

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091399** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.10.28

(51) Int. Cl. *A23L 33/115* (2016.01)
A23D 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(54) **КОМПОЗИЦИИ ЛИЗОФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ**

(31) **62/608,891; 62/725,683**

(32) **2017.12.21; 2018.08.31**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2018/001588**

(87) **WO 2019/123015 2019.06.27**

(71) Заявитель:

**АКЕР БИОМАРИН АНТАРКТИК АС
(NO)**

(72) Изобретатель:

**Оем Нильс, Михрен Финн, Хальс
Петтер-Арт, Хати Арменд (NO)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Данное изобретение обеспечивает композиции лизофосфатидилхолинов морского происхождения для применения в фармацевтических препаратах, нутрицевтиках и функциональных пищевых продуктах, а также способы получения композиций лизофосфатидилхолинов морского происхождения.

A1

202091399

202091399

A1

КОМПОЗИЦИИ ЛИЗОФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Данное изобретение обеспечивает композиции лизофосфатидилхолинов морского происхождения для применения в фармацевтических составах, нутрицевтиках и функциональных пищевых продуктах, а также способы получения композиций лизофосфатидилхолинов морского происхождения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Лизофосфатидилхолин (ЛФХ) представляет собой соединение, полученное в результате частичного гидролиза молекулы фосфатидилхолина (ФХ), таким образом, что одна из групп жирных кислот, присоединенных к молекуле ФХ, удаляется.

Лизофосфатидилхолин с одним молекул жирной кислоты на молекулу липида в положении sn-1 обнаружен в следовых количествах в большинстве тканей животных (при 15 более высоких концентрациях он разрушает мембраны). Он синтезируется путем гидролиза фосфатидилхолина с пищей и желчью и абсорбируется как таковой в кишечнике, но он повторно эстерифицируется перед экспортом в лимфу. Кроме того, он образуется в большинстве тканей путем гидролиза фосфатидилхолина при помощи ферментов суперсемейства фосфолипаз A2 как части цикла деацилирования/реацилирования, который контролирует общий состав молекулярных 20 соединений последнего, как обсуждалось выше. В плазме животных видов значительное количество лизофосфатидилхолина образуется под действием фермента лецитин-холестеринацилтрансферазы (LCAT), который секретируется из печени. Это катализирует перенос жирных кислот из положения sn-2 фосфатидилхолина в свободный холестерин в 25 плазме с образованием сложных эфиров холестерина и, конечно, лизофосфатидилхолина, который состоит из смеси молекулярных соединений с преимущественно насыщенными и моно- и диеновыми компонентами жирных кислот. В плазме он связывается с альбумином и липопротеинами, поэтому его эффективная концентрация снижается до безопасного уровня. Идентификация высокоспецифической фосфолипазы A2 γ в пероксисомах, которая 30 является уникальной в образовании sn-2-арахидоноил-лизофосфатидилхолина, позволяет предположить, что это может иметь отношение к образованию и сигналингу эйкозаноидов. Сообщается, что повышенные уровни 26:0-лизофосфатидилхолина в крови характерны для спектральных расстройств Целлевегера (результат нарушения биогенеза пероксисом).

Лизофосфатидилхолин обладает провоспалительными свойствами и, как известно, является патологическим компонентом окисленных липопротеинов (ЛПНП) в плазме и атеросклеротических поражений; например, как сообщается, имеется специфическое обогащение 2-арахидоноил-лизофосфатидилхолина в атеросклеротической бляшке сонных артерий от пациентов с диабетом 2 типа. Недавно было обнаружено, что он обладает некоторыми функциями в клеточном сигналинге, и были идентифицированы специфические рецепторы (связанные с G-белками). Он активирует специфическую фосфолипазу C, которая высвобождает диацилглицеролы и трифосфат инозитола, что приводит к увеличению внутриклеточного Ca²⁺ и активации протеинкиназы C. Он также активирует митоген-активируемую протеинкиназу в определенных типах клеток и способствует демиелинизации в нервной системе. В эндотелиальных клетках сосудов он индуцирует важный провоспалительный медиатор циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2), ключевой фермент в синтезе простагландина. Повышенные уровни лизофосфатидилхолина были выявлены при раке шейки матки и могут быть диагностическими для заболевания.

Некоторые биологические эффекты лизофосфатидилхолина могут быть вызваны его способностью легко диффундировать в мембраны, изменяя их кривизну и косвенно влияя на свойства мембранных белков.

В WO2015048554 раскрыты способы идентификации соединений, которые модулируют транспорт посредством белка Mfsd2a, и другие потенциальные применения композиций ЛФХ.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение обеспечивает композиции лизофосфатидилхолинов морского происхождения для применения в фармацевтических составах, нутрицевтиках и функциональных пищевых продуктах, а также способы получения композиций лизофосфатидилхолинов морского происхождения.

Соответственно, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что содержат от около 10 до около 100 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и необязательно имеют одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; в) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; д) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в

композиции; е) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 60 до 100 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 70 до 90 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 20 до 50 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 20 до 30 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 10 до 20 % мас. ЛФХ в композиции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 30 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 35 до 45 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 5 до 20 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (a). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (b). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (c). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (d). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (e). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойство (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют два или более свойств (a), (b) и (c). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют два или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют три или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют четыре или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют пять или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют свойства (a), (b), (c), (d), (e) и (f).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции выбраны из группы, состоящей из композиции ЛФХ криля, композиции ЛФХ сельди, композиции ЛФХ икры сельди, композиции ЛФХ водорослей и композиции ЛФХ Calanus.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает фармацевтическую или нутрицевтическую композицию, содержащую композицию, как описано выше, и физиологически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления физиологически приемлемый носитель представляет собой липидный носитель.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает носитель для пероральной доставки, содержащий композицию ЛФХ морского происхождения, фармацевтическую композицию или нутрицевтическую композицию, как описано выше.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композицию липидов, содержащую первую фракцию липидов и вторую фракцию липидов, причем первая фракция липидов представляет собой композицию ЛФХ морского происхождения, как описано выше, и вторая фракция липидов получена из источника, отличного от первой фракции липидов, и/или содержит менее 20% ЛФХ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вторая фракция липидов выбрана из группы, состоящей из фракции триглицеридов, фракции диглицеридов, фракции этиловых эфиров жирных кислот, фракции свободных жирных кислот и их комбинаций. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вторая фракция липидов представляет собой фракцию липидов морского происхождения, содержащую ЭПК и/или ДГК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает фармацевтическую или нутрицевтическую композицию, содержащую описанную выше липидную композицию и физиологически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает носитель для пероральной доставки, содержащий липидную композицию, как описано выше.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способы получения композиции лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) с высоким содержанием ЭПК и ДГК из морского исходного сырья, содержащего фосфолипиды, включающие обработку морского сырья фосфолипазой, которая не является нативной для морского исходного сырья, для получения обработанного фосфолипазой сырья, и фракционирование обработанного фосфолипазой сырья для получения композиции липидов, имеющей более высокое содержание лизофосфатидилхолинов, чем сырье. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье выбрано из группы, состоящей из липидного состава из криля, липидного состава из сельди, липидного состава из икры сельди, липидного состава из водорослей и липидного состава из *Calanus*.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления липидный состав из криля представляет собой липидный состав из *Euphausia superba*.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье приводят в контакт с фосфолипазой в растворителе. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления растворитель представляет собой смесь воды и спирта. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления спирт представляет собой этанол. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье приводят в контакт с фосфолипазой в смеси около 85% воды и 15% этанола.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем концентрация фермента находится в диапазоне 0,1-20 % об./мас., предпочтительно 0,1-15 % об./мас., более предпочтительно 0,1-10 % об./мас., еще более предпочтительно 0,1-5 % об./мас., наиболее предпочтительно 0,1-3 % об./мас.. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем способ осуществляют при pH 3-12, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 4-9, наиболее предпочтительно 5-9. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем способ осуществляют при температуре 4-95 °C, предпочтительно 4-85 °C, более предпочтительно 10-80 °C, еще более предпочтительно 15-70 °C, еще более предпочтительно 15-65 °C, наиболее предпочтительно 15-60 °C.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-70 % мас. и ДГК: 1-70 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-70 % мас. и ДГК: 5-70 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-60 % мас. и ДГК: 10-60 % мас.. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-100 % мас. и/или ДГК: 1-100 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-100 % мас. и/или ДГК: 5-100 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-90 % мас. и/или ДГК: 10-90 % мас..

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ содержит ЛФХ в пределах 10-100 % мас., предпочтительно 20-100 % мас., более предпочтительно 30-100 % мас., еще более предпочтительно 40-100 % мас., наиболее предпочтительно 50-100 % мас.. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ, полученная при помощи процесса, отличающаяся тем, что она содержит от около 20 до около 95 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и необязательно имеют одну или более

следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления способы дополнительно включают составление композиции ЛФХ для употребления человеком.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает ЛФХ или липидную композицию, как описано выше, или изготовленную при помощи способа, как описано выше, для применения в дополнение к рациону человека, предпочтительно в возрасте менее 10 лет, более предпочтительно в возрасте менее 1 года, еще более предпочтительно в возрасте менее 1 месяца и наиболее предпочтительно новорожденного.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что содержат от около 60 до около 100 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 30 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФК) от менее 0,5 до 5 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 0,5 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от менее 5 до 40 % мас. в композиции; и е) соотношение 2-ЛФХ: 2-ЛФХ простого эфира от 2,5: 1 до 4: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что они содержат от около 10 до около 20 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что они содержат от около 20 до около 40 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и
5 необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-
10 ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что они содержат от около 40 до около 60 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и
15 необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-
20 ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, отличающиеся тем, что они содержат от около 60 до около 80 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и
25 необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; с) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; d) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-
30 ЛФХ менее 1,0 % мас.; и f) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции или концентраты лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского
35

происхождения, отличающиеся тем, что они содержат от около 60 до около 100 % мас. ЛФХ в композиции и содержат от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции и необязательно имеет одну или более следующих характеристик или свойств: а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1 или более предпочтительно от 1: 1 до 10: 1; б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) менее 10 % мас. в композиции; в) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2 % мас. в композиции; г) содержание нейтрального липида от 5 до 65 % мас. в композиции; е) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и ф) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

10 В некоторых вариантах осуществления описанные выше композиции лизофосфолипидов предназначены для увеличения количества ЭПК и/или ДГК в целевой ткани или органе путем перорального введения композиции лизофосфолипидов. Предпочтительные целевые ткани и орган согласно изобретению представляют собой надпочечник, кровь, кость, костный мозг, мозг, жир (белый), почку (целую), слизистую оболочку толстой кишки, печень, легкое, мышцы, миокард, поджелудочную железу, гипофиз, предстательную железу, кожу, слизистую оболочку тонкой кишки, селезенку, 15 слизистую оболочку желудка, яички, тимус и/или щитовидную железу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления увеличение количества в ЭПК и/или ДГК по сравнению с эквивалентной дозой ЭПК и/или ДГК, обеспечиваемой в виде фосфолипида (то есть молекулы фосфолипида, содержащей ацильные жирнокислотные группы в положениях как SN-1, так и SN-2 фосфолипида).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: ^1H ЯМР-спектр образца АКВ69444-1.

25 **Фиг. 2:** ВЭЖХ-хроматограмма продукта ЛФХ, образца АКВ69444-1.

Фиг. 3: ^1H ЯМР-спектр образца АКВ70005-2.

Фиг. 4: ВЭЖХ-хроматограмма продукта ЛФХ, образца АКВ70005-2.

Фиг. 5: ^1H ЯМР-спектр образца АКВ70005-3.

Фиг. 6: ВЭЖХ-хроматограмма продукта ЛФХ образца АКВ70005-3.

30 **Фиг. 7:** ^1H ЯМР-спектр образца АКВ70005-4.

Фиг. 8: ВЭЖХ-хроматограмма продукта ЛФХ, образца АКВ70005-4.

Фиг. 9: ^1H ЯМР-спектр образца АКВ70005-5.

Фиг. 10: ВЭЖХ-хроматограмма продукта ЛФХ, образца АКВ70005-5.

Фиг. 11: Блок-схема процессов согласно данному изобретению.

Фиг. 12: Блок-схема процессов согласно данному изобретению.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В контексте данного документа термин «фосфолипид» относится к органическому соединению, которое имеет два фрагмента жирных кислот, присоединенных в положениях sn-1 и sn-2 глицерина, и концевую группу, связанную фосфатным остатком в положении sn-3 глицерина. Иллюстративные фрагменты концевой группы включают холин, этаноламин, серин и инозит. Фосфолипиды включают фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол и фосфатидную кислоту. Фрагмент жирной кислоты представляет собой часть молекулы жирной кислоты, которая связана в положении sn-1 или sn-2, например, сложноэфирной или простоэфирной связью. Когда фрагмент жирной кислоты представляет собой ацил жирной кислоты, алифатическую цепь жирного ацила присоединяется через сложноэфирную связь, а когда фрагмент жирной кислоты представляет собой алифатическую цепь жирной кислоты, алифатическая цепь присоединяется через простоэфирную связь. Когда конкретная жирная кислота упоминается в связи с фосфолипидом согласно изобретению (например, ЭПК или ДГК), поэтому ее следует рассматривать как ссылку на соответствующую ацильную группу жирных кислот или ее алифатическую цепь.

В контексте данного документа термин «эфирный фосфолипид» относится к фосфолипиду, в котором фрагмент жирной кислоты в одном из положений sn-1 или sn-2 представляет собой алифатическую цепь жирной кислоты, присоединенную через простоэфирную связь. Эфирные фосфолипиды включают, например, алкилацилфосфатидилхолин, алкилацилфосфатидилэтанолламин и алкилацилфосфатидилсерин.

В контексте данного документа термин «лизофосфолипид» относится к молекуле фосфолипида, которая имеет фрагмент жирной кислоты в одном из положений sn-1 и sn-2 молекулы и группу -ОН в другом положении, так что имеется один моль фрагмента жирной кислоты на моль молекулы фосфолипида. Термин лизофосфатидилхолин (ЛФХ) относится к молекуле фосфатидилхолина, имеющей остаток жирной кислоты в одном из положений sn-1 и sn-2 молекулы и группу -ОН в другом положении, так что имеется один моль фрагмента жирной кислоты на моль липида. Лизофосфолипиды могут быть обозначены как 1- или 2-лизофосфолипиды для обозначения положения группы -ОН в молекуле. Таким образом, 1-ЛФХ относится к лизофосфатидилхолину с группой -ОН в положении sn-1 молекулы и фрагментом жирной кислоты в положении sn-2. 2-ЛФХ

относится к лизофосфатидилхолину с группой -ОН в положении sn-2 молекулы и фрагментом жирной кислоты в положении sn-1. Когда лизофосфолипид представляет собой эфирный фосфолипид, фрагмент жирной кислоты представляет собой спирт жирного ряда, присоединенный через простоеэфирную связь в положении sn-1 или sn-2.

5 Когда лизофосфолипид представляет собой сложноэфирный фосфолипид, фрагмент жирной кислоты представляет собой сложный эфир жирной кислоты, присоединенный посредством сложноэфирной связи в положении sn-1 или sn-2.

В контексте данного документа термин «длинноцепочечная полиненасыщенная жирная кислота» относится к жирной кислоте, имеющей 20 или более атомов углерода,
10 которая ненасыщена по двум или более связям.

В контексте данного документа термин жирная кислота омега-3 относится к полиненасыщенным жирным кислотам, которые имеют конечную двойную связь в углеводородной цепи между третьим и четвертым атомами углерода от метильного конца молекулы. Неограничивающие примеры жирных кислот омега-3 включают 5,8,11,14,17-
15 эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК), 4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту (ДГК) и 7,10,13,16,19-докозапентаеновую кислоту (ДПК).

В контексте данного документа термин «физиологически приемлемый носитель» относится к любому носителю или наполнителю, обычно используемому с масляными фармацевтическими составами. Такие носители или наполнители включают, но не
20 ограничиваются ими, масла, крахмал, сахарозу и лактозу.

В контексте данного документа термин «носитель для пероральной доставки» относится к любым средствам пероральной доставки фармацевтических составов, включая, без ограничения, капсулы, пилюли, таблетки и сиропы.

В контексте данного документа термин «пищевой продукт» относится к любому
25 продукту питания или корму, подходящим для употребления людьми, нежвачными животными или жвачными животными. «Пищевой продукт» может представлять собой готовый и фасованный пищевой продукт (например, майонез, салатную заправку, хлеб или сырный продукт) или корм для животных (например, экструдированный и гранулированный корм для животных или грубый смешанный корм). «Готовый пищевой
30 продукт» означает любой предварительно упакованный пищевой продукт, одобренный для употребления человеком.

В контексте данного документа термин «продовольственный продукт» относится к любой субстанции, пригодной для употребления человеком или животным.

В контексте данного документа термин «функциональный пищевой продукт»
35 относится к пищевому продукту, к которому добавлена биологически активная добавка.

В контексте данного документа термин «продукт для детского питания» относится к пищевому продукту, разработанному для ребенка, такому как смесь.

В контексте данного документа термин «продукт для питания пожилых людей» относится к пищевому продукту, разработанному для лиц пожилого возраста.

5 В контексте данного документа термин «продукт для питания беременных» относится к пищевому продукту, разработанному для беременных женщин.

В контексте данного документа термин «пищевая добавка» относится к пищевому продукту, составленному в виде диетической или пищевой добавки, предназначенной для применения в качестве части диеты.

10 В контексте данного документа термин % мас. (мас./мас.), если не указано иное, относится к количеству данного вещества в композиции в расчете на массу и выражается в процентах от общей массы композиции. Например, композиция, содержащая 50 % мас. фосфолипидов, означает, что масса фосфолипидов составляет 50% от общей массы композиции (то есть 50 граммов фосфолипидов в 100 граммах композиции, такой как
15 масло). Когда в описании указана концентрация растворителя, она относится к массовой доле растворителя в указанном растворе растворителя. В качестве неограничивающего примера, 96% этанол содержит 96% этанола и 4% воды. В качестве другого неограничивающего примера, когда в описании описывается раствор липидов, содержащий 20 % мас. сухого вещества, и что растворитель представляет собой 95%
20 этанол, это означает, что 100 г раствора содержат всего 20 г сухого вещества и 80 г 95% этанола.

В контексте данного документа термин «крилевая мука» относится к высушенному порошку, приготовленному из криля и имеющему содержание влаги от около 3% до около 15%.

25

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение обеспечивает композиции лизофосфатидилхолинов морского происхождения для применения в фармацевтических составах, нутрицевтиках и функциональных пищевых продуктах, а также способы получения композиций
30 лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения. В особенно предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ получают из фосфолипидов криля, например фосфолипидов *Euphausia superba* или *Euphausia pacifica*. В других предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ получают из фосфолипидов *Calanus*, сельди, икры сельди или водорослей. Подходящие неочищенные экстракты фосфолипидов из

криля, обессоленные экстракты фосфолипидов из криля и способы обработки криля раскрыты в РСТ/IB2016/000208 и РСТ/IB2016/000326, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Интактные фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, обычно превращаются в лизофосфолипиды в тонкой кишке под действием фосфолипаз. Лизофосфолипиды затем всасываются в организм. Данные, представленные в данном документе, демонстрируют, что, когда композиции ЛФХ вводят перорально животным моделям, эти целевые жирные кислоты омега-3 в композиции включаются в большое количество тканей как с большей скоростью, так и в более высоком общем количестве, чем при пероральном введении в композиции ФХ (фосфатидилхолин), которые не содержат измеряемого количества лизофосфолипидов. Этот результат является неожиданным, учитывая тот факт, что можно ожидать, что различий не будет, поскольку известно, что перорально вводимый ФК эффективно превращается в лизофосфолипиды в кишечнике.

1. Исходные материалы

Данное изобретение не ограничено использованием какого-либо конкретного биологического исходного материала. В предпочтительных вариантах осуществления экстракт фосфолипидов получают из биологического исходного материала, а композиции ЛФХ получают путем ферментативной обработки экстракта фосфолипидов. Биологический исходный материал предпочтительно может быть или получен из биомассы водорослей, растительной биомассы или биомассы морских животных. В предпочтительных вариантах осуществления биомассы морских животных используют в качестве исходного материала. Подходящие биомассы морских животных включают, но не ограничиваются ими, криль, крабов, *Calanus*, планктон, яйца, раков, креветок, рыбу, особенно, сельдь, и моллюсков. Биологический исходный материал может быть или свежим, или замороженным, или может представлять собой материал, полученный из биомассы водорослей, растений или морских животных, такой как мука, порошок, гидролизат или коагулят (паста). Паста может представлять собой влажную пасту или сухую пасту. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления биологический исходный материал представляет собой материал из криля, например, крилевую муку, гидролизат криля, коагулят криля или свежий или замороженный криль. Может быть использован любой вид криля. В предпочтительных вариантах осуществления криль представляет собой *Euphausia superba* или *Euphausia pacifica*.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления биологический исходный материал представляет собой крилевую муку. Крилевая мука может быть предпочтительно получена при помощи любого стандартного процесса получения муки

морского происхождения. Как правило, крилевую муку получают путем варки только что выловленного криля при низкой температуре (приблизительно 80-85°C) и сушки для снижения содержания влаги примерно до 5-8%, а затем измельчения. В вариантах осуществления, где продукт предназначен для употребления человеком, предпочтительно 5 упаковывать и хранить еду в атмосфере азота без добавления антиоксидантов.

Соответственно, способы согласно данному изобретению могут использоваться с широким разнообразием исходных материалов. Остальная часть обсуждения процессов обычно относится к применению криля в качестве исходного материала. Однако будет понятно, что любой из исходных материалов, рассматриваемых в данном документе, 10 может быть заменен на крилевую муку в описанных процессах.

