FREMBRINGELSENS OMRÅDE

Frembringelsen vedrører området for kosttilskud til individer og nedsættelse af virkningerne af muskeltilstande fremkaldt af høje niveauer af fysisk aktivitet. Især tilvejebringes ifølge frembringelsen diætformuleringer, sammensætninger omfattende disse formuleringer og brug af disse sammensætninger til støtte for kroppens muskelregenereringsproces.

BAGGRUND FOR FREMBRINGELSEN

Niveauer af fedme og andre tilstande, som resulterer af en mindre aktiv livsstil, er øget dramatisk i den almindelige befolkning i de senere år. Samtidig hermed har individer gennem de senere årtier anstrengt sig for at modvirke den reducerede mængde fysisk aktivitet i deres normale liv gennem deltagelse i motion i øget omfang. I mange tilfælde er intensiteten af denne motion øget, og det er ikke ualmindeligt, at normalt motionerende individer har en præstationsprofil svarende til professionelle atleter.

Alt for meget, eller alt for intens, motion skaber nye udfordringer for subjektet såsom motion-induceret muskelskade og muskelstress. Forsinket muskelømhed eller DOMS (Delayed Onset Muscle Soreness), der også kaldes muskelfeber, er smerten og stivheden, som føles i muskler ca. 24 til 72 timer efter uvant og/eller anstrengende motion. Med andre ord er det et symptom på muskelskade forårsaget af hård motion.

Yderligere skader og tilstande er blevet set ledsage DOMS. Eksempler herpå er ultrastrukturelle sprængninger af myofilamenter, navnlig ved Z-skiven, samt skade på musklens bindevæv. Skønt DOMS sædvanligvis forsvinder af sig selv efter ca. 72 timer, så kendes kun få midler til at accelerere muskelregenerering. Givet intensiteten og den øgede frekvens af fysisk aktivitet er der et stort behov for midler til at nedsætte regenereringsperioden til et minimum.

Kendte eksempler på midler, der acelererer muskelregenerering, er midler der øger blodgennemstrømningen til musklen, såsom lavintensitetsarbejde, massage, varme bade eller saunabesøg.

Sådanne midler vil sædvanligvis kun i ringe grad reducere ømheden eller skaden og tilhørende tilstande, og således bliver disse midler typisk kun anset for at være

støttemidler. Disse midler overvinder ikke det underliggende problem og mekanisme og leder således ikke til en hurtig muskelregenerering.

I tillæg til DOMS kan der også optræde andre og mere alvorlige tilfælde af motion-induceret muskelskade. Mange atleter oplever de ubehagelige og svækkende virkninger af motion-induceret muskelskade, der knytter sig til forøgede inflammatoriske processer i musklen. Motion-induceret muskelskade i mennesker optræder ofte efter uvant motion, navnlig hvis motionen indebærer en stor mængde excentriske (muskelforlængende) sammentrækninger.

Oven i øgningen i inflammatoriske processer bliver der også produceret frie radikaler under og efter forskellige former for sammentrækningsaktiviteter. Frie radikaler er kendt for at resultere i knoglemuskelskade.

Det er ikke kun motion-relaterede aktiviteter, der fører til de heri beskrevne tilstande. En vilkårlig anden øgning af fysisk aktivitet kan føre til disse tilstande. Blot som et eksempel kan nævnes, at dagligt hårdt fysisk arbejde, som det forekommer i byggebranchen eller andre kropsudfordrende aktiviteter eller skader, kan være årsagen. Det er også muligt, at muskelstivhed og andre livsstilsrelaterede virkninger, som har en negativ indflydelse på normal muskelkondition og -funktion, kan blive fremkaldt af ikke-fysiske aktiviteter.

I de senere år har virkningerne af motion og øget fysisk aktivitet været hovedfokusområder for områderne med nutraceutica, kosttilskud og funktionel mad. Forskellige publikationer har vurderet virkningerne af aktive ingredienser såsom antioxidanter, phospholipider, vitaminer og lignende. Nogle af disse er diskuteret nedenfor.

I Jäger *et al., J. Int. Soc. Sports. Nutr.* 2007: 4: 5, beskrives den fordelagtige virkning af phospholipider på sportspræstationer. Dette dokument viser, at intens motion reducerer cholinniveauer, der er precursor for acetylcholin, et kendt signalmolekyle og neurotransmitter. Tilskuddet af cholin har vist sig at have fordele i form af forbedret præstation.

Mens nogle publikationer peger på en mulig virkning af antioxidanterne til forbedring af muskelgenvinding efter motion, Teixeira *et al; Med Sci Sports Exerc.* 2009 Sep: 41(9):

1572-60, viste at antioxidanter ikke forhindrer post-motion peroxidation og kan endog forsinke eller hindre muskelregenerering. Dette studie sigtede på at bestemme virkningerne af 4 uger med antioxidanttilskud på motion-induceret lipid peroxidation, muskelskade og inflammation i kajakroere. De anvendte antioxidanter var alfa-tocopherol, vitamin C, betacaroten og lutein, i tillæg til generiske ingredienser.

WO 2008117062 foreslår en sammensætning bestående af phospholipider og astaxanthin, som alle er direkte afledt fra udtrækning af krilolie, til bekæmpelse af forskellige forhold inkluderende diætinduceret hyperinsulinæmia, insulininsensitivitet, muskelmassehypertrofi, serumadiponectinreduktion og hepatisk steatose (fedtlever).

Yderligere diættilskudskombinationer af antioxidanter, fiskeolier og andre ingredienser er vist i WO 2007076416 med det formål at tilvejebringe tilskud til forhindring af udviklingen af makulær degenerering og at fremme sund synsevne.

Den foreliggende ansøger har tidligere solgt en kombination af antioxidanterne lutein, astaxanthin og zeaxanthin under varemærket VitaePro™ som et kosttilskud til forbedring af immunsystemet såvel som til at øge virkningerne af motion. I modsætning til resultaterne i tidligere publikationer, blev markører for oxidativ stress i leveren reduceret i studierne ved brug af produktet. Yderligere, når der tages hensyn til resultaterne fra epidemiologiske studier i diabetikere, hvor virkningerne af carotenoider er blevet studeret, synes det, at produktet VitaePro™ er effektivt til forebyggelse af type 2 diabetes.

Zoppi *et al., J Int Soc Sports Nutr* 2006; 3: 37-44 beskriver, at kombinationen af vitaminerne E og C kan reducere oxidation og muskelskader i professionelle fodboldspillere. *Rosa et al. J Appl* Physiol 2009; 107: 1532-1538 beskriver, at vitamin C og E tilskud også forebygger mitochondrisk skade på ileum myocytes som følge intens og umattende motionstræning.

Naziroglu *et al. Can J Appl Physiol* 2005; 30: 172-185 og Kutlu *et al. Int J Vitam Nutr Res* 2005; 75: 71-80 beskriver de beskyttende virkninger af moderat motion med vitamin C og vitamin E tilskud på den blodantioxidativ forsvarsmekanisme i rotter med streptozotocin-induceret diabetes, og også at denne kombination modvirker oxidativ stress i nyre og linse på streptozotocin-induceret diabetesrotter.

Kiokias *et al. Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1135-1140 beskriver, at diættilskud ved en naturlig carotenoidblanding nedsætter oxidativ stress. Mere detaljeret viser dette studie, at indtagelse af den naturlige carotenoide blanding sænkede stigningen i oxidativ stress induceret af fiskeolien som fastslået ved *ex vivo* oxidativ stabilitet af LDL og DNA nedbrydningsprodukter i urin. den carotenoide blanding øger også de plasmatriglycerid-sænkende virkninger af fiskeolien.

Atalay *et al Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 601-607 viser, at vitamin E tilskud markant nedsætter fiskeolie- og motion-inducerede antioxidant enzymaktiviteter i alle væv.

Sen *et al J Appl Physiol* 1997; 83: 189-195 beskriver administrering af en kombination af fiskeolie og vitamin E tilskud til subjekter i en tilstand af oxidativ stress, i hvile og efter fysisk motion. Denne publikation beskriver, at fiskeolie inducerede oxidativ beskadigelse af lipider på en vævsspecifik måde, mens en kombination af fiskeolie og vitamin E nedsatte vævsoxidationsstress til under det, der ses i dyr uden tilskud af vitamin E. Fiskeolie og vitamin E tilskuddet synes også at have en vis effekt på stigningen i motion-induceret oxidativ stress i leveren på forsøgsdyr.

Bortset fra tilgængeligheden af formuleringerne, fremgangsmåderne og stofferne som beskrevet ovenfor, resterer der behov for nye sammensætninger, der er effektive til at nedsætte virkningerne af motion-inducerede tilstande såsom oxidativ stress, oxidative skader og svækkelse af immunsystemet gennem forøgede niveauer af fysisk aktivitet. Navnlig savnes et produkt, som kan virke forbedrende på muskelskade eller stress. Den aktuelle opfinder har designet et optimal nutraceutisk tilskudsformulering til at adressere dette problem.

SAMMENDRAG AF FREMBRINGELSEN

Hovedmålet for opfinderen af den foreliggende frembringelse var at modvirke de negative virkninger af DOMS og andre muskelskader gennem tilvejebringelse af en sammensætning omfattende flere stoffer, der reducerer relaterede symptomer og accelererer muskelregenereringsprocessen. I tillæg til at adressere specifikke muskelrelaterede tilstande, så tilvejebringer formuleringerne ifølge frembringelsen en generel forbedring af subjektets velbefindende og øger udholdenheden af disse individer gennem at reducere negative sidevirkninger relateret til overanstrengte

muskler. Til opnåelse af dette mål var det nødvendigt at nærme sig denne udfordring ikke blot ved at adressere nogle af de underliggende mekanismer men også at betragte den samlede mængde faktorer, der fører til disse tilstande herunder, men ikke begrænset til, inflammatoriske processer, muskelskade og udviklingen af frie radikaler. Der er grund til at antage, at adressering af disse forskellige kausale faktorer under ét og på den ifølge frembringelsen beskrevne måde gør det muligt at opnå en signifikant og accelereret muskelregenereringsproces. Formuleringerne ifølge frembringelsen kan også påvirke andre muskler, end direkte de muskler, som lider af følgerne af individets fysiske aktivitet. F.eks. kan hjertemusklen blive styrket af formuleringerne ifølge frembringelsen.

Den foreliggende frembringelse beskriver for første gang en specifik kombination af ingredienser i en diætformulering, som har en signifikant virkning på den accelererede reduktion af muskelstress og -skade efter motion/træning og tilvejebringer på samme tid en immunitetsforøgende virkning på individet.

I et første aspekt af den foreliggende frembringelse tilvejebringes en diætformulering omfattende:

a) en antioxidant

b) et stof til støtte for cellulær funktion og struktur, og

c) et anti-inflammatorisk stof.

I denne ansøgning benyttes udtrykkene "funktionel ingrediens", "funktionelt stof" eller "funktionel komponent" synonymt og refererer til substanser, der er kendt for at have ét af de følgende funktionelle træk eller aktiviteter: (a) antioxidant aktivitet; (b) aktivitet som stof til støtte for cellulær funktion og struktur; og (c) antiinflammatorisk aktivitet.

