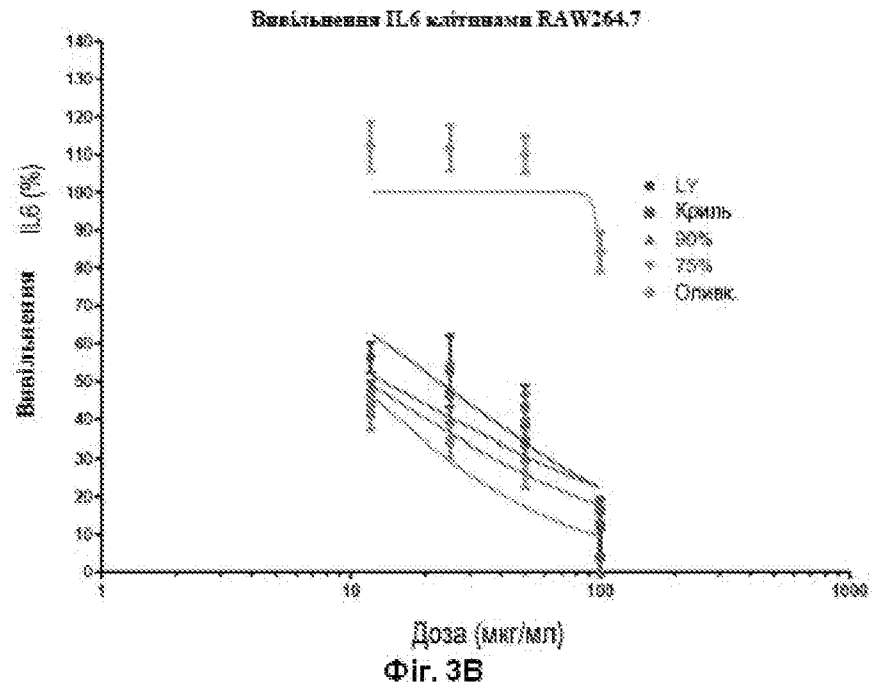
Fig. 2A



Фіг. 2В



Фіг. 3А



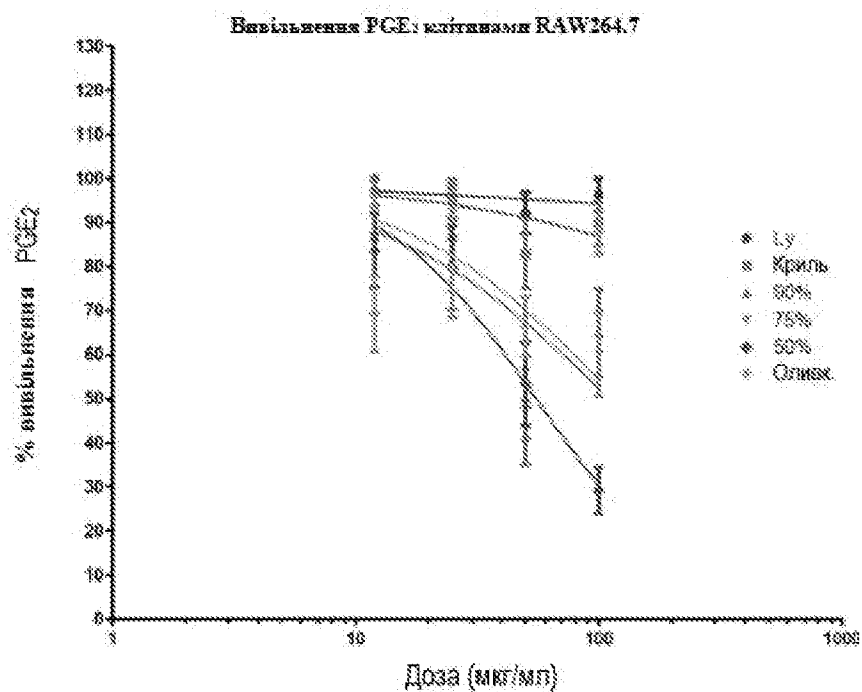