2. Экстракция растворителем из крилевой муки

На первом стадии процесса экстракции крилевую муку смешивают с подходящим растворителем для экстракции липидов из муки. В отличие от способов предшествующего уровня техники в данном изобретении используются условия, при которых 15 предпочтительно извлекать максимальное количество липидов из крилевой муки за счет увеличения количества загрязняющих веществ в первоначальном экстракте растворителя. В предпочтительных вариантах осуществления растворитель представляет собой органический протонный растворитель, однако могут также использоваться другие растворители, известные для использования в экстракции пищевых липидов, такие как 20 ацетон, гексан и т. д. Подходящие органические протонные растворители включают, но не ограничиваются этим, н-бутанол, н-пропанол, изопропанол, нитрометан, этанол и метанол. В особенно предпочтительных вариантах осуществления протонный растворитель представляет собой этанол.

В предпочтительных вариантах осуществления концентрация протонного 25 растворителя, используемого на начальной стадии экстракции растворителем, составляет по меньшей мере 90%, или предпочтительно от около 94% до 98%, более предпочтительно от около 95% до 97% и наиболее предпочтительно около 96% (например, 96% этанол или метанол).

В некоторых вариантах осуществления протонный растворитель смешивают с 30 биологическим исходным материалом в соотношении протонный растворитель: биологический исходный материал от около 1: 1 до 10: 1, предпочтительно от около 3: 1 до 6: 1, более предпочтительно от около 4: 1 до 5: 1, и наиболее предпочтительно около 4,4: 1.

В предпочтительных вариантах осуществления биологический исходный материал 35 экстрагируют протонным растворителем при температуре от около 5°C до 65°C, от около

20°C до около 60°C, предпочтительно от около 30°C до 50°C, более предпочтительно от около 30°C до 50°C и наиболее предпочтительно при температуре около 40°C. В

некоторых вариантах осуществления время экстракции (т.е. количество времени, в течение которого биологический исходный материал находится в контакте с

5 растворителем) составляет от около 10 минут до около 2 часов, предпочтительно от около 15 минут до 60 минут, более предпочтительно от около 20 минут до около 45 минут и наиболее предпочтительно около 30 минут.

После стадии экстракции неочищенный раствор липидов криля, содержащий липиды из крилевой муки, отделяют от смеси растворителя/крилевая мука, например, 10 путем декантации и/или фильтрации. Нерастворимый материал, содержащий белки и другие полезные материалы, затем сушат для выделения этанола. Оставшийся богатый белком пищевой продукт может впоследствии использоваться в пищевых продуктах, белковых добавках, кормах для животных и тому подобном. В некоторых вариантах осуществления декантированный раствор, содержащий растворимые липиды, содержит 15 сухого вещества от около 4 до 9 % мас. предпочтительно от около 5,5 до 7,5 % мас., и наиболее предпочтительно от около 6 до 7 % мас., где % мас.. относится к массе сухого вещества в процентах от общей массы раствора. В предпочтительных вариантах осуществления сухое вещество состоит по существу из неочищенных липидов криля и предпочтительно содержит более 90, 95, 96, 97, 98 или 99 % мас. липидов, где % мас. 20 относится к массе липидов в процентах от общей массы сухого вещества.

3. Обессоливание и концентрирование

В некоторых вариантах осуществления неочищенный раствор липидов криля обессоливают для удаления нерастворимых в гексане материалов, таких как нерастворимые неорганические соли (например, NaCl с небольшими или 25 незначительными количествами KCl и/или AlCl₃), а также нежелательных соединений, таких как оксид триметиламина, и металлов, таких как медь и мышьяк. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композицию ЛФХ согласно данному изобретению получают из обессоленной композиции липидов криля. Хотя способы описаны со ссылкой на обессоленные липиды криля, описанные выше, эти способы 30 обычно применимы к любым фракциям липидов, которые содержат фосфолипиды.

В некоторых вариантах осуществления неочищенный раствор липидов криля обессоливают путем выпаривания растворителя из неочищенного раствора липидов криля, чтобы получить неочищенную композицию липидов криля, и затем подвергая неочищенную композицию липидов криля повторной промывкой водным растворителем. 35 Подходящие водные растворители включают, но не ограничиваются ими, этанол,

смешанный с водой или деионизированной водой, так что концентрация этанола составляет от около 40% до 70%, предпочтительно от около 50% до 60%. В этих вариантах осуществления неочищенную композицию липидов криля смешивают с растворителем, липидную фазу выделяют, а водную фазу декантируют. Стадию промывки можно повторять по мере необходимости, например, 1, 2, 3, 4, 5 или более раз. Соотношение водный растворитель: неочищенная композиция липидов криля предпочтительно составляет от около 1: 1 до 1: 5 для каждой стадии промывки, более предпочтительно от около 1: 1 до 2,5: 1 и наиболее предпочтительно около 1: 1,7.

В некоторых вариантах осуществления неочищенный раствор липидов обессоливают при помощи хроматографии. Подходящие хроматографические среды включают силикагель, включая, но не ограничиваясь этим, сферические силикагели и дериватизированные силикагели, такие как C8 (октил-функционализированный диоксид кремния) и C18 (октадецил-функционализированный диоксид кремния), и ионообменные смолы, такие как смолы Dowex™. В вариантах осуществления, где используют хроматографию, неочищенные липиды криля предпочтительно наносят на хроматографическую среду в протонном растворителе, предпочтительно в том же растворителе, который используется при первоначальной экстракции (например, этаноле). Могут быть использованы стандартные способы колоночной хроматографии, однако предпочтительно могут быть использованы устройства для хроматографии с движущимся слоем или для хроматографии с псевдодвижущимся слоем. Данное изобретение не ограничено каким-либо конкретным типом устройства для хроматографической очистки. Действительно, в предпочтительных вариантах осуществления устройство для хроматографической очистки может представлять собой колонку, устройство с неподвижным слоем, устройство с псевдоподвижным слоем или устройство с подвижным слоем. В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления устройство представляет собой устройство с псевдоподвижным слоем (SMB). Подходящие системы SMB описаны, например, в патенте США №№ 9556116; 9650590; и 9560333; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Композиция обессоленных липидов криля на основе сухого вещества предпочтительно может быть охарактеризована следующим образом. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат от около 30 до 50 % мас. фосфолипидов, более предпочтительно от около 35 до около 45 % мас. фосфолипидов и наиболее предпочтительно около 40 % мас. фосфолипидов, причем % мас. относится к массе фосфолипидов в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля

предпочтительно содержат от около 32 до 52 % мас. триглицеридов, более предпочтительно от около 36 до около 48 % мас. триглицеридов и наиболее предпочтительно около 42 % мас. триглицеридов, причем % мас. относится к массе триглицеридов в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат от около 3 до около 13 % мас. свободных жирных кислот, более предпочтительно от около 5 до около 11 % мас. свободных жирных кислот и наиболее предпочтительно около 8 % мас. свободных жирных кислот, причем % мас. относится к массе свободных жирных кислот в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат от около 0,5 до 5 % мас. лизофосфолипидов, более предпочтительно от около 0,8 до около 3,2 % мас. лизофосфолипидов и наиболее предпочтительно от около 1,2 до около 2,8 % мас. лизофосфолипидов, причем % мас. относится к массе лизофосфолипидов в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат менее около 1 % мас. неорганических солей, более предпочтительно менее около 0,5 % мас. неорганических солей, еще более предпочтительно менее около 0,2 % мас. неорганических солей, и наиболее предпочтительно менее около 0,1 % мас. неорганических солей, причем % мас. относится к массе неорганических солей в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат менее около 5 мг N / 100 г, более предпочтительно менее около 3 мг N / 100 г, еще более предпочтительно менее около 2 мг N / 100 г и наиболее предпочтительно менее около 1 мг N / 100 г, причем содержание N служит удобным показателем для определения содержания оксида триметиламина (ТМАО). В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля содержат менее около 10 м.д. меди (Cu^{++}), более предпочтительно менее около 5 м.д. Cu^{++} , еще более предпочтительно менее около 2 м.д. Cu^{++} и наиболее предпочтительно менее около 1 м.д. Cu^{++} . В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля содержат менее около 10 м.д. общего мышьяка (As^{3+} , органический и неорганический), более предпочтительно менее около 5 м.д. общего мышьяка, еще более предпочтительно менее около 3 м.д. общего мышьяка и наиболее предпочтительно менее около 1 м.д. общего мышьяка. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля предпочтительно содержат от около 0,01 до 2 % мас. этиловых эфиров, более предпочтительно от около 0,01 до около 1,5 % мас. этиловых эфиров и наиболее предпочтительно от около 0,01 до около 1 % мас. этиловых эфиров, причем % мас. относится к массе этиловых эфиров в процентах от

общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат менее около 5, 4, 3 или 2 % мас. этиловых эфиров до нижнего предела 0,01% этиловых эфиров (то есть от 5 до 0,01 % мас. этиловых эфиров, от 4 до 0,01 % мас. этиловых эфиров, от 3 до 0,01 % мас. этиловых эфиров или от 2 до 0,01 % мас. этиловых эфиров), более предпочтительно менее около 1,5 % мас. этиловых эфиров, и наиболее предпочтительно менее около 1 % мас. этиловых эфиров, причем % мас. относится к массе этиловых эфиров в процентах от общей массы обессоленных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля имеют проводимость менее около 50 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле, более предпочтительно проводимость менее около 30 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле и наиболее предпочтительно проводимость менее около 20 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле. В некоторых вариантах осуществления обессоленные липиды криля имеют вязкость от около 50 до 800 мПа*с при 25°C, более предпочтительно от около 100 до 400 мПа*с при 25°C и наиболее предпочтительно от 180 до 340 мПа*с при 25°C. В некоторых вариантах осуществления обессоленные композиции липидов криля имеют рН от около 6,7 до 8,3 при измерении в 95% этаноле.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ согласно данному изобретению получают из композиции фосфолипидов, изготовленной из обессоленной композиции липидов криля. Хотя способы описаны со ссылкой на обессоленные липиды криля, описанные выше, эти способы обычно применимы к любым фракциям липидов, которые содержат фосфолипиды.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления содержание сухого вещества в композиции липидов, содержащей фосфолипиды, такой как обессоленная композиция липидов криля, описанная выше, доводят до заранее определенного уровня путем добавления или удаления растворителя, и получающуюся в результате смесь позволяют фракционировать таким образом, что фосфолипиды преимущественно отделяются в одну фазу, а нейтральные липиды отделяются в другую фазу. В некоторых вариантах осуществления композицию липидов, содержащую фосфолипиды, такие как обессоленные липиды криля, смешивают с подходящим протонным растворителем, предпочтительно этанолом, так что содержание сухого вещества (то есть липида) в полученном растворе составляет от около 10 до 40 % мас., предпочтительно от около 15 до 35 % мас., более предпочтительно от около 18 до 30 % мас., и наиболее предпочтительно от около 20 до 25 % мас.. В вариантах осуществления, где стадия обессоливания уже обеспечивает липиды в подходящем протонном спиртовом растворе,

как, например, в случае, когда этанол используется в качестве растворителя для хроматографии, обессоленный раствор липидов криля предпочтительно может быть выпарен для обеспечения желаемого содержания сухого вещества, т.е. от около 10 до 40 % мас., предпочтительно от около 15 до 35 % мас., более предпочтительно от около 18 до 28 % мас., и наиболее предпочтительно от около 20 до 22 % мас.. Подходящие способы выпаривания включают, но не ограничиваются ими, выпаривание при пониженном давлении (например, вакуумную перегонку), выпаривание в падающей пленкой и удаление растворителей через мембрану.

После доведения содержания сухого вещества до желаемого уровня путем добавления или удаления растворителя, раствору затем дают возможность фракционировать в верхний раствор легкой фазы с обогащенным содержанием фосфолипидов и в более низкий раствор тяжелой фазы, содержащий преимущественно нейтральные липиды и высокий уровень астаксантина. Предпочтительно температуру раствора на стадии фракционирования контролируют. В некоторых вариантах осуществления температура для стадии фракционирования составляет от около 0°C до около 20°C, предпочтительно от около 5°C до около 15°C, более предпочтительно от около 8°C до около 12°C и наиболее предпочтительно около 10°C.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию протонного растворителя можно варьировать для контроля концентрации фосфолипида в композиции липидов верхней фазы. В некоторых вариантах осуществления протонный растворитель имеет концентрацию от около 55% до 100%, более предпочтительно от около 65% до 98%. В некоторых предпочтительных вариантах протонный растворитель имеет концентрацию от около 90% до 100%, более предпочтительно от около 92% до 98% и наиболее предпочтительно около 95%. В этих вариантах осуществления содержание фосфолипидов в пересчете на сухое вещество липидов в верхней фазе после фракционирования составляет от около 50 до 70 % мас., предпочтительно от около 55 до 65 % мас., и наиболее предпочтительно около 60 % мас.. В еще других предпочтительных вариантах осуществления протонный растворитель имеет концентрацию от около 80 до 90 % мас., более предпочтительно от около 82 до 88 % мас., и наиболее предпочтительно около 85 % мас.. В этих вариантах осуществления содержание фосфолипидов в пересчете на сухое вещество липидов в верхней фазе после фракционирования составляет от около 70 до 90 % мас., предпочтительно от около 75 до 85 % мас., и наиболее предпочтительно около 80 % мас..

В некоторых вариантах осуществления верхнюю и нижнюю фазы разделяют при помощи центрифугирования, предпочтительно криоцентрифугирования с использованием

двухфазного или трехфазного сепаратора. В некоторых вариантах осуществления центрифугирование проводят при температуре от около 0°C до около 30°C, более предпочтительно от около 0°C до около 10°C и наиболее предпочтительно от около 3°C до около 7°C. В общем, используемая сила тяжести будет зависеть от дельты T между фазами. Более низкие температуры обеспечивают большую дельту T. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ускорение силы тяжести, используемое при разделении, составляет от около 8000 X G до около 15000 X G.

В некоторых вариантах осуществления стадии процесса регуляции содержания сухого вещества, как описано выше, посредством стадий центрифугирования повторяют один или более раз.

В некоторых вариантах осуществления верхнюю легкую фазу собирают и обрабатывают дополнительно. Растворитель предпочтительно удаляют из верхней фазы с помощью одной или более стадий выпаривания с получением композиции фосфолипидов криля. Композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат от около 50 до 85 % мас. фосфолипидов и более предпочтительно от около 55 до 80 % мас. фосфолипидов, причем % мас. относится к массе фосфолипидов в процентах от общей массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления нижнюю тяжелую фазу собирают и обрабатывают дополнительно. В некоторых вариантах осуществления растворитель удаляют из нижней фазы, чтобы получить композицию нейтральных липидов криля. В некоторых вариантах осуществления нижняя фаза может быть фракционирована протонным растворителем и подвергнута второй стадии центрифугирования для выделения дополнительных фосфолипидов, которые не были выделены на первой стадии фракционирования. Аналогично вышеуказанному растворитель удаляют из полученной нижней фазы, чтобы получить композицию нейтральных липидов криля. Композиция нейтральных липидов криля в обоих случаях характеризуется высоким содержанием астаксантина. В некоторых вариантах осуществления композицию нейтральных липидов криля можно комбинировать или смешивать с композицией фосфолипидов криля для получения композиции липидов с требуемыми уровнями фосфолипидов, нейтральных липидов и астаксантина. В некоторых вариантах осуществления композицию нейтральных липидов криля можно дополнительно обработать (например, при помощи хроматографии) для получения композиции астаксантина. Композицию астаксантина затем можно комбинировать или смешивать с композицией фосфолипидов криля для получения композиции липидов с желаемым уровнем фосфолипидов и астаксантина.

В некоторых вариантах осуществления процессы дополнительно включают стадию добавления триглицеридного масла, такого как среднецепочечное триглицеридное масло

или длинноцепочечное триглицеридное масло, на любой стадии процесса. Например, триглицеридное масло может быть добавлено к собранной легкой фазе, тяжелой фазе, композиции фосфолипидов или композиции нейтральных липидов. В некоторых вариантах осуществления стадии процесса регуляции содержания сухого вещества, как описано выше, посредством стадии центрифугирования и/или стадий выпаривания повторяют один или более раз.

В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов и нейтральных липидов криля получают на дополнительной стадии хроматографии. В этих вариантах осуществления по меньшей мере часть потока, обогащенного обессоленными липидами, описанного выше, вводят в зону экстракции полярным растворителем, включающую адсорбер с неподвижным слоем, содержащий макропористую стирольную полимерную бисерную смолу, эффективную для адсорбции нейтральных липидов. В предпочтительных вариантах осуществления стадия хроматографии с неподвижным слоем обеспечивает поток экстракта полярных липидов, содержащий растворитель и по меньшей мере 50 % мас. полярных липидов на сухое вещество. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления адсорбер с неподвижным слоем периодически регенерируют потоком горячего этанола при температуре горячей регенерации от около 40°C до около 60°C, чтобы получить поток рафината нейтральных липидов, содержащий растворитель, нейтральные липиды и астаксантин. В некоторых вариантах осуществления растворитель восстанавливают из потока экстракта полярных липидов для получения композиции фосфолипидов криля и из потока рафината нейтральных липидов для получения композиции нейтральных липидов. Данные процессы более подробно описаны в находящейся в настоящее время на рассмотрении заявки на патент США №14/619102, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля в пересчете на сухое вещество предпочтительно содержат от около 5 % мас. до 35 % мас. триглицеридов, более предпочтительно от около 10 % мас. до около 30 % мас. триглицеридов и наиболее предпочтительно от около 15 до 25 % мас. триглицеридов, причем % мас. относится к массе триглицеридов в процентах от общей массы композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат от около 2 % мас. до 13 % мас. свободных жирных кислот, более предпочтительно от около 4 % мас. до около 11 % мас. свободных жирных кислот и наиболее предпочтительно от около 4 до 10 % мас. свободных жирных кислот, причем % мас. относится к массе свободных жирных кислот в процентах от общей массы

композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат от около 0,5 % мас. до 10 % мас. лизофосфолипидов, более предпочтительно от около 0,8 % мас. до около 7,0 % мас. лизофосфолипидов и наиболее предпочтительно менее около 5,0 % мас. или 3,0 % мас. лизофосфолипидов, причем % мас. относится к массе лизофосфолипидов в процентах от общей массы композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат менее около 1 % мас. неорганических солей, более предпочтительно менее около 0,5 % мас. неорганических солей, еще более предпочтительно менее около 0,2 % мас. неорганических солей и наиболее предпочтительно менее около 0,1 или 0,05 % мас. неорганических солей, причем % мас. относится к массе неорганических солей в процентах от общей массы композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиция фосфолипидов криля предпочтительно содержит менее около 5 мг N / 100 г, более предпочтительно менее около 3 мг N / 100 г, еще более предпочтительно менее около 2 мг N / 100 г и наиболее предпочтительно менее около 1 мг N / 100 г, причем содержание N служит удобным показателем для определения содержания оксида триметиламина (ТМАО). В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля содержат менее около 10 м.д. меди (Cu^{++}), более предпочтительно менее около 5 м.д. Cu^{++} , еще более предпочтительно менее около 2 м.д. Cu^{++} и наиболее предпочтительно менее около 1 м.д. Cu^{++} . В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля содержат менее около 10 м.д. общего мышьяка (As^{3+}), более предпочтительно менее около 5 м.д. общего мышьяка, еще более предпочтительно менее около 3 м.д. общего мышьяка и наиболее предпочтительно менее около 1 м.д. общего мышьяка. В некоторых вариантах осуществления композиции фосфолипидов криля предпочтительно содержат от около 0,01 до 2 % мас. этиловых эфиров, более предпочтительно от около 0,01 до около 1,5 % мас. этиловых эфиров и наиболее предпочтительно от около 0,01 до около 1 % мас. этиловых эфиров, причем % мас. относится к массе этиловых эфиров в процентах от общей массы композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления композиция фосфолипидов криля предпочтительно содержат менее около 5, 4, 3 или 2 % мас. этиловых эфиров до нижнего предела 0,01 % мас. этиловых эфиров (то есть от 5 до 0,01 % мас. этиловых эфиров, от 4 до 0,01 % мас. этиловых эфиров, от 3 до 0,01 % мас. этиловых эфиров или от 2 до 0,01 % мас. этиловых эфиров), более предпочтительно менее около 1,5 % мас. этиловых эфиров, и наиболее предпочтительно менее около 1 % мас. этиловых эфиров, причем % мас. относится к массе этиловых эфиров в процентах от общей массы композиции фосфолипидов криля. В некоторых вариантах осуществления

композиция фосфолипидов криля имеет проводимость менее около 50 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле, более предпочтительно проводимость менее около 30 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле и наиболее предпочтительно проводимость менее около 20 мкСм/см, 10 мкСм/см, 5 мкСм/см или 1 мкСм/см при измерении с 5% сухого вещества в 95% этаноле. В некоторых вариантах осуществления композиция фосфолипидов криля имеет вязкость от около 400 до 2000 мПа*с при 35°C, более предпочтительно от около 500 до 1800 мПа*с при 35°C, и наиболее предпочтительно от около 600 до 1600 мПа*с при 35°C. В некоторых вариантах осуществления композиция фосфолипидов криля имеет рН от около 6,7 до 8,3 при измерении в 95% этаноле.