En antioxidant er således en forbindelse med antioxidant aktivitet; et stof til støtte for cellulær funktion og struktur er en forbindelse med aktivitet til støtte for cellulær funktion og struktur; og et antiinflammatorisk stof er en forbindelse med antiinflammatorisk aktivitet.

Udtrykket "antioxidant" benyttes heri i betydningen et stof, der kan forhindre eller reducere oxidativ (muskel) stress og skade i et individ. Antioxidanter inkluderer, men er ikke begrænset til, naturlige antioxidanter inkluderende ascorbinsyre eller derivater deraf såsom ascorbylpalmitat, samt tocoferoler, urteekstrater, resveratrol, carotenoider

og syntetiske antioxidanter, såsom butyleret hydroxytoluen, eller blandinger deraf. Et bredt udvalg af antioxidante stoffer er kommercielt tilgængelige fra kilder, der kendes af fagfolk.

Den benyttede antioxidant i forbindelse med den foreliggende frembringelse kan være en vandopløselig substans, der valgfrit kan vælges fra gruppen bestående af vitamin C, polyphenoler, proanthocyanidiner, anthocyaniner, bioflavonoider, en selenkilde (f.eks. natriumselenit, natriumselenat eller L-selenmethionin), alfa-liponsyre, glutathion, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechingallat, epicatechingallat og cystein.

Alternativt kan antioxidanten være en fedtopløselig substans, valgt frit fra gruppen bestående af vitamin E, gamma-tocopherol, alfa-caroten, beta-caroten, lutein, zeaxanthin, retinal, astaxanthin, cyrptoxanthin, naturlige blandede carotenoider, lycopen og resveratrol.

Formuleringen kan indeholde en flerhed af antioxidanter. Formuleringen kan valgfrit indeholde både fedtopløselige og vandopløselige antioxidanter. Formuleringen kan som antioxidanter valgfrit indeholde vitamin E, vitamin C og naturlige carotenoider såsom astaxanthin, zeaxanthin og lutein.

De ifølge frembringelsen anvendte antioxidanter kan være hydrofobe eller hydrofile. Fortrinsvis indeholder formuleringerne en blanding af hydrofobe og hydrofile antioxidanter. Antioxidanterne tjener, sammen med andre komponenter i formuleringen, til at hæmme resultaterne af oxidativ (muskel) stress og skade som følge af motion/træning eller andre typer af fysisk aktivitet.

Carotenoider er en foretrukket gruppe af antioxidanter, der finder anvendelse i frembringelsen. Disse antioxidanter udgør en klasse forbindelser, der er opdelt i to hovedgrupper: carotener og xanthofyller. I modsætning til carotener, som er rene polyenhydrocarboner, såsom betacaroten eller lycopen, så indeholder xanthofyller funktionelle oxygengrupper, såsom hydroxyler, epoxy og/eller oxogrupper. Typisk er ikke-begrænsende repræsentanter for xanthofylgruppen astaxanthin, canthaxanthin, lutein, fyxoxanthin, og zeaxanthin. Naturlige kilder med diætisk astaxathin inkluderer kril, krebs, biprodukter fra skaldyrsforarbejdning, bakterier, gær, alger og højerestående planter. Carotenoider kan også være udvundet syntetisk og kan

indeholde andre isomerer af carotenoider end dem, der indeholdes i de naturlige præparationer. Afhængigt af den forventede brug kan naturlige, syntetiske eller blandinger af naturlige og syntetiske carotenoider indgå på en lang række måder i frembringelsen. Eventuelt kan de inkluderes som olier, indkapslede olier eller blandinger.

Koncentrationerne af carotenoider i formuleringerne vil variere, men vil være i mængder, der er nyttige i kosttilskud.

Stoffet til støtte af cellulær funktion og struktur er fortrinsvis en olie udvundet af en marin organisme. Den udvundne olie fra en marin organisme kan udvindes af fisk, og fortrinsvis er fisken en koldtvandsfisk, og mere foretrukket laks, tun, helleflynder eller sild. Det foretrækkes dog, at olien er udvundet af marine hvirvelløse dyr, såsom mollusk eller skaldyr. Fortrinsvis er mollusken i en blæksprutte (tiarmet blæksprutte). Det mest foretrukne skaldyr er kril.

Eventuelt kan stoffet til støtte af cellulær funktion være en phospholipid såsom, uden begrænsning, phosphatidylcholiner såsom phosphatidylcholin (PC), dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), og andre disaturerede phosphatidylcholiner, phosphatidylethanolaminer, phosphatidylinositol, phosphatidylseriner såsom sphingomyelin eller andre keramider, forskellige andre phospholipider, phospholipid-indeholdende olier såsom lecithinolier udvundet af sojabønner, og blandinger og kombinationer deraf.

Phospholipiderne ifølge frembringelsen kan findes blandt polyumættet fedtsyre (PUFA)-rige ekstrakter af enkeltcelleorganismer såsom, men ikke begrænset til, Crypthecodinium sp., Schizochytrium sp., Mortierella sp. og Paracoccus sp. Phospholipider ifølge frembringelsen kan også være udvundet af animalske kilder inkluderende, men ikke begrænset til, animalske organekstrakter (f.eks. hjerne, lever, andet animalsk processpildprodukt), æggeblomme, æggeblommeekstrakter, fiskebiprodukter og fiskebiproduktekstrakter (dvs. bearbejdede spildprodukter fra fremstillingen af fiskemel eller renset fiskeolie).

I en foretrukket udførelsesform er stoffet til støtte for cellulære funktion og struktur en phospholipid ekstraheret fra eller til stede i olien af en marin organisme som beskrevet ovenfor. Phospholipider fra marine hvirvelløse dyr foretrækkes. Særligt foretrukne phospholipider stammer fra mollusk, mere foretrukket blæksprutter, og fra skaldyr,

mere foretrukket kril. De mest foretrukne phospholipider stammer fra Euphausiider fra gruppen Euphausiacia, der er almindelig kendt som kril. Phospholipider, der egner sig til denne frembringelse, inkluderer dem fra krilolie inkluderende sådanne olier, som indeholder ca. 70 w/w procent omega-3 phospholipider ud af den totale mængde phospholipider; og har en mængde phospholipider der set i forhold til den samlede lipidmængde udgør ca. 40% (40 g/100 g). Den samlede mængde omega-3 fedtsyre er 36 w/w procent af den samlede mængde fedtsyrer.

Formuleringen kan indeholde en flerhed af stoffer til støtte for cellulær funktion og struktur. Yderligere, mulige stoffer til støtte for cellulær funktion og struktur inkluderer de, som afledes fra andre phospholipidkilder f.eks. fra æggeblommer, okselever, kohjerne og soja; samt fra en vilkårlig anden kilde af triglycerid omega-3 fedtsyrer f.eks. fra hørfrø, valnødder, hampefrø, sojabønner og nogle sortgrønne bladrige grøntsager, majsolie, safflorolie, solsikkeolie, og rapsolie eller ganske særligt fra koldtvandsfisk inkluderende laks, tun, helleflynder og sild.

Det antiinflammatoriske stof er fortrinsvis olie udvundet af en marin organisme. Olien kan være udvundet af fisk, og fortrinsvis er fisken en koldtvandsfisk, især laks, tun, helleflynder eller sild. Imidlertid foretrækkes det, at olien er udvundet af marine hvirvelløse dyr såsom mollusk eller skaldyr. Mollusken er fortrinsvis en blæksprutte (tiarmet blæksprutte). Særlig foretrukket er skaldyrene kril.

Det antiinflammatoriske stof består valgfrit af en omega-3 fedtsyre. Fortrinsvis er omega-3 fedtsyren valgt fra gruppen bestående af α-linolensyre, eicosapentaensyre, docosapentaensyre og docosahexaensyre.

Omega-3 fedtsyre er velkendte forbindelser, som kan fremkomme fra forskellige kilder, men de findes sædvanligvis naturligt i overflod i vævet i koldtvandsfisk og andre marine organismer, såsom skaldyr (f.eks. kril) og mollusk (såsom blæksprutter).

Kilden med omega-3 fedtsyre kan valgfrit være hørfrø, hørfrøolie, valnødder, rapsolie, hvedekim eller olie fra fisk, mollusk eller skaldyr. Formuleringen kan indeholde flere antiinflammatoriske stoffer.

De omega-3 fedtsyrer, som anvendes i de foreliggende formuleringer til at øge hastigheden af den regenererende muskelfunktion ifølge frembringelsen, er fortrinsvis

DHA (docosahexaensyre), EPA (eicosapentaensyre) og α-linolsyre (ALA). For enkelhedens skyld anvendes udtrykket "DHA" heri som refererende til en vilkårlig af disse tre omega-3 fedtsyrer eller til en blanding af to eller tre af disse omega-3 fedtsyrer. Med andre ord, når udtrykket "DHA" bliver anvendt, skal fagmanden forstå, at enten DHA, EPA, ALA eller en blanding af to eller tre af EPA, DHA og ALA kan anvendes i dette tilfælde. Fortrinsvis vil mindst en tredjedel af omega-3 blandingen bestå af DHA og/eller EPA. Når en blanding af EPA til DHA bliver anvendt, så kan forholdet mellem EPA og DHA ligge fra ca. 1,0 til ca. 10,0, fortrinsvis fra ca. 1,0 til 5,0 navnlig fra ca. 1,0 til 4,0. Endnu mere foretrukket er det, at forholdet mellem EPA og DHA, når der anvendes en blanding, ligger i intervallet 1,0 til 2,0 EPA:DHA.

En foretrukket blanding ifølge frembringelsen udvindes af blæksprutter og har typisk et forhold mellem EPA og DHA på 1:4. Den foretrukne blanding ifølge frembringelsen er sædvanligvis udvundet af skaldyr og har typisk et forhold mellem EPA og DHA på mellem 1,7 og 1,9. Fortrinsvis bliver blandingen udvundet af kril, fordi omega-3 phospholipider, som den største omega-3 fedtsyrekilde i krilolie, følger enklere fordøjelses- og distributionsruter end omega-3 triglycerider, i menneskekroppen. Større biotilgængelighed og bioeffektivitet af omega-phospholipider i forhold til omega-3 triglycerider påvirker cellulær absorption, funktion og fordeling af omega-3.

Alternativt eller i tillæg kan ethvert andet anti-inflammatorisk stof med naturlig oprindelse finde anvendelse. Som eksempel inkluderer sådanne anti-inflammatoriske stoffer oleocanthal, beta-glucaner, ekstrakter af nødder, frø og visse krydderier såsom ingefær, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, vitaminer såsom vitamin C eller D, samt også smagsforstærkere af prostaglandiner med anti-inflammatoriske egenskaber.

Valgfrit kan olien, der er udvundet fra en marin organisme, opfylde to funktioner. For det første opfylder olien funktionen som et antiinflammatorisk stof, og for det andet opfylder den funktionen af et stof til støtte for cellulær funktion og struktur.