Fig. 4B

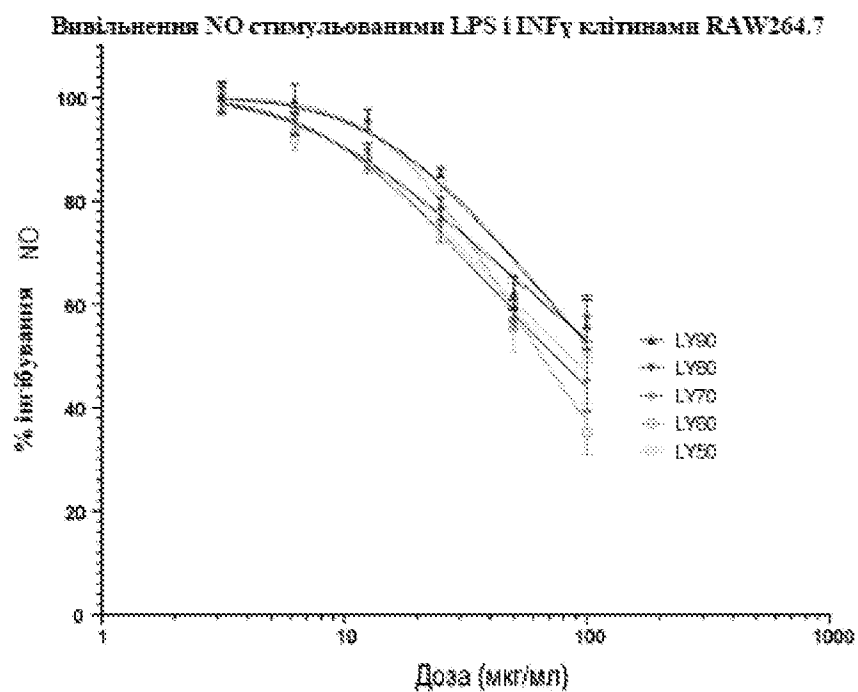


Fig. 5A

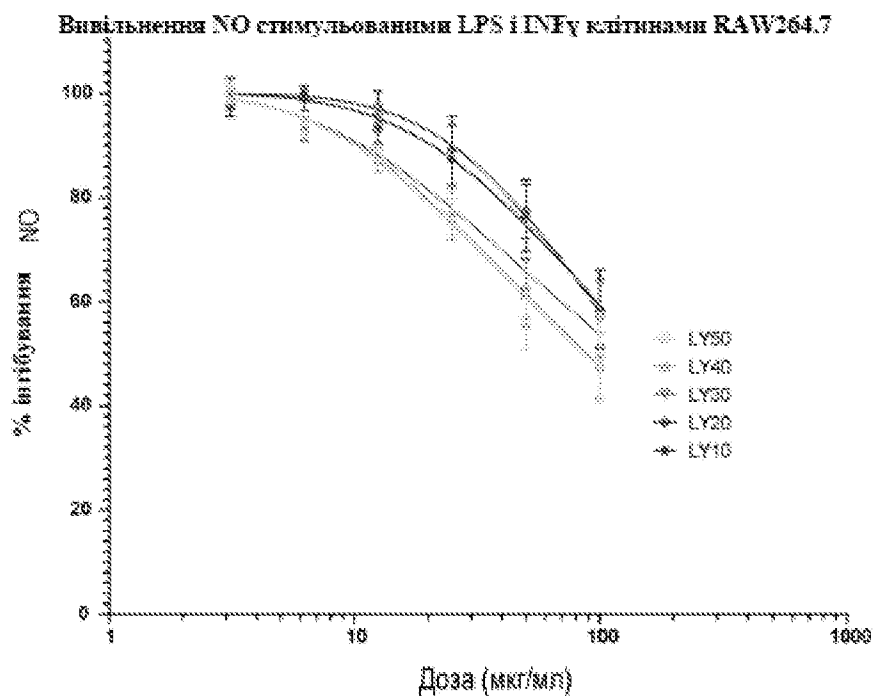


Fig. 5B