4. Получение композиции ЛФХ

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ согласно данному изобретению получают из источников фосфолипидов, описанных выше. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способы получения композиции лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) с высоким содержанием ЭПК и ДГК из морского или другого сырья, содержащего фосфолипиды, включающие обработку морского сырья фосфолипазой, которая не является нативной для морского сырья, для получения обработанного фосфолипазой сырья, и фракционирование обработанного фосфолипазой сырья для получения композиции липидов, имеющей более высокое содержание лизофосфатидилхолинов, чем исходное сырье. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье выбрано из группы, состоящей из липидного состава из криля, липидного состава из сельди, липидного состава из икры сельди, липидного состава из водорослей и липидного состава из *Calanus*, таким образом обеспечивая композицию ЛФХ криля, композицию ЛФХ сельди, композицию ЛФХ икры сельди, композицию ЛФХ водорослей или композицию ЛФХ *Calanus*. В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления липидный состав из криля представляет собой липидный состав из *Euphausia superba*. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления сырье содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-70 % мас. и ДГК: 1-70 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-70 % мас. и ДГК: 5-70 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-60 % мас. и ДГК: 10-60 % мас..

В некоторых вариантах осуществления сырье приводят в контакт с фосфолипазой в растворителе. Данное изобретение не ограничено использованием какой-либо конкретной фосфолипазы. В некоторых вариантах осуществления фосфолипаза представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1). В некоторых особенно предпочтительных вариантах

осуществления фермент представляет собой LECITASE™ Ultra, QUARA™ LowP. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой смесь воды и спирта. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления спирт представляет собой этанол. В еще более предпочтительных вариантах осуществления сырье приводят в контакт с фосфолипазой в смеси около 85% воды и 15% этанола. В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), и концентрация фермента находится в диапазоне 0,1-20 % об./мас., предпочтительно 0,1-15 % об./мас., более предпочтительно 0,1-10 % об./мас., еще более предпочтительно 0,1-5 % об./мас., наиболее предпочтительно 0,1-3 % об./мас.. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем способ осуществляют при pH 3-12, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 4-9, наиболее предпочтительно 5-9. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем способ осуществляют при температуре 4-95 °С, предпочтительно 4-85 °С, более предпочтительно 10-80 °С, еще более предпочтительно 15-70 °С, еще более предпочтительно 15-65 °С, наиболее предпочтительно 15-60 °С.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ согласно данному изобретению получают с помощью дополнительных процедур концентрирования растворителя и/или хроматографического разделения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композицию ЛФХ, обработанную ферментом, концентрируют путем разделения фаз в полярной/неполярной системе растворителей. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композицию ЛФХ, обработанную ферментом, смешивают с системой растворителей, содержащей равные количества полярного растворителя (например, метанола) и неполярного растворителя (например, гептана). Полученную смесь перемешивают, и фазы оставляют разделяться. Полярные липиды (например, ЛФХ и ФХ) разделяются в полярную фазу. В некоторых вариантах осуществления полярную фазу удаляют, промывают гептаном и полярную фазу восстанавливают. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления полярную фазу затем выпаривают досуха, чтобы получить концентрированную композицию ЛФХ. В некоторых вариантах осуществления композицию ЛФХ можно дополнительно концентрировать при помощи хроматографии, например флэш-хроматографии с использованием силикагеля 60 с последующим выпариванием досуха.

Способы, описанные выше, позволяют получать композиции ЛФХ с предпочтительными характеристиками и/или свойствами. В некоторых

предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-100 % мас. и/или ДГК: 1-100 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-100 % мас. и/или ДГК: 5-100 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-90 % мас. и/или ДГК: 10-90 % мас.. В еще более предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ содержит ЛФХ в пределах 10-100 % мас., предпочтительно 20-100 % мас., более предпочтительно 30-100 % мас., еще более предпочтительно 40-100 % мас., наиболее предпочтительно 50-100 % мас..

В еще более предпочтительных вариантах осуществления композиция ЛФХ, полученная при помощи процесса, отличается тем, что она содержит:

от около 10 до около 100 % мас. ЛФХ в композиции или от 60 до 100 % мас. ЛФХ, от 70 до 90 % мас. ЛФХ, от 20 до 50 % мас. ЛФХ, от 20 до 40 % мас. ЛФХ, от 20 до 30 % мас. ЛФХ, от 10 до 30 % мас. ЛФХ и содержит жирные кислоты омега-3 в концентрации от 5 до 60 % мас. в композиции, от 5 до 50 % мас. в композиции, от 5 до 40 % мас. в композиции, или от 5 до 30 % мас. в композиции, или от 20 до 60 % мас. в композиции, от 20 до 50 % мас. в композиции, или от 20 до 40 % мас. в композиции или от 30 до 50 % мас. в композиции. Специалистам в данной области техники будет понятно, что содержание жирных кислот омега-3 включает содержание ацильных цепей жирных кислот омега-3, которые связаны сложноэфирными или простоэфирными связями с молекулами фосфолипида и глицерина в композиции. Мас.% содержание ацильных групп жирных кислот омега-3 в композиции предпочтительно может быть определено с помощью ¹H-ЯМР или других подходящих методов ЯМР, включая ¹³C-ЯМР. Альтернативно, содержание жирных кислот омега-3 может быть выражено в г / 100 г жирных кислот при анализе при помощи газовой хроматографии, как известно в данной области техники. В этих вариантах осуществления композиции лизофосфолипидов предпочтительно содержат от 10 до 50 г / 100 г жирных кислот омега-3, и наиболее предпочтительно от 20 до 40 г / 100 г жирных кислот омега-3, причем г / 100 г представляет собой массу жирных кислот омега-3 на 100 г общих жирных кислот согласно данным газовой хроматографии.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции лизофосфолипидов дополнительно имеют одну или более следующих характеристик или свойств:

а) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1: 8 до 18: 1, и более предпочтительно от 1,2: 1 до 8: 1, от 1,2: 1 до 4: 1, от 1,2: 1 до 2: 1, от 4: 1 до 10: 1; или от 5: 1 до 12: 1;

б) содержание фосфатидилхолина (ФХ) от 0,5 до 10 % мас. в композиции и более предпочтительно менее 10, 9, 8, 7, 6 или 5 % мас. в композиции;

в) содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) менее 1,2, 1,1, 1,0, 0,7 или 0,5 % мас. в композиции;

d) содержание нейтральных липидов от около 5 до 65 % мас. в композиции или более предпочтительно от около 45 до 65 % мас. или от 15 до 35 % мас.;

е) соотношение 2-ЛФХ: простой эфир 2-ЛФХ от 15: 1 до 50: 1 и более предпочтительно от 50: 1 до 25: 1, и при этом композиции предпочтительно могут содержать менее 5%, 4%, 3%, 2%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% 2-ЛФХ-эфир; и/или

ф) соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1, ДГК: ЭПК от 1: 1 до 5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции содержат от 20 до 40 % мас. или от 23 до 35 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции содержат от 40 до 60 % мас., от 40 до 70 % мас. или от 50 до 70 % мас. ЛФХ в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 70 до 90 % мас. ЛФХ в композиции. Что касается свойства (f), когда композицию ЛФХ получают из фосфолипидов криля, композиция ЛФХ предпочтительно будет содержать соотношение ЭПК: ДГК от 1: 1 до 3: 1 и более предпочтительно от 1,5: 1 до 2,5:1. Что касается свойства (f), где композицию ЛФХ получают из морских источников, отличных от криля (например, сельди, икры сельди или морских водорослей), композиция ЛФХ предпочтительно будет содержать соотношение ДГК: ЭПК от 1: 1. до 5: 1, более предпочтительно от 2: 1 до 4: 1 и наиболее предпочтительно от 2,5: 1 до 3,5: 1.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит от 35 до 45 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет свойством (a), (b), (c), (d), (e) или (f) или комбинацию свойств, например: свойств (a) и (b); (a) и (c); (a) и (d); (a) и (e); (a) и (f) (b) и (c); (b) и (d); (b) и (e); (b) и (f); (c) и (d); (c) и (e); ((c) и (f); (d) и (e); (d) и (f); (e) и (f); (a), (b) и (c); (a), (b) и (d); (a), (b) и (e); (a), (b) и (f); (a), (c) и (d); (a), (c) и (e); (a), (c) и (f); (a), (d) и (e); (a), (d) и (f); (b), (c) и (d); (b), (c) и (e); (b) (c) и (f); (b), (d) и (e); (b), (d) и (f); (c), (d) и (e); (c), (d) и (f); (a), (b), (c), и (d); (a), (b), (c), и (e); (a), (b), (c) и (f); (b), (c), (d), и (e); (b), (c), (d) и (f); (a), (c), (d), и (e); (a), (c), (d) и (f); (a), (b), (d), и (e); (a), (b), (d) и (f); (a), (b), (c), (d) и (e); (a), (b), (c), (d), и (f); (b), (c), (d), (e), и (f); (a), (b), (d), (e) и (f); (a), (b), (c), (e) и (f); и (a), (b), (c), (d), (e) и (f), а также любые другие возможные комбинации. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции имеют два или более свойств (a), (b) и (c). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет два или более свойств (a), (b), (c), (d) и (e). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет три или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет четыре или

более свойств (a), (b), (c), (d) и (e). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция имеет пять или более свойств (a), (b), (c), (d), (e) и (f).

5. Состав композиций ЛФХ

5 В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает фармацевтическую или нутрицевтическую композицию, содержащую композицию ЛФХ, как описано выше, и физиологически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления физиологически приемлемый носитель представляет собой липидный носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает носитель для пероральной доставки, содержащий композицию ЛФХ морского происхождения, фармацевтическую композицию или нутрицевтическую композицию, как описано в данном документе.

15 В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композицию липидов, содержащую фракцию липидов и вторую фракцию липидов, причем первая фракция липидов представляет собой композицию ЛФХ морского происхождения, как описано в данном документе, и вторая фракция липидов получена из источника, отличного от первой фракции липидов, и/или содержит менее 20% ЛФХ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вторая фракция липидов выбрана из группы, состоящей из фракции триглицеридов, фракции диглицеридов, фракции этиловых эфиров жирных кислот, фракции свободных жирных кислот и их комбинаций. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вторая фракция липидов представляет собой фракцию липидов морского происхождения, содержащую ЭПК и/или ДГК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает фармацевтическую или нутрицевтическую композицию, содержащую описанную выше композицию липидов и физиологически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данное изобретение предоставляет носитель для пероральной доставки, содержащий липидные композиции, как описано выше.

30 Композиции ЛФХ согласно данному изобретению предпочтительно вводят перорально. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции согласно данному изобретению (такие как описанные в предыдущих разделах) содержатся в приемлемых наполнителях и/или носителях для перорального употребления. Фактическая форма носителя и, следовательно, сама композиция не являются критическими. Носитель может представлять собой жидкость, гель, желатиновую капсулу, порошок, твердую таблетку (с покрытием или без), чай или тому

подобное. Композиция предпочтительно находится в форме таблетки или капсулы и наиболее предпочтительно в форме мягкой гелевой капсулы. Подходящие наполнители и/или носители включают растительное масло, рыбий жир, крилевое масло, мальтодекстрин, карбонат кальция, дикальцийфосфат, трикальцийфосфат, микрокристаллическую целлюлозу, декстрозу, рисовую муку, стеарат магния, стеариновую кислоту, кроскармеллозу натрия, крахмалгликолят натрия, кросповидон, сахарозу, растительные смолы, лактозу, метилцеллюлозу, повидон, карбоксиметилцеллюлозу, кукурузный крахмал и тому подобное (включая их смеси). Предпочтительные носители включают карбонат кальция, стеарат магния, мальтодекстрин и их смеси. Различные ингредиенты и наполнитель и/или носитель смешивают и составляют в желаемую форму с использованием традиционных методик. Таблетка или капсула согласно данному изобретению может быть покрыта энтеросолюбильной оболочкой, которая растворяется при pH от около 6,0 до 7,0. Подходящее энтеросолюбильное покрытие, которое растворяется в тонкой кишке, но не в желудке, представляет собой ацетатфталат целлюлозы. Дополнительную информацию о методиках составления и введения можно найти в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Истон, Пенсильвания).

В некоторых вариантах осуществления композиции ЛФХ составляют для перорального введения с ароматизаторами или подсластителями. Примеры полезных ароматизаторов включают, но не ограничиваются ими, натуральный анисовый ароматизатор, искусственный банановый ароматизатор, искусственный вишневый ароматизатор, экстракт какао-бобов, натуральный лимонный экстракт, натуральный апельсиновый экстракт, натуральный мятный экстракт, искусственный ананасовый ароматизатор, искусственный ромовый ароматизатор, искусственный клубничный ароматизатор, или натуральный ванильный экстракт; или эфирные масла, такие как бальзамное масло, лавровое масло, масло бергамота, кедровое масло, масло грецкого ореха, вишневое масло, коричное масло, гвоздичное масло или масло мяты перечной; арахисовое масло, шоколадный ароматизатор, крошки ванильного печенья, ирис или тоффи. В одном варианте осуществления диетическая добавка содержит какао или шоколад. Эмульгаторы могут быть добавлены для стабильности конечного продукта. Примеры подходящих эмульгаторов включают, но не ограничиваются ими, лецитин (например, из яйца или сои) и/или моно- и диглицериды. Другие эмульгаторы очевидны для специалиста в данной области техники, и выбор подходящего эмульгатора(ов) будет частично зависеть от состава и конечного продукта. В дополнение к углеводам, описанным выше, пищевая добавка может содержать натуральные или искусственные

(предпочтительно низкокалорийные) подсластители, например сахариды, цикламаты, аспартамин, аспартам, ацесульфам К и/или сорбит.

Композиции ЛФХ согласно данному изобретению также могут быть доставлены в виде диетических добавок, пищевых добавок или функциональных пищевых продуктов.

5 Биологически активная добавка может содержать один или более инертных ингредиентов, особенно если желательно ограничить количество калорий, добавляемых в рацион диетической добавкой. Например, диетическая добавка согласно данному изобретению может также содержать необязательные ингредиенты, включая, например, травы, витамины, минералы, усилители, красители, подсластители, ароматизаторы, 10 инертные ингредиенты и тому подобное. Например, диетическая добавка согласно данному изобретению может содержать один или более из следующих компонентов: аскорбаты (аскорбиновая кислота, минеральные соли аскорбата, шиповник, ацерола и тому подобное), дегидроэпиандростерон (DHEA), зеленый чай (полифенолы), инозитол, водоросли, красную водоросль, биофлавоноиды, мальтодекстрин, крапива, ниацин, 15 ниацинамид, розмарин, селен, диоксид кремния (диоксид кремния, силикагель, полевой хвощ, хвощ и тому подобное), спирулина, цинк и тому подобное. Такие необязательные ингредиенты могут быть или природными, или концентрированными формами.

В некоторых вариантах осуществления диетические добавки дополнительно содержат витамины и минералы, включая, но не ограничиваясь этим, фосфат кальция или 20 ацетат, трехосновный; фосфат калия, двухосновный; сульфат или оксид магния; соль (хлорид натрия); хлорид или ацетат калия; аскорбиновая кислота; ортофосфат железа; ниацинамид; сульфат или оксид цинка; пантотенат кальция; глюконат меди; рибофлавин; бета-каротин; пиридоксин гидрохлорид; тиамин мононитрат; фолиевую кислоту; биотин; хлорид или пиколонат хрома; йодистый калий; селенат натрия; молибдат натрия; 25 филлохинон; витамин D₃; цианокобаламин; селенит натрия; сульфат меди; витамин А; витамин С; инозитол; йодистый калий. Подходящие дозировки для витаминов и минералов можно получить, например, путем ознакомления с рекомендуемыми суточными нормами потребления (RDA) США.

В других вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает питательные 30 добавки (например, энергетические батончики или заменяющие еду батончики или напитки), содержащие композиции ЛФХ согласно данному изобретению. В предпочтительных вариантах осуществления питательные добавки содержат эффективное количество описанных выше компонентов. Питательная добавка может выступать в качестве заменителя еды или закуски и в целом обеспечивать калориями.

35 Предпочтительно питательные добавки обеспечивают сбалансированное количество

углеводов, белков и жиров. Питательная добавка может дополнительно содержать углеводы, простые, средней длины или полисахариды или их комбинации. Для обеспечения требуемых органолептических свойств можно выбрать простой сахар. Сырой кукурузный крахмал представляет собой один из примеров сложного углевода. Если требуется сохранить высокомолекулярную структуру крахмала, его следует включать только в пищевые составы или их части, которые не были доведены до готовности или подвергнуты тепловой обработке, поскольку тепло разрушает сложный углевод до простых углеводов, причем простые углеводы представляют собой моно- или дисахариды. В одном варианте осуществления питательная добавка содержит комбинации источников углеводов с тремя длинами цепей (простые, средние и сложные, например, сахароза, мальтодекстрины и сырой кукурузный крахмал).

В еще других вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает пищевые продукты, приготовленные пищевые продукты или продовольственные продукты (т.е. функциональные пищевые продукты), содержащие композиции ЛФХ согласно данному изобретению. В предпочтительных вариантах осуществления указанные продукты питания содержат эффективное количество компонентов, описанных выше. Например, в некоторых вариантах осуществления предложены напитки и твердые или полутвердые продукты питания, содержащие жирные кислоты или их производные. Эти формы могут включать, но не ограничиваются ими, напитки (например, безалкогольные напитки, молоко и другие молочные напитки и диетические напитки), хлебобулочные изделия, пудинги, молочные продукты, кондитерские изделия, закуски или замороженные кондитерские изделия или новинки (например, мороженое, молочные коктейли), замороженные полуфабрикаты, конфеты, закуски (например, чипсы), супы, спреды, соусы, салатные заправки, готовые мясные продукты, сыр, йогурт и любые другие продукты питания, содержащие жиры или масла, и пищевые ингредиенты (например, пшеничную муку).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиции ЛФХ вводят в жевательные матрицы. Предпочтительные жевательные матрицы представляют собой желейные конфеты и мармеладные конфеты на основе желатина. Примеры мармеладных конфет включают мармеладных медведей, мармеладных червей, мармеладных лягушек, мармеладные гамбургеры, мармеладные вишни, мармеладные бутылки с содовой, мармеладных акул, мармеладных солдат, мармеладных бегемотов, мармеладных омаров, мармеладных арбузов, мармеладных осьминогов, мармеладные яблоки, мармеладные персики и мармеладные апельсины. Термины «мармеладный» (gummi) и «мармеладный» (gummy) в данном документе применяются взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции, содержащие композиции ЛФХ, описанные выше, и одно или более дополнительных производных жирных кислот омега-3 или свободных жирных кислот. Производные омега-3 жирных кислот или свободные жирные кислоты могут быть

5 получены из экстракта нейтральных липидов или из дополнительного источника, такого как рыбий жир композиция сложных эфиров омега-3. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных производных жирных кислот омега-3 выбраны из сложных эфиров и глицеридов омега-3. Например, в некоторых вариантах осуществления указанная композиция может содержать от около 1 до около 60 % мас.

10 композиции крилевого масла (т.е. масса фосфолипидных соединений/общая масса композиции), при этом оставшиеся от 99 до 40 % мас. представляют собой омега-3 глицериды, сложные эфиры или свободные жирные кислоты или их комбинацию (т.е. масса глицеридов, сложных эфиров или свободных жирных кислот омега-3 или их комбинация/общая масса композиции). В некоторых вариантах осуществления

15 композиция может содержать от около 5 до около 60 % мас. фосфолипидов, при этом оставшиеся от 95 до 40 % мас. композиции представляют собой глицериды, сложные эфиры или свободные жирные кислоты омега-3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать от около 20 до около 60 % мас. фосфолипидов, при этом оставшиеся от 80 до 40 % мас. композиции представляют собой

20 глицериды, сложные эфиры или свободные жирные кислоты омега-3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать от около 30 до около 60 % мас. фосфолипидов, при этом оставшиеся от 70 до 40 % мас. композиции представляют собой глицериды, сложные эфиры или свободные жирные кислоты омега-3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления композиция может

25 содержать от около 40 до около 60 % мас. фосфолипидов, при этом оставшиеся от 60 до 40 % мас. композиции представляют собой глицериды, сложные эфиры или свободные жирные кислоты омега-3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать от около 50 до около 60 % мас. фосфолипидов, при этом оставшиеся от 50 до 40 % мас. композиции представляют собой глицериды, сложные

30 эфиры или свободные жирные кислоты омега-3 или их комбинацию.

Композиции ЛФХ согласно данному изобретению могут быть дополнительно включены в корм и рацион животных и рыб. Для животных и рыб могут быть

приготовлены различные кормовые рационы из разных кормовых ингредиентов. Рационы обычно составляются для обеспечения питательными веществами в соответствии со

35 стандартами Национального исследовательского совета. Кормовые продукты,

используемые в рационе, выбираются в соответствии с рыночной ценой и доступностью. Таким образом, некоторые компоненты рациона могут со временем меняться. В кормах согласно данному изобретению рацион всегда будет содержать композицию ЛФХ согласно изобретению, предпочтительно в количестве от 0,1% до 50%, от 0,5% до 50%, от 1,0% до 40%, от 1,0% до 30%, от 1,0% до 20%, от 1,0% до 10%, от 0,1% до 10% или от 0,5% до 5% от общего количества жира в рационе. Для обсуждения составления кормового рациона, фактического рациона и руководящих принципов NRC см. Church, Livestock Feeds and Feeding, O&B Books, Inc., Corvallis, Oreg. (1984) и Feeds and Nutrition Digest, Ensminger, Oldfield and Heineman eds., Ensminger Publishing Corporation, Clovis, CA (1990), включенных в данный документ в посредством ссылки.

Рационы для кормления животных согласно данному изобретению могут быть охарактеризованы согласно требованиям NRC. Требования NRC могут быть найдены в Church, Feeds and Feeds, O&B Books, Inc., Corvallis, Oreg. (1984) или других справочных кормовых данных. Рационы животных и рыб традиционно балансируют с использованием требований к белку и энергии, а затем корректируются, если необходимо, для удовлетворения других требований. Корм для животных и рыб согласно данному изобретению будет содержать от около 0,05 до 5% липидов плюс другие кормовые материалы, необходимые для уравнивания корма для соответствия требованиям NRC (или другим признанным требованиям) для различных стадий роста и содержания.

