



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327883**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 35/56 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20003535	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.01.20 PCT/US99/01179
(22)	Inng.dag	2000.07.07	(85)	Videreføringsdag	2000.07.07
(24)	Løpedag	1999.01.20	(30)	Prioritet	1998.01.21, US, 10123
(41)	Alm.tilgj	2000.09.14			
(45)	Meddelt	2009.10.12			
(73)	Innehaver	Peter Donald Collin, P O Box 172, Sunset, ME 04683, US			
(72)	Oppfinner	Peter Donald Collin, P O Box 172, Sunset, ME 04683, US			
(74)	Fullmektig	ABC-Patent, Siviling. Rolf Chr. B. Larsen AS, Postboks 6150 Etterstad, 0602 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av et olje-produkt omfattende et karotenoidbærende lipid, kjemisk sammensetning omfattende et slikt lipid, vanddiett omfattende nevnte olje-produkt, fraksjon av nevnte olje-produkt, og olje-produkt for å inhibere lipoksygenaseaktivitet henholdsvis immunsvær eller angiogenese.
(56)	Anførte publikasjoner	D1) J. A. Findlay et al., Journal of Natural Products, vol. 47, no. 2, 1984, s. 320-324 D2) US 5770205
(57)	Sammendrag	

Metoder og komposisjoner beskrives for behandling av inflammatoriske autoimmune og andre sykdommer gjennom administrering av lipidfraksjoner av sjøpølsevev. Komposisjoner som kan anvendes som tilskudd i vann- og menneske - dietter beskrives også.

Oppfinnelsens område

Dette patentet angår det allmenne området av terapeutiske produkter for å forhindre visse sykdomsforhold som henhører seg til det allmenne medisinske området for menneskelig og veterinær farmakologi hvorved aktiveringen av lipoksygenasbanene bidrar til det patologiske forholdet. Midler som forhindrer eller modulerer banene for 5-lipoksygenase eller 12-lipoksygenase er kjent for å være nyttige medisiner. Midler med en liten eller ingen toksisitet som forhindrer systemiske eller dermatologiske betennelser kan anvendes for helbredelse. Dette patent angår også området for pigmenterte midler som kan brukes i aquakulturindustrien der pigmenterte ingredienser må inkorporeres i vandige tilførselsmidler for å gi en deponering av farge enten i kjøttet hos et dyr eller på huden eller skallet av dette.

Mer spesielt angår den foreliggende oppfinnelsen visse nye lipider som er avledet fra klassen Holothuridia eller sjøpølse og spesielt variasjonen Cucumaria frondosa som finnes i Maine og Nord Atlanterhavet. Hvilken som helst art av sjøpølsedeler vil kunne brukes som råmateriale fra hvilket forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan ekstraheres. Oljene av slike sjøpølser fra en art kan brukes for pigmentering av vann dyr gjennom inkorporering i maten samt for behandling eller forbedring av sykdommer der produkter av lipoksygenasenzymaktivitet eller reaksjon av leukotriener bidrar til det patologiske forholdet. Det betyr at de nye lipidene som utvinnes fra en klasse eller art av sjøpølse forhindrer lipoksygenase enzymer og/eller binder leukotrienereseptorer. Lipoksygenase enzymer er vel kjent i den arakidoniske syrekaskaden. Disse oljene som kalles RED OIL og GOLD OIL kan brukes som de er for immunosuppressive formål og også være råmaterialer fra hvilke ingredienser av immunosuppressive medisiner kan fremstilles hvilke er brukbare for å forbedre immunsvarene på grunn av organtransplantasjon eller autoimmune svar i sykdommer f.eks. lupus eller reumatoidartritt. Disse oljer eller derivat av disse fra molekyldestillering er brukbare som de er eller de kan viderefraksjoneres ved hjelp av kjente teknikker og kan anvendes for å redusere, undertrykke, inhibere eller forhindre ikke ønskede

immunsvar f.eks. hos mennesker eller dyr som behøver immunosuppresjon. Eksempel på slike situasjoner inkluderer men er ikke begrenset til behandling eller forhindring av autoimmune sykdommer f.eks. diabetes, lupus og reumatoid artritt. Immunosuppresjon behøves også ofte i forbindelse med organtransplantasjoner. Immunosuppressive midler kan også brukes når et menneske eller dyr har blitt eksponert for superantigener eller andre faktorer som er kjent for å frembringe overstimulering av immunsystemet. Produktene eller forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er også brukbare som standarder for å bedømme aktiviteten av andre putative immunosuppressive midler. Disse produktene eller oljene har også vist seg gjennom den foreliggende oppfinnelse å forhindre angiogenesis som vises i den korioallantoiske membranprøven hos kylling (Knighton et al., 1977). Den pigmenterte oljen som er designert for formål ifølge dette patentet som RED OIL har vist seg å inneholde overraskende mengder av karotenoidene kantaksantin og astaksantin og er passende for tilsats til kommersiell fiskemat for å gi fargedeposering til kjøttet eller huden på visse arter som behøver dette.

Bakgrunn

Den foreliggende oppfinnelse angår nye produkter og kjemiske sammensetninger for behandling av sykdommer der 5- og 12-lipoksygenasaktivitet bidrar til det patologiske forholdet. Den foreliggende oppfinnelsen angår også produkter som er utvunnet fra lipidfraksjoner av vev fra sjøpølse som forbedrer immunsvarene og som også kan inkorporeres i vanndietter med det formål for øyet å gi farge til kjøtt eller hud hos slik fisk eller reke. Selv om det har blitt rapportert i litteraturen angående marinelipider fra visse fisker ved behandling av forskjellige artrittrelaterte sykdommer har lipider fra sjøpølse aldri blitt inkludert i noen studie, ei heller finnes det noe bevis på at mekanismer som forhindrer betennelse som er kjent hos virveldyrfisker er relevant i pattedyrsystem ifølge denne oppfinnelsen (DeLuca et al., 1995). Det er også kjent at visse sjøsvamper og askidianer har immunomodulerende eller immunosuppressive

aktiviteter men det finnes ingen rapporter fra området marinfarmakologi at sjøpølselipider har vist seg å ha noen slik forhindrende virkning som er anvendelig på det medisinske området (Konig og Wright, 1995).

Mer spesielt forhindrer de forbindelser som defineres nedenfor 5-lipoksygenasbanen og 12-lipoksygenasbanen hos pattedyr. Lipoksygenasbaneprodukter f.eks. leukotriener B₄, C₄, D₄ og E₄, 5-hydroksyeikosatetranosyre, 5-hydroperoksy-eikosatetranosyre og 12-hydroksyeikosatetranosyre relateres til de ovenfor beskrevne forhold. Spesielle forhold for anvendelse av de nye lipoksygenasforhindrende forbindelsene, farmasøytiske komposisjoner derav og den nye metoden for å anvende dem ifølge den foreliggende oppfinnelse inkluderer allergi, astma, artritt, hudsykdommer inkluderende psoriasis, atopisk dermatitt og akne; betennelser inkluderende tarmsykdommer med betennelse eller smerte; forskjellige cancersorter inkluderende prostata, lunge, colorektal og hud; og kardiovaskulære sykdommer inkluderende myokardial ischemi og infarkt, angina, arytmi, stroke, migrene og aterosklerose.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kommer fra lipidfraksjoner av sjøpølse av hvilken som helst sort eller sub-fyla; fra en avpigmentert fraksjon av en sådan lipidfraksjon; fra de demolekylære destillasjonsfasene som er kjente for de som arbeider innen yrket eller fra de kolonne-kromatografiske separasjonene av disse; fra den epidermale, dermale, foregående, etterfølgende eller intestinale massen inkluderende respiratore tre, gonader, kuveriske tubuler eller poliane vesikler hos en sjøpølse.

Sjøpølser av ulike sorter gir medisinsk aktive fraksjoner som kan anvendes for å helbrede. US-patent nr. 5 519 010 beskriver at en avpolymerisert polysakkarid kan anvendes som et antikoagulerende middel. US-patent nr. 5 770 205 (Collin) beskriver at sjøpølsevev ekstrahert med forskjellige metoder har antibetennelseaktivitet som kan anvendes for medisinsk behandling av mennesker og dyr. Glykosider fra sjøpølseorganer har vist seg å inneholde anticancermiddel (Miyamoto et al., 1990). Ingen av de ovennevnte beskriver en lipid fra sjøpølse som hindrer en lipoksygenasbane eller betennelse, ei heller beskriver de noen anvendelse av slike

midler som kommer fra sjøpølse for å hindre patologiske sykdomsforhold der lipoksygenaseprodukter, isomerer eller metaboliter bidrar til et slikt forhold. Ei heller beskriver noen av de ovenfor nevnte patentene noen teknikk der slike lipider gir en immunomodulert aktivitet i et pattedyr.

Den foreliggende oppfinnelse lærer at både de pigmentrike lipidmaterialene og de avpigmenterte lipidmaterialene og de lette fasene som kommer fra molekyldestillasjon av en av de pigmenterte eller avpigmenterte sjøpølselipidmaterialene kan hindre 5-lipoksygenaseenzymaktivitet i menneskelige neutrofiler og 12-lipoksygenaseenzym i menneskelige pletter.

For tiden er det beskrevet mange midler som påstås hindre leukotriene og 5-lipoksygenase og 12-lipoksygenasebaner hos pattedyr. Noen av disse forbindelsene er effektive og noen har toksiske bieffekter eller kan være dyre å fremstille. Det er et formål med den foreliggende oppfinnelse at fremstillingen av sjøpølseoljer og deres derivat som kan inkorporeres i salver, suppositorier og føres inn i kroppen oralt administrert eller injiseres som medisiner eller administreres i medisiner eller på annen måte gir en kostnadseffektiv og lett tilgjengelig måte for å modulere leukotrienbanen i pattedyr og vil således bidra til den terapeutiske behandlingen av slike sykdommer som cancer, psoriasis, atopisk dermatitt etc. der leukotriener, LTB₄, 5-HETE og 12-HETE bidrar til den patologiske tilstanden.

Hensikten med den foreliggende oppfinnelse

Terapeutisk applikasjon av de nye produktene eller forbindelsene og sammensetningene som inneholder dem kan utføres ved hjelp av hvilken som helst passende behandling og teknikk som for nærværende eller senere kan være kjent for fagfolk. Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse har anvendelse som utgangsmateriale eller som mellomprodukter for fremstilling av andre anvendelige forbindelser og komposisjoner som utviser mer potent aktivitet.

Det er et formål med den foreliggende oppfinnelse å frembringe farmasøytiske komposisjoner som omfatter som aktive ingredienser en effektiv mengde av en eller flere av de nye forbindelsene som beskrives her. Et formål med den

foreliggende oppfinnelsen er å frembringe nye forbindelser som er anvendelige som immunomodulatorer gjennom sine forhindrende aktiviteter av lipoksygenasebaner i pattedyr og gjennom sine forhindrende aktiviteter av lymfocyttoproliferasjonsbaner i immunsystemet hos pattedyr samt som ingredienser som kan anvendes i vanndietter for pigmentering av marint liv. Molekyldestillering eller andre separasjonsteknikker omfatter såkalte LETTE FASER av de ekstraherte sjøpølseoljene som finnes i sjøpølsevev og som har vist seg kunne hindre lipoksygenasebaner. De TUNGE FASENE fra molekyldestillasjon av de samme oljene viser også lignende aktiviteter. Isolering av mer aktive grupper av disse baner kan fremstilles gjennom f.eks. kolonnekromatografi eller andre kjente metoder for de som kjenner til lipidbiokjemien. Det er derfor et formål med den foreliggende oppfinnelse å frembringe et råmateriale og aktive mellomprodukter for slike isoleringer om mer potente eller spesifikke fraksjoner ønskes.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse hindrer 5-lipoksygenase- og 12-lipoksygenaseaktivitet hos pattedyr hvilken forhindrende aktivitet har blitt assosiert med antiallergisk, antibetennelses og antihyperproliferativ aktivitet. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er således anvendelige for behandling av allergiske sykdommer, slik som det har blitt diskutert ovenfor, betennelsessykdommer av epitelium, sure oppstøt, cancer og hyperproliferative hudsykdommer. Det har også vist seg at de kan hindre lymfocyttoproliferasjon i menneskeblod.

Betennelsessykdommene som kan behandles inkluderer artritt, bursitt, tendinit, artrittis urica og betennelser i tarmer og innvoller.

Med "hyperproliferativ hudsykdom" menes en tilstand der et symptom aksellererer hudcelleproduksjonen, flakning, skalning eller papuløse skader. Eksempler på hyperproliferative hudsykdommer inkluderer f.eks. psoriasis, likenifiert eksem, flass og lignende.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres i et antall av konvensjonelle doseringsformer, f.eks. topiske, orale, parenterale, rektale, transdermale, inhaleringsformer og lignende. Orale eller rektale doseringsformer

inkluderer kapsler, tabletter, piller, pulver og suppositorier. Flytende orale doseringsformer inkluderer løsninger og suspensjoner. Parenterale tilberedninger inkluderer sterile løsninger og suspensjoner. Inhalasjonsadministrering kan være i form av en nasal eller oral spray eller gjennom insuflasjon. Topiske doseringsformer kan være kremer, salver, losjoner (lotions), transdermale anordninger (f.eks. av den konvensjonelle koplings- eller matrisetypen) og lignende og foretrekkes for behandling av hyperproliferative hudsykdommer.

Formuleringene og de farmasøytiske komposisjonene som inngår i de ovenfor nevnte doseringsformene kan fremstilles med konvensjonelt farmasøytisk akseptable bindemidler og additiver med anvendelse av konvensjonelle teknikker. Slike farmasøytisk akseptable bindemidler og additiver inkluderer bærere, bindemidler, smakmiddel, bufferter, fortykningsmidler, fargemidler, stabiliseringsmidler, emulgeringsmidler, dispergeringsmidler, suspensjonsmidler, parfymer, preservative, smøremidler, etc.

Passende farmasøytisk akseptable faste bærere er magnesiumkarbonat, magnesiumstearat, talkum, sukker, lakose, pektin, dekstrin, stivelse, gelatin, tragant, metylcellulose, natriumkarboksymetylcellulose, lavtsmeltende vokser, kokossmør og lignende. Kapsler kan fremstilles der den aktive forbindelsen innføres i farmasøytisk akseptable kapsler som en bærer. De aktive forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan blandes med farmasøytisk akseptable bindemidler eller kan brukes som fintfordelt pulver uten bindemiddel for inneslutning i kapsler. På samme måte innesluttet kapsler som er liposomer hvilket er kjent for fagmannen i yrket.

Tilberedninger i flytende form inkluderer løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Som et eksempel kan nevnes vann eller vannpropylenglykolløsninger for parenteral injeksjon. Flytende tilberedninger kan også formuleres i løsning i polyetylenglykol og/eller propylenglykol som kan inneholde vann. Vannløsninger som er passende for oral anvendelse kan fremstilles gjennom tilsats av den aktive komponenten i vann og med tilsats av passende fargemidler, smaksmidler, stabiliseringsmidler, søtningsmidler, løsnings- og fortykningsmidler

om så ønskes. Vannsuspensjoner som er lempelige for oral anvendelse kan fremstilles gjennom dispergering av den aktive komponenten i oljeformen med et emulgeringsmiddel f.eks. TWEEN-80 som er kjent i industrien for å være familiær med olje-vannemulsjoner.

Formuleringene for topisk applikasjon, f.eks. for anvendelse ved behandling av hyperproliferative hudsykdommer kan inkludere de ovennevnte flytende formene samt kremer, aerosoler, sprayer, støv i hvilken oljen er innblandet med en passende bærer, losjoner og salver som er fremstilt gjennom kombinerings av den aktive ingrediensen ifølge denne oppfinnelsen med konvensjonelle farmasøytisk akseptable fortyknelsesmidler og bærere som vanlig anvendes i topiske formuleringer. Salver og kremer kan f.eks. formuleres med en vann- eller oljebase med tilsetning av passende fortyknings og/- eller gelatineringsmidler. Slike baser kan f.eks. inkludere vann og/eller en olje f.eks. flytende parafin eller bivoks eller en vegetabilsk olje f.eks. peanøttolje eller lakserolje. Fortykningsmidler som kan brukes ifølge naturen av basen inkluderer myke vokser, aluminiumstearat, setostearylalkohol, propylenglykol, polyetylenglykol, ullfett, hydrogenert lanolin etc.

Losjoner kan være formuleringer med en vann- eller oljebase og vil i alminnelighet også inkludere ett eller flere farmasøytisk akseptable stabiliseringsmidler, emulgeringsmidler, dispergeringsmidler, suspenderingsmidler, fortykningsmidler, fargemidler, parfymer og lignende.

De topiske farmasøytiske komposisjonene kan også inkludere en eller flere preservativer eller bakteriestatiske midler f.eks. metylhydroksybenzoat, propylhydroksybenzoat, klorokresol, benzalkoniumklorider, etc.

De topiske farmasøytiske komposisjonene kan også inneholde en aktiv forbindelse ifølge denne oppfinnelsen i kombinasjon med andre aktive ingredienser, f.eks. antimikrobielle midler særskilt antibiotika, anestetika, analgesika og anti-kløemidler f.eks. sinkpyrition.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse kan også gis transdermalt for systemisk distribusjon. De transdermale komposisjonene kan ta formen av kremer, losjoner og/eller

emulsjoner og inkluderes i en transdermallapp av matrise eller reservoartype som er konvensjonelle på dette området for dette formål.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres ved hjelp av en konvensjonell måte for administrering gjennom anvendelse av en antiallergisk antibiotennelse eller antihyperproliferativ effektiv mengde av en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen. Dosene kan varieres i avhengighet av kravene til pasienten ved bedømmelse av den uttøvende legen, alvorret av det forhold som skal behandles og den spesielle forbindelsen som anvendes. Avgjørelsen av den passende dosen for en spesiell situasjon må tas av yrkesmannen. Behandling kan initieres med mindre doser som er mindre enn den optimale dosen for forbindelsen. Deretter bør dosen økes med små mengder til den optimale effekten oppnås under de rådende forholdene. Det er lempelig at den daglige dosen kan deles og administreres i porsjoner under døgnet om så ønskes.