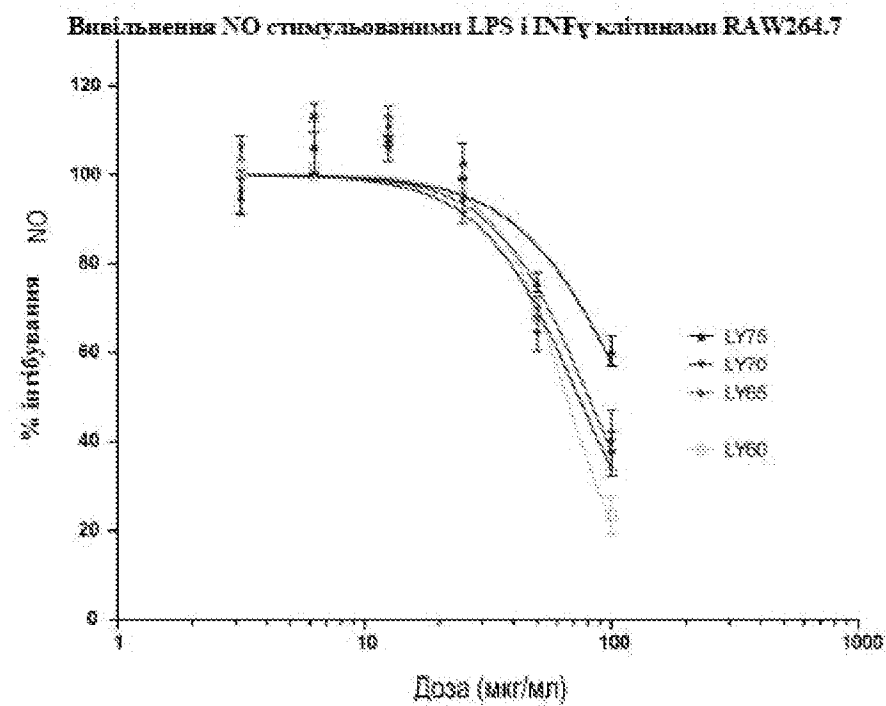
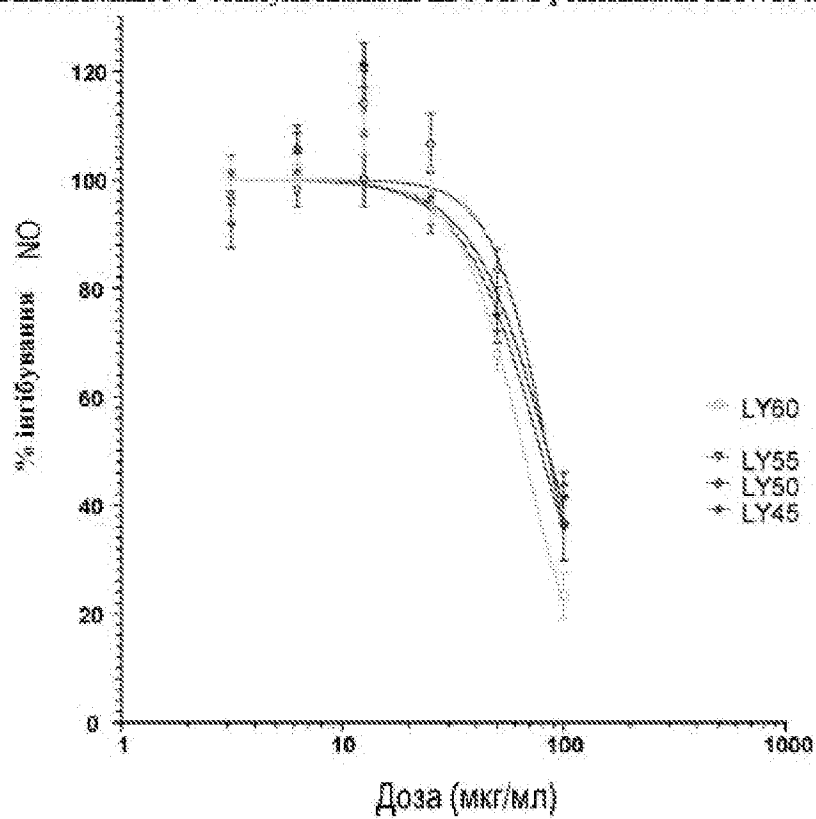
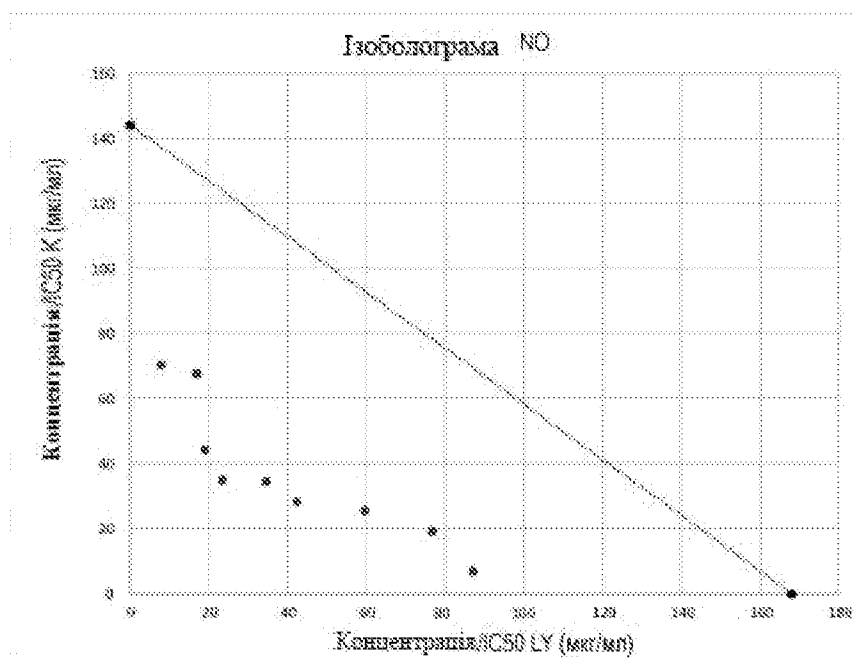