I en foretrukket udførelsesform for frembringelsen opfylder krilolie to funktioner. For det første opfylder krilen funktionen som antiinflammatorisk stof, og for det andet opfylder den funktionen som stof til støtte for cellulær funktion og struktur. I en anden foretrukket udførelsesform for frembringelsen opfylder blæksprutter to funktioner, for det første opfylder blæksprutten funktionen som antiinflammatorisk stof og for det andet opfylder den funktionen som stoffet til støtte for cellulær funktion og struktur.

Phospholipider fra krilolie eller fra blæksprutteolie kan, udover deres virkninger som stoffer til støtte af cellulær funktion og struktur, blive anvendt som antiinflammatoriske stoffer i formuleringer ifølge frembringelsen. Omega-3 fedtsyre fra krilolie eller fra blæksprutteolie kan, udover deres antiinflammatoriske virkning, også blive anvendt som stoffer til støtte for cellulær funktion og struktur i formuleringerne ifølge frembringelsen.

Derfor er der ifølge frembringelsen specifikt inkluderet det scenario, hvor formuleringen omfatter hver af komponenterne a), b) og c), som nævnt ovenfor, men et produkt eller en sammensætning er både komponent a) og komponent b) eller både komponent b) og komponent c), eller både komponent a) og komponent c). Alternativt betragtet er der inden for rammerne af frembringelsen inkluderet formuleringer, hvori to af komponenterne a) til c) fra den samme kilde eller er det samme produkt eller sammensætning. Fortrinsvis er krilolie eller blæksprutteolie begge både det anti-inflammatoriske stof og stoffet til understøttelse af cellulær funktion og struktur.

I et yderligere aspekt af frembringelsen tilvejebringes en diætformulering omfattende:

a) en antioxidant; og
b) olie udvundet fra en marin organisme.

Antioxidanten og olien udvundet fra en marin organisme kan være som beskrevet overalt heri.

Formuleringen kan omfatte flere antioxidanter og/eller flere olier udvundet fra marine organismer, eller komponenter deraf, som beskrevet overalt heri. Formuleringen kan omfatte yderligere antiinflammatoriske stoffer og/eller stoffer til støtte for cellulær struktur og funktion, som beskrevet overalt heri.

I et yderligere aspekt tilvejebringes ifølge frembringelsen en sammensætning, der er et dyrefoderprodukt, et kosttilskud eller et humant fødevareprodukt, omfattende den ovenfor nævnte formulering, eller overalt heri.

I et yderligere aspekt af frembringelsen tilvejebringes en formulering som anført ovenfor eller overalt heri til brug i bekæmpelse af en overdreven motion-induceret eller

fysisk aktivitet-induceret tilstand i et subjekt eller til at reducere oxidativ muskelstress eller muskelskade.

Alternativt betragtet er der tilvejebragt brug af frembringelsen til at bekæmpe en hård motion-induceret eller fysisk aktivitet-induceret tilstand eller reduktion af oxidativ muskelstress eller muskelskade i et subjekt bestående i, at subjektet indtager en formulering som beskrevet ovenfor eller overalt heri

De ovenfor eller overalt heri omtalte formuleringer bliver anvendt i en mængde, der er effektiv til at bekæmpe de negative resultater af en motion-induceret eller fysisk aktivitet-induceret tilstand såsom oxidativ stress og oxidativ skade. Valgfrit kan nævnte hård motion-induceret eller fysisk aktivitet-induceret tilstand vælges fra gruppen bestående af forsinket muskelømhed DOMS (Delayed Onset Muscle Soreness), muskelkramper eller -spasmer, muskelsmerter, muskelatrofi, muskelskader såsom forstrækninger og muskelfibersprængning, muskelsvækkelse og -tunghed, metaboliske muskellidelser, muskelømhed og muskeltræthed.

Ligeledes er der tilvejebragt brug af formuleringen som defineret overalt heri, til accelereret reduktion af muskelstress og -skade efter motion og/eller træning. Fortrinsvis tilvejebringer formuleringerne ifølge frembringelsen samtidigt en immunitetsforøgende virkning på individet, hvortil formuleringerne bliver administreret.

I visse udførelsesformer bliver formuleringen administreret som del af et diætregime, f.eks. én eller flere gange om dagen, én eller flere gange om ugen eller mindre frekvent, afhængigt af omfanget af motion eller fysisk aktivitet. Administreringen kan ske over en vilkårlig tidsperiode, som bedømmes effektivt, f.eks. én uge, én måned, tre måneder eller ét år eller mere, eller udstrakt til varigheden af subjektets liv.

Andre træk og fordele ved frembringelsen vil kunne forstås med reference til den detaljerede beskrivelse og eksempler, der følger.

DETALJERET BESKRIVELSE AF FREMBRINGELSEN

Udfordringerne ved muskelstress og -skade efter aktivitet/motion kan ikke blive løst ved administrering af et af de ovenfor beskrevne stoffer alene, fordi tilstandene ikke stammer fra kun én kilde. I stedet vil en kombination af forskellige årsager føre til disse

tilstande. Derfor vil en kombination af stofferne beskrevet ovenfor, fortrinsvis i specifikke koncentrationer, sætte individet i stand til at regenerere med en meget større hastighed i sammenligning med brug af almindelig kost, indtagelse af ét stof alene eller endog ved at tilsætte aktive, kendte modforanstaltninger. Yderligere tillader formuleringerne ifølge frembringelsen positive synergier mellem sine komponenter, hvilke synergier er fordelagtige til behandling af de ovennævnte tilstande. I tillæg til brugen af disse formuleringer som midler til at modvirke en eksisterende tilstand, så er sammensætningerne ifølge frembringelsen særligt fordelagtige som profylakse før motion eller fysiske aktiviteter.

Eksemplerne heri viser navnlig den exceptionelle og overraskende virkningsgrad af formuleringerne ifølge frembringelsen, navnlig indvirkningen fra den marine olie og af kombinationer af antioxidanter.

I tillæg til brugen af disse formuleringer som midler til at modvirke en eksisterende tilstand, er sammensætningerne ifølge frembringelsen særligt nyttige som profylakse før motion eller fysiske aktiviteter.

"Effektiv mængde" refererer til en mængde af en forbindelse, et materiale eller sammensætning som beskrevet heri, der er effektivt til at opnå et særligt biologisk resultat jævnfør formålet for frembringelsen. En sådan effektiv aktivitet kan blive opnået, f.eks. ved administrering af sammensætninger ifølge frembringelsen til et individ.

Et "subjekt" eller "individ" refererer til et dyr af en vilkårlig race. I forskellige udførelsesformer er dyret et pattedyr, og kan være et menneske.

Udtrykket "muskelskade", "muskellidelser", "motion-induceret muskellidelser", "muskeltilstande", "muskelstress" og lignende udtryk refererer til tilstande af muskelændringer som resultat af hård motion eller fysisk aktivitet. Sådanne tilstande inkluderer, men er ikke begrænset til, muskelkramper eller -spasmer, muskelsmerte, muskelatrofi, muskelskader såsom forstrækninger og muskelfibersprængning, muskelsvækkelse og -tunghed, metaboliske muskellidelser, muskelømhed, muskeltræthed, muskelstivhed og mangel på muskelfleksibilitet.

Som beskrevet heri betyder et "kosttilskud", et produkt, der er beregnet til at blive indtaget i tillæg til den normale kost for et dyr. Dyret er et pattedyr og kan være et menneske.

I sammenhæng med frembringelsen kan ingredienserne blive kombineret i forskellige formuleringer. Blot som eksempel omfatter én formulering mindst én antioxidant, fortrinsvis én vandopløselig antioxidant og én fedtopløselig antioxidant. En anden formulering omfatter mindst én funktionel ingrediens, der reducerer inflammation.

De følgende dele af beskrivelsen vedrører oral administrering af tabletter, capletter eller kapsler omfattende formuleringen ifølge frembringelsen. Denne administreringsmåde og disse fysiske produkter er blot eksempler, og brugen af sådanne eksempler skal ikke udelukke andre administreringsmåder eller andre typer produkter.

I én udførelsesform er den gennemsnitlige totale fyldning af en sammensætning (tablet, caplet, kapsel osv.) omfattende formuleringen ca. 555 mg. Hvis der forekommer et overtræk på sammensætningen, så vil fyldvægten af kapslen der indeholder formuleringen og eventuelle excipienser, fortrinsvis være ca. 555 mg, og kapselskallen vejer ca. 205 mg. Således vejer sammensætningen ca. 760 mg. Disse vægte gives blot som eksempel, og en fagmand ville være opmærksom på andre vægte af sammensætninger, fyldninger og skaller, som kunne blive anvendt.

Alle de nedenstående w/w% værdier er baseret på denne foretrukne gennemsnitlige fyldningsvægt. Fagmanden på området for nutraceutika og tilskud vil forstå, at forskellige typer tabletter eller capletter kan finde anvendelse til at afgive formuleringen ifølge frembringelsen, og at disse kan have forskellige vægte og kan omfatte forskellige mængder af formuleringen. En fagmand vil derfor anerkende, at forholdene mellem ingredienserne i et afgivelsesobjekt omfattende formuleringen ifølge frembringelsen kan variere afhængigt af vægten af afgivelsesobjektet, mængden af den foreliggende formulering, typen af administrering, og mange andre parametre. Fagmanden ville også huske de maksimale og anbefalede daglige indtagelsesdoser for hver af komponenterne i formuleringen, når man bestemmer de nøjagtige mængder, som skal inkluderes i tabletten, kapslen eller andet afgivelsesobjekt. Udtrykket "kapsel", når det anvendes nedenfor, er blot et eksempel, og et ethvert andet afgivelsesobjekt eller sammensætning kunne blive anvendt i stedet for.

I en anden udførelsesform er den samlede gennemsnitlige fyldningsvægt af en kapsel indeholdende formuleringen, ca. 560 mg. Dette overtræk (eller skal) findes på kapslen og vejer ca. 205 mg. I alt vejer sammensætningen ca. 765 mg. I en anden udførelsesform er den gennemsnitlige totale fyldningsvægt af en kapsel indeholdende formuleringen ca. 673 mg. Et overtræk (skal) findes på kapslen og vejer ca. 250 mg. I alt vejer sammensætningen ca. 923 mg. Igen skal disse vægte blot tages som eksempler, og en fagmand ville være klar over af også andre vægte af sammensætninger, fyldninger og skaller kan finde anvendelse. Fyldningens, skallens og den samlede kapsels vægt kan variere med +/- ca. 20%, især +/- ca. 10%.

"Olie udvundet fra en marin organisme" (komponent (b)) findes typisk i formuleringen ved en koncentration på ca. 30 til 90%, især ca. 40 til 90%, og særligt foretrukket ca. 40 til 60% eller ca. 54% til 90%, mest foretrukket ca. 55 w/w procent, eller i en mængde på ca. 150 til 500 mg, især ca. 225 til 500 mg, mere foretrukket ca. 225 til 350 mg eller ca. 300 til 500 mg, mest foretrukket ca. 300 mg pr. enhed dosisform.