Avhengig av måten kan således doser av fra ca. 0,1 til ca. 500 mg/kg kroppsvekt administreres per døgn. F.eks. har doser når de administreres oralt antiallergiaktivitet i mengder av fra ca. 0,5 til ca. 200 mg/kg kroppsvekt og fortrinnsvis ca. 50 til ca. 100 mg/kg kroppsvekt; når dosene administreres gjennom inhalering har forbindelsene anti-allergiaktivitet i doser av fra 0,1 til 5 mg per inhalering og 1 til 4 inhaleringer kan tas hver fjerde time.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres på hvilken som helst konvensjonell administreringsmåte for å få antibiotennelsesaktivitet gjennom å anvende en effektiv mengde av en antibiotennelsesforbindelse ifølge denne oppfinnelsen. Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan som et antibiotennelsesmiddel administreres i doser av ca. 0,1 til ca. 500 mg/kg kroppsvekt og fortrinnsvis ca. 5 til ca. 200 mg/kg per døgn. Fortrinnsvis administreres de totale dosene i to til firedelte doser per døgn. F.eks. oppgår en oral dose fra ca. 5 mg/kg kroppsvekt per døgn til ca. 50 mg/kg kroppsvekt per døgn i delte doser som tas med ca. 4 timers intervall.

Når forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen administreres for behandling av hyperproliferative hudsykdommer kan de administreres topisk, oralt, rektalt eller parentalt, fortrinnsvis topisk. Når forbindelsene administreres topisk varierer mengden av den administrerte forbindelsen meget med mengden av den hud som skal behandles og med konsentrasjonen av den aktive ingrediensen som appliseres på det påvirkede området. Fortrinnsvis inneholder topiske komposisjoner fra ca. 0,10 til ca. 10 vekt% av den aktive ingrediensen og appliseres som de behøves ifølge bedømmelsen hos den behandelende legen. Når forbindelsene administreres oralt er forbindelsene av RED OIL og GOLD OIL effektive for behandling av hyperproliferativ hudsykdom i daglige doser som oppgår fra ca. 0,1 mg/kg til ca. 500 mg/kg kroppsvekt fortrinnsvis fra ca. 5 mg/kg til ca. 100 mg/kg som kan administreres i delte doser. Når forbindelsene administreres rektalt kan de administreres i daglige doser som oppgår fra 0,1 mg/kg til ca. 100 mg/kg.

Som et resultat av administreringen av en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen kan en remisjon av symptomene hos en psoriasispatient i de fleste tilfellene ventes. Således kan en som har psoriasis forvente seg en minskning av flasningen, erytema, størrelsen på plakkene, kløe og andre symptomer som assosieres med psoriasis. Doseringen av medikamentet og tiden som kreves for en fremgangsrik behandling kan variere for hver individuell psoriasispatient men fagmenn i yrket kan se disse variasjonene og justere behandlingen i henhold til variasjonene.

Lipoksygenasesystemer

Arakidonsyre tjener som den biologiske grunnsubstansen for en familie av fysiologisk aktive eikosanoider. Disse inkluderer produkter som kommer fra virkningen av syklo-oxygenase f.eks. klassen prostaglandin-E og -F forbindelser, tromboksaner og prostasyklin og produkter som kommer fra virkningen av lipoksygenaseenzymer f.eks. hydroksy- og hydroperoksyekosatetranoidsyrer og leukotriener.

Disse lipoksygenaseprodukter har vist seg være meget potent stereospesifikke induserere av polymorfonukleær-

leukosittmigrering eller kemotaksis, lysosomal enzymutløsning og degranulering. Dessuten induserer disse produkter konsentrasjonen av myke muskler f.eks. vaskulær og pulmonær vev og induserer genereringen av ytterligere inflammogener f.eks. tromboksaner A_2 og prostasyklin. Lipoksygenaseprodukter samvirker også med vasodilatorprostanoider og andre mediatorer som leder til forsterkning eller forstørring av det inflammatoriske svaret.

Leukotriener og hydroksy- og hydroperoksyekosatetraenoisyrer spiller en stor rolle i patogenesen hos mange sykdomsforhold. Disse forbindelsene har blitt funnet i synovial væske i raumatoide ledd, i involvert hud hos psoriasis-pasienter, i inflammet kolonnevev og i forhøyde nivåer i ischemisk myokardialvev. De er også mediatorer for allergiske og astmatiske forhold.

En rolle for 5-HETE for stimulering av vekst av et antall forskjellige typer av tumører har nylig blitt demonstrert i et antall publikasjoner. F.eks., resulterer en tilsats av arakidonsyre til kulturerde menneskelige prostatacancerceller i en signifikant økning av celleteilveksten og en forhøyd biosyntese av 5-hydroksyeikosatetraenoisyre (5-HETE) (Ghosh og Myers, 1997). Den forhøyde tilveksten ble blokkert av 5-lipoksygenase (5-LO) inhibitorer AA681 og MK886, men ikke av 12-LO inhibitorer, baikalein og N-benzyl-N-hydroksy-5-fenylpentanamid (BHPP) ei heller av syklooksygenase (COX) inhibitorer. Dessuten ikke bare stimulerte tilsatsen av 5-HETE, men ingen andre produkter av 5-LO banen så som leukotrien B_4 , celleteilveksten men reverserte også effekten av MK886. Lignende oppdagelser har også blitt observert hos andre typer av cancerceller både in vitro og in vivo. F.eks. hindret i menneskelig brystcancer (HS578T) cellelinjen LO inhibitorer nordihydroguaiaretinsyre (NDGA) og eskuletin celleteilveksten men COX inhibitor piroksikam hadde ingen effekt (Hofmanova et al., 1996). I en cellelinje av murinadenokarsinom (MAX) og mus transplantert med MAC-celler forhindret 5-LO inhibitorer BWA4C (en acetohydroksaminsyre med den allmenne formelen R-CONHOH) og BWB70C (et acetohydroksaminsyrederivat) tumorcelleteilvekst og 5-HETE produksjon (Hussey og Tisdale, 1996). Dessuten i in vivo

studier i A/J mus med adonema induisert av uretan minsket administreringen av NDGA merkbart lungeadenoma celleantallet (Moody et al., 1998) og i murin adenokarsinom, BWA4C og BWB70C ble det også påvist en minskning av MAC26 og MAC16 celletilvekst gjennom virkningen på både 5- og 12-HETE produksjonen (Hussey og Tisdale, 1996).

12-HETE

Stadig økende bevis antyder at 12-HETE frembrakt av pletter og tumorceller er en avgjørende molekyl for promovering av tumormetastaser. Den forsterker tumorcelleindusert plettaggregasjon og tumorcelleadhesjon til subendotelialmatrise gjennom å øke eksperesjonen av overflateintegrins, induserer endotelialcelleretraksjon og øker tumorcellemotiliteten hvilke alle er viktige trinn i tumorcellemetastasen (Honn et al., 1994). In vitro studier har vist at 12-LO inhibitor BHPP tar bort de ovennevnte effektene av både endogen og eksogen tilsats 12-HETE (Honn et al., 1992; Chen et al., 1994). Det har også blitt vist at 12-HETE produksjon er en god indikator av tumorcellemetastasepotensial. F.eks. er 12-HETE mRNA nivåene forhøyde i prostatacancer celler jamført med normale celler og denne økningen av mRNA-nivået overenstemmer med avanserte stadier og svak differensiering av cancer celler (Gao et al., 1995). Ved ytterligere studier har det vist seg at Valke karsinoma (W256) hos rotter og mus melanoma (B16a) celler metaboliserer arakidonsyre (AA) til 12-HETE og 5-HETE og at i eksperimentmetastaser minsker anvendelsen av BHPP kolonidannelsen i lungen (Chen et al., 1994; Liu et al., 1994).

Forbindelser, farmasøytiske og nutraceutikale komposisjoner ifølge den foreliggende oppfinnelse hindrer lipoksygenase eller biosyntese eller biokjemisk aksjon av leukotriener og er derfor anvendelige i behandling av eller for forbedring av et antall av sykdommer der patogenes involverer produksjonen av leukotriener og andre produkter som kommer fra lipoksygenase, f.eks. 5-HETE og 12-HETE og leukotrien B₄ (LTB₄). Disse lipoksygenaseinhibitorer hjelper til å forhindre vevskader og inflammasjon, som er et resultat av infiltrasjon av leukocytter, frigjør vevkonsumerende

lysomalenzymmer og forandrer permeabiliteten og det kontraktile stadiet av mykmuskelvev.

Spesielle forhold, i hvilke slike lipoksygenaseforhindrende eller leukotrienantagoniserende forbindelser og farmasøytiske komposisjoner ifølge den foreliggende oppfinnelsen er anvendelige, inkluderer allergi, astma, artritt, hudsykdommer inkluderende psoriasis og akne; inflammasjon, inflammatoriske magesykdommer, smerte og kardiovaskulære plager inkluderende myokardial ischemia og infarkt, angina, arytmier, stroke, atopisk dermatitis, aterosklerose og cancer av forskjellige etiologier inkluderende cancer i prostata, lunger, hud og i mageregionen.

Angiogenese inhibering av RED OIL og GOLD OIL ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Det har vært stort vitenskapelig interesse i letingen etter nye inhibitorer for angiogenese med den hensikten at denne inhibisjonen av nye blodkar vil begrense tilveksten av neoplastiske tumorer som avhenger av ny vaskulær tilvekst. Når en normal celle utvikler seg til en fast tumor undergår den en rekke forandringer. Ved det fysiologiske nivået forstørres tilveksten, immuniteten minsker og neovaskularisasjon induseres. Neovaskularisasjon eller angiogenese ser ut til å være en forutsetning for tumortilvekst. Eksperiment med faste tumorer viser at disse ikke kan vokse mer enn noen mm i tykkelse uten blodtilførsel. De fleste naturlige tumorer forfiner angiogene faktorer som attraherer de nye blodkarene som de er avhengige av. Det har således vært en kontinuerlig forskning rettet mot spørsmålene av hva det er som kan forhindre hyppig kapillarproliferasjon og som beholder det hvilende stadiet av kapillære endoteliale celler hos normal vev.

Et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen er å forhindre angiogenese i et varmblodig dyr som behøver slik behandling hvilket omfatter administrering til det varmblodige dyret av en terapeutisk effektiv mengde av en komposisjon omfattende isolert RED OIL eller GOLD OIL eller LIGHT eller HEAVY faser fra molekylærdestillasjonsprosesser som beskrives i de følgende kapitlene.

Karotenoider fra sjøpølsevev

Karotenoider fra sjøpølser har blitt nevnt i forskjellige vitenskapelige journalartikler nemlig: Matsumo et al., (1995) rapporterte forekomsten av astaksantin som den hovedsakelige karotenoiden i gonadene hos sjøpølse *Holothuria leucospilota* og *Stichopus japonicus*, og betakaroten echinenon, kantaksantin og zeaksantin ble identifisert fra gonaden av *H. leucospilota* og *S. japonicus*. På den andre siden ble astaksantin og estrene, kantaksantin fönikosantin og ekinenon isolert av Bullock og Dawson (1970) fra den røde kroppsveggen av *Psolus fabrichii*. Tsushima et al., (1996) rapporterer nye marine di-Z karotenoider, kukumariaksantiner A, B og C fra sjøpølse *Cucumaria japonica*. Findlay et al., (1983) rapporterte kantaksantin fra arten *Cucumaria frondosa*. Ingen av disse rapportene gir noen ledning for å anvende slike karotenoider for en aquakultur eller medisinsk eller helsekostindustri applikasjon og ingen beskriver metoder for å konsentrere slike pigmenterte lipidfraksjoner.

US patent nr. 4 692 280 beskriver en metode for å frembringe rensede fiskeoljer (etter initial ekstraksjon fra fiskevev) ved anvendelse av superkritisk karbondioksid og inkorporeres her som referanse for å beskrive disse metodene. Dette patentet beskriver ikke noen apparat for rensing av sjøpølselipidfraksjoner gjennom den superkritiske rensningsmetoden som angis i dette patentet.

Det finnes således ikke noe tidligere kjent for en effektiv og i stor skala fjerning av lipidfraksjoner og ikke noen rettet mot å få anvendelige karotenoid eller ikke karotenoid lipidfraksjoner av sjøpølsevev.

J.A. Findlay et al., *Journal of Natural Products*, vol. 47, nr. 2 (1984), side 320-324 beskriver et ekstrakt fra *Cucumaria frondosa* og foreslår en struktur for en triterpenoid laktonacetat-xylosid-forbindelse som ble oppnådd ved delvis hydrolyse av saponin-fraksjonen.

Det er et formål med den foreliggende oppfinnelsen å få frem anvendelige pigmenterte lipidfraksjoner og pigmentfrie lipidfraksjoner fra fordøyelseskanalen og/eller kroppsvegger fra sjøpølse spesielt fra arten *Cucumaria frondosa*. Det er ytterligere en hensikt med den foreliggende oppfinnelsen å

beskrive en komposisjon som er den pigmenterte lipidfraksjonen og en avpigmentert lipidfraksjon som resulterer fra en slik metode. Den resulterende pigmenterte lipidfraksjonen erholdt fra en løsningsmiddelekstraksjon med aceton eller alkohol med kommersiell ekstraksjonsutrustning f.eks. Crown 2 Extractor (Crown Iron Works, Chicago, IL), som anvendes for ekstraksjon av soyabønneoljer, gir et pigmentert materiale som er rikt på kantaksantin og astaksantin i mengden av ca. 4.500 deler per million og kan anvendes i aquakulturindustrien som et utgangsmateriale. Etter lipidekstraksjonen kan det tørre avlipidiserte vevet brukes som et høyproteinmåltid eller hydrolysat med overraskende nivåer av viktige aminosyrer.

Oppsummering av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelsen går ut på industriell ekstraksjon av nye pigmenterte og ikke pigmenterte lipidforbindelser som kan erholdes fra sjøpølsetarm eller kroppsveggsvev i våte eller tørre materialforhold. Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes som pigmenterende additiver i vanndietter eller som medisinske terapeutiske midler i pattedyr og produseres gjennom molekylærestillasjonsteknikker, løsningsmiddelekstraksjonsteknikker i industriell skala, kolonnekromatografiteknikker og gjennom preparative høytrykksflytende kromatografiteknikker som beskrives her.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen demonstrerer antiinflammatorisk aktivitet som har vist seg gjennom den lave prosentøkningen i ørevekt hos apemodeller av inflammasjon og når det appliseres topisk og gjennom resultatene av forhindring av adiovant indusert inflammasjon i bakpoten hos rotter samt fra anektotiske rapporter av subjektiv velstand fra mennesker.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen RED OIL og GOLD OIL og molekyldestillasjonsfraksjonene av disse anvendes for å behandle allergier hos pattedyr (f.eks. mennesker eller hunder) og en foretrukket anvendelse er for behandling av allergiske, kroniske inflammasjoner av dermis hos slike pattedyr og med passende transdermale bærerforbindelser som

inhibitorer for artrittisk inflammatoriske forhold i hvilke oljene ifølge den foreliggende oppfinnelsen bæres transdermalt til setene for lipoksygenaseaktivering lokalt. En ytterligere foretrukket anvendelse er for behandling av allergisk, kronisk, obstruktiv lungesykdom. Kronisk obstruktiv lungesykdom som nevnes her betyr sykdomsforhold der passasjen av luft inn og ut av lungene forhindres eller minskes slik som i tilfellet med astma, allergisk eller sesongmessig rinit og/eller bronkitt og lignende. Behandling av psoriasis, akne, artritt eller cancer kan skje ved hjelp av forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse som topiske forbindelser samt ved hjelp av oral administrering.

Et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen angår derfor immunosuppresiv anvendelse av RED OIL og GOLD OIL isolert fra sjøpølsevev og forskjellige derivat og analoger av disse forbindelser. Disse forbindelsene kan brukes for å redusere, undertrykke, inhibiere eller forhindre uønskede immunsvær. Denne immunosuppresjon kan med fordel oppnås uten cytotoxisitet. Disse forbindelsene er derfor anvendelige for behandlinger av mennesker eller dyr som trenger immunosuppresjon. Eksempel på slike situasjoner inkluderer men er ikke begrenset til behandling eller forhindring av autoimmune sykdommer f.eks. diabetes lupus og reumatoid artritt. Immunosuppresjon behøves også ofte i samband med organtransplantasjoner. Immunosuppressive midler kan også brukes når et menneske eller dyr har blitt eller kan bli eksponert for superantigener eller andre faktorer som er kjent for å gi overstimulering av immunsystemet. Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er også anvendelig som standarder for å bestemme aktiviteten av andre putative immunosuppressive midler. Den foreliggende oppfinnelsen angår dessuten farmasøytiske komposisjoner inneholdende disse forbindelsene.

Som pigmentadditiver kan forskjellige pigmenterte oljer tilsettes til mat for fisk eller reker med forskjellige inklusjonsrater avhengig av karotenoidinnholdet av oljen eller ønsket av hvis intensitet av fargen i spesielle vannarter som mates med den pigmenterte dietten.

Nårmere angivelser av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av olje-produktet eller -forbindelsene, samt andre aspekter ifølge oppfinnelsen, er å finne i patentkravene. I den forbindelse er det å bemerke at betegnelsen "produkt" også opptrer i formen "forbindelse" i denne beskrivelsen. Tilsvarende gjelder for "kjemisk sammensetning" og "farmasøytisk komposisjon".

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 viser effekten av GOLD OIL LIGHT PHASES på syntesen av LTB₄ jamført for kontroll.

Fig. 2 viser inhiberingen av neutrofil 5-lipoksygenase metabolittsyntese gjennom utspedninger av GOLD OIL.

Fig. 3 viser effekten av RED OIL i en fortykning av 1:10.000 på neutrofil 5-lipoksygenasemetabolittsyntese.

Fig. 4 viser effekten av RED OIL og GOLD OIL på 12-HETE syntese jamført med metanolkontroll.

Fig. 5 viser en gasskromatografi av GOLD OIL.

Fig. 6 viser ett absorpsjonsspektrum av RED OIL.

Fig. 7 viser effekten av 5%ig GOLD OIL på museører som var blitt behandlet med krotonolje jamført med acetonkontroll.

Fig. 8 viser effekten av RED OIL på museører som var blitt behandlet med krotonolje jamført med acetonkontroll.