Fig. 6A

Вивільнення NO стимульованими LPS і INF γ клітинами RAW264.7



Фиг. 6В



Фиг. 7

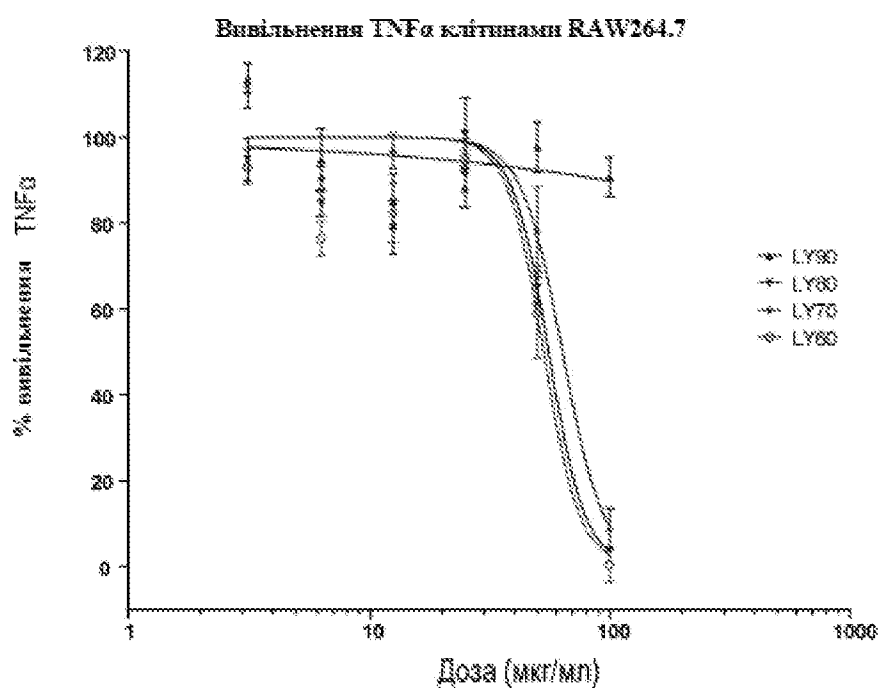