Hvis de forefindes, så vil den kombinerede koncentration (w/w) af carotenoider i kapslen fortrinsvis ligge i intervallet mellem ca. 0,1 til 10%, navnlig 0,1 til 9%, mere foretrukket 0,1 til 5%, og mest foretrukket 0,18 til 4,5%. Alternativt betragtet, hvis de forekommer, vil mængden af carotenoider i kapslen som helhed fortrinsvis udgøre ca. 1 til 50 mg.

Forskellige carotenoider kan forekomme i forskellige koncentrationer/mængder. F.eks., hvis de forekommer, er astaxanthin fortrinsvis til stede i en koncentration på ca. 0,1 til 2%, mere foretrukket 0,18 til 1,8% (w/w) eller i en mængde på ca. 1 til 25 mg, og mest foretrukket ca. 1 til 20 mg, endnu mere foretrukket ca. 1 til 5 mg, og mest foretrukket ca. 2 mg pr. kapsel. Astaxanthin kan forekomme i sammensætningen i form af et astaxanthin-indeholdende produkt, der ikke kun består af astaxanthin, og mængden af dette produkt, som skal inkluderes i sammensætningen for at tilvejebringe det krævede astaxanthinniveau, vil en fagmand let kunne fastlægge. F.eks. findes der tilgængeligt astaxanthin-indeholdende sammensætninger bestående af ca. 10% astaxanthin. Hvis astaxanthin findes i form af et produkt indeholdende ca. 10% astaxanthin så omfatter sammensætningen fortrinsvis ca. 10 til 250 mg, mere foretrukket ca. 10 til 200 mg, stadig mere foretrukket ca. 10 til 50 mg, og mest foretrukket ca. 20 mg pr. kapsel af dette produkt.

Hvis der forekommer lutein/zeaxanthin (dvs. lutein og zeaxanthin sammen), optræder de fortrinsvis i en samlet koncentration på ca. 0,1 til 3%, mere foretrukket ca. 0,18 til 2,7%, endnu mere foretrukket ca. 1,0 til 1,4 w/w procent eller i en mængde på ca. 1 til 35 mg, mere foretrukket ca. 1 til 10 mg, og mest foretrukket ca. 6,5 til 7,5 mg pr. kapsel.

De individuelle koncentrationer af de forskellige carotenoider vil ikke nødvendigvis være de samme. Fortrinsvis er forholdet mellem lutein og zeaxanthin, som er til stede, ca. 7:1 til 4:1, mere foretrukket ca. 5:1. Fortrinsvis optræder lutein ved en koncentration på ca. 0,15 til 1,8%, mere foretrukket ca. 0,75 til 1,35%, mest foretrukket ca. 0,9 til 1,07 w/w procent eller i en mængde på ca. 1 til 10 mg, mere foretrukket ca. 5 til ca. 7,5 mg, mest foretrukket ca. 6 mg pr. kapsel. Fortrinsvis optræder zeaxanthin ved en koncentration af ca. 0,03 til 0,4%, mere foretrukket ca. 0,15 til 0,28%, mest foretrukket ca. 0,18 til 0,2 w/w procent, eller i en mængde på ca. 0,2 til 5 mg, mere foretrukket ca. 1 til 1,5 mg, mest foretrukket ca. 1,2 mg pr. kapsel.

Lutein og zeaxanthin kan blive tilført sammensætningen separat eller samlet i et enkelt kommercielt produkt. Lutein og zeaxanthin kan optræde i sammensætningen i form af produkter, som ikke kun består af lutein og zeaxanthin, og mængden af produktet, der skal inkluderes i sammensætningen for at tilvejebringe det ønskede niveau af lutein og zeaxanthin, vil nemt kunne fastlægges af fagmanden.

Som nævnt ovenfor kan der i formuleringer ifølge frembringelsen være tilsat andre antioxidanter, såsom vitamin E og/eller vitamin C, hvilke udviser antioxidantfunktion.

Der er ingen kendt, optimal, daglig dosis af vitamin C, skønt den i USA anbefalede kosttilsætning er 60 mg. Imidlertid har doser på 1,0 g og mere ofte været indtaget som et supplement til det almindelige helbred uden negative sideeffekter og alle sådanne doser er nyttige i formuleringerne ifølge frembringelsen. Skønt ascorbinsyre eller hyben kan finde anvendelse, så benytter den foreliggende frembringelse fortrinsvis vitamin C i form af natriumascorbat, fordi det er let at opløse i fordøjelsessystemet og medfører relativt minimal irritation. hvis der forekommer vitamin C, optræder det valgfrit i en koncentration af ca. 2 til 90%, ca. 2 til 50%, ca. 2%, eller ca. 1,26% (w/w) eller valgfrit i en mængde på ca. 10 til 1000 mg, 12 til 50 mg eller 12 mg pr. kapsel.

Fortrinsvis optræder vitamin C ved en koncentration på ca. 1 til 50%, mere foretrukket ca. 2 til 25%, mest foretrukket ca. 5 til 12% (w/w), eller i en mængde på ca. 5 til 300 mg, mere foretrukket ca. 10 til 150 mg, mest foretrukket ca. 30 til 80 mg pr. kapsel. Vitamin C kan optræde i sammensætningen i form af et produkt, der ikke kun indeholder vitamin C, og mængden af dette produkt, der skal inkluderes i sammensætningen for at tilvejebringe det krævede niveau af vitamin C, vil let kunne fastsættes af fagmanden.

Fortrinsvis er der tilsat vitamin C/ascorbinsyre i form af et produkt, fortrinsvis et frugtekstrakt f.eks. en Acerola eller Emblica officinalis ekstrakt, som omfatter ca. 17% eller ca. 50% vitamin C. Hvis sådanne produkter bliver anvendt, så omfatter sammensætningen fortrinsvis ca. 30 til 1000 mg, mere foretrukket ca. 60 til 500 mg, mest foretrukket ca. 175 mg af produktet pr. kapsel.

Den aktuelle U.S. Recommended Dietary Allowance (RDA) af vitamin E er 10 mg/dag. Hvis vitamin E er til stede, optræder den fortrinsvis i en koncentration på ca. 0,2 til 25%, mere foretrukket ca. 0,32 til 22,5%, endnu mere foretrukket ca. 1 til 5%, og mest foretrukket ca. 1,8 til 2,15% (w/w), eller i en mængde på ca. 0,5 til 250 mg, mere foretrukket ca. 1,8 til 125 mg, endnu mere foretrukket ca. 5 til 30 mg, og mest foretrukket ca. 12 mg pr. kapsel. Vitamin E kan optræde i sammensætningen i form af et produkt, der ikke kun består af vitamin E, og mængden af dette produkt, der skal inkluderes i sammensætningen for at tilvejebringe det krævede niveau af vitamin E, vil let kunne fastslås af fagmanden. Fortrinsvis optræder vitamin E i form af en D-α-tocopherol, som er bredt tilgængelig og kendt for at have vitamin E aktivitet.

Yderligere ingredienser, som kan optræde i formuleringen ifølge frembringelsen er vitaminer, såsom vitamin A, vitamin A acetat, vitamin A palmitat, riboflavin, vitamin B, ascorbinsyre, ascorbylpalmitat, nicotinsyre, nicotinamid, pyridoxinhydrochlorid, vitamin D3, (også kendt som cholecalciferol og calciol), tocopherol, tocopherolacetat, tocopherolpalmitat, tocotrienol, vitamin K, thiamin, calciumpantothenat, biotin, lipolsyre, foliesyre, og folisyrederivater såsom forbindelser med vitamin eller coenzymkarakteristika, såsom cholinchlorid, carnitin, taurin, creatin, ubiquinoner, S-methylmethionin og S-adenosylmethionin. Disse vitaminer kan, hvor det er passende, enten blive anvendt som antioxidanter ifølge frembringelsen eller som yderligere faktorer til støtte for én eller flere ingredienser i formuleringen følge frembringelsen eller ganske enkelt tjene som yderligere nyttige ingredienser.

Hvis der forekommer vitamin D_3, optræder det fortrinsvis i en koncentration af ca. 0,0005 til 0,0015%, mere foretrukket ca. 0,0006 til 0,0010%, mest foretrukket ca. 0,0007 til 0,0009% (w/w) eller i en mængde af ca. 2 til 20 mikrogram, mere foretrukket ca. 3 til 10 mikrogram, mest foretrukket ca. 5 mikrogram pr. kapsel. Vitamin D_3 kan optræde i sammensætningen i form af et produkt, der ikke kun består af vitamin D_3, og mængden af dette produkt, der skal inkluderes i sammensætningen for at tilvejebringe det krævede niveau af vitamin D_3, vil let kunne fastslås af en fagmand.

Hvis der optræder krilolie, er den fortrinsvis til stede ved en koncentration af ca. 30 til 90%, mere foretrukket ca. 40 til 90%, stadig mere foretrukket ca. 40 til 60% eller ca. 54 til 90%, mest foretrukket ca. 55% (w/w) eller i en mængde på ca. 150 til 500 mg, mere foretrukket ca. 225 til 500 mg, mere foretrukket ca. 225 til 350 mg eller ca. 300 til 500 mg, og mest foretrukket ca. 300 mg pr. kapsel.

Hvis blæksprutteolie forekommer, er den fortrinsvis til stede i en koncentration af ca. 25 til 75%, mere foretrukket ca. 35 til 50%, mest foretrukket ca. 45% (w/w) eller i en mængde på ca. 150 til 500 mg, mere foretrukket ca. 225 til 350 mg, og mest foretrukket ca. 300 mg pr. kapsel.

Valgfrit kan formuleringen ifølge frembringelsen også omfatte fysiologisk acceptable excipienser såsom, men ikke begrænset til, lecithin, monoglycerider, glycerolmonostearat og sojabønneolie. Hvis kapselfyldningen er ca. 555 mg eller ca. 560 mg, er den samlede mængde excipienser i fyldningen fortrinsvis ca. 5 til 15 mg, mere foretrukket ca. 8 mg, men den kan dog varieres stort mellem forskellige sammensætninger, og en fagmand ville være klar over de passende mængder af excipienser, som kan optræde.

En foretrukket formulering omfatter krilolie, vitamin C, og én eller flere af (f.eks. alle af) astaxanthin, lutein og zeaxanthin. Navnlig foretrukket omfatter formuleringen også vitamin E og/eller vitamin E. Valgfrit kan formuleringen også omfatte lecithin som en excipiens. Alle mulige kombinationer af koncentrationerne og mængderne, som beskrevet heri er hver af disse komponenter påtænkes explicit som en del af frembringelsen. Ligeledes påtænkes formuleringer, hvori mængden eller koncentrationen af en vilkårlig given én, to, tre, fire, fem, seks eller syv komponenter er specificeret, mens mængderne eller koncentrationerne af de andre komponenter ikke er specificeret. Alle potentielle arrangementer af komponenter med specificeret/ikke-

specificeret mængder eller koncentrationer påtænkes explicit som en del af frembringelsen.