Fig. 9 viser effekten av GOLD OIL LIGHT PHASES på 12-HETE syntese jamført med metanolkontroll.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Metoder for fremstilling av anvendelige fraksjoner av sjøpølse

Forskjellige fraksjoner av sjøpølse isoleres og brukes enten terapeutisk eller som en del av vannføden. I korthet betyr dette en metode for fremstilling av disse fraksjoner som involverer ekstrahering av tørket sjøtungetarm eller kroppsvegg med et løsningsmiddel for fremstilling av en pigmentert olje kalt RED OIL. Pigmentene kan tas bort fra RED OIL for å gi en mer eller mindre avpigmentert olje kalt GOLD OIL samt en andre fraksjon som er ett rødt pigmentert lipid-konsentrat. RED OIL og GOLD OIL kan hver for seg destilleres

for å gi forskjellige fraksjoner inkluderende bad som kalles LIGHT PHASES og HEAVY PHASES. En annen vei å gå er å bruke vått sjøpølsevev istedenfor tørt vev. Når dette gjøres med aceton eller alkohol gir den første løsningsmiddelekstraksjonen et produkt kalt RED GREASE. En andre metode for å fremstille GOLD OIL beskrives også. Denne alternative metoden involverer en andre løsningsmiddelekstraksjon av sjøpølsevev som tørkes på en passende måte etter at den første ekstraksjonen har fjernet all eller det meste av den røde fargen. Til slutt erholdes en annen fraksjon av sjøpølse gjennom å ta sjøpølsevev som har blitt avlipidisert og behandle denne for å fremstille proteinrikt hydrolysat. Dette hydrolysatet kan anvendes som et supplement til mat eller kan inkorporeres i en stor variasjon av fødeemner. Metode for å gjøre og bruke hver og en av fraksjonene vises nedenfor. Metodene nedenfor viser mer enn en enkel metode for å gjøre hver og en av de forskjellige produktene ifølge oppfinnelsen f.eks. RED OIL og GOLD OIL. Selv om noe forskjellig metoder vises frembringer metodene hovedsakelige ekvivalente produkter og navnet på produktene menes å omfatte et produkt som er uavhengig av hvilken metode som beskrives i denne artikkel eller annen metode som gir et vesentlig ekvivalent produkt med lignende aktiviteter eller anvendelser anvendes for å fremstille produktet.

Metode for fremstilling av anvendelige fraksjoner av sjøpølse

Tarmmassen fra 460 kg sjøpølse, *Cucumaria frondosa*, ble oppsamlet fra prosessavfallet i en sjøpølseindustri. Tarmmassen (352 pund) ble tørket i en konvensjonell sjømatstørkeanordning med lav varme (Southwind, Nova Scotia, Canada) på nettingstativ under 3 dager hvilket resulterte i 105 pund av tørt materiale. Den tørkede tarmmassen ble deretter ekstrahert ved hjelp av heksan som er kjent ved soyabønneoljefremstilling med konvensjonelle metoder (Crown Model 2 Extractor, Crown Iron Works, Chigaco, IL) hvilket ga ca. 42 pund av rødt lipidmateriale som kalles RED OIL. Lipidmaterialet ble deretter "avgummiert" gjennom tilsats av 1% vann til oljen som fikk hydratisere under 30 minutter og deretter sentrifugert ved 8.000 rpm ved 150°F. Det røde avgummierte lipidmaterialet

ble deretter forbehandlet med 0,5% kiselsyregele, oppvarmet til 180°F og deretter filtrert ut ved anvendelse av et 6 mikrons filterpapir. Fjernelsen av pigmentet ble utført ved hjelp av 5% blekende leire til den forhandlede oljen. Oljen ble opphetet til 220°F under 20 minutter ved et vakuum av 28 tommer HG. Den resulterende oljen (34 pund) hadde en lysgul farge og det meste av pigmentet hadde blitt absorbert i den blekende leiren. Tarmlipiden som var fri for pigment ble kalt GOLD OIL og er en av de lipidfraksjoner som ytterligere ble prøvet for inhibiering av lipoksygenaseaktivitet og inflammatorisk aktivitet.

Den resulterende leiren ble deretter ekstrahert med aceton 1:2 (w:w) leire til løsningsmiddelforhold og vasket to ganger. Den resulterende løsningen ble deretter befridd fra løsningsmiddelet i en Luwa evaporator ved 90°C og 29 tommer HG vakuum og 8 pund av det røde lipidfraksjonskonsentratet ble beholdt.

En alternativ metode for fremstilling av GOLD OIL er å la RED OIL passere gjennom en kolonne med kiselsyre ekvilibrert med kloroform og vaske kolonnen med kloroform. GOLD OIL drives ut med kloroformvasken. En konsentrert RED OIL kan deretter utdrives fra kolonnen gjennom å la en blanding av kloroform:metanol (fortrinnsvis 60%:40%) passere gjennom kolonnen. Dette resulterer i at ca. 70% av det originale materialet som ble ladet i kolonnen utvinnes som GOLD OIL og 30% utvinnes som konsentrert RED OIL.

Den pigmentfrie GOLD OIL og det pigmenterte RED OIL ble begge underkastet molekylardestillasjon for å separere flyktige fraksjoner. Tre passasjer gjordes mellom en molekylstill ved 200°C og 0,005 torr. Tre fraksjoner ble utvunnet i hver passasje. Den lyse fasen (LIGHT PHASE I) ble oppsamlet med en kondensertemperatur av ca. 30°C og ble holdt igjen. Den flyktige fraksjonen ble oppsamlet i en alkohol/tørris felle og kastet. Den tunge fasen (HEAVY PHASE I) var den porjonen som ble drevet ut ved bunnen av stillen, ikke evaporert av prosessen. HEAVY PHASE I ble deretter igjen introdusert i molekylarsikten og ga LIGHT PHASE II OG HEAVY PHASE II. HEAVY PHASE II som ble utdrevet ved bunnen av destillasjonsapparatet ble deretter ført inn på dette igjen og ga LIGHT PHASE III

og HEAVY PHASE III. Totalt ga disse teknikkene LIGHT PHASE I, II og III; HEAVY PHASE I, II og III og dessuten flyktige emner som ble kastet. De lette fasene ble deretter prøvet på sin aktivitet å inhibiere lipoksygenasebaner. Fig. 1 viser inhiberingen av 5-lipoksygenase aktivitet av de lette fasene. Fig. 2 viser inhiberingsaktiviteten av 5-lipoksygenase av udestillert GOLD OIL. Fig. 3 viser den 5-lipoksygenase inhiberende aktiviteten av RED OIL før avpigmenteringen. Fig. 4 viser effekten av GOLD OIL og RED OIL på aktiviteten av 12-lipoksygenasebanen og generasjonen av 12-HETE. Fig. 9 viser effekten av GOLD OIL LIGHT PHASES som en løsning av 1:1000 på 12-HETE syntese jamført med metanol-kontroll.

En annen metode for fremstilling av anvendelige fraksjoner

Formålet med den foreliggende oppfinnelse som inkluderer anvendelsen av oljefraksjonene fra sjøpølsetarm eller kroppsveggvev som pigmentgivende forbindelser for pigmentering av fisk eller reker utføres gjennom en prosess som inkluderer trinnene i kombinasjon:

a. Separering av tarmmateriale fra den behandlede sjøpølsen manuelt eller i maskin. Håndseparasjon involverer skjæring av dyret med en kniv og fysisk fjerning av tarmene. Maskinskjæring involverer en mekanisert form der automatiske skjæreverktøy kan skjære opp dyret hvorved tarmene er tilgjengelige for fjerning.

b. Det proteinholdige lipidtarmmaterialet forbehandles etter separasjon fra dyret med tilstrekkelig syre for å gi et lavere pH i materialet til et område av fra ca. 4 til ca. 5,5, fortrinnsvis ca. 4,3 til ca. 4,7 for å undertrykke mikrobiell degradering, demineralisere massen og forbedre utvinnelsen av rødt karotenoidpigment under den etterfølgende ekstraksjonen med løsningsmiddel eller kombinasjon av løsningsmidler.

c. I en metode under prosessen blandes det proteinholdige lipidtarmmaterialet med aceton, alkohol eller lignende løsningsmiddel i 3:1 (v:v) løsningsmiddel til materialforhold og omskakes under 24 timer eller til tilstrekkelig pigment har blitt løsgjort fra tarmmaterialet til løsningsmiddelet.

d. Aceton eller et annet løsningsmiddel dekanteres av fra resten av tarmmaterialet og tarmmaterialet vaskes deretter fire eller flere ganger med rent løsningsmiddel for å fjerne resterende karotenoidbærende lipider.

e. Resten av tarmmaterialet sentrifugeres for å drive ut gjenværende løsningsmiddel eller opphetes i en tilsluttet beholder og løsningsmiddelet gjenvinnes gjennom metoder under anvendelse av et apparat for løsningsmiddelfjerning som er kjent innen yrket.

f. Den pigmentbærende acetonen eller løsningsmiddelet pumpes til en "wiped-film" evaporator som er kjent innen yrket for oljekjemi og pigmentet beholdes og sekvestreres og løsningsmiddelet gjenvinnes.

g. Den resulterende lipidpigmentfraksjonen er et blandet karotenoidbærende lipidmateriale inneholdende kantaksantin og astaksantin og kalles her RED GREASE. Den hovedsakelige karotenoiden er kantaksantin i eksempelet med *Cucumaria frondosa*.

h. Den resulterende pigmenterte lipidfraksjonen kan stabiliseres med kjente antioksydanter som er kjent innen yrket.

i. Det gjenværende tarmmaterialet tørkes siden og ekstraheres med heksan, butan, superkritisk karbondioksid eller lignende løsningsmidler for å fjerne en gylden olje som er vesentlig fri for pigment. Denne gyldne olje som er hovedsakelig fri fra de fleste karotenoider kalles GOLD OIL. Det resulterende gjenværende tørre proteinholdige materialet som er fritt fra lipider har en høy konsentrasjon av protein og polysakkarider og passer for inkusjon i mateksperimenter for dyr og mennesker der essensielle aminosyrer behøves. Det proteinholdige avpigmenterte måltidet er unikt i fiskemat-industrien ettersom det er avpigmentert avlipidisert, kan bli gjort vannløselig ved hjelp av metoder som angis her, har et høyt innhold av anvendbar protein og vesentlige aminosyrer og er hovedsakelig fri for luktende forurensninger. Det kan lett fremstilles som pulver eller hydrolysat ved hjelp av metoder som er kjent for de som er fagmenn i hydrolysatyrket og som beskrives her.

I en annen prosess ifølge den foreliggende oppfinnelse tørkes de separerte sjøpølsetarmene etter at de har blitt surgjort slik som er beskrevet i den foregående metoden. Tarmmaterialet kan også varmes i vann i et område mellom 150°F og kokepunktet under varierende tidsperioder mellom 10 minutter og 30 minutter før de blir surgjort uten at dette har noen negativ virkning på den generelle prosessen ifølge oppfinnelsen. Tørkningsprosessen kan skje ved lav temperatur (60 til 80°F) eller ved høy temperatur (150 til 200°F) uten at de tilsiktede lipidfraksjonene eller karotenoidene påvirkes. Denne prosessen som inkluderer tørkning av tarmen eller vevmaterialet utføres videre i trinn som inkluderer i kombinasjon:

a. Underkastning av det tørkede tarmmaterialet som har et fuktighetsinnhold av mindre enn ca. 10% til en standard "oljeutvinningsprosedyre" med heksan eller et annet passende løsningsmiddel som er kjent for yrkesmannen i hvilken det tørre tarm eller vevmaterialet blandes i et 1:1 forhold ved 130°F under 5 minutter og tørkes deretter. Det ekstraherte produktet vaskes siden tre ganger med et friskt løsningsmiddel. Løsningen inneholdende karotenoiden befris fra løsningsmiddel i en film evaporator (Luwa og Pope) ved 95°C og 28 tommer Hg vakuum.

b. Sekvestrering av løsningsmiddel/lipidfasen i beholdere som er konstruert for slik avendelse og fjerning av løsningsmiddelet fra karotenoid-olje/løsningsmiddelfasen gjennom standard "dampstripping" eller ved hjelp av filmoljeteknologi.

c. Behandling av en sådan oljefase med antioksidanter som er kjent for fagmannen innen yrket f.eks. 6-etoksy-1,2-dihydro-2,4,4-trimetylkinolin (Ethoxyquin, Monsanto) i en konsentrasjon av mellom 300 til 600 deler per million eller vitamin E i ca. 1%.

d. Underkastelse av den røde pigmenterte oljen som har blitt frembrakt på denne måten til en degummieringsprosess gjennom tilsats av 1% vann til oljen og deretter la denne få hydrere under 30 minutter og deretter sentrifugering ved 8000 rpm ved en temperatur av 150°F. Denne oljen kalles RED OIL.

e. Utvinning av det konsentrerte pigmentet på følgende måte: Den degummierte oljen forbehandles først med 0,5% kiselsyregele (Trysil 600, Grace Co.) opphetes til 180°F og filtreres ut ved anvendelse av 6 mikron filterpapir. Utvinningen av fargen skjer gjennom en tilsetning av 5% blekningsmiddel av aktivert leire (Englehard 105) til den forbehandlede oljen og oljen opphetes deretter til 220°F for under 20 minutter ved et vakuum av 28 tommer Hg. Den resulterende oljen har en lys gul farge og det meste av pigmentet er absorbert på den blekende leiren. Denne oljen kalles GOLD OIL. Den resulterende leiren ekstraheres med aceton 1:2 (w:w) leire til løsningsmiddelforhold og vaskes to ganger. Den resulterende løsningen befries deretter for løsningsmiddel i en evaporator (Rotovap) ved 90°C og 29 tommer Hg vakuum.

f. Bestemmelse av karotenoidinnholdet av ekstrahert konsentrat gjennom standard HPLC metoder som er kjent for fagmannen innen området. Konsentrert pigment ekstrahert gjennom denne oppfinnelsen er lempelig for inklusjon i vanndieter og inneholder deler per million av karotenoider kantaksantin i en konsentrasjon mellom 2000 og 5000 avhengig av karotenoidinnholdet i det originale materialet.

g. Stabilisering av den avpigmenterte lipiden fra karotenoidekstraksjonsprosedyren (GOLD OIL) gjennom tilsats av vitamin E eller en annen passende antioksydant som er kjent i området i en konsentrasjon av mellom 1 og 5 vekt%.

h. Innkapsling av den avpigmenterte lipidfraksjonen (GOLD OIL) eller den pigmenterte oljen (RED OIL) som man fikk fra den karotenoidbærende oljeekstraksjonsprosedyren av sjøpølsetarmmasse i "soft-gel" kapsler av 500 til 1000 mg eller innpakning i passende containere for oral eller topisk administrasjon til pattedyr. De topiske administreringsproduktene kan fåes med en kombinasjon av bløtgjørende midler kombinert med den ikke pigmenterte lipidfraksjonen avhengig av den ønskede effekten i et spesielt eller generelt tilfelle.

i. Innkorporering av den pigmenterte lipidfraksjonen avhengig av deler per million av karotenoid i vanndieter i en prosentsats av slik føde som er tilstrekkelig for å gi en karotenoiddeponering i kjøttet eller huden.

Ytterligere metoder for fremstilling av anvendelige fraksjoner

Det er dessuten et formål med den foreliggende oppfinnelsen å frembringe en komposisjon som omfatter en lipidfraksjon fra sjøpølsetarmer som er vesentlig fri for karotenoider. Den er relativt luktfri; inneholder signifikante mengder av omega-3 fettsyrer, EPA (eikosapentanoinsyre) og inneholder vitamin E.

Gasskromatografi/massespektrometri ble utført på den avpigmenterte lipidfraksjonen. Gasskromatografidata vises på fig. 5. Fig. 5 er spekteret av den avpigmenterte lipidfraksjonen etter ekstraksjon av karotenoider ved hjelp av aktivert leire og ble utført med en Hewlett-Packard modell 5890 gasskromatograf og en 5971 Mass Selective Detector (Mass Spectrometer). Kolonnen som ble brukt i analysen var en HP Ultra-1 Capillary GC kolonne med en lengde på 25 mm. Den avpigmenterte lipidfraksjonen ble først forsåpet til frie fettsyrer under anvendelse av natriummetoksid som er standard for lipidanalyser og deretter surgjort og siden omvandlet til metylestere. Deretter ble syntetiske metylestere som ble fremstilt på denne måten jamført med standardprofiler av fettsyrer fra kjente referansebibliotek. Tabell 1 sammenligner prosentinnholdet av match av fettsyrene fra sjøpølse avpigmenterte lipidfraksjoner med kjente fettsyreprofiler.

Tabell 1

Topp Forbindelse fra bibliotek	%Match
A tetradekanoinisyremetylester	97
B 2-naftol, 8-amino	64
C pentanamid	49
D pentadekanoinisyre, metylester	91
E pentadekanoinisyre, metylester	98
F heksadekanoinisyre, metylester	43
G pentadekanoinisyre, 4-metyl-, metylester	64
H heksadekanoinisyre, metylester	41
I heksadekanoinisyre, metylester	87
J 7-heksadekanoinisyre, metylester	99
K 9-heksadekanoinisyre, metylester	98

L	pentadekanoinsyre, 14-metyl-, metylester	93
M	heksadekanoinsyre, 14-metyl-, metylester	93
N	heksadekanoinsyre, 15-metyl-, metylester	78
O	1,2,8-dodekatrien (E,E,E)-	94
P	10, 13-oktadekadienoinsyre, metylester	98
Q	9-oktadekanoinsyre (Z)-, metylester	99
R	7-oktadekanoinsyre, metylester	99
S	oktadekanoinsyre, metylester	98
T	metyleikosa-5,8,11,14,17-pentaenoat	80
U	7-heksadekanoinsyre, metylester (Z)	91

Det er et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen å fremstille en komposisjon omfattende sjøpølsetarmmaterialet som har blitt avlipidisert gjennom de metoder som beskrives her. Dette materialet er unikt på det viset at det er vesentlig fritt for lukt, har høyt proteininnhold og er lett å fremstille til anvendelig pulver. De to eksemplene som umiddelbart følger er illustrative for typiske kjøringer valgt fra et antall kjøringer som har blitt utført under anvendelse av forskjellige teknikker og løsningsmidler. Kroppsveggsvev inneholder mindre lipid enn tarmmassene og ekstraheres ved hjelp av samme metode som var blitt beskrevet for tarmmaterialer av sjøpølse. Innholdet av lipidfraksjonen i kroppsveggsvevet er mye mindre enn i tarmmaterialet eller ca. 1 til 2% av den totale vekten av kroppsveggsvev.