Fig. 8A

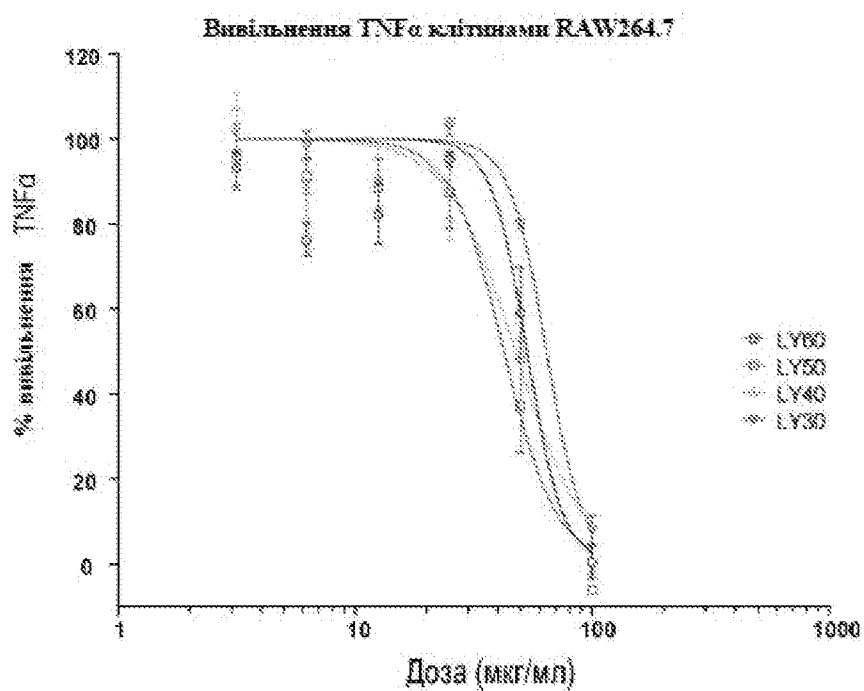
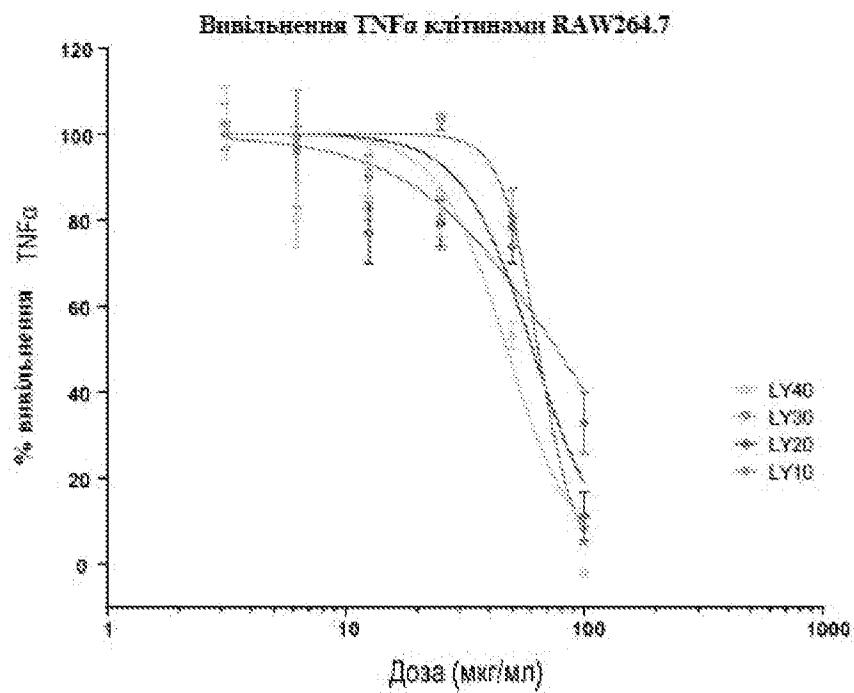
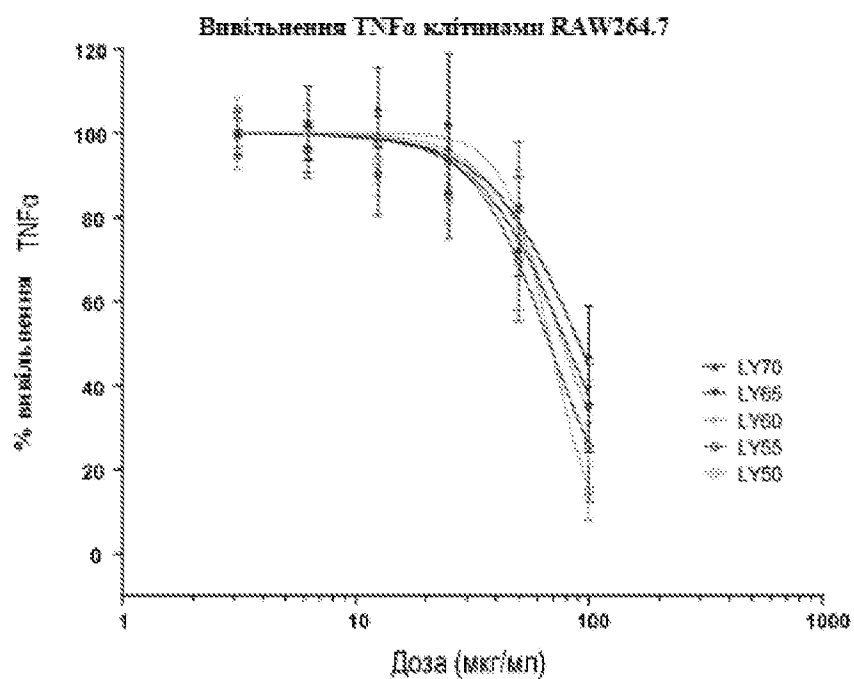