Относительные количества белка и энергии корректируются с учетом стандартных требований. Количество компонентов корма будет зависеть от стадии кормления животных. Растовой рацион для молодых животных и рыб будет иметь более высокие уровни белка, в то время как конечный рацион для конечных животных на рынке будет иметь более высокие энергетические показатели, которые обеспечиваются углеводами. Например, престартерные, стартерные, финишные рационы животных обычно содержат около 20-24% белка, 18-20% белка и 13-17% белка, соответственно. В некоторых ситуациях при кормлении необходимо соблюдать осторожность, чтобы обеспечить соответствующие аминокислоты, а также общее содержание белка. Потребности в энергии также могут быть удовлетворены путем добавления жира в рацион. В данном изобретении композиция лизофосфолипидов обеспечивает часть потребности в энергии.

Типичные рационы лосося согласно изобретению включают от около 5 до 65% рыбной муки и/или крилевой муки, от 5 до 30% растительного масла и 5-15% рыбьего жира, выраженные в % мас. компонента/массы рациона (% по массе) и от 0,5 до 5% композиции ЛФХ согласно данному изобретению для обеспечения общего содержания жира от 10 до 45 % мас. в рационе. В некоторых вариантах осуществления рационы

содержат от около 32 до 46%, предпочтительно от около 36% до 42% неочищенных белков, от около 26% до 42%, предпочтительно от около 28% до 38% неочищенного липидов, от около 11% до 18%, предпочтительно от около 13% до 15% углеводов (NFE), от около 1% до 5%, предпочтительно от около 1,5% до 2,5% волокон, от около 4% до 7%,
5 предпочтительно от около 4,5% до 6,5% золы, от около 0,5% до 1,1%, предпочтительно от около 0,6% до 1,0% общего фосфора (P), от около 20 до 30 МДж /кг, предпочтительно от около 23 до 28 МДж/кг общей энергии и от около 20 до 24 МДж/кг усваиваемой энергии.

Другие ингредиенты могут быть добавлены в кормовой рацион. Эти ингредиенты включают, но не ограничиваются ими, минеральные добавки, такие как кальций, фосфор,
10 соль, селен и цинк; витаминные добавки, такие как витамины А, В, D, Е и К; аминокислотные добавки, такие как лизин; кокцидиостатики за исключением кормов для свиней, или стимуляторы роста, такие как бацитрацин или вирджидамицин; и другие активные препараты, такие как хлортетрациклин, сульфатиозол и пенициллин. Для получения витаминных, минеральных и антибиотических добавок см. Church, Livestock
15 Feeds and Feeding, O&B Books, Inc., Corvallis, Oreg. (1984).

В предпочтительном варианте осуществления композиции лизофосфолипидов включают в гранулированный корм для кормления домашних животных. Гранулированный корм создается путем сначала смешивания компонентов сырья, а затем уплотнения и экструзии компонентов питания через пресс-форму с нагревом и давлением.
20 Корм гранулируют способами, известными в данной области техники, которые описаны в MacBain, Pelleting Animal Feed, American Feed Manufacturers Association, Arlington, Va. (1974), включенной в данный документ посредством ссылки. При добавлении жира в гранулированный корм необходимо соблюдать осторожность, чтобы избежать образования мучных гранул. Как правило, только около 2% жира добавляется во время
25 гранулирования, а остальное добавляется после охлаждения гранул.

Масло и корм, содержащий масло, могут быть стабилизированы путем добавления антиоксидантов. Следовательно, антиоксиданты могут быть добавлены в качестве химических консервантов в соответствии с нормативными актами FDA, перечисленные в официальной публикации от 1997 г. Американской ассоциации инспекторов по контролю
30 за кормовыми продуктами (1997 г.), включенной в данный документ посредством ссылки. Подходящие антиоксиданты включают, но не ограничиваются ими: лецитин, токоферолы, аскорбат, аскорбил пальмитат и экстракты пряностей, такие как экстракт розмарина.

Корма составлены, как указано выше, и с учетом требований к животному, которое должны кормить, в соответствии с рекомендациями NRC. Например, корма могут быть
35 составлены для собак, кошек, домашней птицы, крупного рогатого скота, креветок и рыб,

таких как лосось, форель, сом и тилапия. Различные составы кормов, методы балансировки и требования к этим животным обсуждаются в Church, Livestock Feeds and Feeding, O&B Books, Inc., Corvallis, Oreg. (1984) и Feeds and Nutrition Digest, Ensminger, Oldfield and Heineman eds., Ensminger Publishing Corporation, Clovis, Calif. (1990),

5 включенных в данный документ посредством ссылки.

6. Применение композиций фосфолипидов криля

В некоторых вариантах осуществления композиции лизофосфолипидов согласно данному изобретению предназначены для увеличения количества ЭПК и/или ДГК в
10 целевой ткани или органе путем перорального введения композиции лизофосфолипидов. Предпочтительные целевые ткани и орган согласно изобретению представляют собой надпочечник, кровь, кость, костный мозг, мозг, жир (белый), почку (целую), слизистую оболочку толстой кишки, печень, легкое, мышцы, миокард, поджелудочную железу, гипофиз, предстательную железу, кожу, слизистую оболочку тонкой кишки, селезенку,
15 слизистую оболочку желудка, яички, тимус и/или щитовидную железу.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество соединений или композиций, описанных выше, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения, предотвращения или улучшения когнитивных функций и/или когнитивного заболевания, расстройства или нарушения (памяти, концентрации, научения (дефицит)). или для
20 лечения или предотвращения нейродегенеративных расстройств. В некоторых вариантах осуществления когнитивное заболевание, расстройство или нарушение выбрано из расстройства дефицита внимания (ADD), синдрома дефицита концентрации внимания с гиперактивностью (ADHD), аутизма/расстройства аутистического спектра (ASD), (дислексии, возрастного нарушения памяти и нарушения способности к обучению,
25 амнезии, умеренного когнитивного нарушения, когнитивного нарушения перед болезнью Альцгеймера без деменции, болезни Альцгеймера, эпилепсии, болезни Пика, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Лу Герига, преддеменционный синдром, деменция с тельцами Леви, дентато-рубро-паллидо-люисовой атрофии, атаксии Фридрейха, множественной системной атрофии, спиноцеребеллярной атаксии типов 1, 2,
30 3, 6, 7, бокового амиотрофического склероза, семейного спастического парализа, спинальной мышечной атрофии, спинальной и бульбарной мышечной атрофии, возрастного снижения когнитивных функций, нарушения когнитивных функций, умеренного снижения интеллектуальной деятельности, психического нарушения в результате старения, патологических состояний, которые влияют на интенсивность
35 мозговых волн и/или утилизацию глюкозы мозгом, стресса, тревоги, нарушения внимания

и концентрации, ухудшения настроения, общего когнитивного и психического благополучия, нарушения развития нервной системы, нейродегенеративных нарушений, гормональных нарушений, неврологического дисбаланса или любых их комбинаций. В конкретном варианте осуществления когнитивное расстройство представляет собой

5 ухудшение памяти.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество соединений или композиций, описанных выше, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения или предотвращения сердечно-сосудистого нарушения или метаболического синдрома. В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое расстройство выбрано из

10 атеросклероза, артериосклероза, ишемической болезни сердца (сонной артерии) (ИБС или ИБС), острого коронарного синдрома (или ОКС), порока клапанов сердца, порока аортального и митрального клапанов, аритмии/мерцательной аритмии, кардиомиопатии и сердечной недостаточности, стенокардии, острого инфаркта миокарда (или ОИМ), гипертонии, ортостатической гипотензии, шок, эмболии (легочной и венозной),

15 эндокардита, заболеваний артерий, аорты и ее ветвей, расстройства периферической сосудистой системы (болезни периферических артерий или PAD), болезни Kawasaki, врожденного порока сердца (сердечно-сосудистые дефекты) и инсульта (цереброваскулярного заболевания), дислипидемии, гипертриглицеридемии, гипертонии, сердечной недостаточности, сердечной аритмии, низких уровней ЛПВП, высоких уровней

20 ЛПНП, стабильной стенокардии, ишемической болезни сердца, острого инфаркта миокарда, вторичной профилактики инфаркта миокарда, кардиомиопатии, эндокардита, диабета 2 типа, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, инсульта, гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии, хронического заболевания почек, перемежающейся хромоты, гиперфосфатемии, дефицита омега-3,

25 дефицита фосфолипидов, атеросклероза сонных артерий, заболевания периферических артерий, диабетической нефропатии, острого синдрома гиперхолестеринемии при синдроме гиперхолестеринемии при ВИЧ-инфекции, острого коронарного синдрома (ОКС), неалкогольной жировой болезни печени / неалкогольного стеатогепатита (НАЖБП/НАСГ), окклюзионных поражений артерии, церебрального атеросклероза,

30 артериосклероза, цереброваскулярных расстройств, ишемии миокарда, коагулопатий, приводящих к образованию тромба в сосуде, и диабетической вегетативной невропатии.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество соединений или композиций, описанных выше, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для ингибирования, предотвращения или лечения воспаления или воспалительного

35 заболевания. В некоторых вариантах осуществления воспаление или воспалительное

заболевание выбрано из отторжения трансплантата органа; реоксигенационного повреждения в результате трансплантации органов (см. Grupp et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 31: 297-303 (1999)), в том числе, но не ограничиваясь этим, трансплантации следующих органов: сердца, легких, печени и почек; хронических воспалительных заболеваний суставов, в том числе артрита, ревматоидного артрита, остеоартрита и заболеваний 5 костей, связанных с повышенной резорбцией кости; воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как илеит, язвенный колит (ЯК), синдром Барретта и болезнь Крона (БК); воспалительных заболеваний легких, таких как астма, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и хроническая обструктивная болезнь легких 10 (ХОБЛ); воспалительных заболеваний глаз, в том числе дистрофии роговицы, трахомы, онхоцеркоза, увеита, симпатического офтальмита и эндофтальмита; хронических воспалительных заболеваний десен, в том числе гингивита и периодонтита; воспалительных заболеваний почек, в том числе уремических осложнений, гломерулонефрита и нефроза; воспалительных заболеваний кожи, в том числе 15 склеродерматита, псориаза и экземы; воспалительных заболеваний центральной нервной системы, в том числе хронических демиелинизирующих заболеваний нервной системы, рассеянного склероза, СПИД-ассоциированной нейродегенерации и болезни Альцгеймера, инфекционного менингита, энцефаломиелита, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, эпилепсии, амиотрофического бокового склероза, и вирусного или аутоиммунного 20 энцефалита, преэклампсии; хронической печеночной недостаточности, травмы головного и спинного мозга и рака. Воспалительное заболевание также может представлять собой системное воспаление организма, примером которого является грамположительный или грамотрицательный шок, геморрагический или анафилактический шок или шок, вызванный противораковой химиотерапией в ответ на провоспалительные цитокины, 25 например, шок, связанный с провоспалительными цитокинами. Такой шок может быть вызван, например, химиотерапевтическим агентом, которое вводят для лечения рака. Другие расстройства включают депрессию, ожирение, аллергические заболевания, острые сердечно-сосудистые заболевания, мышечное истощение и раковую кахексию. Кроме того, воспаление, возникающее в результате хирургического вмешательства и травмы, 30 можно лечить с помощью композиций фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления композиции ЛФХ, описанные выше, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения заболевания или патологического состояния, связанного с эритроцитами и клеточными мембранами, и, в частности, 35 заболевания или патологических состояний, связанных с аномалией в клеточных мембранах эритроцитов. В некоторых вариантах состояние или заболевание представляет

собой серповидноклеточную анемию или серповидно-клеточную аномалию. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние или заболевание представляет собой талассемию (альфа-, бета- или дельта-), талассемию в комбинации с гемоглинопатией (гемоглобин E, гемоглобин S или гемоглобин C), спленомегалией или нарушениями мембраны, такими как акантоциты или шпоровидные/шипиковые клетки, кодоциты (мишеневидные клетки), эхиноциты (зубчатые клетки), эллиптоциты и овалоциты, сфероциты, стоматоциты (эритроциты с центральным просветлением в виде ротового отверстия) и дегмациты («надкусанные клетки»).

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество содержит от около 0,1 до около 5 г композиции фосфолипидов криля, предпочтительно от около 0,2 до около 3 г композиции фосфолипидов криля и наиболее предпочтительно от около 0,5 до около 1,5 г композиции фосфолипидов криля.

Композиции лизофосфолипидов криля согласно данному изобретению могут быть использованы для лечения различных субъектов. Подходящие субъекты включают людей, а также домашних животных (таких как крупный рогатый скот, лошади, овцы, свиньи, козы, рыба и креветки), приматов, не являющихся людьми, и домашних животных (таких как собаки, кошки и птицы). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъект представляет собой человека в возрасте менее 10 лет, более предпочтительно в возрасте менее 1 года, еще более предпочтительно в возрасте менее 1 месяца и наиболее предпочтительно новорожденного. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъекту от 10 до 20 лет. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъекту от 20 до 50 лет. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъекту от 50 до 100 лет. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъекту от 60 до 100 лет. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъекту от 70 до 100 лет.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пример 1 - SUPERBA™ BOOST™

В этом примере описывается получение композиции ЛФХ с использованием SUPERBA™ BOOST™ (Aker Biomarine AS, Лисакер, Норвегия) в качестве исходного источника фосфолипидов. SUPERBA™ BOOST™ предпочтительно получают с помощью процессов SMB, описанных в других местах в данном документе. SUPERBA™ BOOST™ представляет собой композицию фосфолипидов криля, в которой 1000 мг содержит 560 мг фосфолипидов, 150 мг ЭПК и 70 мг ДГК. Вкратце, 9 грамм SUPERBA™ BOOST™

смешивают с 90 мл EtOH, а затем добавляют 450 мл воды в однолитровую круглодонную реакционную колбу, продуваемую азотом. Затем добавляют 0,40 мл LECITASE™ Ultra и оставляют на 30 минут при перемешивании. Затем добавляют 500 мл EtOH, чтобы дезактивировать фермент, и смесь выпаривают досуха с использованием роторного испарителя. Затем проводят разделение с использованием растворителей. Обработанный ферментом образец липидов криля смешивают в ванне с растворителем с гептаном и метанолом. Соединения ЛФХ и ФХ мигрируют в полярный растворитель (метанол), а неполярные липиды отделяются в гептан. Декантирование фазы гептана оставляет полярную фазу с большим количеством полярных липидов, включая ЛФХ и ФХ. 250 мл каждого гептана и MeOH добавляют к высушенной липидной композиции в колбе. Полученную смесь перемешивают, и фазы оставляют разделяться. Верхнюю неполярную фазу декантируют, и еще 250 мл гептана добавляют к полярной фазе MeOH, и разделение повторяют. Затем к экстракту MeOH добавляют 10 г силикагеля и раствор выпаривают досуха в роторном испарителе. Затем ЛФХ очищают от высушенной композиции липидов при помощи флэш-хроматографии (100 г силикагеля в колонке диаметром 5 см). ЛФХ элюируют с серией подвижных фаз: МРА (гептан); МРВ (толуол: метанол: триэтиламин, 60: 40: 1); и метанол: триэтиламин, 95: 5). Фракции собирают и выпаривают досуха.

Композицию ЛФХ, полученную способами согласно данному изобретению, анализировали с помощью ¹H-, ³¹P-, 2D-ЯМР, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ в зависимости от ситуации. Результаты ¹H-ЯМР и ВЭЖХ показаны на Фиг. 1 и Фиг. 2, соответственно, обозначенные АКВ6444-1.

³¹P- и 2D-ЯМР использовали для определения фосфолипидных компонентов, результаты представлены в Таблице 1, Таблице 2 и Таблице 3, обозначенных АКВ6444-1.

Пример 2 – Предварительная промывка и флэш-хроматография SUPERBA™ BOOST™

В этом примере описывается получение композиции ЛФХ с использованием SUPERBA™ BOOST™ (Aker Biomarine AS, Лисакер, Норвегия) в качестве исходного источника фосфолипидов. SUPERBA™ BOOST™ предпочтительно получают с помощью процессов SMB, описанных в других местах в данном документе. SUPERBA™ BOOST™ представляет собой композицию фосфолипидов криля, в которой 1000 мг содержит 560 мг фосфолипидов, 150 мг ЭПК и 70 мг ДГК. Вкратце, 10 грамм SUPERBA™ BOOST™ смешивают с 100 мл EtOH, а затем добавляют 450 мл воды в однолитровую круглодонную реакционную колбу, продуваемую азотом. Затем добавляют 0,40 мл LECITASE™ Ultra и

реакции дают перемешиваться в течение 40 минут. Затем добавляют 500 мл EtOH, чтобы дезактивировать фермент, а смесь выпаривают досуха с использованием роторного испарителя. Затем проводят разделение с использованием растворителей. Обработанный ферментом образец липидов криля смешивают в ванне с растворителем с гептаном и метанолом. Соединения ЛФХ и ФХ мигрируют в полярный растворитель (метанол), а неполярные липиды отделяются в гептан. В частности, к высушенному образцу добавляли метанол (250 мл) и гептан (250 мл). После энергичного встряхивания фазы разделяли и фазу метанола экстрагировали другой порцией гептана (250 мл). Фракции гептана анализировали с помощью ТСХ и выпаривали отдельно. К остатку метанолу добавляли силикагель 60 (20 г) и раствор концентрировали досуха. Затем ЛФХ очищают от высушенной композиции липидов при помощи флэш-хроматографии. Силикагель загружали в колонку (диаметр 5 см) с силикагелем (130 г) и колонку элюировали. Объем фракции 25 мл. Элюенты: 500 мл EtOAc, 250 мл EtOAc: MeOH 80: 20, 250 мл EtOAc: MeOH 50: 50, 250 мл MeOH, 500 мл MeOH: Et3N 95: 5, 500 мл MeOH: Et3N 90: 10.

15 Фракции анализировали методом ТСХ и выпаривали в соответствии с полученными данными. Фракции, содержащие ЛФХ, после хроматографического разделения давали конечную массу 3,28 грамма.

Композицию ЛФХ, полученную способами согласно данному изобретению, анализировали с помощью ^1H -, ^{31}P -, 2D-ЯМР, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ в зависимости от ситуации. Результаты ^1H -ЯМР и ВЭЖХ показаны на Фиг. 7 и Фиг. 8, соответственно, обозначенные АКВ70005-4.

^{31}P - и 2D-ЯМР использовали для определения фосфолипидных компонентов, результаты представлены в Таблице 5, Таблице 9 и Таблице 10, обозначенных АКВ70005-4.

25 **Пример 3 - Флэш-хроматография SUPERBA™ BOOST™**

В этом примере описывается получение композиции ЛФХ с использованием SUPERBA™ BOOST™ (Aker Biomarine AS, Лисакер, Норвегия) в качестве исходного источника фосфолипидов. SUPERBA™ BOOST™ предпочтительно получают с помощью процессов SMB, описанных в других местах в данном документе. SUPERBA™ BOOST™ представляет собой композицию фосфолипидов криля, в которой 1000 мг содержит 560 мг фосфолипидов, 150 мг ЭПК и 70 мг ДГК. Вкратце, 10 грамм SUPERBA™ BOOST™ смешивают с 100 мл EtOH, а затем добавляют 450 мл воды в однолитровую круглодонную реакционную колбу, продуваемую азотом. Затем добавляют 0,40 мл LECITASE™ Ultra и реакции дают перемешиваться в течение 40 минут. Затем добавляют 500 мл EtOH, чтобы

35 дезактивировать фермент, а смесь выпаривают досуха с использованием роторного

испарителя. Затем ЛФХ очищают от высушенной липидной композиции флэш-хроматографией следующим образом: остаток повторно растворяют в метаноле (200 мл) и добавляют силикагель 60 (20 г) и суспензию концентрируют досуха на роторном испарителе. Силикагель загружали в колонку (диаметр 5 см) с силикагелем (130 г) и колонку элюировали. Объем фракции 25 мл. Элюенты: 500 мл EtOAc, 250 мл EtOAc: MeOH 80: 20, 250 мл EtOAc: MeOH 50: 50, 250 мл MeOH, 500 мл MeOH: Et3N 90: 10. Фракции анализировали методом ТСХ и выпаривали в соответствии с полученными данными. Фракции, содержащие ЛФХ, после хроматографического разделения давали конечную массу 3,73 грамма.

10 Композицию ЛФХ, полученную способами согласно данному изобретению, анализировали с помощью ¹H-, ³¹P-, 2D-ЯМР, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ в зависимости от ситуации. Результаты ¹H-ЯМР и ВЭЖХ показаны на Фиг. 9 и Фиг. 10, соответственно, обозначенные АКВ70005-5.

³¹P- и 2D-ЯМР использовали для определения фосфолипидных компонентов, результаты представлены в Таблице 6, Таблице 9 и Таблице 10, обозначенных АКВ70005-5.

Пример 4 – Предварительная промывка и флэш-хроматография ROMEGA™

В этом примере описывается получение композиции ЛФХ с использованием ROMEGA™ (Arctic Nutrition AS, Ørsta, Лисакер, Норвегия) в качестве исходного источника фосфолипидов. ROMEGA™ предпочтительно получают с помощью процессов, описанных в другом месте. ROMEGA™ представляет собой композицию из масла икры сельди и рыбьего жира, в которой 1000 мг/3000 мг содержат 340 мг/1020 мг фосфолипидов, 100 мг/300 мг ЭПК и 320 мг/960 мг ДГК. Вкратце, 9 грамм ROMEGA™ смешивают с 90 мл EtOH, а затем добавляют 450 мл воды в однолитровую круглодонную реакционную колбу, продуваемую азотом. Затем добавляют 0,40 мл LECITASE™ Ultra и реакции дают перемешиваться в течение 40 минут. Затем добавляют 500 мл EtOH, чтобы дезактивировать фермент, а смесь выпаривают досуха с использованием роторного испарителя. Затем проводят разделение с использованием растворителей. Обработанный ферментом образец липидов икры сельди/рыбы смешивают в ванне с растворителем с гептаном и метанолом. Соединения ЛФХ и ФХ мигрируют в полярный растворитель (метанол), а неполярные липиды отделяются в гептан. В частности, к высушенному образцу добавляли метанол (250 мл) и гептан (250 мл). После энергичного встряхивания фазы разделяли и фазу метанола экстрагировали другой порцией гептана (250 мл).