Den pigmenterte lipidfraksjonen av sjøpølse som kalles RED GREASE inkorporeres i vanndieter i et prosentinnhold i slik føde (avhengig av deler per million av karotenoider) som er tilstrekkelig for å frembringe karotenoiddeponering i kjøtt eller på hud. Det er et formål med den foreliggende oppfinnelse å skape en komposisjon som omfatter en karotenoidlipidfraksjon som kan fås fra sjøpølsetarmer eller kroppsvev som inneholder varierende prosenthalter og deler per million avhengig av miljøfaktorer av astaksantin og kantaksantin. En av karotenoidlipidfraksjonene som kalles RED GREASE ble bestemt å inneholde 4.706,52 deler per million av kantaksantin ved hjelp av spektrometeranalyse. Absorpsjonsspekteret vedlegges her som fig. 6. Fig. 6 viser et absorpsjonsspektrum som ble gjort i en Beckman DU-800 kromatograf av den acetonekstraherte karotenoidlipidfraksjonen av ferskt

sjøpølsetarmmateriale med et kalkulert ppm karenoidinnhold av 4.706,52. 23 mg av acetonekstrahert karotenoidlipidfraksjon ble fortynnet med 10 ml petroleumeter med karotenoidmaterialet som hadde en ekstingsjonskoeffisient av $E=2.400$ og ble lest ved 467 nm for kantaksantin.

Ferskt sjøpølsemateriale samt kroppsvev kan være en kilde for lipidforbindelser og kan ekstraheres med varm spiselig olje ifølge metoden av Meyers og Chen (1982). Patentet nr. 4 505 963 (som inkorporeres her som referanse) også av Meyers og Chen beskriver en industriell metode hvorved karotenoidpigment fra kreps ekstraheres fra avfall fra prosessen med anvendelse av varm olje. Selv om anvendbarheten av denne industrielle metode er forskjellig fra en varm olje metode som er mulig med anvendelse av fersk sjøpølsetarm som primær materialkilde er prosessen hovedsakelig den samme ettersom begge prosesser bygger på migrasjon av karotenoidbærende lipider inn i den varme spiselige oljen. Ferskt tarmmateriale av *Cucumaria frondosa* (1 kg) ble plassert i en beholder med 5 kg soyabønneolje og oppvarmet til 170°F og fikk stå under 20 minutter. Vevet ble fjernet gjennom filtrering gjennom en rustfri stålsikt med dimensjonen 200 mesh og et "vanlig kaffefilter" papir og overskuddsolje ble lett presset tilbake inn i kokebeholderen. Deretter ble 1 kg tarmmateriale plassert i beholderen og prosedyren ble gjentatt med nye satser av tarmmateriale. Etter 5 nye satser av tarmmateriale som ble behandlet på denne måten hadde oljen i kokebeholderen blitt mørk rød fra migrasjonen av tarmlipider til oljeblandingen. I et eksempel av denne prosedyren ble startvolumer av 5 kg av soyabønneolje behandlet i hvilke 5 kg av vått tarmmateriale deretter hadde blitt holdt igjen og siden fjernet etter ca. 20 minutter. Total karotenoidprosentinnhold i en på denne måten behandlet måte prøve av den gjenværende oljen ble bestemt til å være 540 deler per million gjennom standardmetoder.

Produksjon av avlipidisert proteinrikt hydrolysat

300 g av tarmvevmateriale fra sjøpølse ble fremskaffet slik som har blitt beskrevet her, tørket og avlipidisert gjennom heksanekstraksjon som er kjent for fagmannen på soyabønneoljeområdet. Det resulterende sjøpølsemelet ble befridd fra løsningsmiddel gjennom varme og luftstrømning og det resulterende melet ble oppsamlet. Melet ble ytterligere brakt i løsning med 1 liter av destillert vann. Ph ble høynet til 12 gjennom anvendelse av konsentrert natriumhydroksyd og denne løsningen ble omrørt under 30 minutter. Ved slutten av de 30 minuttene ble pH justert ned til pH 8,5 med anvendelse av HCl. Så snart dette pH hadde blitt oppnådd ble løsningen oppvarmet til 80°C under ett minutt. Denne løsningen fikk kjøles til 25°C og deretter sentrifugert ved 10.000 rpm under 20 minutter og de faste emnene ble kastet som avfall og væsken ble justert til et pH av 3,0. Proteinene ble utfelt av løsningen og fjernet fra løsningen gjennom sentrifugering og dekantering. Proteinene ble deretter løst i en minimal mengde vann og pH ble justert til 7,2 og deretter ble løsningen tørket under anvendelse av en frysetørker. Det viste seg at det flytende hydrolysatet er passende for konvensjonell spraytørkning som er kjent på området. Ekstraksjonseffektene av disse preliminare eksperiment indikerte en 73% effektivitet fra startmaterialet. Den protokoll som har blitt beskrevet ovenfor viste seg å være passende for produksjon av store mengder i større beholdere med maskineri som er vanlig for næringsvitenskapen og proteinhydrolysatindustrien. Det tørkede hydrolysatet som ble oppnådd på denne måten ble bestemt å være vannløselig og aminosyreprofilen hos dette materialet er følgende:

Tryptofan	0,82%
Aspartinsyre	8,14
Treonin	3,01
Serin	2,62
Glutaminsyre	8,67
Prolin	2,67
Gysin	4,21
Alanin	4,39
Systein	0,21

Valin	4,31
Metioinin	1,00
Isoleucin	4,03
Leucin	3,38
Fenylalanin	4,39
Lysin	5,31
Histidin	1,88
Arginin	5,93

Sjøpølsehydrolysatet som har blitt beskrevet ovenfor er i en passende form for inklusjon som et protein eller forfordøyd aminosyreforbindelse i flytende drinker, innkapslede næringssupplement, salatdressings, gravies, melksubstituent for barn, proteinhinder, kosmetikk, softdrinks, pasta, brød og enterale matoppskrifter for personer for hvilke protein er skadelig næring og bidrar til deres næringstilstand. Det er ikke nødvendig å inkludere her de variasjoner i hvilke slike tørkede eller flytende aminosyrerike pulver kan inkorporeres og i hvilke prosentinnhold til mat, ettersom disse typer av formuleringer er kjente fullt og helt for de som er fagmenn på næringsområdet.

Metoder for bruk av sjøpølsefraksjoner

Eksempel på pigmentert lipidinklusion i vanndietter

A) Ett hundre pund av ferskt sjøpølsetarmmateriale ble blandet med ca. 55 gallons av aceton og rystet ved romtemperatur under 3 timer i en 300 gallon stor stengt beholder. Acetonet ble drenert fra blandingen inn i en beholder og friskt aceton ble vasket over tarmmaterialet til lite pigmentfarge kunne oppdages. Acetonet ble pumpet gjennom en filmevaporator (Pope Still) og det vannet som var inkludert i acetonblandingen og acetonet ble separert fra den pigmenterte lipidfraksjonen og brukt igjen. Acetonet ble ivaretatt og vannfasen ble kastet.

Den resulterende lipidfraksjonen (0,63 pund) hadde en konsistens som tykt smøremiddel og 4.700 deler per million av karotenoiden kantaksantin. Antioksydanten 6-etoksy-1,2-dihydro-2,2,4-trimetylkinolin (Ethoxyquin, Monsanto) ble tilsatt til lipidfasen og blandet til 1 vekt%.

Den tunge lipidfraksjonen inneholdende karotenoid-materialet (RED GREASE) ble funnet å inneholde 4.700 deler per million av kantaksantin ved hjelp av HPLC analyse og ble inkorporert i standardornamental fiskemat som hadde hatt det kommersielle karotenoidmaterialet ekskludert under fremstillingen. Fiskeføden ble formulert av fabrikanten slik at det til slutt inneholdt 80 deler per million av antaksantin fra sjøpølse. Clownfish ble matet med en eksperimentdiett av denne føde under to måneder og ble undersøkt av et panel av fem personer som ga et gjennomsnittlig tall av 8,5 (på en skala fra 1 til 10, med "10" som er en meget akseptabel fargedeposering) og bedømte at det hadde skjedd en akseptabel fargedeposering til huden.

(B) Sjøpølser (1.000) av arten *Cucumaria frandosa* ble maget for hånd og tarmmaterialet (352 pund) ble tørket med lav temperatur ved 70°F under 4 dager i en sjømatstørker (Southwind, Nova Scotia). Før tørkingen ble propionsyre tilsatt til det friske, våte tarmmaterialet av sjøpølse i en mengde av 7,2 vekt%. Det resulterende tørkede materialet (105 pund) inneholdt 10% fuktighet og 41% lipider. Det tørre tarmmaterialet ble deretter underkastet heksanekstraksjon av lipidfraksjonen ifølge industristandard i en 200 gallons stengt beholder, i hovedsak som en prosess som ble anvendt i soyabønneoljeindustrien, og en rød lipidfraksjon (42 pund) (heretter kalt (RED OIL) inneholdende 924,5 deler per million karotenoid bestemt som kantaksantin med 8,8% eikosapentanoinsfettsyre ble fremstilt. Denne lipidfraksjonen inneholdt også 35 IU d- α -tokoferol per 100 gram. Den røde lipidfraksjonen (RED OIL) ble deretter degummiert ved hjelp av en tilsats av 1% vann til oljen og den fikk hydrere under 30 minutter hvorefter den ble sentrifugert ved 8.000 rpm ved en temperatur av 150°F. Det degummierte materialet omfattes også av frasen RED OIL.

Den degummierte oljen (tarmlipidfraksjon av sjøpølse) ble først forbehandlet med 0,5% kiselsyregele, opphetet til 180°F og deretter filtrert med anvendelse av et 6 mikron filterpapir. Oppsamlingen av fargen skjedde gjennom tilsats av 5% blekningsleire til den forhandlede oljen. Oljen ble opphetet til 220°F under 20 minutter ved 28 tommer Hg vakuum.

Den resulterende oljen (34 pund) var svakt gul og det meste av pigmentet hadde blitt absorbert på den blekende leiren. Denne fraksjonen kalles GOLD OIL. Den resulterende leiren ble deretter ekstrahert med aceton 1:2 (w:w) leire til løsningsmiddelsforhold og vasket to ganger. Den resulterende løsning ble siden befridd fra løsningsmiddel i en Luwa evaporator ved 90°C og et vakuum av 29 tommer Hg og 8 pund av et rødt lipidfraksjonskonsentrat ble erholdt.

Prosessen resulterte i tre materialer: en gul/gylden olje (GOLD OIL); en konsentrert rød karotenoidbærende lipidfraksjon; og et tørt proteinpulver uten lipider. Den gule lipidfraksjonen (GOLD OIL) ble inkorporert i en topisk kosmetisk og en oral "nutraceutical" marin "Omega 3 lipid" test for eksperimentell anvendelse. Den røde konsentrerte lipidfraksjonen ble inkorporert i en ornamental fiskediett under 1 måned for å bestemme effektiviteten av den karotenoidbærende lipiden for å frembringe passende farge til sådan fisk.

Angiogenese inhibiering i kyllingembryo med RED OIL

1 µg av RED OIL ble plassert på hver og en av 6-metylcelluloseskiver med en diameter av en ¼ tomme med en mikropipette og fikk tørke. Skivene ble plassert på seks 10-dagers gamle kyllingembryo korioallantoiske membraner og hydrokortison/heparinimpregnerte skiver ble også plassert på kontrollmembraner av seks andre egg som har blitt beskrevet av Knighton et al. (1977). De RED OIL behandlede membranene viste i det nærmeste fullstendig inhibiering av vaskulær tilvekst og de var mer effektive for inhibiering av neovaskularisering enn den "positive kontrollen" der heparin og hydrokortison ble brukt. Dette forsøk er et in vivo forsøk og er tenkt å være indikativt for klinisk anvendelse av forbindelser som skal hindre tumortilvekst gjennom inhibisjon av tumorers blodtilførsel (Knighton et al., 1977).

Adjuvantindusert artrittforsøk på rotter med RED OIL

RED OIL fremstilt fra *Cucumaria frondosa* sjøpølsetarmer og kroppsveggvev gjennom heksanekstraksjon fra tørket materiale slik som har blitt beskrevet ovenfor og hydrokortison og fenylbutason ble anvendt i en adjuvant artrittmodell hos rotter for å studere deres antiinflammatoriske virkning (Winter og Nuss, 1966; Glenn, 1966; Langford et al., 1972).

Den utviklede adjuvantartrittmodellen som anvendte rotter har vist seg være anvendbar for screening av forbindelser som kan være anvendbare for behandling av reumatoid artritt hos menneske. Den adjuvantinduserte artritten svarer på både steroider og ikke-steroider. Graden av inflammasjon kan bestemmes med enten oppmåling av økningen i potvekt og/eller potvolum.

Metoder

Rotter som veide mellom 160 til 180 gram ble innkjøpt fra B&K Universal Inc., Kent, WA 98032. De var hannrotter: Sprague-Dawley. Dyrene ble holdt individuelt i bur av rustfritt stål og hadde fri tilgang til vann og mat. Lyssyklusen ble holdt ved 12 timers lys og 12 timers mørke. Temperaturen ble holdt ved 22±3°C og den relative fuktigheten ble holdt ved 40 til 70%. Maten var Harlan Teklan Rodent Diet.

Testartikler

Testmaterialene ble suspendert i avionisert vann i de doser som indikeres nedenfor. Alle volumer var 2 ml.

Test materiale	Lot#	Dose mg/kg kroppsvekt
Avionisert vann	12/4/98	2 ml
Hydrokortison	Spectrum, Lot# HH325	10
Fenylbutazon	Sigma, Lot# 15H0063	10
RED OIL	Coastside Research	10

Eksperimentell design

Hannrotter av arten Sprague-Dawley (160-180g) ble gjort følsomme gjennom injisering av Freund's Complete Adjuvant (0,5% suspensjon av drepte mykobakteriumtuberkulosis (H37RA, Difco i mineralolje)). 0,05 ml ble administrert intradermalt på et plantart sete på det høyre bakbenet av hver rotte.

Testmateriale ble gitt oralt og (ved tvang) i 0,5% metylcellulose og gitt en gang per døgn under 7 døgn. Administreringen startet dagen etter sensiteringen.

Potevektene for hver gruppe i hver test ble beregnet gjennomsnittelig. Aktiviteten ble kalkulert som følger:

$$((\text{Gjennomsnittelig potevekt hos kontrollmus} - \text{gjennomsnittelig kontrollvekt hos testgruppen}) / \text{Gjennomsnittelig potevekt hos testgruppen}) \times 100 = \% \text{ antiinflammatorisk svar.}$$

Resultat og diskusjon

Det antiinflammatoriske svarets resultat vises i tabellen 2. Det antiinflammatoriske svaret er differansen i den gjennomsnittelige potevekten av rottepote behandlet med Freund's adjuvant sammenlignet med ikke behandlet pote. I dette studium ga hydrokortisonkontrollen et antiinflammatorisk svar av 59,9% og fenylbutazon ga et svar av 155,3%. Disse to forbindelsene er den positive kontrollen. RED OIL ga et antiinflammatorisk svar av 158,6% i dette forsøket.

Tabell 2

% Antiinflammatorisk svar basert på gjennomsnittelig potevolumminskning

Gruppe	Antall rotter	Behandling	Gjennomsnittelig potevekt, g.	% Anti-inflammatorisk svar
I	6	Kontroll, vann	0,97	0
II	6	Hydrokortison, 10 mg/kg	0,61	59,0
III	6	Fenylbutazon, 10 mg/kg	0,38	155,3
IV	6	RED OIL, 10 mg/kg	0,375	158,6

GOLD OIL ble deretter prøvet for å bestemme den inflammatoriske inhibisjonsaktiviteten av oljen i musøreødem.

Musøreødemmodell

Krotonolje som inneholder en variasjon av forbolestere og arakidonsyre (AA) er standard induserere for inflammasjon i musører når de appliseres topisk. Multiple topiske applikasjoner av arakidonsyre på musører induserer inflammatoriske og proliferative forandringer (Doherty et al., 1988). Forbol estere, spesielt forbolmyristylacetat (PMA) aktiverer en eller flere isozymer av den ubikuitøse membranreseptoren, proteinkinas C (PKC), som i sin tur initierer flere metaboliske kaskader som leder til inflammasjon (Castagnia et al., 1982). AA er et substrat for en av disse kaskader som leder til prostaglandin og leukotrienproduksjon hvilke begge er inflammatoriske. Inhibisering av en slik inflammasjon gjennom et putativt bioaktivt middel anses være en generalisert indikator av potensiell farmakologisk aktivitet.

Weanling, hannmus av sorten Balb/C ble innkjøpt fra B&K Universal, Kent, WA og ble holdt i laboratoriet under et døgn før de ble underkastet eksperimentet. Ved $t=0$ ble den ventrale siden av begge ørene på hver mus påført topisk 10 μ l av 10% krotonolje i aceton ($n=12$ ører) eller 5% GOLD OIL løst i aceton ($n=8$ ører). Dyrene ble ofret gjennom servikal dislokasjon ved tiden $t=24$ timer, ørene ble fjernet og en biopsi tatt fra hvert øre med en 8 mm stans. Biopsien ble veid umiddelbart på en balansevekt. Resultatene vises på fig. 7. GOLD OIL ga en 52% minskning ($p<0,05$, Wilcoxin Rank Sum test) ved svelning sammenlignet med acetonbehandlede ører og 50% sammenlignet med ubehandlede ører.

RED OIL ble prøvet for å bestemme den inflammatoriske inhibisjonsaktiviteten av oljen i krotonolje initiert musøreødem som beskrives i eksempelet ovenfor. Med de samme dosene topisk ga RED OIL en 85% inhibisjon for svelning sammenlignet med bare acetonbehandlede ører. Resultatene vises på fig. 8.