En alternativ formulering omfatter blæksprutteolie, vitamin C (ovenfor), og én eller flere af (f.eks. alle af) astaxanthin, lutein og zeaxanthin. Særlig foretrukket omfatter formuleringen også vitamin D og/eller vitamin E. Formuleringen kan valgfrit også omfatte en vilkårlig eller alle af lecitin, monoglycerider, glycerolmonostearat og sojabønneolie som excipienser. Alle mulige kombinationer af de ovennævnte koncentrationer og mængder af hver af disse komponenter påtænkes explicit som en del af frembringelsen. Der påtænkes også formuleringer, hvori mængden eller koncentrationen af en vilkårlig given af én, to, tre, fire, fem, seks eller syv komponenter er specificeret, mens mængderne eller koncentrationerne af de andre komponenter ikke er specificeret. Alle potentielle arrangementer er komponenter med specificerede/ikke-specificerede mængder eller koncentrationer påtænkes explicit som en del af frembringelsen.

I en som eksempel tjenende udførelsesform tilvejebringes ifølge frembringelsen en formulering omfattende krilolie, 300-500 mg/kapsel eller 54 til 90%(w/w); vitamin E, 1,8-125 mg/kapsel eller 0,32 til 22,5 %/w/w); vitamin C, 12 til 500 mg/kapsel eller 2,16 til 90 %(w/w); lutein/zeaxanthin, 1 til 20 mg/kapsel eller 0,18 til 1,8 %(w/w). Eventuelt omfatter denne formulering også fysiologisk accepterede excipienser såsom, men ikke begrænset til, lecithin.

Fortrinsvis omfatter formuleringen 300 mg krilolie, 20,6 mg vitamin E, 176,5 mg vitamin C og 34,3 mg lutein/zeaxanthin i forholdet 5:1 og 22 mg astaxanthin. Eventuelt kan denne formulering også omfatte fysiologisk accepterede excipienser såsom, men ikke begrænset til, lecithin.

I et yderligere eksempel på en udførelsesform tilvejebringer frembringelsen en formulering omfattende krilolie (ca. 40 til 60% (w/w) eller ca. 225 til 350 mg pr. kapsel), astaxanthin (ca. 0,25 til 0,4% (w/w) eller ca. 1 til 5 mg pr. kapsel), lutein (ca. 0,75 til 1,35% (w/w) eller ca. 5 til 7,5 mg pr. kapsel), zeaxanthin (ca. 0,15 til 0,28% (w/w) eller ca. 1 til 1,5 mg pr. kapsel), vitamin C (ca. 2 til 25% (w/w) eller ca. 30 til 80 mg pr. kapsel), vitamin E (ca. 1 til 5% (w/w) eller ca. 5 til 30 mg pr. kapsel), og valgfrit også vitamin D (ca. 0,0006 til 0,0010% (w/w) eller ca. 3 til 10 mikrogram pr. kapsel). Valgfrit

kan denne formulering også omfatte fysiologisk accepterede excipienser såsom, men ikke begrænset til, lecithin.

I et yderligere eksempel på en udførelsesform tilvejebringer frembringelsen en formulering omfattende blæksprutteolie (ca. 35 til 50% (w/w) eller ca. 225 til 350 mg pr. kapsel), astaxanthin (ca. 0,25 til 0,4% (w/w) eller ca. 1 til 5 mg pr. kapsel), lutein (ca. 0,75 til 1,35% (w/w) eller ca. 5 til 7,5 mg pr. kapsel), zeaxanthin (ca. 0,15 til 0,28% (w/w) eller ca. 1 til 1,5 mg pr. kapsel), vitamin C (ca. 2 til 25% (w/w) eller ca. 30 til 80 mg pr. kapsel), vitamin E (ca. 1 til 5% (w/w) eller ca. 5 til 30 mg pr. kapsel), og valgfrit også vitamin D (ca. 0,0006 til 0,0010% (w/w) eller ca. 3 til 10 µg pr. kapsel). Valgfrit kan denne formulering også omfatte fysiologisk accepterede excipienser, såsom, men ikke begrænset til, lecithin, monoglycerider, glycerolmonostearat og sojabønneolie.

Valgfrit kan formuleringen omfatte 300 mg krilolie, 20,6 mg vitamin E, 176,5 mg vitamin C og 34,3 mg lutein/zeaxanthin i forholdet 5:1 og 22 mg astaxanthin. Eventuelt kan denne formulering også omfatte fysiologisk accepterede excipienser såsom, men ikke begrænset til, lecithin.

Formuleringer med følgende specifikke sammensætninger er tilvejebragt:

Krilolie-indeholdende formulering

Komponent	Mængde komponent pr. kapsel	Konc. (% w/w) af komponent i formulering	Konc. (% w/w) af komponent i komponent-indeholdende produkt optrædende i formulering	Mængde komponent-indeholdende produkt pr. kapsel
Krilolie	300 mg	53,6	100	300 mg
Vitamin C	30 mg	5,36	17	176,5 mg
Astaxanthin	2 mg	0,36	10	20 mg
Lutein	6 mg	1,07	21% (kombineret total: Lutein og zeaxanthin i et kombineret produkt i et 5:1 forhold)	34,3 mg
Zeaxanthin	1,2 mg	0,21		
Vitamin D	5 µg	0,0009	1,88	0,266 mg
Vitamin E	12 mg	2,14	58,4	20,56 mg
Lecithin	8,372 mg	1,5	100	8,37 mg
			Total fyldningsvægt	**560 mg**

Blæksprutteolie-indeholdende formulering

Komponent	Mængde komponent pr. kapsel	Konc. (% w/w) af komponent i formulering	Konc. (% w/w) af komponent i komponent-indeholdende produkt optrædende i formulering	Mængde af komponent-indeholdende produkt pr. kapsel
Blæksprutteolie	312,5 mg	46,4	100	312,5 mg
Vitamin C	80 mg	11,89	50	176 mg
Astaxanthin	2 mg	0,30	10	21 mg
Lutein	6 mg	0,89	21% (kombineret total: Lutein og zeaxanthin i et kombineret produkt i et 5:1 forhold)	34,3 mg
Zeaxanthin	1,2 mg	0,18		
Vitamin D	5 µg	0,0007	1,88	0,266 mg
Vitamin E	12 mg	1,78	58,4	20,56 mg
Excipienser	108,37 mg	16,1	100	108,37 mg
			Total fyldningsvægt	**673 mg**

Formuleringen ifølge frembringelsen er valgfrit i form af en kapsel. Fortrinsvis er komponenterne i kapselskallen valgt fra gruppen bestående af gelatine, glycerin og vand. Alt efter forekomsten omfatter kapselskallen fortrinsvis ca. 60%, navnlig ca. 63,41% eller ca. 60,8% gelatine, ca. 30%, mere foretrukket ca. 29,09% eller ca. 27,89% glycerin, og ca. 8% til 12%, navnlig ca. 8%, endnu mere foretrukket ca. 7,49% vand.

De ifølge frembringelsen anvendte ingredienser kan være blandet på forhånd med andre komponenter i sammensætningen for at tilvejebringe de nødvendige fordelagtige mængder; kan være et overtræk på en dyrefodersammensætning; eller kan være tilsat sammensætningen, før den tilbydes til subjektet.

Kostformuleringerne og -sammensætningerne ifølge frembringelsen kan valgfrit omfatte supplerende substanser, såsom andre vitaminer, mineraler, salte, aroma-stoffer, farvestoffer, og konserveringsmidler. Ikke-begrænsende eksempler på supplerende mineraler inkluderer calcium, phosphor, kalium, natrium, jern, chlorid, bor, kobber, zink, mangan, iod, selen og lignende. Ikke-begrænsende eksempler på supplerende vitaminer inkluderer, forskellige B vitaminer, vitamin D og vitamin K. Yderligere kosttilskud kan også være inkluderet f.eks. niacin, pantothensyre, insulin, folinsyre, biotin, aminosyrer og lignende.

Formuleringerne kan også omfatte ét eller flere stivnende, svellende og agglomererende stoffer (under ét omtalt som "stivnende stoffer"). De stivnende stoffer bliver anvendt både i tabletter og til generering af faste bærere, såsom småperler, der er i stand til at transformere olier til stabile agglomerater, der egner sig for granulering, blanding og komprimering, med henblik på at slå tabletter. Eksempler på stivnende stoffer, der er egnede til fremstilling af formuleringerne inkluderer, men er ikke begrænset til, sucrose, glucose, fructose, stivelser (f.eks. majsstivelse), sirupper (f.eks. majssirup), og ioniske og ikke-ioniske polymere inkluderende, men ikke begrænset til, PEG og andre polyether-lignende alkoxycelluloser (HPMC), gellan, carregeenan, guar, hyaluronater, alginater, chondroitinsulfat, pectiner og proteiner, (f.eks. collagen eller deres hydrolyserende produkter (f.eks. gelatiner eller polypeptider)). Andre stivnende stoffer som kendes af fagfolk inden for fremstilling af kosttilskud kan også anvendes til fremstilling af formuleringerne ifølge frembringelsen. Mængden af stivnende stoffer vil variere i afhængighed af de andre komponenter, der indeholdes i formuleringen, men vil generelt omfatte størsteparten af vægt og volumen af kosttilskuddet.

Formuleringerne ifølge frembringelsen kan også omfatte yderligere excipienser, der er nyttige under tilberedning og færdiggørelse af kosttilskuddene. Sådanne excipienser kan inkludere langsomt opløselige polymerovertræksstoffer, som kan anvendes til at forlænge opløsningen af formuleringen i fordøjelseskanalen. Eksempler på sådanne polymere inkluderer, men er ikke begrænset til, ioniske og ikke-ioniske polymere, såsom PEG og andre polyether-lignende alkoxycelluloser (HPMC), gellan, carregeenan, Eucheuma gelaten, stilvelse, hyaluronater, chondroitinsulfat, pectiner og proteiner f.eks. collagen. Fordi xanthophyl/carotenerne er stærkt pigmenterede, så kan der anvendes coatingteknologi på kosttilskuddet med henblik på at tilvejebringe et kosttilskud med ensartet farve. Eksempler på farvecoatingstoffer kan inkludere, men er ikke begrænset til, polymere, farvestoffer, tætningsmidler og overfladeaktive stoffer inkluderende, men ikke begrænset til, fedtsyre og estere, di- og triglycerider, phospholipider inkluderende mono- og di-alkylglycerylphosphater, ikke-ioniske stoffer (såsom sukker, polysaccharider f.eks. HPMC og polysorbat 80) og ioniske stoffer.

Kosttilskuddene kan blive fremstillet ved brug af en række kendte teknikker. De heri beskrevne ingredienser er fortrinsvis til stede i kosttilskuddene ifølge frembringelsen i en tilstrækkelig mængde til at tilvejebringe den daglige dosis (konsumeret mængde pr. dag), når det anbefalede antal kosttilskud bliver fortæret pr. dag. Det foretrækkes dog,

at kosttilskuddet som beskrevet heri indeholdt de beskrevne mængder af i det mindste vitamin C, vitamin E, krilolie (phospholipider), lutein, zeaxanthin og astaxanthin.