Fig. 8B



Фіг. 8С



Фіг. 9А

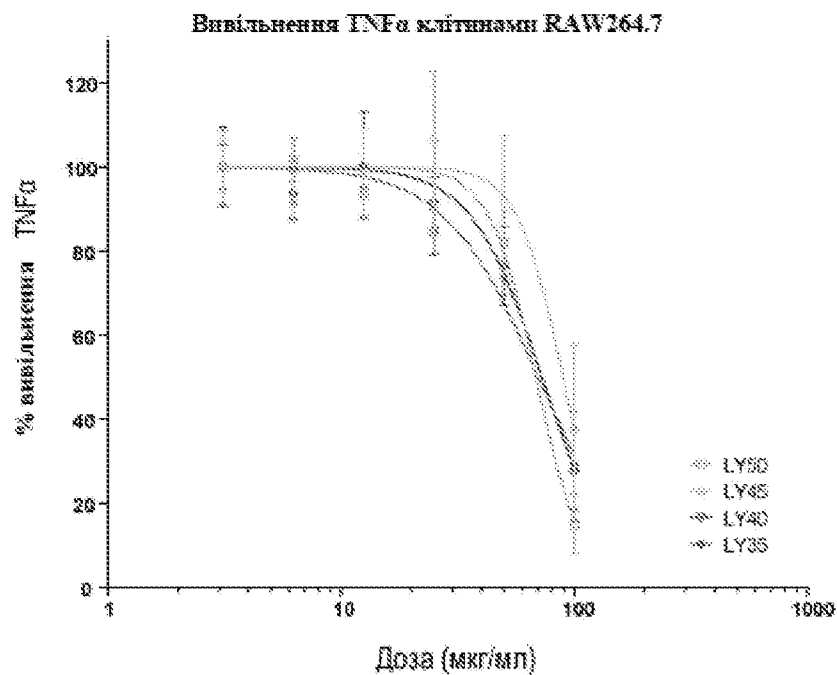


Fig. 9B

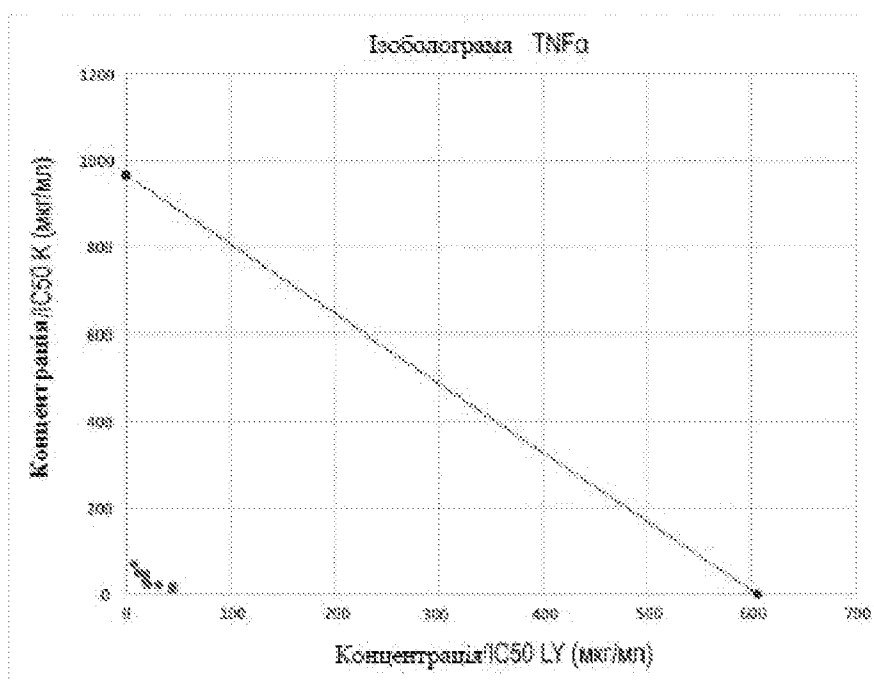