5-lipoksygenaseprøve

5-lipoksygenase (5-LO) er et nøkkelenzym i metabolismen av arakidonsyre (AA) til leukotrien B_4 (LTB_4) og hydroksyeikosatetranoinnsyre (5-HETE) i en stor variasjon av celler inkluderende polymorfonukleær (PMN) leukocytter (Henderson,

1994) og har nylig blitt lenket til prostata- og andre cancersorter (Ghosh og Myers, 1997). LTB_4 er en kemotaksisk signalsubstans som er involvert i migrasjonen av PMN fra blodstrømmen til steder for vevskader som er et merke for inflammatorisk svar. Menneskelig PMN isolert ved hjelp av standard prosedyrer fra en normal frivillig person ble forvarmet til 37°C og ved tiden $t=0$ ble 10 μl av testforbindelsene suspendert i metanol gjennom sonikering eller bare metanol ble tilsatt til 1 ml av PMN suspensjonen. Ved tiden $t=10$ minutter ble 5 ml av 2mM AA tilsatt til hver suspensjon som 5-LO substrat. Ved tiden $t=14$ minutter ble kalsiumionofor A23187 (5 ml, 1 mM) tilsatt for aktivering av enzymet. Reaksjonen ble avsluttet ved tiden $t=19$ minutter gjennom 100 μl av 100 mM sitronsyre og pH ble holdt på 3,0. Prostaglandin B_2 og 15-HETE ble tilsatt som interne standarder for høytrykks flytende kromatografi (HPLC) kvantifisering av LTB_4 og 5-HETE, respektive. Metabolitter og standarder ble ekstrahert fra suspensjonen med kloroform/metanol (7:3). Kloroformfasen ble avdunstet og innført i den mobile fasen av HPLC utdrivningen. Metabolitter ble detektert ved hjelp av ultrafiolett lys og kvantifisert mot standardkurver.

En statistisk signifikant og GOLD OIL doseavhengig reduksjon i PMN produksjonen av LTB_4 , to av dens isomerer og 5-HETE er tydelig i de data som presenteres i fig. 2. At disse resultatene skyldes andre faktorer enn cellulær toksisitet antydes gjennom observasjonen at eksponering av celler til 1:100 og 1:1000 GOLD OIL fortynninger under 10 minutter produserte 85% respektive 94% celleoverlevelse. Overlevelsen ble bestemt ved hjelp av trypanblå eksklusjonsmetoden som er vel kjent innen yrket.

HPLC fraksjoner av RED OIL

RED OIL ble fraksjonert ved hjelp av analytisk høytrykksvæskeskromatografi i 18 separate fraksjoner i E. Merck Si 60 kolonne, 5 μm , 250 x 4,6 mm med en lineær gradient under 30 minutter fra 100% heksan til 30% isopropanol. Strømmen var 2,0 ml per minutt. Ingen fraksjoner ble oppsamlet under de første 2 minuttene. Fraksjoner ble oppsamlet med 2 minutters intervaller deretter. Alle fraksjoner som var

sekvestrert ble underkastet en prøve for å detektere den inhibitoriske aktiviteten i 5-lipoksygenasebanen hos menneskeneutrofiler slik som har blitt beskrevet i tidligere seksjoner. Det viste seg at fraksjonene 7 og 8 som skulle ha topper mellom 14 og 18 minutter var aktive for inhibiering av leukotrien B₄, 6-trans-leukotrien B₄ og 6-trans-12-epi-leukotrien B₄ og 5-HETE (5(S)-hydrokso-(E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-eikosatetraenoinsyre).

12-HETE prøver

RED OIL og GOLD OIL ble prøvet gjennom en metode som var lik prøven for 5-lipoksygenase med anvendelse av menneskepletter. Polymorfonukleære leukocytter ble blandet tilsatt A23187 og 12-HETE produksjonen ble målt med høytrykksvæskerkromatografi (HPLC). Tilsats av en 1:10.000 fortynning av RED OIL til reaksjonen ga 12-HETE nivåer som var 65% av de hos metanolkontrollene, mens A 1:1000 fortynning av GOLD OIL ga nivåer som var 46% av kontrollene.

Mastcelledegranulering

Weanling hannmus Balb/c ble behandlet med GOLD OIL løst i heksan ved 24 timer, 12 timer og 5 minutter før behandlingen samt 5 minutter og 20 minutter etter behandlingen. Ørene ble behandlet med 20 µl av 10% krotonolje i aceton applisert på begge sidene av ytterøret. 8 millimeter utstansede biopsier ble tatt fra hvert øre 6 timer etter behandlingen, veid og preservert i formalin for histologisk analyse. Tre 5 mikronskiver ble fjernet med 1/3 intervall gjennom parafinomgitt biopsi og merket med toluidinblått som er spesifikk for histamininnholdende granuler. Den midtre seksjonen samt de som viste degranulering ble talt. Resultatene vises i tabell 3.

Tabell 3Degranulering av musøremastceller fra topisk behandling med
krotonolje

<u>Behandling</u>	% Degranulert
Bærer (heksan)	72,4 (2,2)
10% GOLD OIL	20,4 (3,5)
10% Parafinolje	66,4 (3,0)

Ørene ble behandlet profylaktisk under 24 timer pluss to etter behandlingene som beskrevet. Data angis som gjennomsnittelige (+/- standard feil i forhold til de gjennomsnittelige; n=4 ører) prosent av mastceller degranulert.

Lymfocyttoproliferasjonsprøve

Effekten av GOLD OIL og RED OIL på lymfocyttoproliferasjon ble bestemt gjennom den tritsierte (³H)-tymidinopptaksprøven. Perifert blod ble fremskaffet gjennom venpunktering enten fra menneskelige frivillige eller fra sau og de perifere blodmononukleære cellene (PBMNC) ble separert fra røde blodceller og granulocytter gjennom Ficoll densitetsgradientsentrifugering. Etter sentrifugeringen ble PBMNC sugd ut, vasket i PMS og resuspendert i mediet (RPMI inneholdende 10% fetal calf serum (FCS) og 2 mM glutamin). PBMNC ble justert til en densitet av 2×10^6 /ml og 100 µl alikvoter (2×10^5 celler) ble pipettert i fordypninger i en rund bunnplate med 96 fordypninger. Hver eksperimentgruppe bestod av replikat av 5 fordypninger. Cellene ble inkubert under 24 timer i nærvær av enten GOLD OIL eller RED OIL i en rad av fortyntninger. Fortyntningene av oljene ble gjort som følger: En micell suspensjon av oljene ble gjort i absolutt metanol til en konsentrasjon av 5 vekt%. Denne 5%-ige løsningen av olje ble ytterligere fortynnet i RPMI medium inneholdende 10% FCS hvilket ga en rad fortyntninger (0,0062, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 vekt%). Hvert fortyntningstrinn ble kraftig blandet for å holde oljen i suspensjon.

I kontrollfordypninger ble celler dyrket uten noen olje. Etter 24 timers inkubasjon ble 1 µCurie av ³H-tymidin tilsatt

til hver fordypning inneholdende lymfocytterne og ble innkubert under ytterligere 18 timer for å tillate inkorporasjon av ^3H -tymidin i den replikerende DNA av lymfocytterne. Celler ble høstet fra de 96-fordypningsplatene på glassfiberfiltere som fanger radioaktivt merket DNA. Filter som inneholder de høstede cellene ble deretter talt på ^3H under anvendelse av en skintillasjonsteller som er standard prosedyrer innen yrket.

Dessuten tilsattes mitogen Concanavalin A (Con A) til lymfocytter i en konsentrasjon av 10 $\mu\text{g/ml}$. Effekten av oljene på den mitogene stimuleringen ble vurdert gjennom koinkubasjon av oljene med Con A. Concanavalin A er en lektin som kommer fra *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) som har affinitet for alfa-D-mannosyl og alfa-D-glukosyl rester. Con A viser mitogen aktivitet som er beroende av evnen hos molekylet til å forme aggregat og krever kalsium- og/eller manganioner.

Resultat og diskusjon

Den ubehandlede PBMNC tilberedningen viste lav baselinjeinkorporasjon av ^3H -tymidin. Når PBMNC imidlertid ble stimulert med Con A demonstrerte disse celler øket proliferasjon hvilket ble indikert av det økte ^3H -tymidinopptaket sammenlignet med deres baselinjeverdier. Dessuten når enten GOLD OIL eller RED OIL ble koinkubert med Con A, ble en doseresponsinhibiering av proliferasjon observert, hvilket indikertes gjennom en reduksjon i ^3H -tymidin inkorporasjonen av PBMNC. Con A stimulert menneskelig PBMNC proliferasjon ble inhibiert mellom 71% til 12% i et fortynningsområde mellom 0,1% til 0,025% av GOLD OIL og sau PBMNC ble inhibiert med 100% til 57% i samme fortynningsområde. Inhibieringseffektene av RED OIL viste en lignende trend til den som ble observert med GOLD OIL. RED OIL ga inhibiering av 85% ved en fortynning av 0,1% i menneskelig PBMNC og i sau PBMNC ble det en inhibiering av 95% ved 0,1% og en 56% inhibiering ved 0,05%.

Blandet lymfocytreaksjon med RED OIL

Den blandede lymfocytreaksjonen (MLR) er en in vitro prøve av lymfocytproliferasjon mediert gjennom alloreaktiviteten hos lymfocytter fra to ikke relaterte individer. Dette proliferative svar måles gjennom opptak av tritiert tymidin. Essensielt i MLR presenterer antigenpresenterende celler (APC) fra et individ allopeptider via MHC molekyler til T-cellerreseptorer på T-celler hos et andre individ. Denne reaksjon kalles signal 1. Etter signal 1 medieres kostimulering (signal 2) gjennom samvirking av celleadhesjonsmolekyler mellom T-celler og APC (f.eks. CD28-B7) hvilket leder til T-celleaktivering og proliferasjon. Derfor er MLR en in vitro representasjon av alloreaktiviteten som følger i både vert-versus implantat sykdom (benmargtransplantasjonsavstøtning) og implantat versus vertysykdom (organtransplantasjonsavstøtning). Denne prøve har ofte blitt anvendt klinisk for å forutsi alloreaktiviteten og også eksperimentelt for å sortere potensielle immunosuppressive midler. RED OIL ble sammenlignet med Cyklosporin A som for nærværende anvendes i hele verden som et immunosuppressivt middel.

Prosedyre for MLR med RED OIL

En MLR som anvender celler fra to ikke beslektede donorer kan studeres på basis av at de to cellepopulasjonene svarer samtidig mot hverandre (dvs. .wo-way MLR).

Perifert blod ble fremskaffet gjennom venepunktering fra to ikke beslektede voksne frivillige mennesker og mononukleære celler fra perifert blod (PBMNC) separertes fra røde blodceller og granulacytter med hjelp av Ficoll density gradientkonfigurasjonen. Etter sentrifugeringen ble PBMNC sugd ut, vasket i PBS og resuspendert i RPMI inneholdende 10% menneskelig AB sera og 2 mM glutamin. Tre MLR ble utført med PBMNC som kom fra 3 par av ikke beslektede individer og ble bedømt være statistisk like hverandre.

I et typisk eksperiment ble PBMNC fra to ikke beslektede individer justert til en densitet av 2×10^6 celler/ml og 50 μ l alikoter (det vil si 1×10^5 celler) fra hver og en ble blandet i fordypninger i en plate med rund bunn og 96 fordypninger. Hver eksperimentgruppe bestod av replikat av 5 fordypninger.

Cellene ble innkubert i nærvær av enten Cyklosporin A eller RED OIL i en rad fortynninger. Fortynningene ble preparert som følger: En micell suspensjon av RED OIL ble gjort i absolutt etanol til en konsentrasjon av 5 vekt%. Denne 5%-ige løsningen av olje ble ytterligere fortynnet i RPMI medium inneholdende 10% menneskelig AB sera hvilket ga en rad fortynninger (0,0062, 0,0125, 0,025, 0,05 og 0,01 vekt%). Hvert fortynningssteg ble blandet kraftig for å holde oljen i suspensjon. Cyklosporin A ble fortynnet i et vevkulturmedium hvilket ga en sluttkonsentrasjon av 100 ng/ml og 500 ng/ml.

I kontrollfordypningene (ikke behandlet) ble celler dyrket uten noen midler. Etter 96 timer av inkubasjon tilsettes 1 μ Curie av ^3H -tymidin til hver fordypning inneholdende de blandede lymfocytterne og innkubertes under 18 timer for å muliggjøre inkorporasjon av ^3H -tymidin i den repliserende DNA av lymfocytterne. Celler ble høstet fra platene ved 96 fordypninger på glassfiberfilter som fanger opp radioaktivt merket DNA. Filteret som inneholdt de innhøstede cellene ble deretter talt på ^3H under anvendelse av en skintillation teller.

Resultat av MLR med RED OIL

Den ubehandlede MLR preparasjonen viste høy baselinje-inkorporasjon av ^3H -tymidin som er indikativt for alloreaktiviteten mellom de to ikke beslektede lymfocyttopulasjonene.

I nærvær av Cyklosporin A i konsentrasjonene av både 100 nanogram per ml og 500 nanogram per ml minsket proliferasjonen som ble indikert gjennom minsket ^3H -tymidin opptak. Inhibisjonen ble uttrykt som et prosenttall av den ubehandlede MLR. Cyklosporin A inhibiering av MLR var fra 37 til 75% ved 100 ng/ml og 81 til 90% ved 500 ng/ml. Dette stemmer overens med de kjente immunosuppressive egenskapene av Cyklosporin A. Cyklosporin A samvirker med immunofiliner og forhindrer den nukleære translokasjonen av transkripsjonsfaktoren NF-AT som er viktig for translokasjonen av interleukin-2 (IL-2, en T celle tilvekstfaktor).

RED OIL viste også en doseavhengig inhibiering av MLR slik som det ble indikert gjennom reduksjon i ^3H -tymidin inkorporasjonen. Ved en fortynning av 0,025% ble inhibisjonen

av MLR i området 40 til 52% i de tre forsøkene som ble utført og ved en fortynning av 0,05% ble inhibisjonen fra 82 til 98%. Celleviabilitet ble bestemt gjennom trypan blå eksklusjon som er kjent innen området og viste at fortynningsområdet mellom 0,025% og 0,05% hadde celleviabilitet mellom 70 til 99% og indikerer en potensiell mangel av toksisitet av RED OIL i disse fortynningene. Fortynninger av RED OIL ved 0,1% viste minsket celleviabilitet.

Forbindelser som oppviser immunosuppresjon slik som det har vist seg i disse prøver har vist at de har anvendbare terapeutiske egenskaper. Derfor er det et formål med den foreliggende oppfinnelsen at RED OIL og GOLD OIL kan bli inkorporert i farmasøytiske forbindelser med immunomodulære aktiviteter. Immunomodulatorforbindelsene kan være immunostimulanter for å bygge opp immuniteter og immuniteter til eller initiere helbredelse fra visse sykdommer eller forstyrrelser. Omvendt kan immunomodulatoren være immunoinhibitorer eller immunosuppresorer for forhindring av ikke ønskelig immunoreaksjon i kroppen mot fremmede materialer eller for å forhindre eller forbedre autoimmune reaksjoner eller sykdommer.

Immunomodulatorer har vist seg være anvendbare for behandling av systemiske autoimmune sykdommer slik som lupus erytamosus og diabetes samt immunbristsykdommer. Immunomodulatorer kan dessuten være anvendbare for immunoterapi av cancer eller for å forhindre utstøtning av fremmede organer eller vev i transplantasjoner, f.eks. nyre, lunge, hjerte eller benmarg (Grover et al., 1997).

Forskjellige immunomodulatorforbindelser har blitt vist inkluderende FK506, muramylsyredipeptidderivat, levamisol, niridasol, oksysuran, flagyl og andre fra gruppen interferoner, interleukiner, leukotriener, kortikosteroider og syklosporiner. Mange av disse forbindelsene har imidlertid vist seg ha ikke ønskelige bieffekter og/eller høy toksisitet. Nye immunomodulatorforbindelser er derfor nødvendige for å gi et større område av immunomodulatorfunksjon for spesifikke områder med et minimum av ikke ønskelige bieffekter (Ishida et al., 1997).

Immunomodulasjon er således av største betydning for mennesker og betydelig forskning har blitt gjort på immunomodulatorområdet. Ytterligere metoder og komposisjoner behøves.

Den foreliggende oppfinnelse har som et mål å anvende oljen av sjøpølse som et kildemateriale og supplementert gjennom syntetiske produksjonsmetoder om de blir tilgjengelige. Den foreliggende oppfinnelse øker arsenalet av immunomodulatorforbindelser gjennom oppdagelsen av nye anvendelige immunomodulatorer inkluderende forbindelser som kan isoleres fra ekstrakter av sjøpølser av hvilket som helst slag.

Et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen angår derfor immunosuppresiv anvendelse av RED OIL og GOLD OIL isolert fra sjøpølsevev og forskjellige derivater og analoger av disse forbindelser. Disse forbindelser kan brukes for å redusere, undertrykke, inhibiere eller forhindre ikke ønskverdige immunsvar. Denne immunosuppresjon kan med fordel oppnås uten cytotoksisitet. Disse forbindelsene er derfor anvendelige for behandling av mennesker eller dyr som behøver immunosuppresjon. Eksempel på slike situasjoner inkluderer, men er ikke begrenset til behandling eller forhindring av autoimmune sykdommer f.eks. diabetes, lupus og reumatoid artritt. Immunosuppresjon behøves også ofte i samband med organtransplantasjoner. Immunosuppressive midler kan også brukes når et menneske eller dyr har blitt eller kan bli eksponert for superantigener eller andre faktorer som man vet forårsaker overstimulering av immunsystemet. Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også brukes som standarder for å bestemme aktiviteten av andre putative immunosuppressive midler. Den foreliggende oppfinnelse angår dessuten farmasøytiske komposisjoner inneholdende disse forbindelser.

Den tenkte anvendelsen er for immunreaksjoner (in vivo/in vitro) å få modulasjon via T-celleaktivitet. Et aspekt med den foreliggende oppfinnelse angår in vivo suppresjon hos mennesker av T-cellesvar, f.eks. transplantasjon og autoimmunitet. Ettersom syklosporin for nærværende brukes på det medisinske området for suppresjon av psoriasis

er det et formål med den foreliggende oppfinnelsen å inkorporere RED OIL eller GOLD OIL i salvene og topiske applikasjoner som har blitt beskrevet her for modulering av immunsvaret fra huden hos psoriasispasienter. De fordelaktige svarene som erholdes gjennom denne oppfinnelsen med psoriasispasienter slik som det har blitt beskrevet i andre kapitler av denne oppfinnelsen kan bli resultatet av lokalisert dermal immunosuppresjon av T-celler og/eller B-celler hos pasienten.