Fagmanden vil kunne forstå, hvorledes han fastlægger den passende mængde ingredienser, som skal tilsættes til en bestemt kostformulering eller sammensætning ifølge den foreliggende frembringelse. De faktorer, der kan tages i betragtning inkluderer typen af sammensætning (f.eks. kæledyrsfodersammensætning versus kosttilskud til mennesker), det gennemsnitlige forbrug af specifikke typer af sammensætninger til forskellige individer, og fremstillingsforholdene, hvorunder sammensætningen bliver fremstillet. Fortrinsvis vil koncentrationerne af en bestemt ingrediens, der skal tilsættes til sammensætningen, blive beregnet på basis af energi- og ernæringskrav til dyret. Ifølge visse aspekter ved frembringelsen, så kan ingredienserne tilsættes på et vilkårligt tidspunkt under fremstillingen og/eller bearbejdningen af sammensætningen. Dette inkluderer uden begrænsning, indføring af kosttilskuddet i formuleringen, eller som et overtræk påført kosttilskuddet.

Den foreliggende frembringelse retter sig mod forbedrede kosttilskudsformuleringer til bekæmpelse af virkningerne af forøget fysisk aktivitet på muskler. Som omtalt heri vil "kosttilskud" eller den kortere form "tilskud" eller udrykket "nutraceutika" referere til et vilkårligt, færdigt kosttilskud eller nutraceutisk dosisform indeholdende diætsubstanser og som er egnet til at blive fordøjet af en vært f.eks. human eller andet pattedyr. Således er udtrykket "kosttilskud" eller "nutraceutika" ment at skulle omfatte enhver form for kosttilskud, såsom en tablet, en tyggetablet, en caplet, en gelhætte, pulver, softgel, væsker osv. I nogle dosisformer, såsom softgeler er brugen af koncentrerede oliefaser af næringsstoffer ønskeligt. Sammensætningen kan også udgøres af de tidsforsinkede eller langsomt afgivende typer.

Sammensætningerne ifølge frembringelsen kan administreres til subjektet med en vilkårlig af mange alternative administreringsruter, såsom, uden begrænsning, oral, intranasal, intravenøs, intramuskulær, intragastrisk transpylorisk, subcutan, og rektal administrering. Fortrinsvis bliver diætformuleringerne eller -sammensætningerne administreret oralt. Som anvendt heri betyder uddtrykket "oral administrering" eller "oralt administreret", at subjektet fordøjer eller et menneske bliver dirigeret til at fodre eller blot fodrer et dyr med en formulering eller sammensætning beskrevet heri.

Administrering kan ske på en efter-behov, eller som-ønsket basis, f.eks. én gang månedlig, én gang ugentlig, dagligt eller flere end én gang dagligt. På tilsvarende måde kan administrering foregå hver anden dag, uge eller måned, hver tredje dag, uge eller måned, hver fjerde dag, uge eller måned og lignende. Administreringen kan foregå flere gange pr. dag. Når sammensætningen anvendes som et supplement til ordinære diætkrav, kan den blive administreret direkte til dyret eller på anden vise bragt i kontakt med eller blandet med den daglige føde eller foderstof. Når den anvendes som daglig føde eller foderstof, vil administreringen, være velkendt for fagfolk.

Forskellige sammensætninger, tabletter og kapsler er beskrevet ovenfor som enhedsdosisformer. 1 til 3 af disse kan passende blive indtaget pr. dag og passende daglige doser beregnes derfra.

De følgende eksempler er tilvejebragt for at beskrive frembringelsen mere detaljeret. De er tænkt at skulle illustrere, men ikke begrænse, frembringelsen. Disse eksempler er inkluderet for at demonstrere foretrukne udførelsesformer for frembringelsen. De skal forstås af fagmænd, at de i eksemplerne, som følger, beskrevne teknikker udgør teknikker, der af opfinderen er fundet at fungere godt i praktisering af frembringelsen, og de kan således opfattes som udgørende foretrukne fremgangsmåder for brugen deraf. Imidlertid bør fagmænd, i lyset af den foreliggende frembringelse, forstå, at der kan forekomme mange modifikationer i de specificerede udførelsesformer, som er vist, og dog stadig opnå en lignende eller tilsvarende resultat uden derved at forlade ånd og rammer for frembringelsen.

Forskellige publikationer, herunder publicerede ansøgninger og videnskabelige artikler er citeret overalt i beskrivelsen. Hver af disse publikationer indgår som reference heri i deres helhed.

Den foreliggende frembringelse er ikke begrænset til de ovenfor beskrevne og eksemplificerede udførelsesformer, men den giver mulighed for variation og modifkation inden for rammerne af de vedhæftede krav.

Figur 1 viser niveauet af lipid peroxidation i mediumfraktionen målt af markøren 8-isoPGF2a. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 2 viser niveauet af lipid peroxidation i cellefraktionen målt med markøren 8-isoPGF2a. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 3 viser niveauet af lipid peroxidation i cellefraktionen målt med markøren MDA. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 4 viser niveauet af DNA skade i cellefraktionen målt med markøren 8-oxo-Gua. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 5 viser niveauet af oxideret protein i mediumfraktionen målt med markøren proteincarbonyl. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 6 viser niveauet af oxideret protein i cellefraktionen målt med markøren proteincarbonyl. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 7 viser niveauet af antioxidantkapacitet i mediumfraktionen målt ved niveauet af den endogene antioxidant GSH. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 8 viser niveauet af antioxidantkapacitet i cellefraktionen målt ved niveauet af den endogene antioxidant GSH. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 9 viser niveauet af antioxidantkapacitet i cellefraktionen målt ved niveauet af den endogene antioxidant SOD. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 10 viser niveauet af antioxidantkapacitet i mediumfraktionen målt ved niveauet af den endogene antioxidant katalase. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

Figur 11 viser niveauet af antioxidantkapacitet i cellefraktionen målt ved niveauet af den endogene antioxidant katalase. Værdierne udgør gennemsnittet af to separate celleisoleringer.

EKSEMPLER

Eksempel 1: Præparation af sammensætninger

Alle referencer til (w/w)% af formuleringskomponenter, der findes i kapslerne, og som anvendes overalt i eksemplerne, er baseret på den samlede fyldningsvægt af kapslerne dvs. ekskluderende vægten af kapselskallen. Alle reference til (w/w)% af kapselskallens komponenter er baseret til den samlede vægt af kapselskallen.

De følgende kapsler er beskrevet:

Placebo: Olivenolie

Sammensætning A:

Komponent	Mængde komponent pr. kapsel	Konc. (% w/w) af komponent i formulering	Konc. (% w/w) af komponent i komponent-indeholdende produkt optrædende i formulering	Mængde af komponent-indeholdende produkt pr. kapsel
Astaxanthin (optræder som Bioastin)	2 mg	2	5	40 mg
Lutein	6 mg	6	21% (kombineret total: Lutein og zeaxanthin i et kombineret produkt i et 5:1 forhold)	34,3 mg
Zeaxanthin	1,2 mg	1.2		
Safflorolie Type (II) (Excipiens)	25,7mg	25,7	100	25,7 mg
			Total fyldningsvægt	**100 mg**

Kapselskal: Gelatine (fisk) : 57,20 mg pr. kapsel
Glycerin 99,5% : 26,24 mg pr. kapsel
Vand, rens. : 10,56 mg pr. kapsel

Gennemsnitlig kapselvægt : 194 mg +/- 10%
Gennemsnitlig fyldningsvægt : 100 mg +/- 10%
Gennemsnitlig skalvægt : 94 mg +/- 10%

Sammensætning A*

Lutein, 6 mg/kapsel; astaxanthin, 2 mg/kapsel og zeaxanthin, 1,2 mg/kapsel; i tillæg til standardexcipienser såsom lecithin, hvor kapselskallen omfatter gelatin 63,41%, glycerin 29,09% og vand 7,49%.

Sammensætning B:

Komponent	Mængde komponent pr. kapsel	Konc. (% w/w) af komponent i formulering	Konc. (% w/w) af komponent i komponent-indeholdende produkt optrædende i formulering	Mængde komponent-indeholdende produkt pr. kapsel
Krilolie	300 mg	53,6	100	300 mg
Vitamin C	30 mg	5,36	17	176,5 mg
Astaxanthin	2 mg	0,36	10	20 mg
Lutein	6 mg	1,07	21% (kombineret total: Lutein og zeaxanthin i et kombineret produkt i et 5:1 forhold)	34,3 mg
Zeaxanthin	1,2 mg	0,21		
Vitamin D	5 µg	0,0009	1,88	0,266 mg
Vitamin E	12 mg	2,14	58,4	20,56 mg
Lecithin	8,372 mg	1,5	100	8,37 mg
			Total fyldningsvægt	**560 mg**

Kapselskal: Gelatine (fisk) : 130,00 mg pr. kapsel
Glycerin 99.5% : 59,64 mg pr. kapsel
Vand, rens. : 15,36 mg pr. kapsel

Gennemsnitlig kapselvægt : 765 mg +/- 8.2%
Gennemsnitlig fyldningsvægt : 560 mg +/- 7.5%
Gennemsnitlig skalvægt : 205 mg +/- 10%

Sammensætning B*:

300 mg krilolie, 20,6 mg vitamin E, 176,5 mg vitamin C, 34,3 mg lutein/zeaxanthin i et forhold på 5:1, 22 mg astaxanthin i tillæg til standard excipienter, såsom lecithin, hvor kapselskallen omfatter gelatine 63,41%, glycerin 29,09% og vand 7,49%.

Sammensætning C:

Komponent	Mængde komponent pr. kapsel	Konc. (% w/w) af komponent i formulering	Konc. (% w/w) af komponent i komponent-indeholdende produkt optrædende i formulering	Mængde komponent-indeholdende produkt pr. kapsel
Blæksprutteolie	312,5 mg	46,4	100	312,5 mg
Vitamin C	80 mg	11,89	50	176 mg
Astaxanthin	2 mg	0,30	10	21 mg
Lutein	6 mg	0,89	21% (kombineret total: Lutein og zeaxanthin i et kombineret produkt i et 5:1 forhold)	34,3 mg
Zeaxanthin	1,2 mg	0,18		
Vitamin D	5 µg	0,0007	1,88	0,266 mg
Vitamin E	12 mg	1,78	58,4	20,56 mg
Excipienser	108,37 mg	16,1	100	108,37 mg
			Total fyldningsvægt:	**673 mg**

Kapselskal: Gelatine (275 Bloom F) : 152,00 mg pr. kapsel
Glycerin 99.5% : 69,73 mg pr. kapsel
Vand, rens. : 28,27 mg pr. kapsel

Gennemsnitlig kapselvægt : 923 mg +/- 8.2%
Gennemsnitlig fyldningsvægt : 673 mg +/- 7.5%
Gennemsnitlig skalvægt : 250 mg +/- 10%

Eksempel 2: Total antioxidantkapacitet

Den totale antioxidant kapacitet af forskellige formuleringer kan sammenlignes ved at måle antioxidantaktiviteten mod nogle af de vigtigste pro-oxidanter, der medfører oxidativ skade i menneskekroppen. I kombination forårsager de DNA, protein og lipidskade og bidrager til systemisk inflammation og andre skadelige angrebsveje.