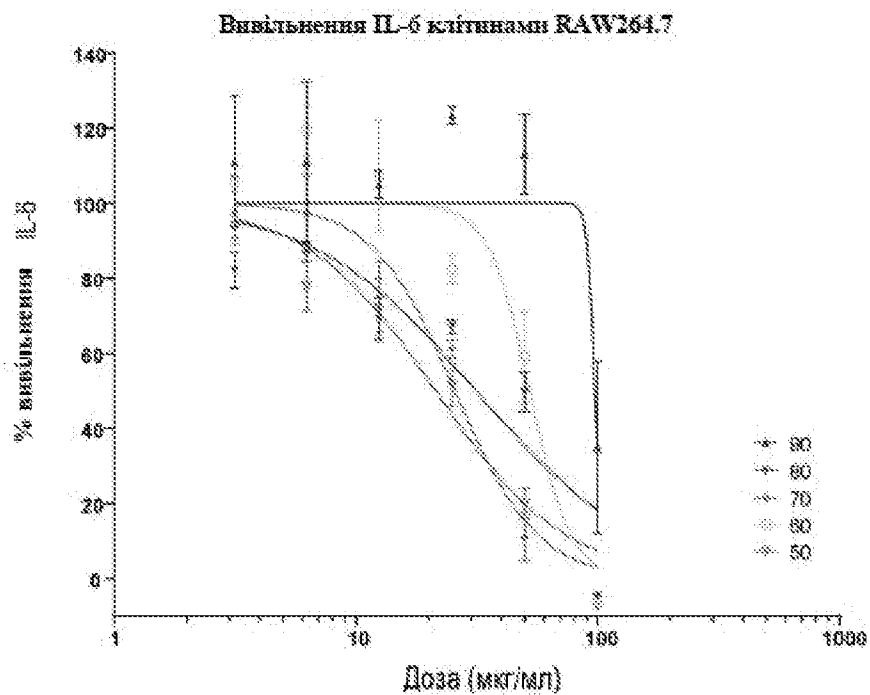
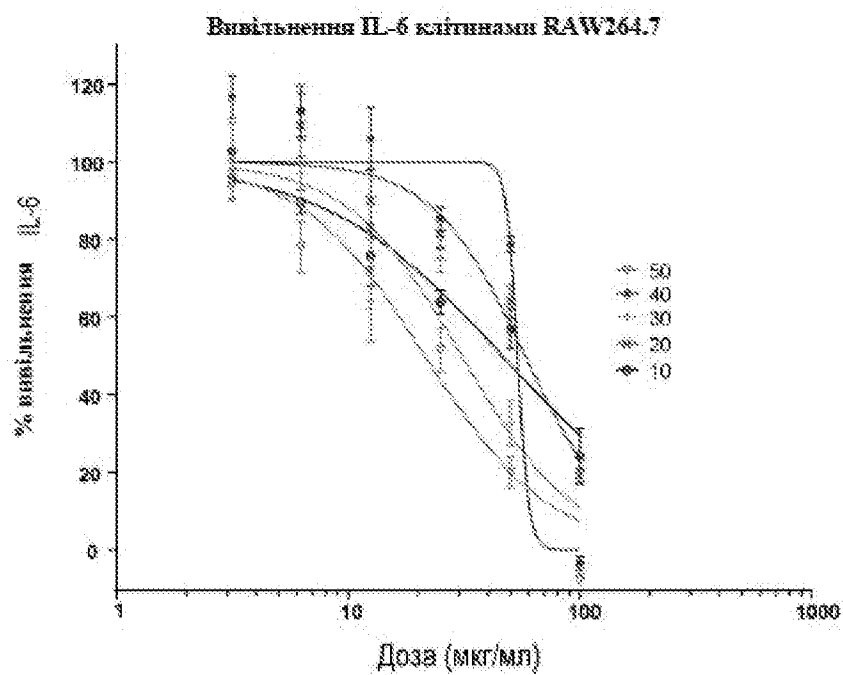