Фракции гептана анализировали с помощью ТСХ и выпаривали отдельно. К остатку метанола добавляли силикагель 60 (20 г) и раствор концентрировали досуха. Затем ЛФХ очищают от высушенной композиции липидов при помощи флэш-хроматографии.

5 Силикагель загружали в колонку (диаметр 5 см) с силикагелем (130 г) и колонку элюировали. Объем фракции 25 мл. Элюенты: 500 мл EtOAc, 250 мл EtOAc: MeOH 80: 20, 250 мл EtOAc: MeOH 50: 50, 250 мл MeOH, 500 мл MeOH: Et3N 95: 5, 500 мл MeOH: Et3N 90: 10. Фракции анализировали методом ТСХ и выпаривали в соответствии с полученными данными. Фракции, содержащие ЛФХ, после хроматографического разделения давали конечную массу 0,84 грамма.

10 Композицию ЛФХ, полученную способами согласно данному изобретению, анализировали с помощью ¹H-, ³¹P-, 2D-ЯМР, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ в зависимости от ситуации. Результаты ¹H-ЯМР и ВЭЖХ показаны на Фиг. 5 и Фиг. 6, соответственно, обозначенные АКВ70005-3.

15 ³¹P- и 2D-ЯМР использовали для определения фосфолипидных компонентов, результаты представлены в Таблице 5, Таблице 7 и Таблице 8, обозначенных АКВ70005-3.

Пример 5 – Флэш-хроматография ROMEGA™

В этом примере описывается получение композиции ЛФХ с использованием ROMEGA™ (Arctic Nutrition AS, Ørsta, Лисакер, Норвегия) в качестве исходного
20 источника фосфолипидов. ROMEGA™ предпочтительно получают с помощью процесса, описанного в другом месте. ROMEGA™ представляет собой композицию из масла икры сельди и рыбьего жира, в которой 1000 мг/3000 мг содержат 340 мг/1020 мг фосфолипидов, 100 мг/300 мг ЭПК и 320 мг/960 мг ДГК. Вкратце, 9 - грамм ROMEGA™ смешивают с 90 мл EtOH, а затем добавляют 450 мл воды в однолитровую круглодонную
25 реакционную колбу, продуваемую азотом. Затем добавляют 0,40 мл LECITASE™ Ultra и реакции дают перемешиваться в течение 40 минут. Затем добавляют 500 мл EtOH, чтобы дезактивировать фермент, а смесь выпаривают досуха с использованием роторного испарителя. Затем ЛФХ затем очищают от высушенной липидной композиции при помощи флэш-хроматографии следующим образом: Остаток повторно растворяли в
30 метаноле (200 мл) и добавляли силикагель 60 (20 г) и суспензию концентрировали досуха на роторном испарителе. Силикагель загружали в колонку (диаметр 5 см) с силикагелем (130 г) и колонку элюировали. Объем фракции 25 мл. Элюенты: 500 мл EtOAc, 250 мл EtOAc: MeOH 80: 20, 250 мл EtOAc: MeOH 50: 50, 250 мл MeOH, 500 мл MeOH: Et3N 90: 10. Фракции анализировали методом ТСХ и выпаривали в соответствии с полученными

данными. Фракции, содержащие ЛФХ, после хроматографического разделения давали конечную массу 0,76 грамма.

Композицию ЛФХ, полученную способами согласно данному изобретению, анализировали с помощью ¹H-, ³¹P-, 2D-ЯМР, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ в зависимости от ситуации. Результаты ¹H-ЯМР и ВЭЖХ показаны на Фиг. 5 и Фиг. 6, соответственно, обозначенные АКВ70005-2.

³¹P- и 2D-ЯМР использовали для определения фосфолипидных компонентов, результаты представлены в Таблице 4, Таблице 7 и Таблице 8, обозначенных АКВ70005-2.

Таблица 1: Результаты (сводные данные), 2D- и ³¹P-ЯМР (ФЛ) образца АКВ69444-1

10 Компонент Способ Массовая доля

ФХ	³¹ P-ЯМР	3,04	—
1-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	5,73	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	75,38	—
ФИ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ФС-Na	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ЛФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
АФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ДФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ФК	³¹ P-ЯМР	0,00	—
ЛФК	³¹ P-ЯМР	0,00	—
Другие ФЛ	³¹ P-ЯМР	0,34	—
Сумма	³¹ P-ЯМР	84,15	—
фосфор	³¹ P-ЯМР	4,83	—

Таблица 2: Результаты (сводные данные), 2D- и ³¹P-ЯМР (простозфирные ФЛ) образца АКВ69444-1

Компонент Способ Массовая доля

ФХ	³¹ P-ЯМР	1,90	—
ФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	1,10	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	57,20	—
2-ЛФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	18,20	—
Другие ФЛ	³¹ P-ЯМР	0,34	—
Сумма	³¹ P-ЯМР	84,15	—
фосфор	³¹ P-ЯМР	4,83	—

15

Таблица 3: Композиция ЛФХ содержала 38,74 % мас. жирных кислот омега-3 в композиции, как определено ¹H-ЯМР образца АКВ69444-1.

Исследуемый образец	Интеграл	Начальная масса [мг]	Интеграл	Начальная масса [мг]	ммоль	ммоль	Содержание [мг]	Содержание [%]
	ИО	ИО (исслед. образец)	ВС	ВС	ВС	ИО	ИО	ИО
АКВ67919-1	198,61	350,65	90,00	20,43	0,0626	0,4141	135,8263	38,74
Внутр. стандарт	Молекулярная масса ИО		328,00	баланс XPE-84.1 Mettler-Toledo XPE205DR/M				
ТФФ	Молекулярная масса ВС		326,29					
Округление 4	Количество атомов ИО		3					
	Количество атомов ВС		9					
en	Содержание [%] ВС		99,9					

Примечание: Начальная масса превышает требуемую мин. массу в 10 мг.

*) рассчитывается как ДНА, содержит смесь любых жирных кислот омега-3 (жирных кислот ω -3)

Таблица 4: Жирные кислоты омега-3 в % мас. композиции ЛФХ, как определено ^1H -ЯМР для образцов АКВ70005-1 и АКВ70005-2.

5 **Таблица 5:** Мас.% жирных кислот омега-3 в композиции ЛФХ, как определено ^1H -ЯМР

компоненты	метод тестирования	АКВ70005-1	описание	АКВ70005-2	описание
		Romega		Lecitase Romega	
		АВ:АВМ-1:1		АВ:АВМ-1:3, флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%	
ЖК омега-3*)	^1H ЯМР	43,56	—	43,78	—

*) рассчитывается как ДНА, содержит смесь любых жирных кислот омега-3 (жирных кислот ω -3)

для образцов АКВ70005-3 и АКВ70005-4.

компоненты	Метод тестирования	АКВ70005-3	описание	АКВ70005-4	описание
		Lecitase Romega		Lecitase Boost	
		MS:АВМ-1:47, пред. обраб./флэш-хроматогр.		MS:АВМ-1:43В, пред. обраб./флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%	
ЖК омега-3*)	^1H ЯМР	42,85	—	47,55	—

*) рассчитывается как ДНА, содержит смесь любых жирных кислот омега-3 (жирных кислот ω -3)

Таблица 6: Мас.% жирных кислот омега-3 в композиции ЛФХ, как определено ¹H-ЯМР для образца АКВ70005-5.

компоненты	Метод тестирования	АКВ70005-5	описание
		Lecitase Boost	
		MS:ABM-1:45B, флэш-хроматогр.	
		мас.%	
ЖК омега-3*)	¹ H ЯМР	47,06	—

*) рассчитывается как ДНА, содержит смесь любых жирных кислот омега-3 (жирных кислот ω -3)

5 **Таблица 7:** Результаты (сводные данные), 2D- и 31P-ЯМР (ФЛ) для АКВ70005-1, АКВ70005-2 и АКВ70005-3.

компоненты	Метод тестирования	АКВ70005-1	описание	АКВ70005-2	описание	АКВ70005-3	описание
		Romega		Lecitase Romega		Lecitase Romega	
		AB:ABM-1:1		AB:ABM-1:3, флэш-хроматогр.		MS:ABM-1:47, пред. обраб./флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%		мас.%	
ФХ	³¹ P-ЯМР	20,97	—	5,03	—	7,29	—
1-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	0,25	—	6,66	—	6,41	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	2,06	—	59,95	—	56,42	—
ФИ	³¹ P-ЯМР	0,35	—	0,00	—	0,00	—
СФН	³¹ P-ЯМР	0,69	—	3,70	—	4,34	—
ФЭ	³¹ P-ЯМР	1,73	—	0,00	—	0,00	—
ЛФЭ	³¹ P-ЯМР	0,25	—	0,00	—	0,00	—
АФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—	0,00	—
ФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—	0,00	—
ДФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—	0,00	—
ФК	³¹ P-ЯМР	0,09	—	0,00	—	0,26	—
ЛФК	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—	0,00	—
Другие ФЛ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,55	—	0,00	—
Сумма	³¹ P-ЯМР	26,39	—	75,88	—	74,73	—
фосфор	³¹ P-ЯМР	1,06	—	4,21	—	4,10	—

Таблица 8: Результаты (сводные данные), 2D- и 31P-ЯМР (ФЛ) для АКВ70005-1, АКВ70005-2 и АКВ70005-3.

компоненты	метод тестирования	АКВ70005-1	описание	АКВ70005-2	описание	АКВ70005-3	описание
		Romega		Lecitase Romega		Lecitase Romega	
		АВ:АВМ-1:1		АВ:АВМ-1:3, флэш-хроматогр.		MS:АВМ-1:47, пред. обраб./флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%		мас.%	
ФХ	³¹ P-ЯМР	20,20	—	2,40	—	3,50	—
ФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	0,80	—	2,70	—	3,80	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	1,40	—	58,50	—	55,10	—
2-ЛФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	0,60	—	1,00	—	0,80	—
2-ЛФХ-плазма	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,50	—	0,50	—
ФЭ	³¹ P-ЯМР	1,60	—	0,00	—	0,00	—
ФЭ-эфир	³¹ P-ЯМР	0,20	—	0,00	—	0,00	—

5 **Таблица 9:** Результаты (сводные данные), 2D- и 31P-ЯМР (ФЛ) для АКВ70005-4 и АКВ70005-5.

компоненты	метод тестирования	АКВ70005-4	описание	АКВ70005-5	описание
		Lecitase Boost		Lecitase Boost	
		MS:АВМ-1:43В, пред. обраб./флэш-хроматогр.		MS:АВМ-1:45В, флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%	
ФХ	³¹ P-ЯМР	9,24	—	3,44	—
1-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	7,24	—	7,37	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	63,04	—	68,64	—
ФИ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ФС-На	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ЛФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
АФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ДФГ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ФК	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ЛФК	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
Другие ФЛ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
Сумма	³¹ P-ЯМР	79,52	—	79,45	—
фосфор	³¹ P-ЯМР	4,43	—	4,54	—

Таблица 10: Результаты (сводные данные), 2D- и 31P-ЯМР (ФЛ) для АКВ70005-4 и АКВ70005-5.

компоненты	метод тестирования	АКВ70005-4	описание	АКВ70005-5	описание
		Lecitase Boost		Lecitase Boost	
		MS:ABM-1:43B, пред. обраб./флэш-хроматогр.		MS:ABM-1:45B, флэш-хроматогр.	
		мас.%		мас.%	
ФХ	³¹ P-ЯМР	4,70	—	1,90	—
ФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	4,60	—	1,60	—
2-ЛФХ	³¹ P-ЯМР	60,30	—	65,50	—
2-ЛФХ-эфир	³¹ P-ЯМР	1,70	—	1,60	—
2-ЛФХ-плазма	³¹ P-ЯМР	1,00	—	1,60	—
ФЭ	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—
ФЭ-эфир	³¹ P-ЯМР	0,00	—	0,00	—

Таблица 11: Легенда (аббревиатуры).

Сокращенное название	Полное название
1-ЛФХ	1-лизофосфатидилхолин
2-ЛФХ	2-лизофосфатидилхолин
АФЭ	N-ацил-фосфатидилэтанолламин
CDCl ₃	хлороформ-d ₁
Cs ₂ CO ₃	карбонат цезия
ДГК	докозогексаеновая кислота
D ₂ O	оксид дейтерия
ДФГ	дифосфатидилглицерин
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЖК	Жирная кислота
ВС	внутренний стандарт
ЛФК	лизофосфатидная кислота
ЛФИ	лизофосфатидилинозитол
ЛФС	лизофосфатидилсерин
MeOD	метанол-d ₄
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
ФК	фосфатидная кислота
ФХ	фосфатидилхолин
ФЭ	фосфатидилэтанолламин
ФГ	фосфатидилглицерин
ФИ	фосфатидилинозитол
ФЛ	фосфолипид
ФС	фосфатидилсерин
СФН	сфингомиелин

ТМС	тетраметилсилан
ТФФ	трифенилфосфат
ЖК ω -3	жирные кислоты омега-3

ПРИМЕР 6

Композицию ЛФХ получали с использованием крилевого масла SUPERBA™ в качестве исходной точки. Содержание фосфолипидов анализировали при помощи ³¹P-ЯМР. Результаты представлены в Таблице 12.

Таблица 12.

Фосфолипид	мас. %	мол. %	ММ [г/моль]
ФХ	7,73	15,08	790,0
1-ЛФХ	10,23	29,50	534,5
2-ЛФХ	17,51	50,47	534,5
ФИ	---*)	---*)	907,0
ЛФИ	---*)	---*)	629,5
ФС-Na	---*)	---*)	833,0
ЛФС	---*)	---*)	555,5
СФН	---*)	---*)	812,0
ФЭ	0,48	0,96	770,0
ЛФЭ	0,96	3,00	492,5
АФЭ	---*)	---*)	1032,0
ФГ	---*)	---*)	820,0
ДФГ	---*)	---*)	774,0
ФК	---*)	---*)	746,0
ЛФК	---*)	---*)	468,5
Другие ЛФ	0,52	0,99	812,0
Сумма	37,44	100,00	
Фосфор	2,01		

Примечание: Примечание: интегралы фосфолипидных сигналов, которые недоступны или не относятся к перечисленным фосфолипидам, записываются как «другие»

*) - не наблюдается, сигнал отсутствует

Пример 7

В этом примере приводятся сводные данные о получении других композиций лизофосфолипидов согласно изобретению.

Способ синтеза соединения ЛФХ из крилевого масла

Способы, используемые для синтеза ЛФХ из крилевого масла, можно разделить на четыре 5 стадии в зависимости от целевой композиции конечной смеси/образца:

1. CRUDE (предварительная обработка): процесс, позволяющий достичь концентрации 14-27,3 % мас. ЛФХ в конечной композиции (Таблицы 13.1-1 и 14.1-1).
- 10 2. POLAR-1/POLAR-2 (разделение растворителями): процесс после CRUDE, который позволяет достичь концентрации 35,2 - 65,7 % мас. ЛФХ в конечной композиции (Таблица 13,1-2 и 14,1-2).
3. FLASH (флэш-хроматография): процесс после CRUDE, который позволяет достичь концентрации 56,6 - 81,1 % мас. ЛФХ в конечной композиции (Таблица 13.1-3).
- 15 4. FORMULATION (составление композиции): процесс после POLAR-2, который позволяет достичь концентрации 39,3- 41,1 % мас. ЛФХ с 5-14 % мас. ПЭГ-400 в конечной композиции (14,1-3).

FLASH и POLAR являются альтернативными процессами для обогащения ЛФХ 20 смесей/образцов ЛФХ CRUDE-1 и CRUDE-2, тогда как FORMULATION представляет собой процесс, который позволяет составлять смеси/образцы ЛФХ POLAR-2 с ПЭГ. Блок-схемы различных процессов представлены в виде Фиг.11 (процесс 1) и 12 (процесс 2).

1. Образцы CRUDE:

Смеси/образцы ЛФХ CRUDE-1 и CRUDE-2 следуют тем же процессам.

Superba Boost (10 г) растворяли в EtOH (2 - 10 г), разбавляли рН-стабилизированной водой (2 - 45 г, рН 6 - 12) до достижения рН смеси 5,2 - 6,2, добавляли Lecitase ultra 40 мкл, 25 закрывали и перемешивали при комнатной температуре в течение 120 - 1440 минут. Для предотвращения окисления образцы могут быть продуты N₂. Реакционную смесь гасили добавлением EtOH (25-50 г) и концентрировали при пониженном давлении при 50 °С с получением ЛФХ-смесей/образцов CRUDE-1 и CRUDE-2 (Таблицы 13 и 16, соответственно).

2. Образцы POLAR-1/POLAR-2:

POLAR-2: Процесс POLAR начинали сразу после прекращения процесса CRUDE. Таким образом, образец CRUDE не концентрировали при пониженном давлении при 50 °С для

получения ЛФХ-смесей/партий CRUDE-1 и CRUDE-2, вместо этого 25-100 г гептана добавляли к смеси CRUDE-1 или CRUDE-2 для разделения фаз и, таким образом, обогащения полярных липидов в EtOH и обогащенной водой фазе, называемой полярной фазой. Фазу гептана декантировали, оставляя только полярную фазу. Полярную фазу концентрировали при пониженном давлении, чтобы получить ЛФХ-смеси/образцы POLAR-1 и POLAR-2 (Таблицы 14 и 17, соответственно).

3. Образцы FLASH:

Образцы CRUDE повторно растворяли в этаноле (10-100 г) с добавлением 25-50 г силикагеля 60 и выпаривали досуха. Флэш-хроматографию (125 г силикагеля 60, диаметр колонки 5 см) выполняли. Элюирование осуществляли с помощью 500 мл 80: 20 МРА: МРВ, 500 мл 50: 50 МРА: МРВ, 500 мл МР В, 500 мл МР С. Колонку затем подвергали экструированию EtOH: Et3N (80: 20, 300 мл). По результатам различные фракции объединяли и выпаривали, чтобы получить ЛФХ-смеси/образцы FLASH (Таблица 15).

4. Образцы FORMULATION:

Состав с ПЭГ-400 получали из смесей/образцов POLAR. Для этого EtOH и ПЭГ-400 добавляли к смеси POLAR, посредством чего смесь (смесь EtOH, PEG400 и ЛФХ POLAR) концентрировали при пониженном давлении и температуре 50 °С, чтобы получить ЛФХ-смеси/образцов FORMULATION (Таблица 18) с конечной концентрацией 5-14 % мас. ПЭГ-400 и 4-7 % мас. EtOH (Таблица 18).