Den dose som administreres vil være avhengig av det immunomodulatorsvaret som ønskes; den type av vert som er involvert; hans eller hennes alder, helse, vekt, slag av samtidig behandling om noen; hyppighet av behandling, terapeutiske forhold og lignende overveielser. De daglige dosenivåene av de administrerte aktive ingrediensene kan derfor med fordel være f.eks. dermal - 1 til ca. 500 mg/kg, oral - 0,01 til 200 mg/kg, intranasal - 0,01 til ca. 100 mg/kg og aerosol - 0,01 til ca. 50 mg/kg av dyrets kroppsvekt.

Om man uttrykker seg i form av konsentrasjon kan den aktive ingrediensen ifølge oppfinnelsen være nærværende i de nye komposisjonene for lokal anvendelse dermalt, intranasalt, bronkialt, intramuskulært, intravaginalt, intravenøst eller oralt i en konsentrasjon av fra ca. 0,01 til ca. 50 vekt% i komposisjonen og spesielt fra ca. 0,01 til ca. 30 vekt% av komposisjonen.

De forbindelser som er anvendelige ifølge den foreliggende oppfinnelse kan isoleres ved hjelp av forskjellige teknikker som beskrives her. Det er åpenbart for fagmannen innen området at eksemplene involverer anvendelse av materialer og reagenser som er kommersielt tilgjengelige fra kjente kilder, f.eks. kjemiske leverandører. Ingen detaljer gis med hensyn til disse annet enn at de detaljer som presenteres her for inkorporasjon av de oljene det er spørsmål om i forskjellige kapsler, salver, losjoner, såper og shampo.

Diskusjon av variabler

Området for oppfinnelsen er ikke begrenset av de spesifikke eksemplene og foreslåtte prosedyrer og anvendelser her ettersom modifikasjoner kan gjøres innen et slikt område fra den allmenne informasjonen som gis gjennom denne beskrivelsen til fagmannen innen området.

De følgende formulasjonene eksemplifiserer noen av de doseformene av komposisjonene ifølge denne oppfinnelsen. I hver og en referer termen "aktiv forbindelse" til lipidforbindelser som kommer fra vev av sjøpølse av et eller annet slag, rensset eller ikke, fraksjonert eller ikke.

Oral administrering

RED OIL og GOLD OIL som beskrives her har blitt innkapslet i prototypen "soft-gel" kapsler som er vel kjente i næringsindustrien. Oljer av den foreliggende oppfinnelse stabiliseres med blandede tokoferoler som er kjent innen industrien. RED OIL fremstilt gjennom heksanekstraksjon av tørket stabilisert tarmmateriale av sjøpølse fra cucumaria frondosa ble degummiert gjennom metoder som er kjent for fagmannen innen området og ble stabilisert gjennom tilsats av 1% blandede tokoferoler (COVI-OX-T70 fra Henkel Corporation, PA) for å unngå oksidasjon. Soft gels prototyper ble produsert i en mengde av 1.000 stykker med 500 mg av RED OIL ifølge foreliggende oppfinnelse. GOLD OIL framstilt fra RED OIL som har blitt beskrevet her ble også inkorporert i soft gel prototypen av kapsler for eksperimentell anvendelse.

GOLD OIL og RED OIL har også blitt inkorporert i appelsinjuice i et forhold av 1:5 med tilsats av lecitin for å forbedre løsningsen av lipidene i vannfasene i appelsinjuicen.

Topisk administrering

RED OIL og GOLD OIL ifølge den foreliggende oppfinnelsen formuleres i to følgende former som er eksempel på noen av de former i hvilken de antipsoriatiske midlene kan anvendes.

Eksempel ASalve

<u>Ingrediens</u>	<u>mg</u>
Aktiv forbindelse	1-20
Benzylalkohol, NF	20,0
Mandelolje eller annen olje	30,0
Hvit petrolatum, USP	for å gjøre totalt 1,0 g

Fremstillingsmetode: Kombiner oljeingrediensene sakte med alkoholingredienser ved 140°F under omrøring.

Eksempel BKrem

<u>Ingrediens</u>	<u>mg</u>
Aktiv forbindelse	1,0-20,0
Stearinsyre, USP	60,0
Glyceryl monostearat	100,0
Propylenglykol, USP	50,0
Polyetylenorbitanmonopalmitat	50,0
Sorbitolløsning, USP	30,0
Benzylalkohol, NF	10,0
Rent vann	for å gjøre blandingen totalt 1,0 g

Fremstillingsmetode: Varm stearinsyre, glyceryl, monostearat og polyetylenorbitanmonopalmitat til 70°C. I en separat beholder løs sorbitolløsning, benzylalkohol, vann og halve kvantiteten av propylenglykol og varm opp det til 70°C. Tilsett vannfasen til oljefasen med høyhastighetsomrøring. Løs den aktive forbindelsen i gjenværende kvantitet av propylenalkohol og tilsett til den ovenfor nevnte emulsjonen når temperaturen i emulsjonen er 37 til 40°C. Bland jevnt med omrøring og avkjøl til romtemperatur.

Eksempel CNasalt inhaleringsmiddel

For administrering som et oralt eller nasalt inhaleringsmiddel kan kjente inerte væsker f.eks. propylenglykol brukes som bærere. De kan også administreres fra en trykk-inhalator med kjente drivmidler, f.eks. triklorfluormetan og

diklordifluormetan, eventuelt med dispergeringsmidler hvilket alt er kjent innen yrket.

Eksempel D

Gele

<u>Ingrediens</u>	<u>mg</u>
Aktiv forbindelse	1,0-20,0
Propylenglykol, USP	300,0
Butylert hydroksytoluen	5,0
Karbomer 940	5,0
Natriumhydroksid (tilsatt som en 1%-ig løsning i propylenglykol)	0,7
Polyetylenglykol 400, USP	for å gjøre totalt 1,0 g

Fremstillingsmetode: Tilbered en 1%-ig løsning av natriumhydroksid i propylenglykol. Tilsett ca. en halvdel av den gjenværende propylenglykolen og polyetylenglykol 400 til en passende beholder og bland. Løs den butylerte hydroksytoluenen i denne blandingen. Disperger karbomer 940 i den ovenfor nevnte blandingen med kraftig omrøring. Tilsett løsningen av natriumhydroksid med høyhastighetsrysting for å bringe pH opp til 7 og bland til en tykk gele dannes. Løs den aktive forbindelsen i den gjenværende propylenglykolen og tilsett den til geleen sakte mens geleen kontinuerlig blandes.

Eksempel E

Losjon

<u>Ingrediens</u>	<u>mg</u>
Aktiv forbindelse	1,0-20,0
Karbomer 940	3,0
Natriumhydroksid (tilsettes som en 4%-ig vannløsning)	0,05
Isopropylalkohol	40,0
Rent vann	for å gjøre totalt 1,0 g

Fremstillingsmetode: Preparer en 4%-ig løsning av natriumhydroksid i vann. Varm det rene vannet til 60°C. Tilsett karbomer 940 og bland ved høy hastighet til disper-

sjonen er ferdig. Avkjøl den ovennevnte blandingen til romtemperatur og tilsett sakte natriumhydroksidløsningen til løsningen blir jevn. Tilsett 80% av isopropylalkohol til det ovennevnte under blanding. Løs den aktive forbindelsen i den gjenværende isopropylalkoholen. Tilsett denne til blandingen under omrøring. Juster pH til 5,0 til 5,5 med natriumhydroksid om så er nødvendig.

Eksempel F

Kombinasjon av herbalantipsoriasis krem

<u>Ingrediens</u>	<u>Prosent</u>
Aktiv forbindelse	1-20
Grønn-te konsentrat	1-5
Boswellia serrata ekstrakt	1-10
Silymarin	1-10
fukosylert kondroitinsulfat	1-20
bivoks	1-40
turmerin olje	1-10
occimum sanctum olje	1-10
ingefær alkoholekstrakt	1-10
vann	1-30
DMSO	1-5
Emuolje	1-30
Tetreolje	1-5

Fremstillingsmetoder: Det er et formål med den foreliggende oppfinnelsen å frembringe basen for en formel der lempelige midler kombineres synergistisk hvilket forbedrer en psoriatisk tilstand. Det er vel kjent at psoriasis medieres av et antall inflammatoriske mediatorer. Angiogenese er en komponent av denne sykdommen så også 12-, 15- og 5-lipoksygenasebaner. Komplementaktivering er også en mediator for denne sykdommen. Det har blitt vist av oppfinneren at en salve som kombinerer RED OIL eller GOLD OIL som lipoksygenaseinhibitor; fukosilert kondroitinsulfat som angiogenese og komplementinhibitor, Boswellia serrata ekstrakt som komplementinhibitor og grønn te ekstrakt som dermal antioksydant og ornitin dekarboksylasinhibitor i en matrise av voksbærere og andre herbale preparasjoner gir et effektivt

topisk legemiddel for psoriasis. Ingefærekstrakt har vist seg å være en inhibitor av ornitin dekarboksylase, en komedikator for psoriatisk inflammasjon. Forskjellige prosentdelene av disse midler kan kombineres med emulgeringsmidler og andre midler som gjør de lempelige for topisk applikasjon. Prosentdelene av de aktive midlene kan variere avhengig av pasientenes tilstand og nivået for de forskjellige symptomene som er et resultat av de ulike mediatorene. Med andre ord kan en pasient med overflod av angiogenesisk neovaskularisasjon behøve mer av fukosilert kondroitinsulfat enn en pasient hvis psoriatiske plakk viser en øket aktivering av lipoksygenasebanen. Det er tenkt at en doktor som er trent i bedømmelsen av forskjellige baner som er involvert i psoriatiske plakk kan formulere en passende kombinasjon av de midler som er oppregnet i eksempel E. F.eks. kan serum fra psoriatiske pasienter prøves for aktivering av lipoksygenasebaner i lokal pustular foki og Complement Cascade-aktivering av C5a og C3a i pustulære skader kan lett bestemmes av fagmannen. Mekanismebaserte mål av psoriatiske symptomer kan derfor oppnås av leger og farmasøyter som kan området. Ingen ytterligere detaljer av bærere, mykgjørere eller lignende behøves inkluderes her.

Eksempel G

Seks psoriatiske pasienter med en alder fra 34 til 67 og med forskjellige former av sykdommen og i ulike flasskondisjoner ved tiden for administrering ble gitt en topisk salve ifølge eksempel F og fikk beskjed at selv administrere under 1 måned og rapportere tilbake til legen deres subjektive bedømmelse av den legende effekten av salven. Fem av de seks pasientene rapporterte "stor forbedring" eller "fullstendig tilbakegang" av deres psoriatiske symptomer.

Tre hunder av ikke kjent avstamning som led av atopisk dermatitis og "hot-spots" på kroppen og de bakre delene av halen fikk den topiske applikasjonen av eks. F av sine respektive eiere på en ukontrollert måte ad libidum under 6 uker. Alle tre hundeeierne rapporterte fullstendig avklaring av symptomene hos sine dyr og et opphør av kløing og biting av områdene under behandlingen.

Ti menn og kvinner mellom aldrene 46 og 81 som led av reumatoid artritt ifølge dem selv fikk oral supplementasjon av RED OIL ca. 2.000 mg per døgn per person under 3 måneder. Åtte av disse personene rapporterte en dramatisk minskning av sine sykdomssymptomer og en øket bevegelsesevne i armer og ben. En kvinne 81 år gammel rapporterte fullstendig opphør av smerte i sine skuldre og vrister.

Tre menn mellom 50 og 56 år behandlet seg selv med en topisk forbindelse omfattende RED OIL i en konsentrasjon av 9,5 vekt%, mentol, dimetylsulfoksid (DMSO) emulje, vintergrønnolje, alkohol og olivenolje for testing av smertenedsettende kapasitet av RED OIL som en topisk "rub-on" smertekontrollformel. Etter fire dager av applikasjon på smertefulle skuldre, fingre eller knær sa to av deltagerne at de hadde den subjektive følelsen av dramatisk forbedring og en mann sa at den subjektive forbedringen var moderat.

Fire kvinner med selvrapportert osteoartritt fikk 1.500 mg 2 ganger per døgn av GOLD OIL i løsninger i appelsinjuice og emulgeringsmiddel under 2 måneder. Alle fire rapporterte øket velvære fra forbindelsen og tre ga bedømmelsen dramatisk minskning i smerte og øket bevegelsesevne.

En 19 år gammel hest av ukjent avstamning som hadde artrittrelatert halting i det høyre frembenet ble behandlet på kneet med en gele omfattende 20% RED OIL og lignende til eksempel D som har blitt beskrevet her. Geleen ble ombundet og ombyttet daglig under 2 uker. Ved slutten av de to ukene sa hesteeieren at det var en øket bevegelsesevne og minsket halting.

En hund med en veterinærdiagnostisert hundelupus fikk 1.000 mg RED OIL daglig under 6 måneder blandet i maten. Under behandlingen avtok symptomene på sykdommen og eieren kunne minske dyrets dosering kraftig av prednisonmedisinen til en tiendedel av de tidligere nivåene.

To personer som led av vanlig sure oppstøt (inflammasjon av esofagus) fikk GOLD OIL emulgert med lecitinjuice og sukker oralt i en mengde av 2.000 mg GOLD OIL per døgn i juicen. De sa at symptomene avtok på bare 2 minutter.

En 22 år gammel person som led av astma tok som mat-supplement 1.000 mg RED OIL daglig, blandet med andre mat-

tilsatser under en periode av to og en halv måned. Under den tiden rapporterte hun minsket behov for sin konvensjonelle inhaleringsmedikasjon og andre indikasjoner av subjektiv velvære.

Tre gutter i oppvekstalderen med forskjellige akne-vulgaris skader i ansiktet fikk administrert RED OIL i 1.000 mg per døgn blandet med appelsinjuice og lecitin under 1 måned. De rapporterte alle subjektiv velvære fra RED OIL som viste seg gjennom minskede erupsjoner.

Anticancerprøver

RED OIL og GOLD OIL og forskjellige tynnsjikt-skromatografiske fraksjoner har blitt testet mot menneskecancer cellelinjer in vitro. Materialer ble i begynnelsen løst i dimetylsulfoksid og deretter fortynnet i vevkulturmedia. Alikots av 23 µg/ml ble deretter applisert til PC3 (menneske prostata), MCF7 (menneskelig brystadenocarcinom), HT29 (menneskelig colon adenocarcinom) eller BRO (menneskelig melanom) cellelinjer. Disse fraksjonene medierte inhibering av celleteilvekst i forhold til ubehandlede kontrollceller som ble bestemt etter 72 timer med MTT levedyktig fargemetoden som vanligvis anvendes av fagmannen. I alle cellelinjene kunne RED OIL og forskjellige fraksjoner inhibere celleteilveksten på en konsentrasjonsavhengig måte. En slik fraksjon isolert fra sjøpølselipidfasen av metoder ifølge Findlay et al. (1983b), plastokromanol-8 ansås være lovende i verdiene 20 til 50 µg/l og bestemtes som IC_{50} verdier (den konsentrasjon som inhiberer 50% av celleteilveksten). Plastokromanol-8 ble også prøvet i 5-lipoksygenaseprøver som er beskrevet ovenfor og viste seg å være en dramatisk inhibitor av 5-lipoksygenase LTB_4 og flere isomerer av enzymet. Plastokromal-8 viste seg også være en inhibitor for 12-lipoksygenasebanen i menneskepletter.

Plastokromanol-8 data

I en leukotrienaktiveringsprøve som viste effekten av plastokromanol-8 på leukotriensyntese uttrykt som et prosent-tall av en metanolkontroll i menneskelige neutrofiler gjennom metoden av Betts (1997) inhibierte plastokromanol-8 aktivering av 5-HETE med ca. 60%, LTB₄ med ca. 40%, og to av de 6-trans isomerene av LTB₄ (6-trans-leukotrien B₄ og 6-trans-12-epileukotrien B₄) med 75%. I en lignende prøve av effekten av plastokromanol-8 på leukotriensyntesen uttrykt som leukotriensyntese per 10⁶ PMN, inhibierte plastokromanol-8 produksjonen av 5-HETE med ca. 75%, LTB₄ med 50% og de to trans-6 isomerene av LTB₄ med ca. 80%. I lignende prøver med menneskepletter inhibierte plastokromanol-8 12-HETE syntese med ca. 80%.

Referanseliste

- Betts H (1997). *Inflammopharmacology* 5:237-246.
- Bullock E and Dawson CJ (1970). *Comp. Biochem. Physiol.* 34:799.
- Castagna M, et al. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851.
- Chen YQ, et al. (1994). *Cancer Res.* 54:1575-1579.
- DeLuca P, et al. (1995). *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 21:759-777.
- Doherty NS, et al. (1988). *J. Invest. Dermatol.* 91:298-302.
- Findlay J.A, et al. (1983a). *Marine Chemistry* 12:228.
- Findlay J.A, et al. (1983b). *J. Nat. Prod.* 47:334-340.
- Findlay J.A, et al, (1984), *Journal of Natural Products*.
- Gao X, et al. (1995). *Urology* 46:227-237.
- Ghosh J and Myers (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:418-423.
- Glenn EM (1966). *Am. J. Vet. Res.* 27:339-352.
- Grover FL, et al. (1997). *Am. J. Surg.* 173:523-533.
- Henderson WR (1994). *Ann. Intern. Med.* 121:648-697.
- Hofmanova J, et al. (1996). *Gen. Physiol. Biophys.* 15:317-331.
- Honn KV, et al. (1994). *Cancer Metastasis Rev.* 13:365-96.
- Honn KV, et al. (1992). *Prostaglandins* 44:413-429.
- Hussey HJ and Tisdale MJ (1996). *Br. J. Cancer* 74:683-687.
- Ishida H, et al. (1997). *Toxicology* 123:167-175.