Fig. 10



Фіг. 11А



Фіг. 11В

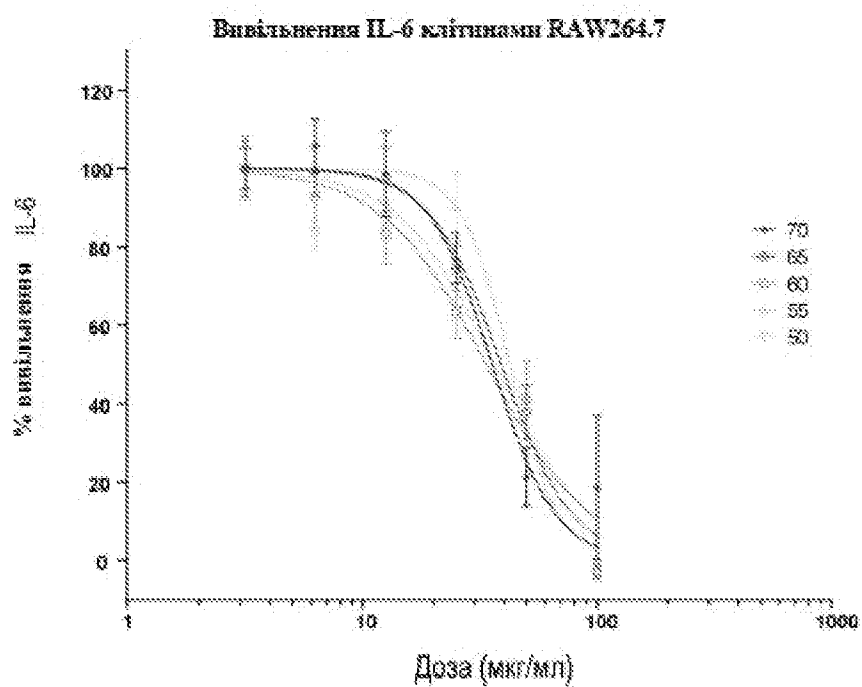


Fig. 12A

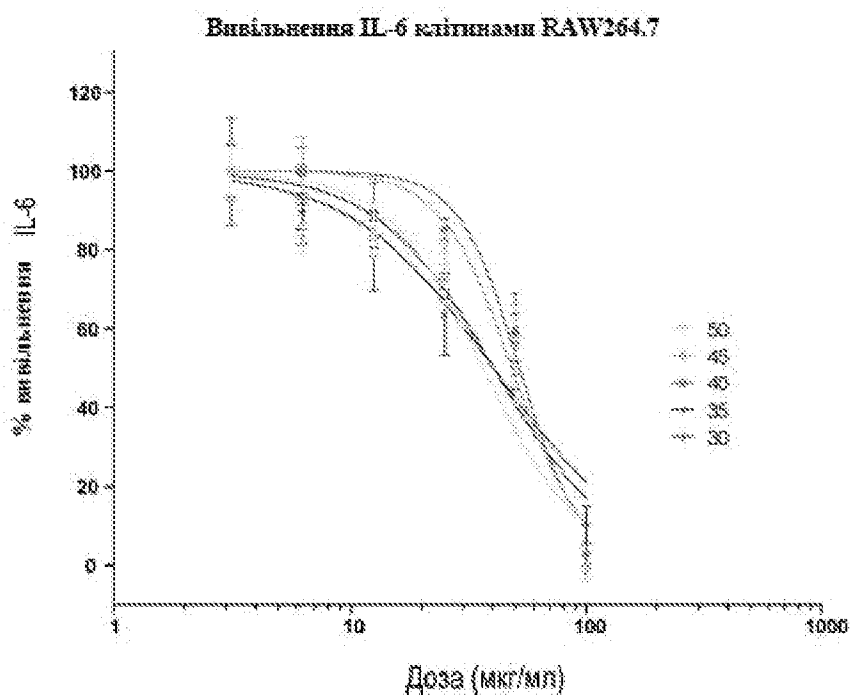


Fig. 12B

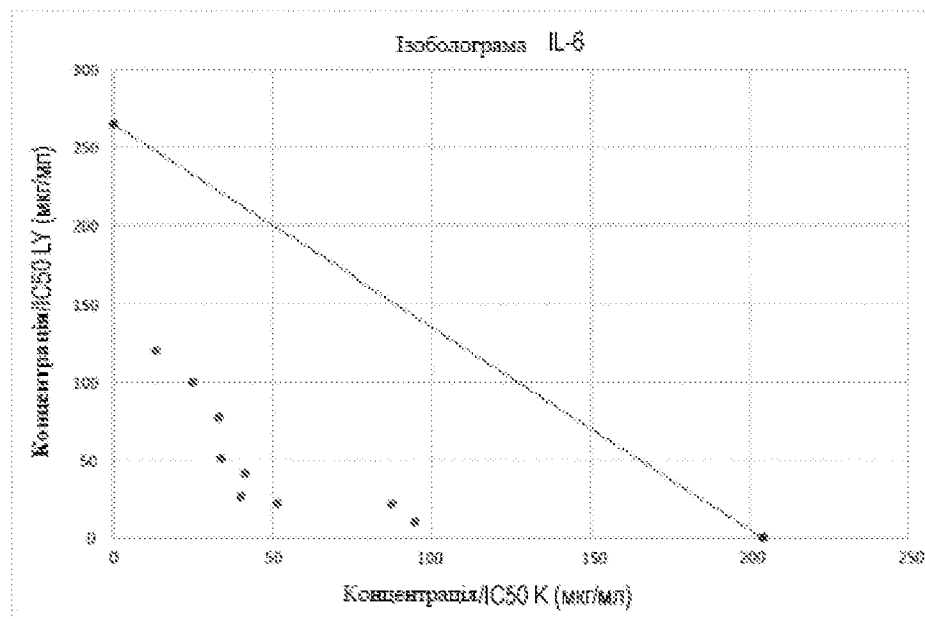


Fig. 13