Таблица 13 Аналитические результаты для шести партий композиции ЛФХ криля CRUDE-1 из Процесса 1

Параметр	Номер партии CRUDE-1					
	АКВ: АВМ-1: 7В	АКВ: АВМ-1: 9В	АКВ: АВМ-1: 13	АКВ: АВМ-1: 15	MS: АВМ-1: 65	MS: АВМ-1: 69
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР						
ФХ	4,9	5,7	7,8	5,1	4,3	10,8
ФХ-эфир	2,8	4,2	4,3	4,2	3,5	4,8
1-ЛФХ	5,0	8,6	6,6	6,3	10,2	10,7
2-ЛФХ	9,1	16,6	17,3	20,7	17,2	16,2
2-ЛФХ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	0,4

ФЭ	0,2	0,4	0,2	0,2	<0,1	0,4
ФЭ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	0,5	0,5	0,4
ЛФЭ	0,3	0,7	0,3	<0,1	1,0	0,9
Другие	0,7	0,9	1,0	1,1	0,5	0,4
Суммарное кол-во ФЛ	23,0	37,1	37,4	38,1	37,5	45,0
Суммарное кол-во ЛФХ	14,1	25,2	23,9	27,0	27,7	27,3
Фосфор	1,2	1,9	1,9	2,0	2,1	2,3
Жирные кислоты, г/100g, GC						
12: 0	Отсутствует				<0,1	<0,1
14: 0	Доступно				3,7	3,9
15: 0					0,2	0,2
16: 0					12,5	13,3
16: 1n7					2,2	2,3
18: 0					0,7	0,7
18: 1n9					4,3	4,5
18: 1n7					3,6	3,8
18: 2n6					0,9	0,9
18: 3n3					1,4	1,5
18: 4n3					2,6	2,7
20: 1n9					0,3	0,3
20: 4n6					0,2	0,2
20: 3n3					<0,1	<0,1
20: 4n3					0,3	0,4
20: 5n3					15,2	16,0
22: 1n9					0,5	0,5
21: 5n3					0,5	0,5
22: 5n3					0,3	0,3
22: 6n3					7,6	7,9
Неизвестно					3,2	3,4
Насыщенные жирные кислоты					17,1	18,1

Моноеновые жирные кислоты					10,9	11,4
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-6)					1,1	1,1
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-3)					27,9	29,2
Общее количество полиненасыщенных жирных кислот					29,0	30,3
Общее количество жирных кислот					60,2	63,2

Таблица 14 Аналитические результаты для шести партий композиции ЛФХ криля POLAR-1 из Процесса 1

Параметр	Номер партии POLAR-1					
	АКВ: АВМ-1: 7В	АКВ: АВМ-1: 9В	АКВ: АВМ-1: 13	АКВ: АВМ-1: 15	MS: АВМ-1: 65	MS: АВМ-1: 69
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР						
ФХ	11,7	7,8	11,1	7,1	8,5	Не применимо
ФХ-эфир	5,0	5,7	6,0	6,0	9,4	
1-ЛФХ	8,9	12,4	7,0	9,0	28,8	
2-ЛФХ	26,3	28,5	33,7	33,8	35,9	
2-ЛФХ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,0	
ФЭ	<0,1	0,4	0,4	0,2	<0,1	
ФЭ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,9	

ЛФЭ	<0,1	1,1	1,1	0,8	1,8	
Другие	2,1	1,9	2,2	2,2	<0,1	
Суммарное кол-во ФЛ	54,0	57,8	61,4	59,1	86,3	
Суммарное кол-во ЛФХ	35,2	40,9	40,7	42,8	65,7	
Фосфор	1,2	1,9	1,9	2,0	4,7	
Жирные кислоты, г/100g, GC					Отсутствует	
12: 0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	доступно	
14: 0	1,1	2,0	1,4	1,4		
15: 0	0,1	0,1	0,1	0,1		
16: 0	6,2	8,5	8,4	7,9		
16: 1n7	0,9	1,4	1,1	1,1		
18: 0	0,6	0,6	0,7	0,7		
18: 1n9	2,4	3,2	2,7	2,7		
18: 1n7	1,6	2,3	2,3	2,1		
18: 2n6	0,6	0,8	0,7	0,7		
18: 3n3	1,1	1,5	1,4	1,3		
18: 4n3	1,3	2,2	2,0	2,0		
20: 1n9	0,1	0,2	0,2	0,1		
20: 4n6	0,2	0,3	0,3	0,2		
20: 3n3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1		
20: 4n3	0,2	0,4	0,4	0,3		
20: 5n3	11,4	18,8	18,2	17,4		
22: 1n9	0,2	0,3	0,3	0,3		
21: 5n3	0,4	0,6	0,6	0,6		
22: 5n3	0,2	0,4	0,4	0,3		
22: 6n3	5,0	9,1	8,8	8,4		
Неизвестно	0,7	1,2	1,0	1,0		
Насыщенные жирные кислоты	7,9	11,2	10,6	10,1		
Моноеновые жирные кислоты	5,2	7,3	6,5	6,4		
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-6)	0,8	1,1	1,0	1,0		

Полиненасыщенные жирные кислоты (n-3)	19,6	33,0	31,7	30,3		
Общее кол-во полиненасыщенных жирных кислот	20,4	34,1	32,6	31,3		
Общее кол-во жирных кислот	34,3	53,9	50,8	48,7		

Таблица 15 Аналитические результаты для шести партий композиции ЛФХ криля FLASH из Процесса 1

Параметр	Номер партии FLASH						
	MS-ABM1-31	MS: ABM-1: 43B	MS: ABM-1: 45B	MS: ABM-1: 65	MS: ABM-1: 67	MS: ABM-1: 69	MS: ABM-1: 71
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР							
ФХ	1,9	4,7	1,9	3,3	1,8	13,7	6,7
ФХ-эфир	1,1	4,6	1,6	3,8	1,6	5,6	3,1
1-ЛФХ	5,7	7,2	7,4	8,7	8,0	7,0	7,1
2-ЛФХ	57,2	60,3	65,5	68,5	55,0	48,6	58,3
2-ЛФХ-эфир	18,2	2,7	3,2	1,4	1,2	1,0	1,6
ФЭ	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
ФЭ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
ЛФЭ	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Другие	0,3	<0,1	<0,1	<0,1	0,5	0,6	<0,1
Суммарное кол-во ФЛ	84,2	79,5	79,5	85,7	68,1	76,5	76,8
Суммарное кол-во ЛФХ	81,1	70,2	76,1	78,6	64,2	56,6	67,0
Фосфор	4,8	4,4	4,5	4,9	3,9	4,1	4,3
Жирные кислоты, г/100g, GC	Не применимо		Не применимо				
12: 0		<0,1		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
14: 0		0,2		0,2	0,2	0,4	0,3

15: 0		<0,1		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
16: 0		1,0		1,4	1,4	4,4	3,4
16: 1n7		0,6		0,6	0,6	0,7	0,6
18: 0		0,2		0,4	0,5	0,5	0,5
18: 1n9		2,5		2,4	2,6	2,7	2,6
18: 1n7		0,4		0,5	0,5	1,2	0,9
18: 2n6		0,9		0,9	1,0	0,9	1,0
18: 3n3		1,8		1,9	2,0	1,8	1,9
18: 4n3		2,6		2,5	2,6	2,3	2,3
20: 1n9		<0,1		<0,1	<0,1	0,1	<0,1
20: 4n6		0,3		0,3	0,3	0,3	0,3
20: 3n3		<0,1		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
20: 4n3		0,4		0,4	0,4	0,4	0,4
20: 5n3		24,5		24,3	24,3	22,0	21,7
22: 1n9		<0,1		<0,1	<0,1	0,2	0,2
21: 5n3		0,9		0,9	0,9	0,8	0,8
22: 5n3		0,5		0,5	0,5	0,5	0,5
22: 6n3		12,4		10,5	10,3	9,8	9,6
Неизвестно		0,4		0,4	0,6	0,4	0,3
Насыщенные жирные кислоты		1,4		1,9	1,9	5,3	4,2
Моноеновые жирные кислоты		3,5		3,5	3,7	4,8	4,4
Полиненасы щенные жирные кислоты (n- 6)		1,2		1,2	1,3	1,2	1,2
Полиненасы щенные жирные кислоты (n- 3)		43,1		40,9	40,9	37,5	37,1
Общее кол- во полиненасы щенных		44,3		42,1	42,1	38,6	38,3

жирных кислот							
Общее кол-во жирных кислот		49,6		47,9	48,3	49,1	47,1

Таблица 16 Аналитические результаты для двух партий композиции ЛФХ криля CRUDE-2 из Процесса 2

Параметр	Номер партии CRUDE-2	
	LS: ABM_9C0	LS: ABM_10C0
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР		
ФХ	4,3	6,1
ФХ-эфир	4,3	3,6
1-ЛФХ	10,7	4,0
2-ЛФХ	15,3	21,0
2-ЛФХ-эфир	-	-
ФЭ	0,7	0,9
ФЭ-эфир	-	-
ЛФЭ	0,9	1,8
Другие	0,9	2,2
Суммарное кол-во ФЛ	37,1	39,5
Суммарное кол-во ЛФХ	26,0	25,0
Фосфор	2,0	2,1
Общее кол-во ФЛ, гравиметрически	42,0	45,3
Общее кол-во НЛ, гравиметрически	58,0	54,7
H ₂ O, % мас.	1,0	0,5
Жирные кислоты, г/100g, GC		
12: 0	0,2	0,1
14: 0	4,4	4,6

15: 0	0,2	0,2
16: 0	13,5	14,3
16: 1n7	2,1	4,1
18: 0	1,3	1,7
18: 1n9	4,8	5,3
18: 1n7	4,0	3,8
18: 2n6	1,0	0,8
18: 3n3	1,7	0,5
18: 4n3	3,7	1,5
20: 1n9	0,3	0,4
20: 4n6	0,2	0,2
20: 3n3	0,1	0,1
20: 4n3	0,5	0,3
20: 5n3	16,0	17,8
22: 1n9	0,4	0,8
21: 5n3	0,5	0,6
22: 5n3	0,4	0,3
22: 6n3	8,6	6,8
Неизвестно	0	0
Насыщенные жирные кислоты	19,5	20,9
Моноеновые жирные кислоты	11,5	14,4
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-6)	1,2	1,0
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-3)	31,4	27,9
Общее кол-во полиненасыщенных жирных кислот	32,6	28,8
Общее кол-во жирных кислот	63,7	64,1

Таблица 17 Аналитические результаты для восьми партий композиции ЛФХ криля POLAR-2 из Процесса 2

Параметр	Номер партии POLAR-2							
	LS: ABM_3K	LS: ABM_3D	LS: ABM_8A1	LS: ABM_8B1	LS: ABM_8C1	LS: ABM_8D1-1	LS: ABM_9A1	LS: ABM_9C1
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР								
ФХ	8,4	5,8	7,5	10,8	6,3	12,2	9,4	8,4
ФХ-эфир	5,5	3,4	7,5	7,9	5,4	5,8	7,9	8,3
1-ЛФХ	15,6	9,4	25,0	18,0	12,8	11,2	18,6	14,1
2-ЛФХ	33,4	33,0	21,2	23,7	36,6	30,6	29,5	35,6
2-ЛФХ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-
ФЭ	1,2	0,9	1,2	1,5	1,1	1,7	1,2	1,1
ФЭ-эфир	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-
ЛФЭ	2,8	2,4	1,6	2,9	2,8	3,0	1,8	1,7
Другие	4,6	3,4	1,6	2,0	4,9	4,5	1,8	2,3
Суммарное кол-во ФЛ	71,5	58,1	65,7	66,7	70,0	68,9	70,1	71,4
Суммарное кол-во ЛФХ	49	42,4	46,2	41,7	49,4	41,8	48,1	49,7
Фосфор	3,8	3,12	3,5	3,5	3,7	3,6	3,7	3,8

Общее кол-во ФЛ, гравиметрически	77,2	63,4	76,2	73,7	76,8	79,4	77,0	79,0
Общее кол-во НЛ, гравиметрически	22,8	36,6	23,8	26,3	23,2	20,6	23,0	21,0
H ₂ O, % мас.	Не применимо		2,4	1,4	1,2	3,7	0,9	0,6
Жирные кислоты, г/100g, GC	Планируемый							
12: 0			<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1
14: 0			1,4	1,9	1,3	1,4	1,3	1,1
15: 0			0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1
16: 0			5,8	7,9	6,2	7,3	6,1	5,2
16: 1n7			0,9	3,1	2,3	1,8	0,9	0,8
18: 0			0,8	1,0	0,9	1,1	1,0	0,9
18: 1n9			2,7	3,3	2,8	3,0	2,6	2,3
18: 1n7			1,7	1,8	1,4	1,9	1,7	1,4
18: 2n6			0,8	1,1	0,9	0,7	0,8	0,7
18: 3n3			1,5	0,4	0,5	0,5	1,5	1,4
18: 4n3			2,6	1,2	2,0	1,4	2,7	2,5

20: 1n9			0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1
20: 4n6			0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
20: 3n3			0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1
20: 4n3			0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4
20: 5n3			18,8	20,4	21,4	21,5	18,7	16,8
22: 1n9			0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2
21: 5n3			0,7	0,7	0,8	0,9	0,6	0,6
22: 5n3			0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
22: 6n3			10,3	9,2	9,9	8,7	10,1	8,9
Неизвестно			1,6	2,1	1,7	1,7	<0,1	<0,1
Насыщенные жирные кислоты			8,1	10,8	8,4	9,8	8,6	7,3
Моноеновые жирные кислоты			5,9	8,8	7,1	7,3	5,4	4,8
Полиненасыщен ные жирные кислоты (n-6)			1,0	1,5	1,2	0,9	1,0	0,9
Полиненасыщен ные жирные кислоты (n-3)			34,8	32,7	35,3	33,6	34,5	30,9
Общее кол-во полиненасыщенн			35,8	34,1	36,5	34,6	35,5	31,8

ых жирных кислот								
Общее кол-во жирных кислот			51,4	55,8	53,6	53,3	49,6	44,0

Таблица 18 Аналитические результаты для двух партий композиции ЛФХ криля Formulation из Процесса 2

Параметр	Номер партии FORMULATION	
	LS: ABM_9A2	LS: ABM_9C2
Композиция фосфолипидов, % мас., ³¹ P ЯМР		
ФХ	7,7	6,9
ФХ-эфир	6,4	6,6
1-ЛФХ	15,0	12,6
2-ЛФХ	24,3	28,5
2-ЛФХ-эфир	-	-
ФЭ	1,1	1,1
ФЭ-эфир	-	-
ЛФЭ	1,3	1,4
Другие	1,1	1,4
Суммарное кол-во ФЛ	57,0	58,5
Суммарное кол-во ЛФХ	39,3	41,1
Фосфор	3,0	3,1
Жирные кислоты, г/100g, GC		
12: 0	0,1	0,1
14: 0	1,2	1,0
15: 0	0,1	0,1
16: 0	5,3	4,8
16: 1n7	0,7	0,7
18: 0	1,0	1,0
18: 1n9	2,2	2,1
18: 1n7	1,4	1,3
18: 2n6	0,7	0,7
18: 3n3	1,3	1,3
18: 4n3	2,3	2,4
20: 1n9	0,1	0,1

20: 4n6	0,2	0,2
20: 3n3	0,1	0,1
20: 4n3	0,3	0,4
20: 5n3	15,8	16,6
22: 1n9	0,2	0,2
21: 5n3	0,5	0,6
22: 5n3	0,3	0,3
22: 6n3	8,4	9,1
Неизвестно	<0,1	<0,1
Насыщенные жирные кислоты	7,5	6,9
Моноеновые жирные кислоты	4,6	4,4
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-6)	0,8	0,9
Полиненасыщенные жирные кислоты (n-3)	29,2	30,7
Общее кол-во полиненасыщенных жирных кислот	30,1	31,6
Общее кол-во жирных кислот	42,2	42,9

В Таблице 19 приведены дополнительные аналитические данные для различных партий.

5 **Таблица 19**

	Партии CRUDE-2		Партии POLAR-2		Партии FORMULATION	
	LS: ABM_9C0	LS: ABM_10C0	LS: ABM_9A1	LS: ABM_9C1	LS: ABM_9A2	LS: ABM_9C2
Соль (NaCl) (м.д.)	490,4	3262,4	1051,7	941,6	999,5	839,6
Астаксантин (мкг/г)	123,2	190,8	75,5	82,8	90,1	74,2

Проводимость (мкСм/см)	15,6	64,4	20,3	16,3	62,0	52,8
-----------------------------------	------	------	------	------	------	------

ПРИМЕР 9

Этот пример обеспечивает данные о поглощении композиций лизофосфолипидов согласно данному изобретению в биологических тканях. Вкратце, в композицию лизофосфолипидов LS: АВМ-9С0, описанную выше, добавляли меченный ¹⁴С ЛФХ-ЭПК или ЛФХ-ДГК и сравнивали с очищенной композицией ФХ криля (98% ФХ, составленной с ПЭГ) с добавлением меченного ¹⁴С ФХ-ЭПК, или ДГК. Композиции с добавкой вводили крысам перорально, а поглощение различными тканями измеряли при помощи количественной автордиографии всего тела. Были собраны данные как о времени поглощения различными органами и тканями, так и о количестве включения в ткани. Результаты приведены в Таблицах 20-23. Удивительно, что эти данные указывают на то, что поглощение как композиции лизофосфолипидов с добавлением ЛФХ-ЭПК, так и композиции лизофосфолипидов с добавлением ЛФХ-ДГК происходило как быстрее по времени, так и с большим по общему количеству включенных ЭПК и ДГК по сравнению с образцами, которые были приготовлены с интактными фосфолипидами (т.е. образцы, которые не содержали заметного количества лизофосфолипидов). Этот результат наблюдали для всех исследуемых органов/тканей, кроме глаза.

Таблица 20

		Время после введения (ч)							
ЭПК-ФХ		0,5	3	8	24	72	96	168	336
(% дозы/орган)	Надпочечники	<0,001	0,009	0,016	0,008	0,011	0,008	0,007	0,003
	Кровь	0,082	0,971	1,012	0,267	0,302	0,269	0,191	0,122
	Кость	<0,014	0,236	0,414	0,162	0,259	0,234	0,257	0,16
	Костный мозг	0,001	0,05	0,099	0,059	0,108	0,058	0,044	0,017
	Головной мозг	<0,001	0,01	0,025	0,028	0,088	0,102	0,118	0,147
	Глаз (целый)	<0,001	0,002	0,003	0,001	0,006	0,006	0,004	0,005
	Жир (белый)	<0,015	0,956	6,599	1,936	2,515	2,811	2,651	0,995
	Почка (целая)	0,006	0,127	0,216	0,119	0,195	0,194	0,122	0,069
	Слизистая оболочка толстой кишки	<0,002	0,886	0,23	0,162	0,16	0,162	0,108	0,059
	Печень	0,103	5,526	10,551	3,188	2,472	2,082	1,286	0,0639
	Легкое	0,005	0,115	0,181	0,074	0,106	0,089	0,074	0,038
	Мышца	<0,094	2,304	4,432	3,47	6,818	7,417	8,361	7,175
	Миокард	0,005	0,074	0,097	0,056	0,119	0,145	0,141	0,103
	Поджелудочная железа	0,003	0,126	0,228	0,107	0,156	0,122	0,097	0,058
	Гипофиз	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Предстательная железа	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Кожа	0,037	0,798	2,286	1,172	2,181	2,426	1,292	1,009

Слизистая оболочка тонкой кишки	0,628	6,092	5,308	0,628	0,461	0,464	0,226	0,143
Селезенка	0,001	0,056	0,081	0,044	0,054	0,04	0,03	0,013
Слизистая оболочка желудка	0,027	0,187	0,235	0,079	0,12	0,086	0,067	0,041
Яички	<0,002	0,02	0,052	0,037	0,061	0,057	0,063	0,045
Тимус	<0,001	0,007	0,012	0,008	0,014	0,012	0,009	0,005
Щитовидная железа	<0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	<0,001
н.д. = нет данных								

Таблица 21

		Время после введения (ч)						
		0,5	3	8	24	72	96	168
ЭПК-ЛФХ								
(% дозы/орган)	Надпочечники	0,002	0,014	0,023	0,042	0,03	0,018	0,012
	Кровь	0,44	1,89	1,16	0,542	0,342	0,374	0,238
	Кость	<0,016	0,25	0,279	0,07	0,129	0,165	0,118
	Костный мозг	0,007	0,118	0,189	0,197	0,124	0,137	0,055
	Головной мозг	0,001	0,031	0,023	0,052	0,152	0,27	0,251
	Глаз (целый)	<0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003

Жир (белый)	0,017	2,92	2,36	2,68	10,7	5,01	3,94
Почка (целая)	0,034	0,237	0,307	0,344	0,304	0,242	0,19
Слизистая оболочка толстой кишки	0,01	0,201	0,463	0,259	0,266	0,212	0,137
Печень	0,864	13,4	12,4	8,24	5,23	4,35	2,56
Легкое	0,043	0,191	0,291	0,198	0,182	0,167	0,129
Мышца	0,106	4,01	7,14	8,16	8,48	10,5	8,41
Миокард	0,023	0,235	0,107	0,085	0,133	0,188	0,145
Поджелудочная железа	0,024	0,279	0,339	0,369	0,302	0,293	0,257
Гипофиз	<0,001	0,001	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
Предстательная железа	<0,001	0,005	0,006	0,007	0,007	0,011	0,005
Кожа	0,021	1,26	1,01	0,986	1,55	1,51	1,36
Слизистая оболочка тонкой кишки	28,4	10,2	3,13	2,23	0,861	0,542	0,389
Селезенка	0,01	0,259	0,247	0,121	0,086	0,094	0,049
Слизистая оболочка желудка	0,259	0,287	0,23	0,211	0,161	0,158	0,107
Яички	<0,002	0,04	0,054	0,077	0,069	0,093	0,081
Тимус	0,001	0,018	0,019	0,016	0,019	0,023	0,016
Щитовидная железа	<0,001	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002

Таблица 22

		Время после введения (ч)							
		0,5	3	8	24	72	96	168	336
ДГК-ФХ	Надпочечники	<0,001	0,007	0,008	0,005	0,009	0,01	0,004	0,005
% дозы/ткань	Кровь	0,084	0,692	0,431	0,18	0,34	0,341	0,143	0,156
	Кость	<0,017	0,202	0,305	0,068	0,166	0,331	0,134	0,0235
	Костный мозг	<0,001	0,042	0,047	0,035	0,061	0,078	0,028	0,021
	Головной мозг	<0,001	0,015	0,02	0,027	0,134	0,176	0,109	0,228
	Глаз (целый)	<0,001	0,002	0,002	0,002	0,006	0,01	0,004	0,008
	Жир (белый)	0,052	3,976	2,57	1,892	5,701	5,942	2,365	2,691
	Почка (целая)	0,011	0,156	0,154	0,091	0,205	0,287	0,101	0,091
	Слизистая оболочка толстой кишки	<0,002	0,191	0,134	0,125	0,2	0,165	0,084	0,08
	Печень	0,222	7,552	5,905	2,814	3,9	3,875	1,291	1,124
	Легкое	0,007	0,113	0,076	0,046	0,096	0,108	0,047	0,04
	Мышца	0,111	6,575	6,166	2,432	8,408	14,879	5,504	10,033
	Миокард	0,005	0,363	0,197	0,133	0,307	0,41	0,149	0,172
	Поджелудочная железа	<0,001	0,199	0,15	0,066	0,162	0,188	0,067	0,085
	Гипофиз	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Предстательная железа	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Кожа	0,022	0,477	0,392	0,219	1,212	2,518	0,95	1,399
	Слизистая оболочка тонкой кишки	1,801	5,223	2,541	0,492	0,545	0,612	0,23	0,19

Селезенка	0,002	0,058	0,045	0,027	0,046	0,053	0,017	0,016
Слизистая оболочка желудка	0,028	0,149	0,117	0,052	0,087	0,101	0,048	0,05
Яички	<0,002	0,016	0,018	0,025	0,082	0,083	0,047	0,069
Тимус	<0,001	0,006	0,006	0,004	0,013	0,013	0,006	0,005
Щитовидная железа	<0,001	0,001	0,001	<0,001	0,001	0,001	0,001	<0,001
н.д. = нет данных								

Таблица 23

		Время после введения (ч)						
		0,5	3	8	24	72	96	168
ДГК-ЛФХ	Надпочечники	0,003	0,014	0,026	0,011	0,015	0,035	0,012
% дозы/ткань	Кровь	0,421	2,1	0,674	0,315	0,358	0,364	0,202
	Кость	<0,017	0,232	0,123	0,189	0,304	0,219	0,064
	Костный мозг	0,005	0,129	0,167	0,112	0,14	0,13	0,106
	Головной мозг	0,001	0,027	0,058	0,077	0,247	0,333	0,441
	Глаз (целый)	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,007	0,004
	Жир (белый)	<0,017	1,49	3,8	12,2	6,59	5,57	3,79
	Почка (целая)	0,022	0,27	0,433	0,337	0,396	0,422	0,181

Слизистая оболочка толстой кишки	0,008	0,202	0,399	0,146	0,3	0,29	0,19
Печень	1,51	19,2	15,1	11,3	7,49	6,9	2,99
Легкое	0,034	0,23	0,157	0,166	0,143	0,164	0,114
Мышца	0,107	4,96	12,8	8,47	14,1	21,5	16,6
Миокард	0,034	0,756	0,442	0,404	0,418	0,643	0,532
Поджелудочная железа	0,014	0,413	0,33	0,332	0,331	0,416	0,208
Гипофиз	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Предстательная железа	<0,001	0,002	0,013	0,006	0,008	0,012	0,012
Кожа	0,042	0,512	1,09	1,17	1,52	1,75	2,1
Слизистая оболочка тонкой кишки	26	4,32	5,25	2,29	1,18	0,951	0,416
Селезенка	0,006	0,151	0,13	0,091	0,109	0,104	0,043
Слизистая оболочка желудка	0,046	0,268	0,319	0,186	0,145	0,139	0,072
Яички	<0,002	0,027	0,062	0,032	0,095	0,115	0,081
Тимус	0,001	0,013	0,016	0,011	0,018	0,02	0,013
Щитовидная железа	<0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,001

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения, характеризующаяся тем, что содержит от около 10 до около 100 % мас. ЛФХ композиции и содержит от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 композиции и необязательно имеет одну или более из следующих характеристик или свойств:

- a) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1:8 до 18:1;
- b) содержание фосфатидилхолинов (ФХ) менее 10 % мас. композиции;
- c) содержание фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) менее 1,2 % мас. композиции;
- d) содержание нейтральных липидов от 5 до 65 % мас. композиции;
- e) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и
- f) соотношение ЭПК:ДГК от 1:1 до 3:1 или соотношение ДГК:ЭПК от 1:1 до 5:1.

2. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 60 до 100 % мас. ЛФХ композиции.

3. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 30 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 композиции.

4. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 70 до 90 % мас. ЛФХ композиции.

5. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 35 до 45 % мас. жирных кислот омега-3 композиции.

6. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 20 до 50 % мас. ЛФХ композиции.

7. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 20 до 30 % мас. ЛФХ композиции.

8. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит от 5 до 20 % мас. жирных кислот омега-3 композиции.
9. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (а).
10. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (b).
11. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (с).
12. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (d).
13. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (е).
14. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что композиция имеет свойство (f).
15. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет два или более свойств (а), (b) и (с).
16. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет два или более свойств (а), (b), (с), (d), (е) и (f).
17. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет три или более свойств (а), (b), (с), (d), (е) и (f).
18. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет четыре или более свойств (а), (b), (с), (d), (е) и (f).
19. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет пять или более свойств (а), (b), (с), (d), (е) и (f).

20. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что композиция имеет свойства (a), (b), (c), (d), (e) и (f).
21. Композиция лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) морского происхождения по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что композиция выбрана из группы, состоящей из композиции ЛФХ криля, композиции ЛФХ сельди, композиции ЛФХ икры сельди, композиции ЛФХ водорослей и композиции ЛФХ *Calanus*.
22. Фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-21 и физиологически приемлемый носитель.
23. Фармацевтическая или нутрицевтическая композиция по п. 22, отличающаяся тем, что физиологически приемлемый носитель представляет собой липидный носитель.
24. Носитель для пероральной доставки, содержащий композицию ЛФХ морского происхождения, фармацевтическую композицию или нутрицевтическую композицию по любому из пп. 1-23.
25. Композиция липидов, содержащая первую липидную фракцию и вторую фракцию липидов, причем первая фракция липидов представляет собой композицию ЛФХ морского происхождения по любому из пп. 1-21, и вторая фракция липидов получена из источника, отличного от первой фракции липидов, и/или содержит менее 20% ЛФХ.
26. Композиция липидов по п. 25, отличающаяся тем, что вторая фракция липидов выбрана из группы, состоящей из фракции триглицеридов, фракции диглицеридов, фракции сложных этиловых эфиров жирных кислот, фракции свободных жирных кислот и их комбинаций.
27. Композиция липидов по п. 19 или п. 20, отличающаяся тем, что вторая фракция липидов представляет собой фракцию липидов морского происхождения, содержащую ЭПК и/или ДГК.
28. Фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая композицию липидов по любому из пп. 25-27 и физиологически приемлемый носитель.
29. Носитель для пероральной доставки, содержащий композицию липидов по любому из пп. 25-27.
30. Способ получения композиции лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) с высоким содержанием ЭПК и ДГК из морского сырья, содержащего фосфолипиды, включающий

обработку морского сырья фосфолипазой, которая не является нативной для морского сырья, для получения обработанного фосфолипазой сырья, и фракционирование обработанного фосфолипазой сырья для получения композиции липидов, имеющей более высокое содержание лизофосфатидилхолинов, чем исходное сырье.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что исходное сырье выбрано из группы, состоящей из препарата липидов криля, препарата липидов сельди, препарата липидов икры сельди, препарата липидов водорослей и препарата липидов *Calanus*.
32. Способ по любому из пп. 30-31, отличающийся тем, что препарат липидов криля представляет собой препарат липидов *Euphausia Superba*.
33. Способ по любому из пп. 30-32, отличающийся тем, что сырье приводят в контакт с фосфолипазой в растворителе.
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что растворитель представляет собой смесь воды и спирта.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что спирт представляет собой этанол.
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что сырье приводят в контакт с фосфолипазой в смеси около 85% воды и 15% этанола.
37. Способ по любому из пп. 30-36, отличающийся тем, что фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1).
38. Способ по любому из пп. 30-37, отличающийся тем, что фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), при этом концентрация фермента находится в диапазоне 0,1-20 % об./мас., предпочтительно 0,1-15 % об./мас., более предпочтительно 0,1-10 % об./мас., еще более предпочтительно 0,1-5 % об./мас., наиболее предпочтительно 0,1-3 % об./мас.
39. Способ по любому из пп. 30-38, отличающийся тем, что фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), при этом способ осуществляют при pH 3-12, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 4-9, наиболее предпочтительно 5-9.
40. Способ по любому из пп. 30-39, отличающийся тем, что фермент представляет собой фосфолипазу A1 (PLA1), причем способ осуществляют при температуре 4-95°C, предпочтительно 4-85°C, более предпочтительно 10-80°C, еще более предпочтительно 15-70°C, еще более предпочтительно 15-65°C, наиболее предпочтительно 15-60°C.

41. Способ по любому из пп. 30-40, отличающийся тем, что сырье содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-70 % мас. и ДГК: 1-70 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-70 % мас. и ДГК: 5-70 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-60 % мас. и ДГК: 10-60 % мас..

42. Способ по любому из пп. 30-41, отличающийся тем, что композиция ЛФХ содержит ЭПК и ДГК в диапазоне; ЭПК: 1-100 % мас. и/или ДГК: 1-100 % мас., более предпочтительно ЭПК: 5-100 % мас. и/или ДГК: 5-100 % мас., наиболее предпочтительно ЭПК: 10-90 % мас. и/или ДГК: 10-90 % мас..

43. Способ по любому из пп. 30-42, отличающийся тем, что композиция ЛФХ содержит ЛФХ в диапазонах 10-100 % мас., предпочтительно 20-100 % мас., более предпочтительно 30-100 % мас., еще более предпочтительно 40-100 % мас., наиболее предпочтительно 50-100 % мас..

44. Способ по любому из пп. 30-43, отличающийся тем, что композиция ЛФХ, полученная при помощи процесса, характеризуется тем, что она содержит от около 20 до около 95 % мас. ЛФХ в композиции и содержит от 5 до 50 % мас. жирных кислот омега-3 композиции и, необязательно, имеющих одну или более из следующих характеристик или свойств:

a) соотношение 2-ЛФХ: 1-ЛФХ от 1:8 до 18:1;

b) содержание фосфатидилхолинов (ФХ) менее 10 % мас. композиции;

c) содержание фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) менее 1,2 % мас. композиции;

d) содержание нейтральных липидов от 5 до 65 % мас. композиции;

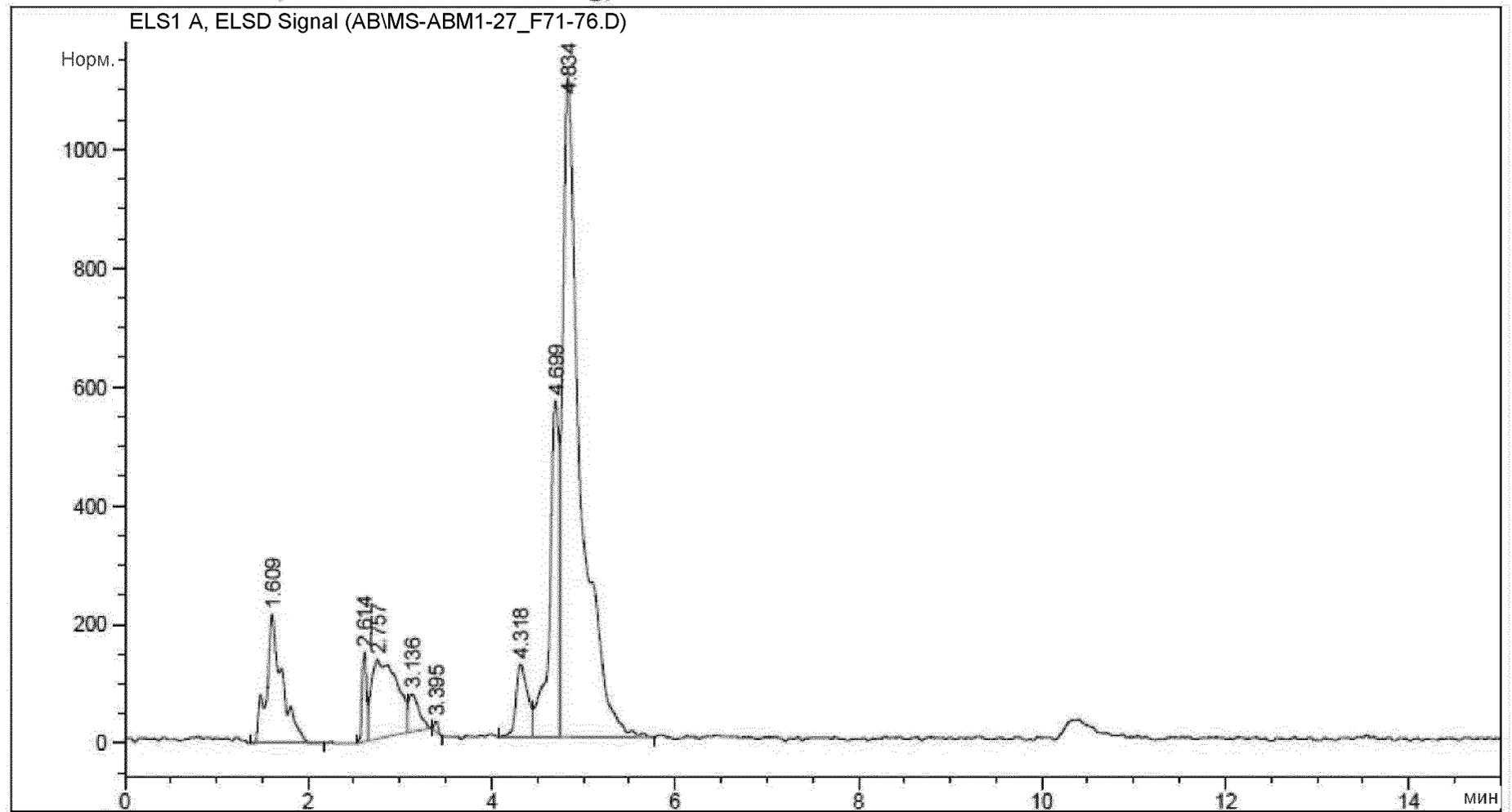
e) содержание простого эфира 2-ЛФХ менее 1,0 % мас.; и

f) соотношение ЭПК: ДГК от 1:1 до 3:1 или соотношение ДГК: ЭПК от 1:1 до 5:1.

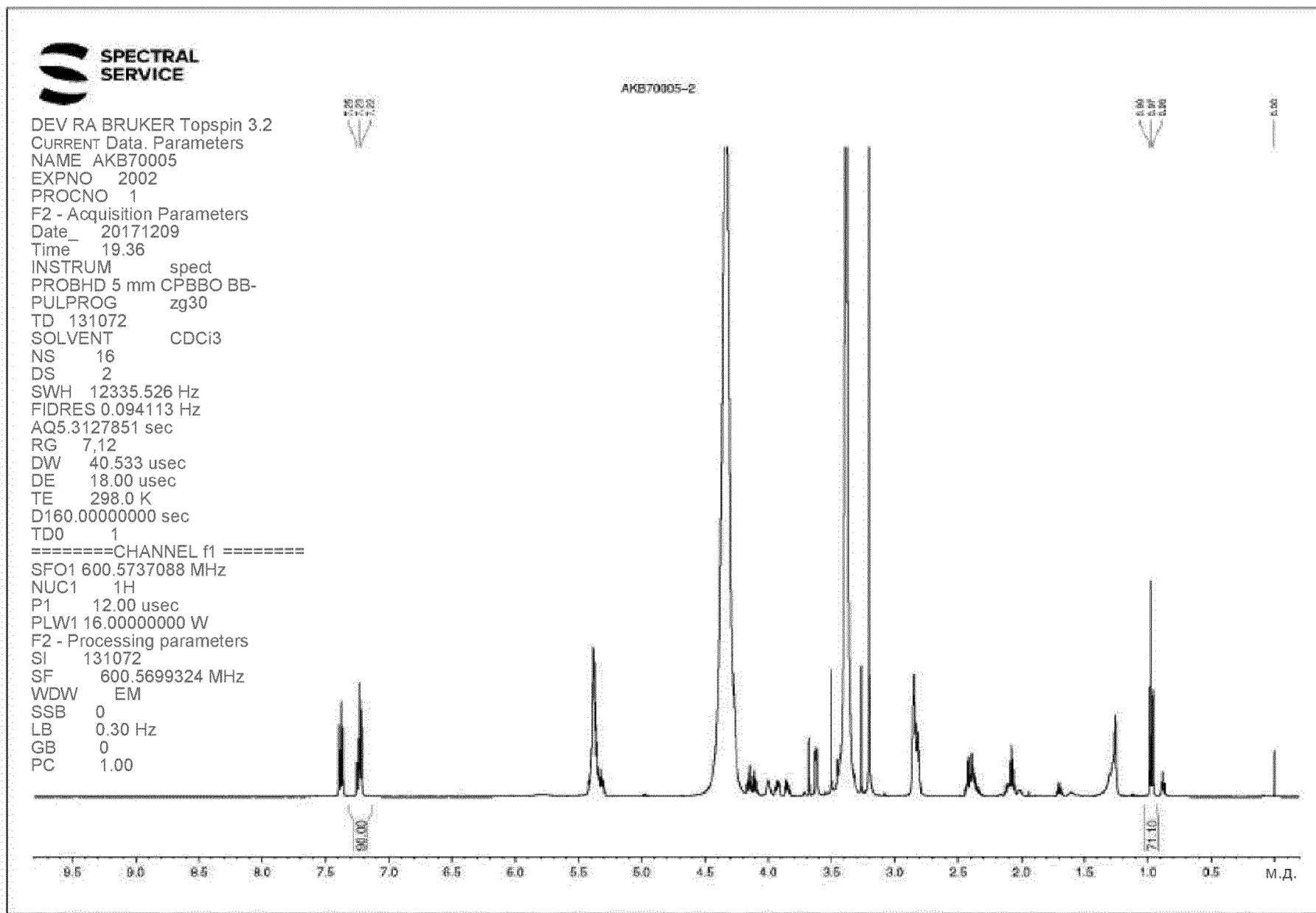
45. Способ по любому из пп. 30-44, дополнительно включающий составление композиции ЛФХ для употребления человеком.

46. Композиция по любому из пп. 1-29 или полученная способом по любому из пп. 24-39 для применения для дополнения рациона человека, предпочтительно в возрасте менее 10 лет, более предпочтительно в возрасте менее 1 года, еще более предпочтительно в возрасте менее 1 месяца, и наиболее предпочтительно новорожденного.