Antioxidantstyrken af formuleringer A og B fra eksempel 1 blev målt ved den følgende prøverørsanalyse:

- FRAP – jernreducerende antioxidantstyrke – dette er en analyse, der måler en sammensætnings evne til at overføre elektroner til jernioner dvs. evnen til at forhindre jernoxidering.
- Ydermere blev antioxidantkapaciteten af en sammensætning estimeret gennem måling af dens effekt på reaktive oxygenkomponenter såsom peroxyl-

radikaler, peroxynitrit og superoxidanion (NORAC - peroxynitrit radikal hæmmende kapacitet, HORAC - hydroxyl radikal hæmmende kapacitet, SOD - superoxid radikal absorbanskapacitet).

FRAP analysen blev udført på et uafhængigt kontraktlaboratorium; Brunswick Laboratories, 50 Commerce Way Norton, MA 02766, USA.

Brunswick laboratorierne er i fuld overensstemmelse med Good Laboratory Practices (GLP, 21 CFR, dels 58) retningslinier. Resultaterne er vist i tabel A nedenfor:

TABEL A: FRAP analyse 1

	Sammensætning A	Sammensætning B
µmol TE/gram	151	510

Sammensætning B havde en 237,75% højere antioxidantkapacitet sammenlignet med sammensætning A, som målt med FRAP.

FRAP studiet blev derpå gentaget ved et kemisk analysekontraktlaboratorium Vitas AS, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo, Norge. Resultaterne er vist i tabel B nedenfor:

TABEL B: FRAP analyse 2 (udført af Vitas AS)

	Sammensætning A	Sammensætning B
µmol /kapsel	6,17	182,4

Sammensætning B havde en 2856,24% højere antioxidantkapacitet end sammensætningen A, som målt med FRAP.

Frie radikaler analysen blev udført af Brunswick Laboratories. Resultaterne, målt i µmol TE/gram, der er vist i tabel C nedenfor.

TABEL C: Fri radikalanalyse (µmol TE/gram)

	Sammensætning A	Sammensætning B
Antioxidantstyrke mod peroxylradikaler	71	575
Antioxidantstyrke mod peroxynitrit	1	34
Antioxidantstyrke mod superoxidanion	178	2333

Antioxidantkapaciteten af sammensætning B mod peroxylradikaler var 710% øget i sammenligning med sammensætning A. Antioxidantkapaciteten af sammensætning B mod peroxynitrit var 3300% øget i sammenligning med sammensætning A. Antioxidantkapaciteten af sammensætning B mod superoxid anion var 1211% øget i sammenligning med sammensætning A.

Konklusion: Antioxidantsammensætningen B har en større antioxidantstyrke end sammensætningen A målt ved FRAP, antioxidantstyrken mod peroxylradikaler, antioxidantstyrken mod peroxynitrit og antioxidantstyrken mod superoxidanion.

Eksempel 3: Beskyttelse af muskelceller mod oxidativ stress

Den beskyttende effekt af sammensætning A og B fra eksempel 1 på oxidativ skade i muskelceller blev sammenlignet.

Oxidativ stress og antioxidant styrke kan være vanskelig at måle, fordi mange relative oxygenemner (ROS) har en meget kort levetid. Det er almindelig praksis at måle oxidativ skade på biomolekyler som et mål for graden af oxidativ stress. Det er kendt at oxidativ skade på disse biomolekyler indgår i udviklingen af en række sygdomme. Nogle af disse skadede markører kan samle sig i kroppen i både unormale processer og ved ældning. Ofte anvendte biomarkører er:

- Oxideret lipid: Oxidation af lipider fører til dannelse af adskillige slutprodukter såsom malondialdehyd (MDA) og isoprostaner. Disse slutprodukter kan blive målt i blot og urin. F_2-isoprostaner bliver formet ved fri radikal-katalyseret peroxidation af esterificeret arachidonsyre, før den bliver skåret over og frigivet til cirkulationen. Oxideret prostaglandin kan være indblandet i mekanismen bag atherosclerosis og kan virke som ét mutagen. Ydermere kan 8-isoPGF2 være i stand til at modificere fluiditeten og integriteten af membraner. Det kan måles i både blod og urin og anses for at være en god markør for oxidativ stress.

- Oxiderede proteiner: Proteincarbonyler er dannet ved oxidation af flere aminosyrekæder og ved dannelse af arrangerede glykererde slutprodukter. Blodkoncentrationen af disse er en markør for oxidativ stress.
- Oxidativ skade på DNA: Oxidation af genetisk materiale (DNA) er særlig knyttet til risikoen for cancer. Der findes mange forskellige oxideret DNA-produkter.

En fælles markør er 8-hydroxy-20-deoxyguanosin (8OHdG). 8OHdG er én af de mest kendte DNA læsioner, der skyldes reaktive oxygenender og anvendes som en følsom markør oxidativ stress. Læsionen kan resultere i en forkert parring og resulterer i substitutionerne i genomet. Reparationsmekanismer resulterer i udskillelse af 8-oxo-Gua fra det intracellulære til det ekstracellulære miljø inkluderende blodet og urinen.

Neonatal rottekardiomyocyt stimuleret af oxidativ stress.

H_2-O_2-behandling er en fysiologisk relevant og let manipulerbar form for oxidativ stress. Normal human H_2O_2 koncentration i blod er 20 µmol /l og kan nå 40 µmol /l under infektioner. I en rotte er det normale H_2O_2 koncentrationer ca. 3 µmol /l og i diabetiske rotter stiger niveauet til ca. 6 µmol /l. Koncentrationer > 100 µmol /l fremmer kardiacmyocytapoptose. Den mulige beskyttende effekt af forbehandling af neonatale rottekardiomyocytter med antioxidanter mod H_2O_2 induceret oxidativ stress blev undersøgt. Markører for oxidativ stress: 8-OH-GUA, 8-iso-PGF2a, TBARS, SOD, katalase, proteincarbonyl og udvalgte cytokiner blev evalueret af Vitas AS, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo, Norge.

Alle celler blev forbehandlet i 2 timer med/uden sammensætning A eller B fra eksempel 1 eller olivenolie som kontrol før behandling med 50 µmol /liter H_2O_2 i det tilsvarende medie i 6-brønds cellekulturplader. Celler blev fjernet fra mediet ved centrifugering ved 1000 x g i 10 minutter ved 4°C. De vedhængende celler blev vasket med iskold PBS og skrabet fra brøndene. Tælle-og mediumfraktioner blev lagret i en fryser under tilstedeværelse af proteaseinhibitorer før analysering.

a) Lipid peroxidation målt ved 8-iso-PGF2

8-iso-PGF2a blev målt i cellefraktionen ved LC – MS/MS. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

I mediumfraktionen havde sammensætning A en lille men ikke signifikant virkning til reduktion af lipidperoxidation med 1,9%. Sammensætning B sænkede lipidperoxidation målt ved 8-iso-PGF2 med 23% som vist i tabel 1 nedenfor og i fig. 1.

Tabel 1: 8-iso-PGF2a niveau i mediumfraktionen.

Medium	8-iso-PGF2a (ng/ml)	St.dev	% reduktion
Kontrol	0,260	0,021	
Sammensætning A	0,255	0,010	1,9%
Sammensætning B	0,200	0,042	23%

I cellefraktionen var standardafvigelsen mellem de to celleisoleringer alt for stor ved at konkludere, om sammensætning A havde en virkning på lipid peroxidation. Sammensætning B sænkede lipidperoxidation med 86,8%, som vist i tabel 2 nedenfor og i fig. 2:

Tabel 2: 8-iso-PGF2a niveau i cellefraktionen

Celle	8-iso-PGF2a (ng/ml)	St.dev	% reduktion
Kontrol	2,155	0,696	
Sammensætning A	2,505	1,170	
Sammensætning B	0,285	0,116	86,8%

b) Lipid peroxidation målt med MDA

MDA blev målt ved at estimere virkningen af antioxidantsammensætningerne på lipid peroxidation. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

MDA niveau i mediumfraktionen var under detekteringsgrænsen. I cellefraktionen reducerede sammensætning A lipidperoxidation med 8,02%, mens sammensætning B resulterede i en 11,69% nedsættelse, som vist i tabel 3 nedenfor og i fig. 3:

Tabel 3: MDA niveau fra cellefraktionen

Celle	MDA (µM)	St.dev	% reduktion
Kontrol	8,98	1,87	
Sammensætning A	8,26	2,33	8,02
Sammensætning B	7,93	2,32	11,69

c) DNA oxidation målt med 8-oxo-Gua

8-oxo-Gua blev målt i cellefraktionen med LC – MS/MS. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

I mediumfraktionen lå niveauet for 8-oxo-Gua under detektionsgrænsen i alle prøver. I cellefraktionen reducerede sammensætning A niveauet af 8-oxo-Gua med 1,9%, mens antioxidantopløsningen B sænkede niveauet af 8-oxo-Gua med 23%, som vist i tabel 4 nedenfor og i fig. 4:

Tabel 4: 8-oxo-Gua A niveau i cellefraktionen

Celle	8-oxo-Gua (ng/ml)	St.dev	% reduktion
Kontrol	0,260	0,021	
Sammensætning A	2,255	0,010	1,9
Sammensætning B	0,200	0,042	23,0

d) Proteinoxidation målt med proteincarbonyl

Proteincarbonyl blev målt i cellefraktionen med ELISA. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

I mediumfraktionen havde sammensætning A en signifikant virkning, som reducerede proteincarbonylniveauet med 23,4%, mens sammensætning B havde en endnu større virkning til reduktion af proteincarbonylniveauet med 56,6%, som vist i tabel 5 nedenfor og i fig. 5.

Tabel 5: Proteincarbonylniveau i mediumfraktionen

Celle	Proteincarbonyl (nmol/mg)	St.dev	% reduktion
Kontrol	10,25	2,015	
Sammensætning A	7,85	0,176	23,4
Sammensætning B	4,45	0,318	56,6

I cellefraktionen reducerede sammensætning A niveauet af proteincarbonyl med 5,5%, mens antioxidantopløsningen B nedsatte niveauet af proteincarbonyl med 8,0%, som vist i tabel 6 nedenfor og i fig. 6.

Tabel 6: Proteincarbonylniveau i cellefraktionen

Celle	Proteincarbonyl (nmol/mg)	St.dev	% reduktion
Kontrol	34,45	1,66	
Sammensætning A	32,55	3,36	5,5
Sammensætning B	31,70	2,47	8,0

Antioxidantniveauer

Niveauet af antioxidanter i kroppen er en indikation af mængden af oxidativ stress. Glutathion i blodet anses for at tilvejebringe et mål for niveauet i andre dele af kroppen, og sænkning af koncentrationen af både reduceret glutathion (GSH) og glutathiondisulfid (GSSG) bliver anvendt som en indikator for oxidativ stress. Også andre antioxidanter såsom SOD, GPX og katalase og glutathion reduktase kan blive målt.

e) Antioxidantkapacitet målt med GSH

Total GSH blev målt i cellefraktionen med HPLC-FLD. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

GSH niveauet i mediumfraktionen var ikke signifikant påvirket af antioxidant-sammensætningerne, men sammensætning B resulterede i en svag 1,6% hævning af GSH niveau, som vist i tabel 7 nedenfor og i fig. 7.