- Knighton D, et al. (1977). *J. Cancer* 35:347-355.
- Konig GM and Wright AD (1995). *Planta Medica* 62:193-211.
- Langford FD, et al. (1972). *J. Pharm. Sci.* 61:75-78.
- Liu B, et al. (1994). *Lab. Invest.* 70:314-323.
- Matsuno T, et al. (1995). *Comp. Biochem. Physiol. B* 11B:597-605.
- Meyers S and Chen N (1982). *Journal of Food Science* 47:345-348.
- Miyamoto T, et al. (1990). *Liebigs Ann. Chem.* 33:453-460.
- Moody TW, et al. (1998). *Exp. Lung Res.* 24:617-28.
- Tsushima M, et al. (1996). *J. Nat. Prod.* 59:30-34.
- Winter CA and Nuss GW (1966). *Arthritis & Rheumatism* 9:394-404.
- U.S. Patent No. 4,495,207
- U.S. Patent No. 4,505,963
- U.S. Patent No. 4,692,280
- U.S. Patent No. 5,519,010
- U.S. Patent No. 5,770,205

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et olje-produkt omfattende en karotenoidbærende lipid,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet blir isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev gjennom ekstraksjon av vevet med et løsningsmiddel.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at løsningsmiddelet er et organisk løsningsmiddel i form av varm spiselig olje, med påfølgende separering av tarmmaterialet fra olje, hvorved produktet omfatter olje pluss lipider ekstrahert fra tarmmaterialet inn i oljen.
- 15 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet isoleres gjennom følgende trinn:
 - a) separering av tarmvev fra sjøpølse,
 - 20 b) justering av pH i tarmvevet til et område av fra ca. 4 til ca. 5,5,
 - c) tørking av tarmvevet etter at pH har blitt justert til området ca. 4 til ca. 5,5,
 - d) ekstrahering av tarmvevet med løsningsmiddelet,
 - 25 e) separering av løsningsmiddelet fra tarmvevet; og
 - f) evaporering av løsningsmiddelet, og eventuelt inklusive trinnene:
 - g) degummiering,
 - h) behandling med kiselsyregel,
 - 30 i) oppvarming, og
 - j) filtrering.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet isoleres
35 gjennom følgende trinn:
 - a) ekstrahering av sjøpølse-tarmvev med et løsningsmiddel for å produsere et ekstrakt,
 - b) blanding av en adsorbent som binder pigmenter til ekstraktet; og

hvorved produktet består av det som gjenstår etter fjerningen av adsorbenten.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d at adsorbenten er kiselsyre i en kolonne balansert med kloroform og produktet fjernes fra adsorbenten ved å føre kloroform gjennom kolonnen.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 4 eller 5,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at følgende trinn inngår etter fjerning av adsorbenten:

ekstrahering av adsorbenten med et løsningsmiddel, separering av løsningsmiddelet fra adsorbenten og fjerning av løsningsmiddelet for derved å etterlate
15 produktet.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 4 eller 6,

k a r a k t e r i s e r t v e d at adsorbenten velges fra gruppen bestående av aktivert leire, ikke-aktivert leire,
20 trekull, kiselsyre og kiselsyreanhydrid.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet blir isolert ved hjelp av følgende trinn:

- 25 a) ekstrahering av tørket sjøpølse-tarmvev med et løsningsmiddel for å produsere et ekstrakt,
b) destillering av ekstraktet, og
c) oppsamling av en destillasjonsfraksjon i en kondenser på ca. 25-35°C.

30

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet blir isolert ved hjelp av følgende trinn:

- 35 a) ekstrahering av tørket sjøpølse-tarmvev med et løsningsmiddel for å produsere et ekstrakt,
b) blanding av en adsorbent som binder pigmenter i ekstraktet,
c) fjerning av adsorbenten for å produsere en gylden olje,
d) destillering av den gyldne oljen, og

- e) oppsamling av en destillasjonsfraksjon i en kondensor på ca. 25-35°C.

10. Fremgangsmåte for fremstilling av et olje-produkt fra ferskt sjøpølsevev,

karakterisert ved at produktet blir er isolert gjennom følgende trinn:

- a) separering av tarmvev fra sjøpølsen,
- b) justering av pH i tarmvevet til et område fra ca. 4 til ca. 5,5,
- c) ekstrahering av tarmvevet med et løsningsmiddel,
- d) separering av løsningsmiddelet fra tarmvevet, og
- e) fjerning av løsningsmiddelet, hvorved produktet er et karotenoidbærende lipidmateriale som gjenstår etter fjerning av løsningsmiddelet.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10,

karakterisert ved at løsningsmiddelet er et organisk løsningsmiddel.

12. Fremgangsmåte ifølge kravene 1 eller 10,

karakterisert ved at løsningsmiddelet er valgt fra gruppen bestående av heksan, butan, flytende propan, alkohol, aceton, kloroform og superkritisk karbondioksid.

13. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-12,

karakterisert ved at produktet omfatter en antioksydant.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for storskala-ekstraksjon av lipidfraksjoner fra sjøpølse-tarmvev,

karakterisert ved at den omfatter følgende trinn:

ekstrahering av tarmvevet fra sjøpølse for hand eller maskinelt, og ekstrahering av en lipidfraksjon fra det tørkede vevet med et løsningsmiddel som er valgt fra gruppen heksan, flytende

propan, superkritisk karbondioksid, aceton, alkohol eller kombinasjoner av disse løsningsmidler.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 14,

- 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter surgjøring av tarmvevet til en pH av mellom 4 og 5,5 av sjøpølsevev-materialet, forut for tørkettrinnet.

16. Kjemisk sammensetning

- 10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en karotenoidbærende lipid isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev ved ekstrahering av vevet med et løsningsmiddel, og dessuten omfattende fukosilert kondroitinsulfat, en antioksydant, grønn teekstrakt, et ingefæralkoholekstrakt og et Boswellia
- 15 ekstrakt som ytterligere komplementinhibitor hvorved komposisjonen er en topisk salve dessuten omfattende passende eksipienter som er lempelige for dyr og mennesker.

17. Vanndiett,

- 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter olje-produkter fremstilt med fremgangsmåten ifølge krav 8 eller 10.

18. En fraksjon av olje-produkt,

- 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en karotenoidbærende lipid isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev ved ekstrahering av vevet med et løsningsmiddel, hvilken fraksjon er aktiv for inhibering av leukotriene B₄, 6-trans leukotriene B₄ og 6-trans-12-epileukotrienene B₄ og 5-HETE,
- 30 5S-hydroksy (E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-eikosatetraenoinsyre.

19. Fraksjon ifølge krav 18,

- 35 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er fremkommet gjennom utførelse av preparativ HPLC på produktet.

20. Fraksjon ifølge krav 18 til å inhibere inflammasjon hos et pattedyr som behøver dette,

k a r a k t e r i s e r t v e d administrering av en effektiv mengde av den nevnte fraksjon.

21. Fraksjon ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at inflammasjonen er
resultatet av 5-lipoksygenase-aktivitet.

5

22. Olje-produkt for å inhibere sykdomstilstander hos et
pattedyr der aktivering av lipoksygenase-baner bidrar til den
patologiske tilstand,

10

k a r a k t e r i s e r t v e d administrering av en
effektiv mengde av et produkt omfattende en karotenoidbærende
lipid isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev ved ekstrahering av
vevet med et løsningsmiddel, der en fraksjon er aktiv for
inhibiering av leukotriene B₄, 6-trans leukotriene B₄ og 6-
trans-12-epileukotrienene B₄ og 5-HETE, 5S-hydroksy
15 (E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-eikosatetraenoinsyre.

23. Olje-produkt ifølge krav 22 for å inhibere immunsvaret hos
et pattedyr som behøver dette,

20

k a r a k t e r i s e r t v e d administrering av en
effektiv mengde av et produkt omfattende en karotenoidbærende
lipid isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev ved ekstrahering av
vevet med et løsningsmiddel, der en fraksjon er aktiv for
inhibiering av leukotriene B₄, 6-trans leukotriene B₄ og 6-
trans-12-epileukotrienene B₄ og 5-HETE, 5S-hydroksy
25 (E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-eikosatetraenoinsyre, hvorved produktet
administreres i en mengde av mellom 5 mg per kg kroppsvekt
per døgn og 500 mg per kg kroppsvekt per døgn.

24. Produkt ifølge krav 23, for å inhibere immunsvaret hos et
pattedyr som behøver dette,

30

k a r a k t e r i s e r t v e d at pattedyret er et
menneske med psoriasis, artritt eller atopisk dermatitt.

25. Produkt ifølge krav 23 for å inhibere immunsvaret hos et
pattedyr som behøver dette,

35

k a r a k t e r i s e r t v e d at pattedyret løper en
risiko for transplantatbortstøtning.

26. Olje-produkt ifølge krav 22 for å inhibere lipoksygenaseaktivitet hos et pattedyr som behøver dette, k a r a k t e r i s e r t v e d at dyret lider av en eller flere sykdommer valgt fra gruppen bestående av allergi, astma, artritt, hudforstyrrelser, akne, psoriasis, inflammatorisk magesykdom, kardiovaskulær sykdom, angina, stroke, atopisk dermatitt, prostatacancer, lungecancer, hudcancer og cancer i fordøyelsestraktene.
27. Produkt ifølge krav 23 for å inhibere immunsvaret hos et pattedyr som behøver dette, k a r a k t e r i s e r t v e d at dyret lider av enten diabetes, reumatoid artritt, osteoartritt, ankylosing spondylitis, migrene, akne, sure oppstøt, lupus eller en cancer og effektive midler ifølge denne oppfinnelsen administreres i en dosemengde mellom 5 mg per kg kroppsvekt per døgn til 500 mg per kg kroppsvekt per døgn.
28. Produkt ifølge krav 23 for å inhibere immunsvaret hos et pattedyr som behøver dette, k a r a k t e r i s e r t v e d at immunsvaret legger for dagen akne vulgaris og pattedyret er et menneske.
29. Olje-produkt ifølge krav 22 for å inhibere aktivitet av 5- og/eller 12-lipoksygenaser hos et pattedyr, k a r a k t e r i s e r t v e d at produktet omfatter plastokromanol-8 som kommer fra en kilde eller er laget syntetisk og er innrettet til å administreres med en effektiv mengde til pattedyret som trenger inhibering av 5- og/eller 12-lipoksygenaser.
30. Produkt ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at pattedyret behøver anti-cancerbehandling.
31. Olje-produkt ifølge krav 22 for å inhibere angiogenese hos et pattedyr der neovaskularisering bidrar til den patologiske tilstanden,

k a r a k t e r i s e r t v e d administrering av en effektiv mengde av produktet som omfatter en karotenoid-bærende lipid isolert fra tørket sjøpølse-tarmvev ved ekstrahering av vevet med et løsningsmiddel, der en fraksjon er aktiv for inhibiering av leukotriene B₄, 6-trans leukotriene B₄ og 6-trans-12-epileukotrienene B₄ og 5-HETE, 5S-hydroksy (E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-eikosatetraenoinsyre ved administrering med mellom 20 til 500 mg per kg kroppsvekt per døgn.

10

32. Produkt ifølge krav 31, k a r a k t e r i s e r t v e d at administreringen utføres gjennom topisk kontakt på et område for neovaskularisering.