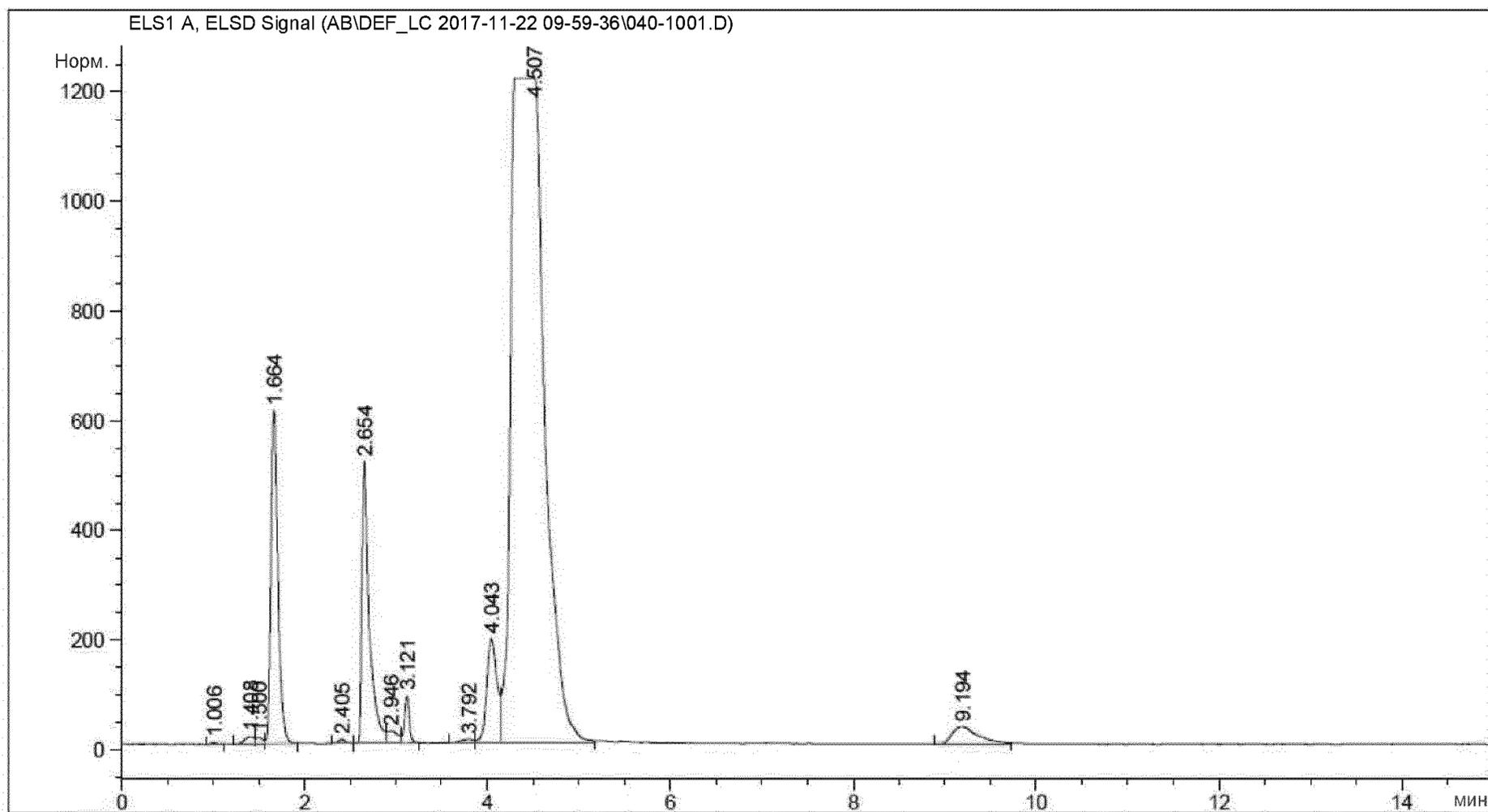
Фиг. 2



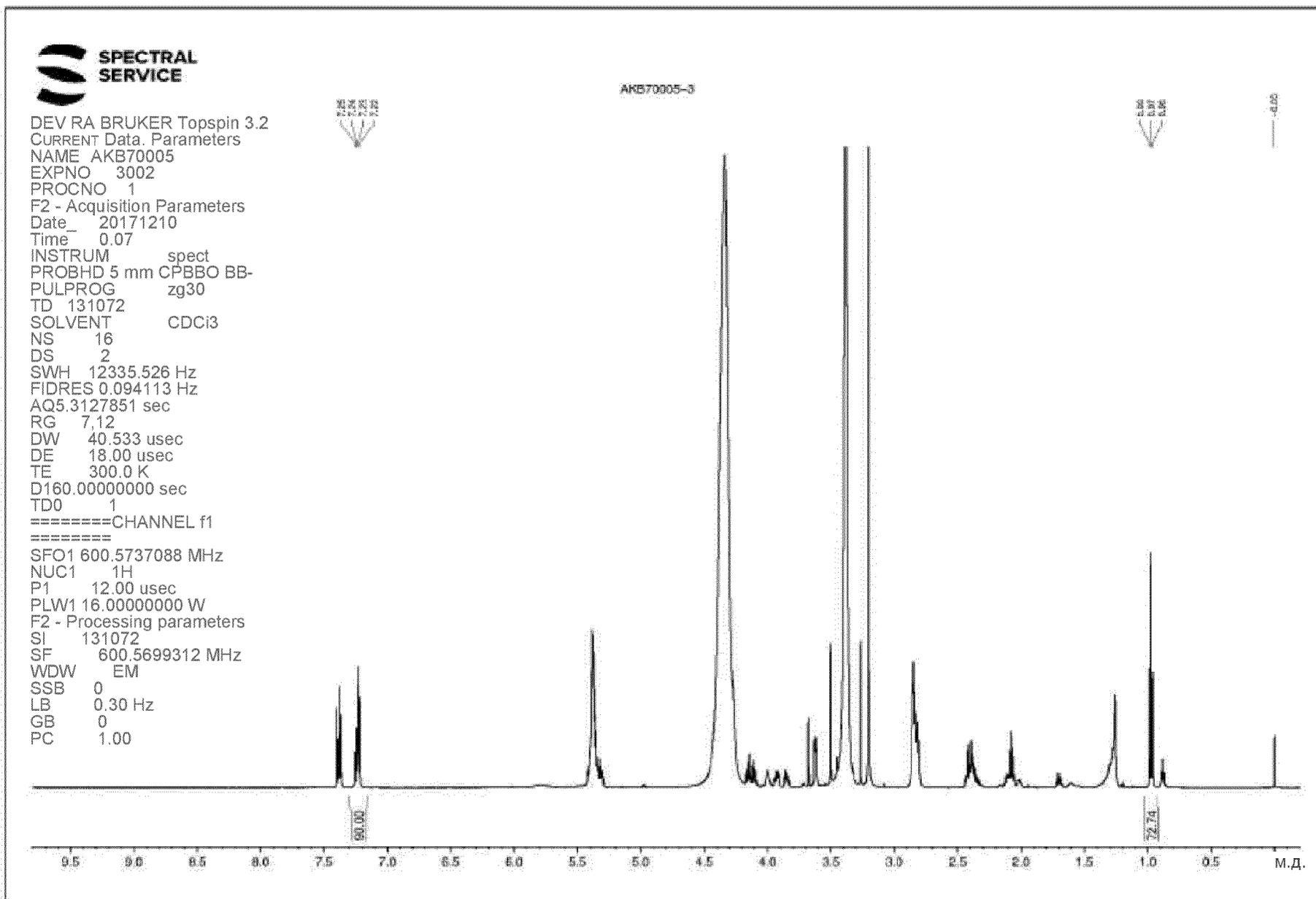
Фиг. 3



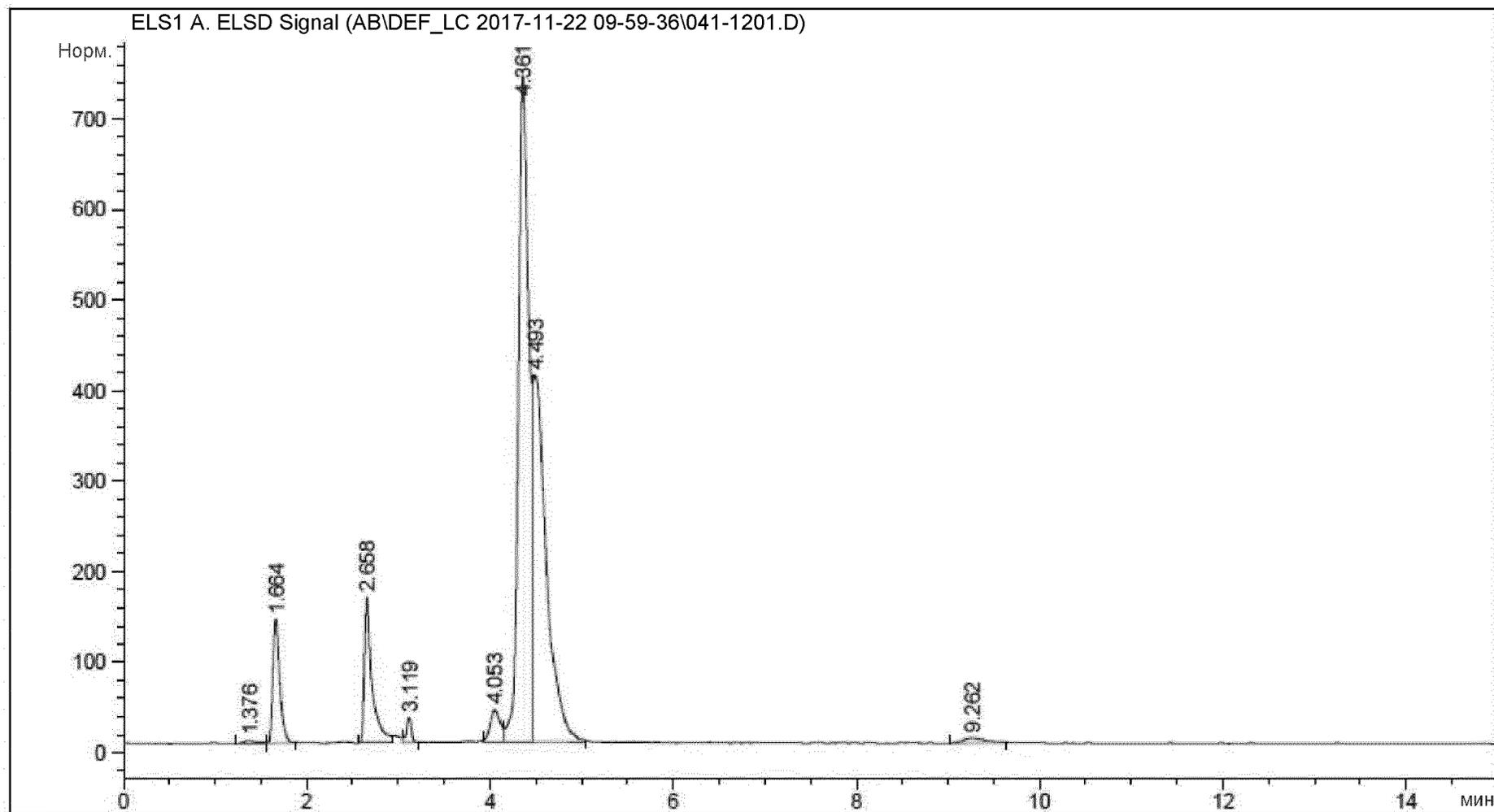
Фиг. 4



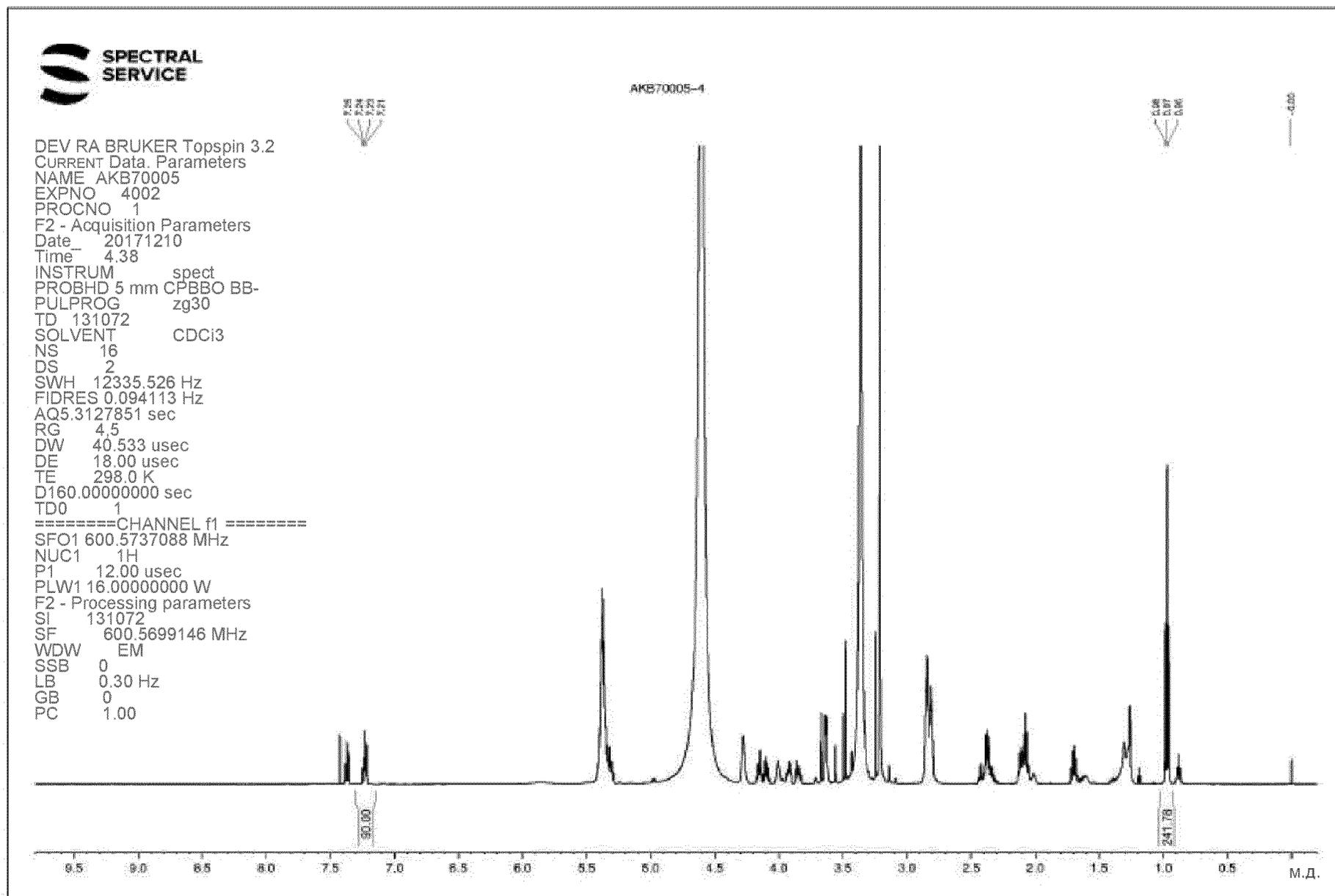
Фиг. 5



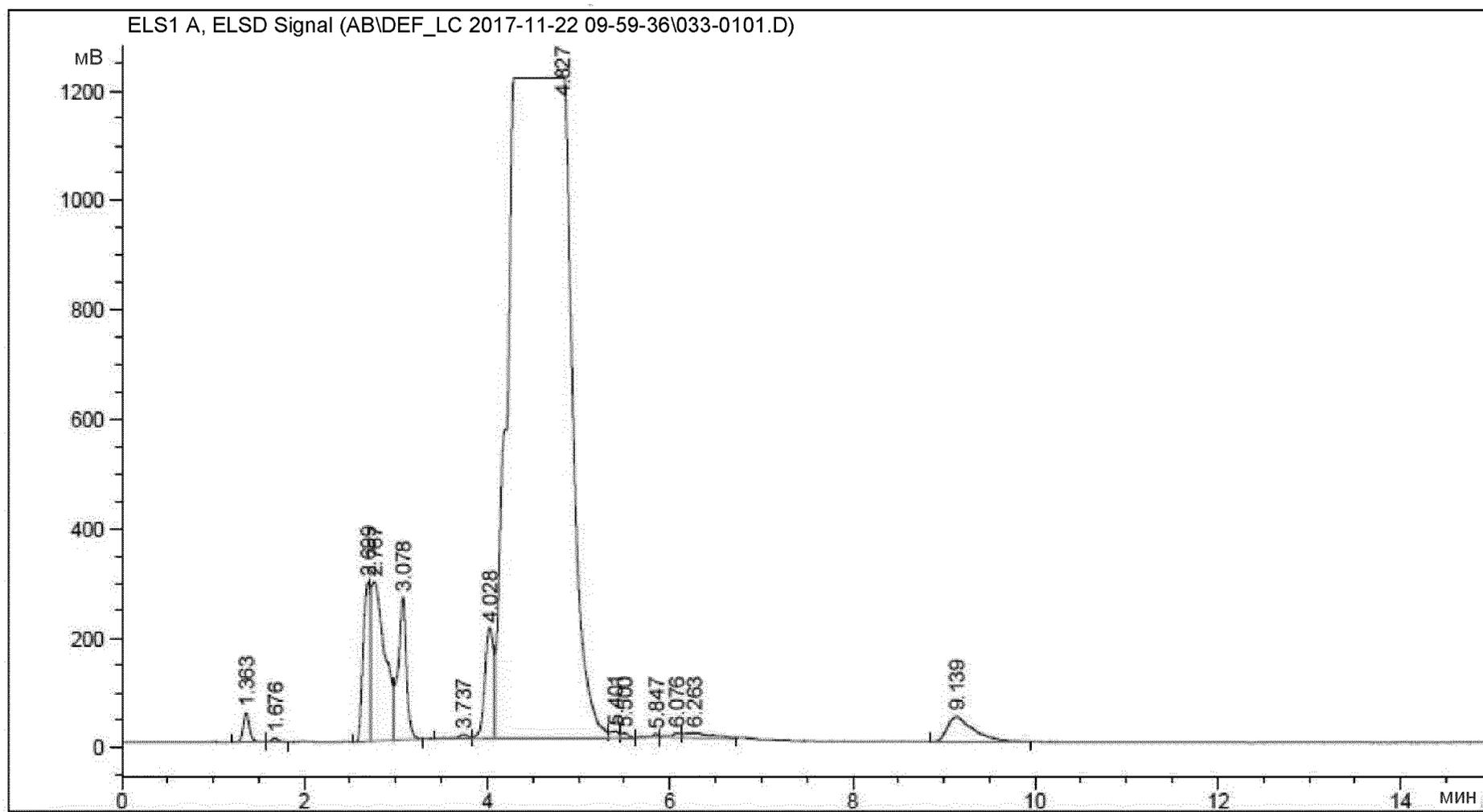
Фиг. 6



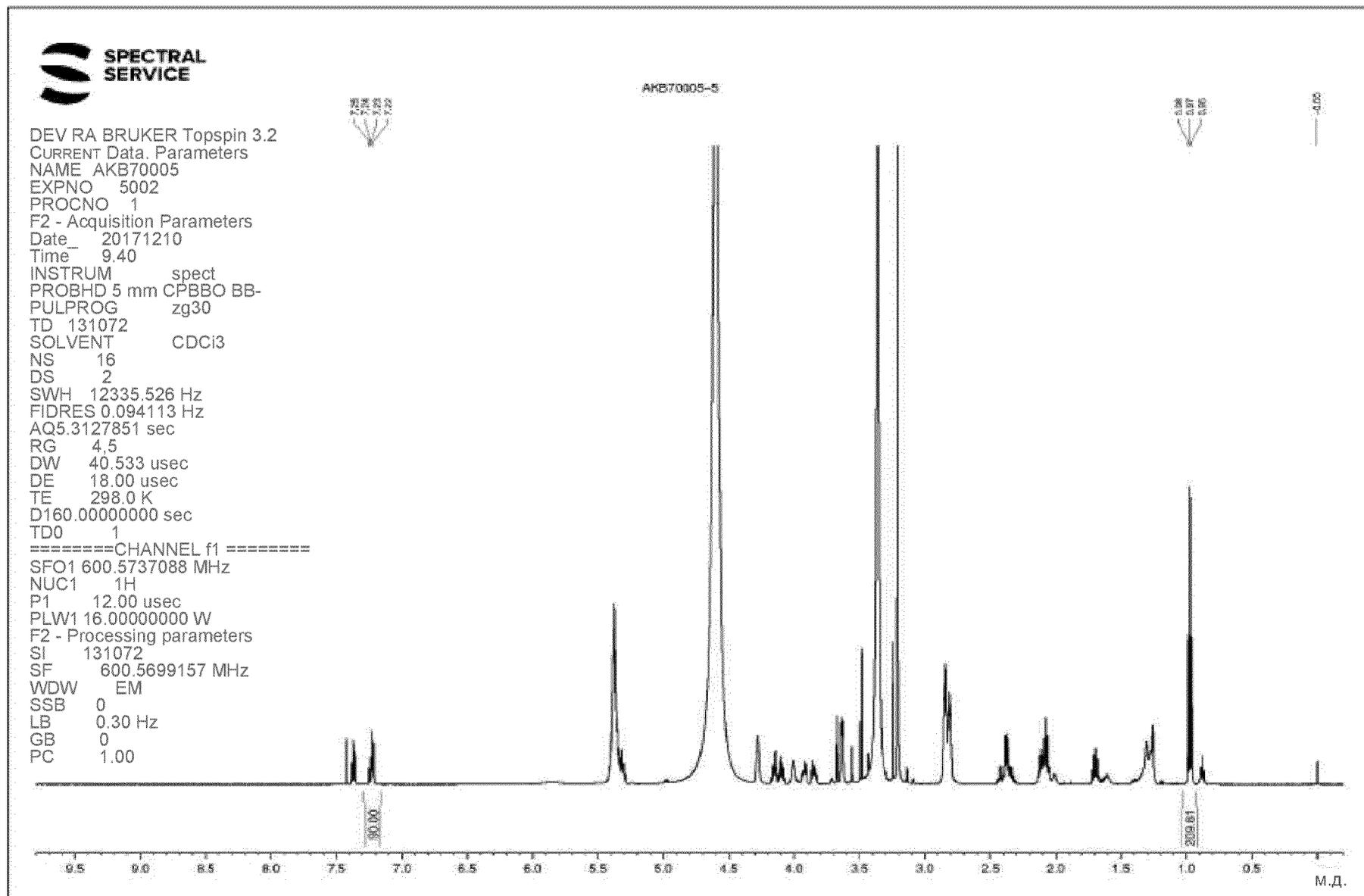
Фиг. 7



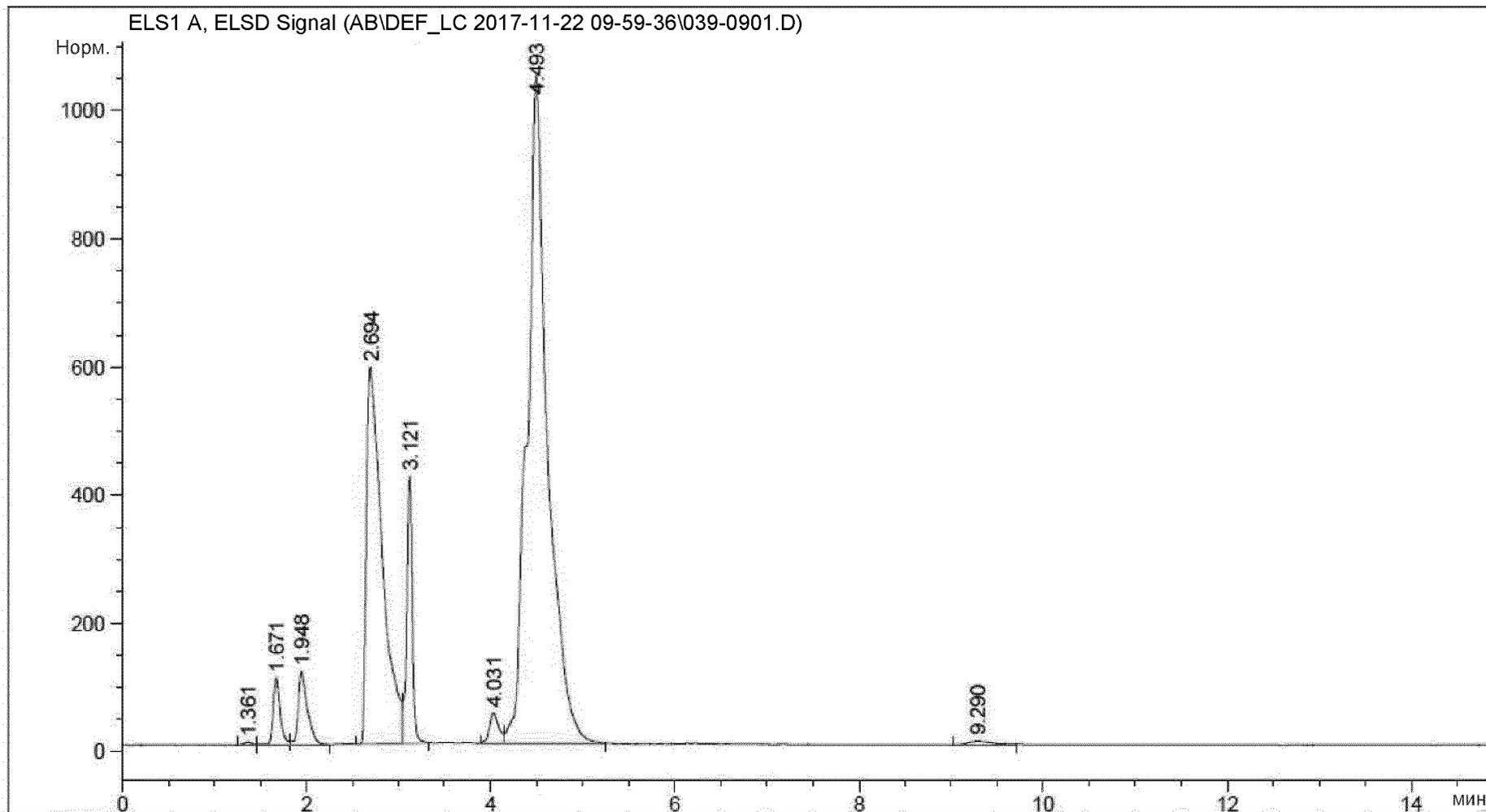
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



ФИГ. 11