Tabel 7: GSH niveau i mediumfraktionen

Medium	GSH (µM)	St.dev	% reduktion
Kontrol	10,17	0,39	
Sammensætning A	9,98	0,38	
Sammensætning B	10,33	0,01	1,6

I cellefraktionen var standardafvigelserne alt for høje til at konkludere, om der var en virkning. Men der var en tendens til, at både sammensætning A og B kunne øge GSH antioxidantkapaciteten med 23,3% og 39,4%, som vist i tabel 8 nedenfor og i fig. 8.

Tabel 8: GSH niveau i cellefraktionen

Medium	GSH (µM)	St.dev	% reduktion
Kontrol	4,31	1,61	
Sammensætning A	5,61	2,81	23,3
Sammensætning B	7,10	3,87	39,4

f) Antioxidantkapacitet målt med SOD

Total SOD blev målt i cellefraktionen ved hjælp af ELISA. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

I mediumfraktionen var niveauet af SOD under detekteringsgrænsen i alle prøver. I cellefraktionen øgede sammensætning B GSH antioxidantkapaciteten med 18%, som vist i tabel 9 nedenfor og i fig. 9.

Tabel 9: SOD niveau i cellefraktionen

Medium	SOD (mUnits/µL)	St.dev	% reduktion
Kontrol	16,61	6,059	
Sammensætning A	8,76	2,768	
Sammensætning B	20,25	4,401	18,0

g) Antioxidantkapacitet målt med proteinkatalase

Proteinkatalase blev målt i cellefraktionen ved hjælp af ELISA. Værdierne udgør gennemsnittet fra to separate celleisoleringer.

Proteinkataleniveauet var under detekteringsgrænsen i de fleste af celleprøverne. Antioxidantkapaciteten målt ved proteinkataleniveauet i mediumfraktionen blev øget med begge antioxidantsammensætninger. Sammensætning A sorterede i en 53,5%'s stigning mens sammensætning B øgede niveauet med 44,1%, som vist i tabel 10 nedenfor og i fig. 10.

Tabel 10: Proteinkataleniveau i mediumfraktionen

Medium	Proteinkatalase (U/ml)	St.dev	% reduktion
Kontrol	19,15	1,750	
Sammensætning A	41,16	1,527	53,5
Sammensætning B	34,26	10,18	44,1

I prøver fra en af celleisoleringerne blev proteinkataleniveauet målt efter antioxidant-behandling. Sammensætning B øgede niveauet betydeligt mere end sammensætning A, som vist i tabel 11 nedenfor og i fig. 11.

Tabel 11: Proteinkataleniveau i cellefraktionen

Medium	Proteinkatalase (U/ml)	St.dev	% reduktion
Kontrol	<1,56		
Sammensætning A	9,24		
Sammensætning B	46,38		

Konklusion: Antioxidantsammensætning B havde en større effekt end sammensætning A på lipid peroxidation målt med den specifikke markør 8-iso-PGF2a og MDA og oxidativ skade på protein og DNA målt med proteincarbonyl og 8-oxo-Gua. Ydermere var sammensætning B mere effektiv end sammensætning A til at øge antioxidantkapaciteten målt med GSH og SOD.

EKSEMPEL 4: Total antioxidant styrke

Den totale antioxidant kapacitet af forskellige formuleringer kan sammenlignes ved at måle antioxidantaktiviteten mod nogle af de mest vigtige pro-oxidanter, der medfører oxidativ skade i menneskekroppen. I kombination med medfører de DNA, protein og lipidskade og bidrager til systemisk inflammation og andre skadelige angrebsveje.

Sammensætning A*:

Lutein, 6 mg/kapsel; astaxanthin, 2 mg/kapsel og zeaxanthin, 1,2 mg/kapsel; i tillæg til standardexcipienser såsom lecithin, hvor kapselskallen omfatter gelatin 63,41%, glycerin 29,09% og vand 7,49%.

Sammensætning B*:

300 mg krilolie, 206 mg vitamin E, 176,5 mg vitamin C, 34,3 mg lutein/zeaxanthin i et forhold på 5:1, 22 mg astaxanthin i tillæg til standardexcipienser såsom lecithin, hvor kapslen omfatter gelatin 63,41%, glylcerin 29,09% og vand 7,49%.

Placebo: Olivenolie

Antioxidantkraften af de forskellige formuleringer vil blive målt ved hjælp af den følgende prøverørsanalyse:

FRAP-jernreducerende antioxidantstyrke
ORAC hydro-oxygenradikal absorbanskapacitet
ORAC lipo
ORAC total
SOAC - singlet oxygenabsorbanskapacitet
NORAC - peroxynitrit radikalforhindrende kapacitet
HORAC - hydroxyl radikalforhindrende kapacitet
SOD - superoxid radikalabsorbanskapacitet

Analysen vil blive udført ved et uafhængigt kontraktlaboratorium; Brunswick Laboratories, 50 Commerce Way Norton, MA 02766, USA.

Brunswick Laboratories opfylder til fulde Good Laboratory Practices (GLP, 21 (CRF part 58) retningslinier.

EKSEMPEL 5: Differentiel beskyttelse mod oxidativ stress

Formuleringerne i eksempel 4 med deres beskyttende virkning mod oxidativ beskadigelse af muskelceller vil blive sammenlignet.

Lipid peroxidation, såsom malondialdehyd (MDA), vil blive målt med thiobarbitursyrereaktion.

Muskelceller, såsom f.eks. L6 myoblastceller vil blive dyrket og præinkuberet med sammensætningen A eller B eller placebo før inkubering med prooxidanter. Efter høstning vil celler blive nedhængt i PBS og sonikeret. Det sonikerede materiale vil blive tilsat til butyleret hydroxytoluen. Femten procent trichloreddikesyre, HCl, butyleret hydroxytoluen, thiobarbitursyre og SDS vil blive tilsat til prøven og vortexet. Farven vil udvikles ved 95°C, og reaktionen stoppes ved afkøling på is.

Prøverne vil blive centrifugeret, og supernatanten fra hvert rør vil blive overført til en 96-brønds plade. Absorbansen ved 540 nm vil blive målt med reference til et reagensråemne. Thiobarbitursyre reaktiv substans (TBAR) vil blive beregnet ud fra en standardkurve med forskellige koncentrationer af 1,1,3,3-tetraethoxypropan og normaliseret til proteinkoncentrationen af hver prøve.

Også oxidativ stressskade på muskelceller vil blive fastslået ved måling af markører såsom F2-isoprostan.

8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) og Comet assay vil blive bestemt som et mål for DNA oxidativ skade.

Ydermere vil der blive præpareret kerneekstrakter af muskelceller og til måling af oxidativ stress gennem at bestemme omplaceringen af p65 NFkappaB ind i cellekernen og at udtrykke chemokiner reguleret ved denne faktor såsom MCP-1 og CINC-1.

Cellernes naturlige antioxidantforsvar vil blive undersøgt gennem måling af celleproducerede antioxidanter såsom katalase, glutathion og superoxiddismutase.

Oxidativ stress er tæt knyttet til inflammatoriske reaktioner. Inflammatoriske markører såsom TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 og IL-15, IL-17 vil blive anvendt til at måle inflammatorisk respons.

BRUGSMODELKRAV

1. Diætformulering omfattende:
   a) en vandopløselig antioxidant og en fedtopløselig antioxidant; og
   b) en olie udvundet fra en marin organisme.

2. Formulering ifølge krav 1, hvor den vandopløselige antioxidant er vitamin C.

3. Formulering ifølge krav 1 eller krav 2, hvor den fedtopløselige antioxidant er valgt fra gruppen bestående af vitamin E, lutein, zeaxanthin og astaxanthin.

4. Formulering ifølge et af kravene 1-3, hvor sammensætningen omfatter antioxidanterne vitamin E og vitamin C.

5. Formulering ifølge et af kravene 1-4, hvor den marine organisme er en hvirvelløs organisme.

6. Formulering ifølge krav 5, hvor den marine organisme er skaldyr eller mollusk.

7. Formulering ifølge krav 6, hvor nævnte skaldyr er kril.

8. Formulering ifølge krav 6, hvor nævnte mollusk er blæksprutte.

9. Formulering ifølge et af kravene 1-8, hvor olien udviser anti-inflammatorisk aktivitet og/eller aktivitet som et stof til støtte for cellulær struktur og funktion.

10. Formulering ifølge et af kravene 1-10, hvor olien omfatter en phospholipid, fortrinsvis valgt fra gruppen bestående af phosphatidylcholin, dipalmitoyl-phosphatidylcholin og andre disaturerede phosphatidylcholiner, phosphatidyl-ethanolaminer, phosphatidylcholinsitol og phosphatidylseriner, fortrinsvis sphingomyelin eller andre ceramider.

11. Formulering ifølge et af kravene 1-10, hvor olien omfatter en omega-3 fedtsyre, fortrinsvis valgt fra gruppen bestående af α-linolensyre, icosapentaensyre, docosapentaensyre og docosahexaensyre.

12. Formulering ifølge krav 1, hvor formuleringen omfatter krilolie, vitamin E, vitamin C, lutein, zeaxanthin og astaxanthin.

13. Formulering ifølge krav 12, hvor formuleringen omfatter:
225 til 350 mg krilolie;
5 til 30 mg vitamin E;
30 til 80 mg vitamin C;
5 til 7,5 mg lutein;
1 til 1,5 mg zeaxanthin; og
1 til 5 mg astaxanthin.

14. Formulering ifølge krav 13, hvor formuleringen omfatter:
300 mg krilolie, 12 mg vitamin E, 30 mg vitamin C, 6 mg lutein, 1,2 mg zeaxanthin, og 2 mg astaxanthin.

15. Formulering ifølge krav 12, hvor formuleringen omfatter:
40 til 60 w/w % krilolie;
1 til 5 w/w % vitamin E;
2 til 25 w/w % vitamin C;
0,75 til 1,35 w/w % lutein;
0,15 til 0,28 w/w % zeaxanthin; og
0,25 til 0,40 w/w % astaxanthin.

16. Formulering ifølge krav 15, hvor formuleringen omfatter:
53,6 w/w % krilolie;
2,14 w/w % vitamin E;
5,36 w/w % vitamin C;
1,07 til 1,35 w/w % lutein;
0,21 til 0,28 w/w % zeaxanthin; og
0,36 til 0,40 w/w % astaxanthin.

17. Sammensætning omfattende formuleringen ifølge et af kravene 1 til 16, hvor sammensætningen er et animalsk foderstof, et kosttilskud, eller et humant fødevareprodukt, hvor nævnte sammensætning valgfrit omfatter en fysiologisk excipiens.

18. Sammensætning ifølge krav 17, i form af en tablet eller formuleret i en kapsel.