15

FIG. 1

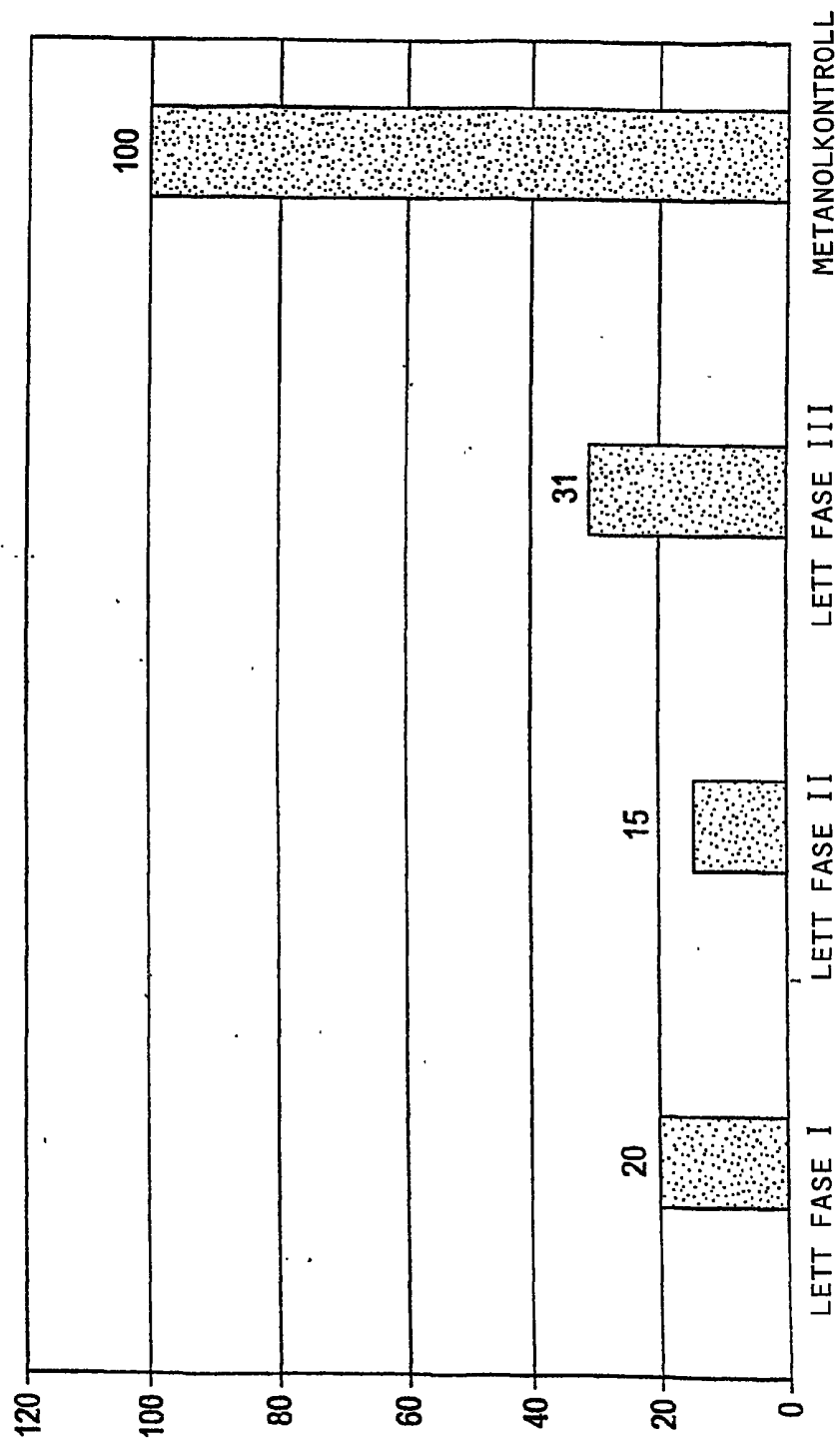


FIG. 2

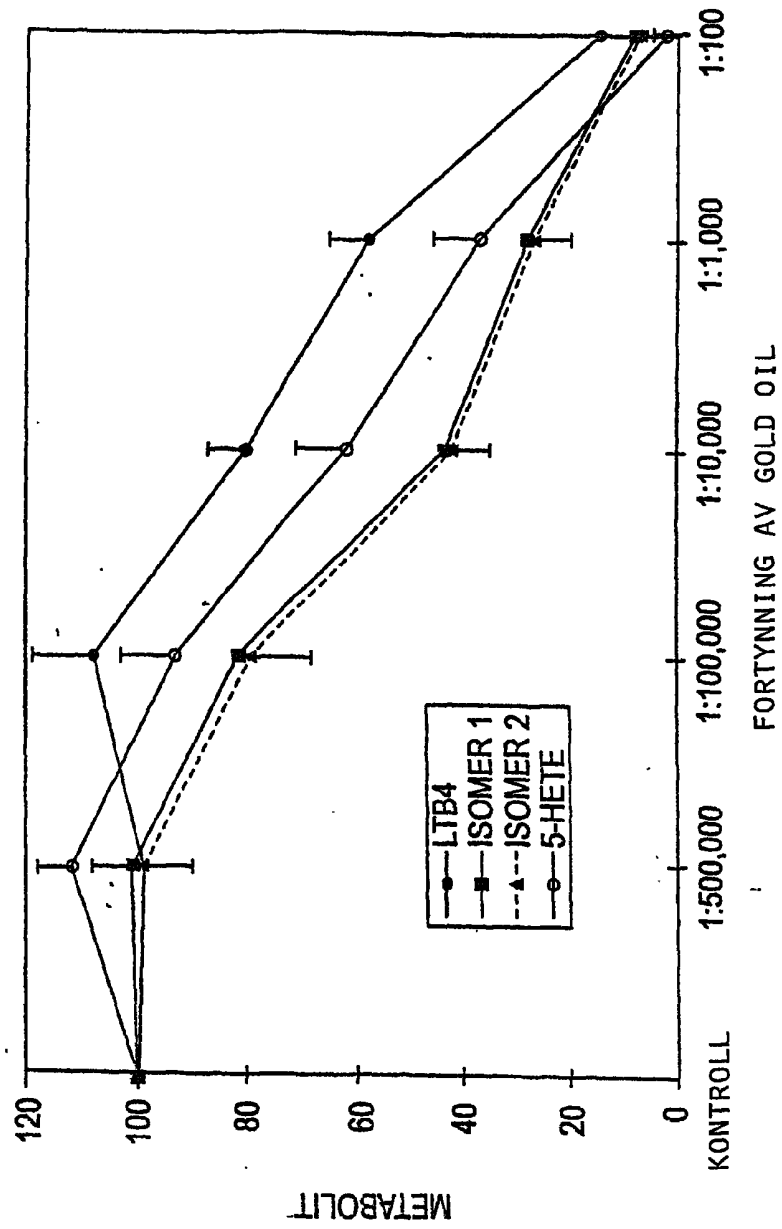


FIG. 3

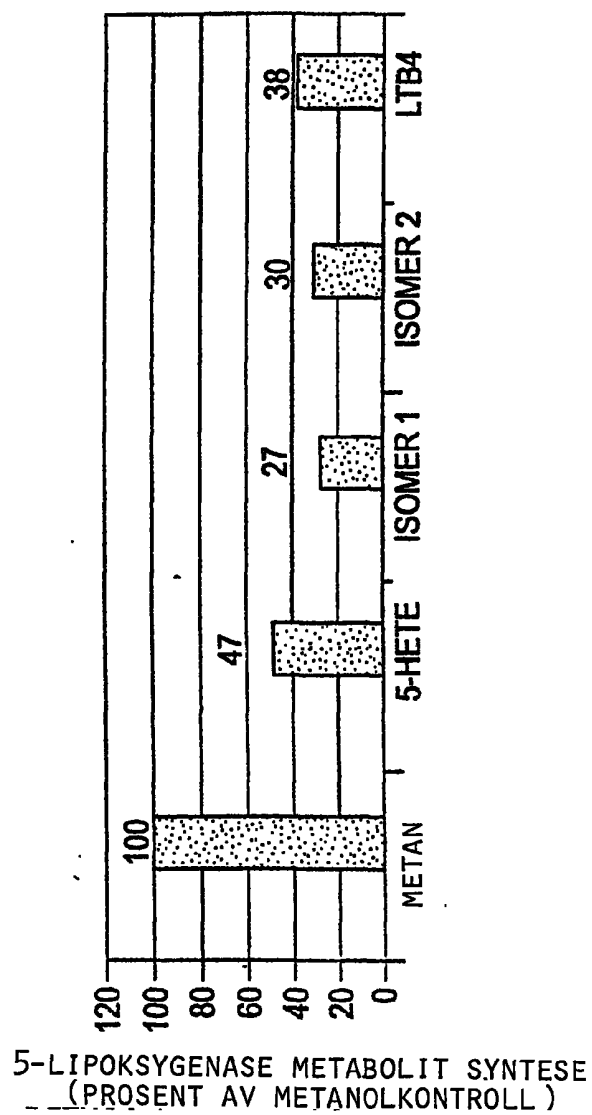


FIG. 4

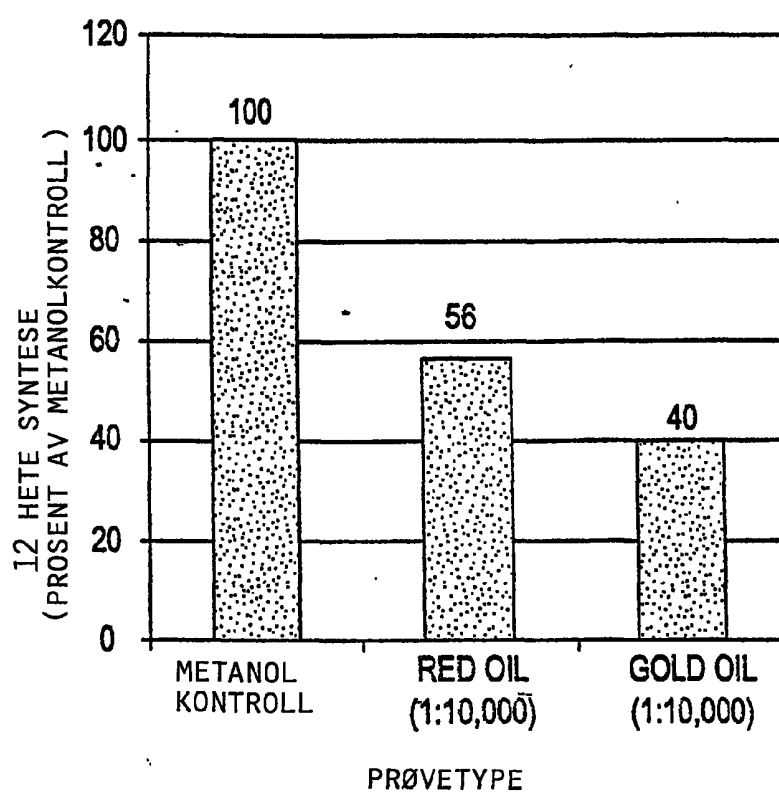
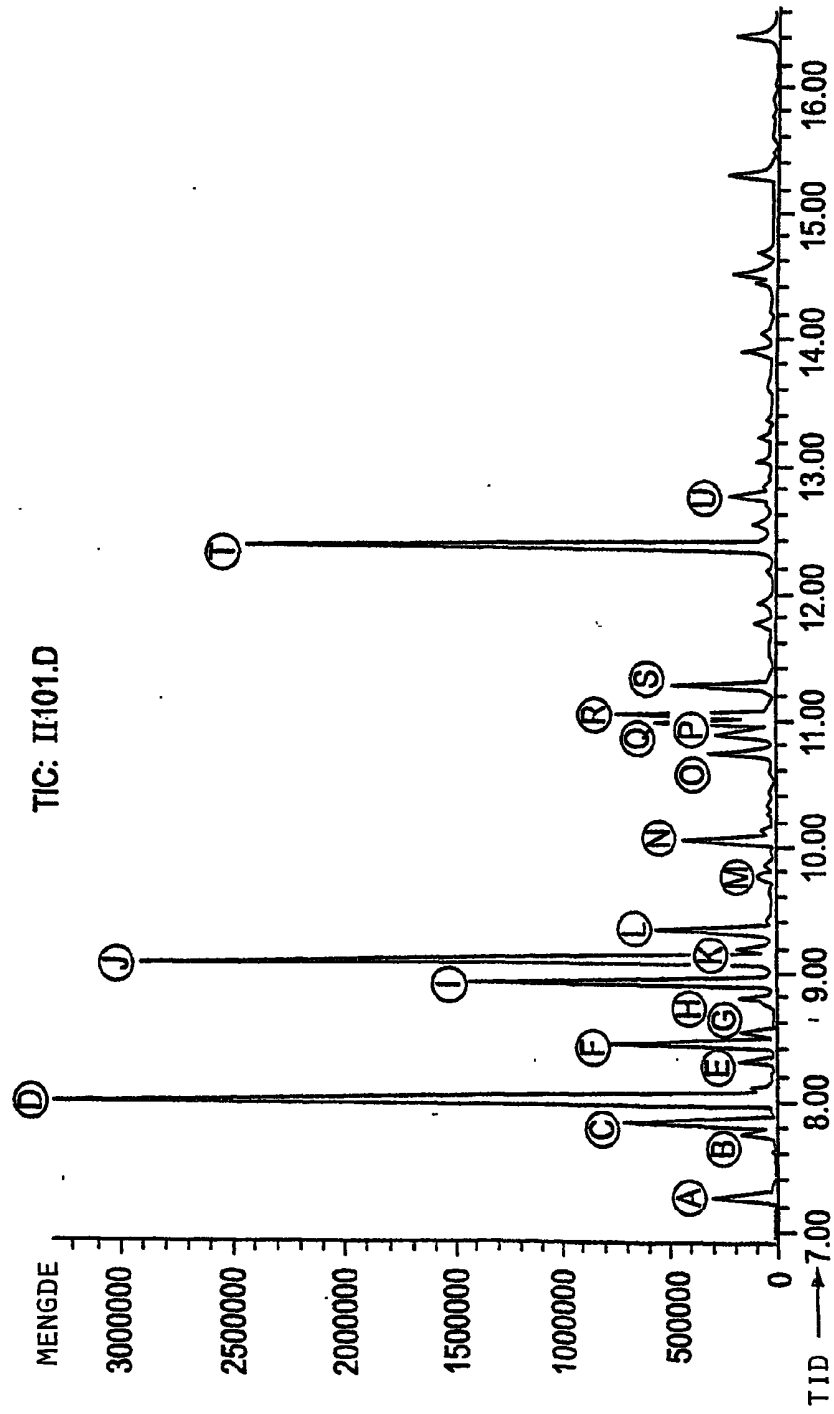


FIG. 5



ZOOM ZOOMOUT TRACE FUNCTION AUTOSCALE ANNOTATE PRINT

FUNCTIONS: SCAN

FIG. 6

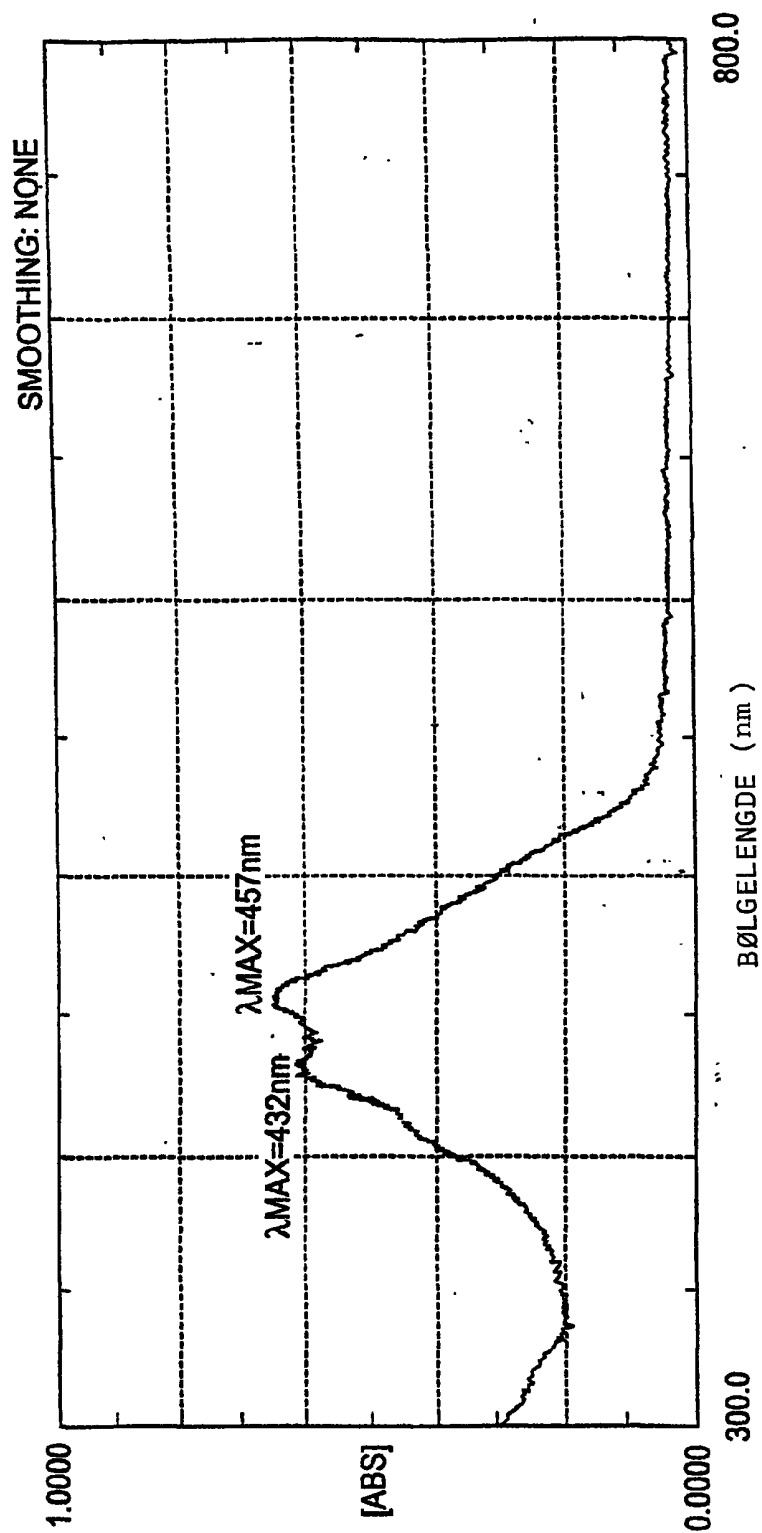


FIG. 7

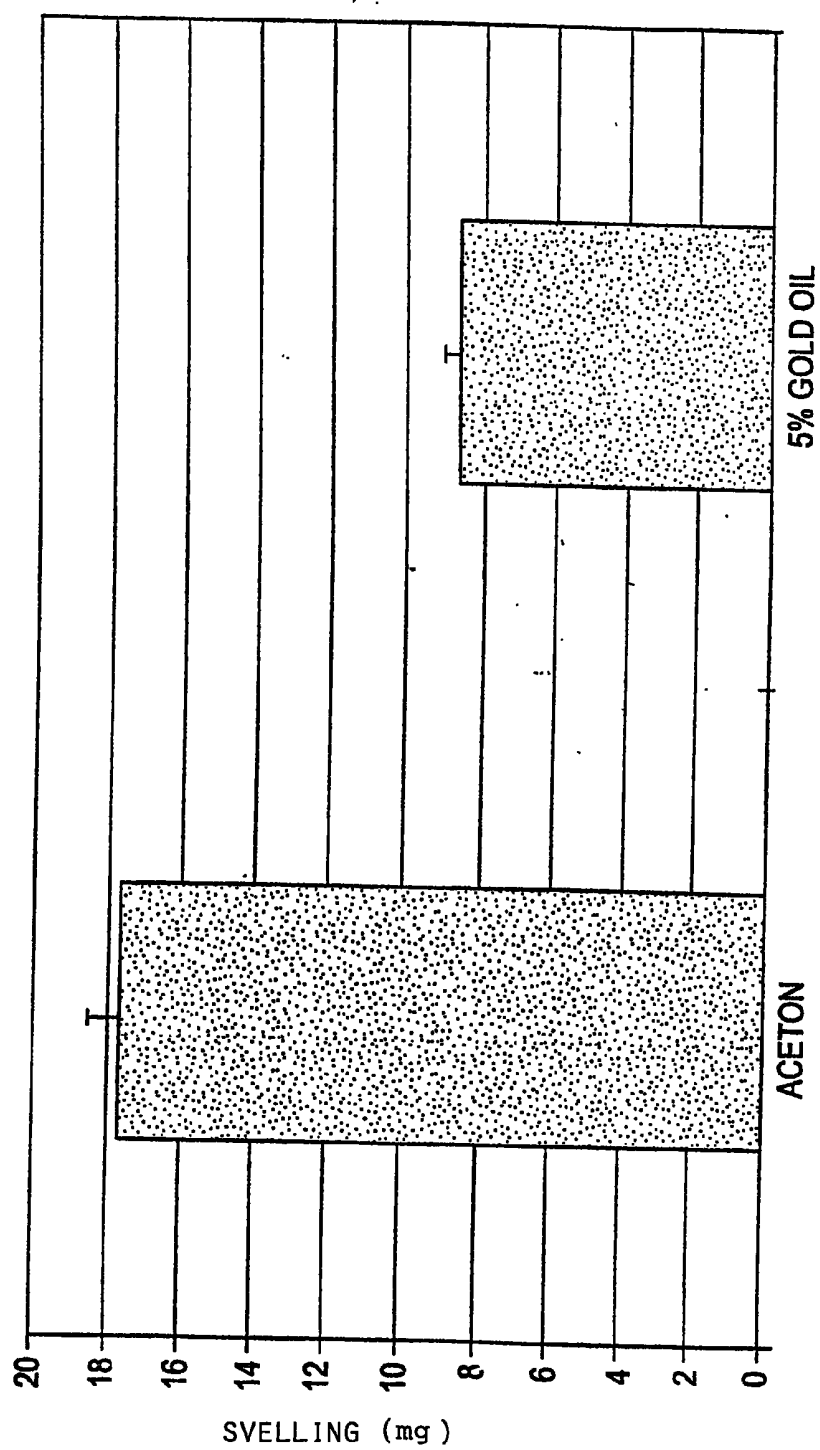


FIG. 8

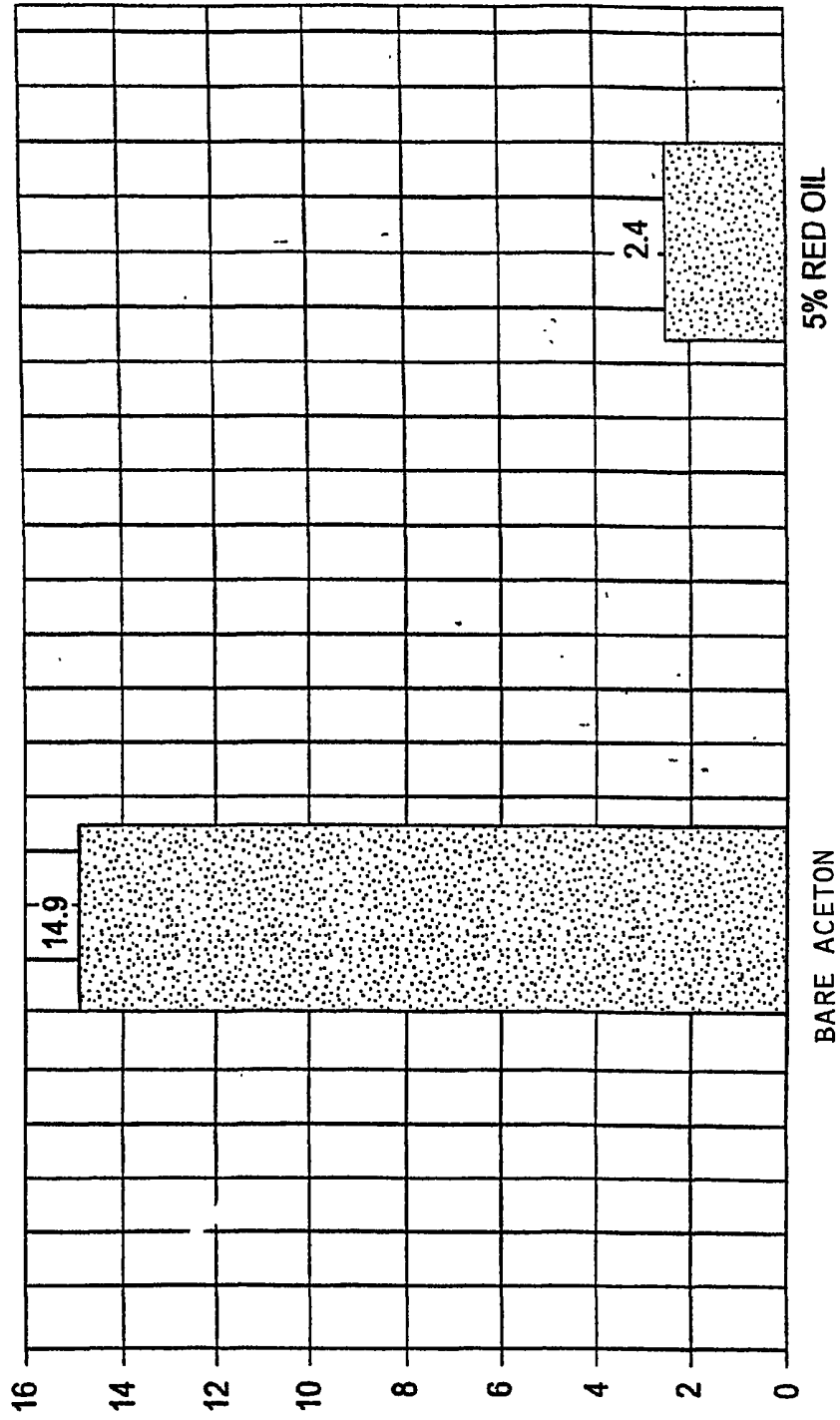


FIG. 9

