

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091551** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.13

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(51) Int. Cl. *A61K 35/612* (2015.01)
A61K 35/618 (2015.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИИ ЛИПИДОВ

(31) 2017905181

(32) 2017.12.22

(33) AU

(86) PCT/IB2018/060482

(87) WO 2019/123400 2019.06.27

(71) Заявитель:
**ФАРМАЛИНК ИНТЕРНЭШНЛ
ЛИМИТЕД (CN)**

(72) Изобретатель:
**Ходжсон Чарльз (NZ), Майерс Стефен,
Оливер Кристофер (AU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к комбинации или композиции липида мидии и крилевого масла, которую применяют для лечения воспаления или боли. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу получения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов приблизительно 50% или более.

A1

202091551

202091551

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563490EA/061

КОМБИНАЦИИ ЛИПИДОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится, главным образом, к комбинациям морских липидов. В частности, настоящее изобретение относится к комбинациям липидов, полученных из *Perna canaliculus* и криля, к композициям и препаратам, содержащим указанные комбинации, и к применению указанных комбинаций и композиций в терапии. Описание, кроме того, относится к способам изготовления крилевых масел и к их применению в комбинациях и композициях.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Ссылка в настоящем описании на любую предшествующую публикацию (или полученную из нее информацию), или на любой известный объект, не представляет собой и не должна быть принята как признание или допущение, или предположение в любой форме, что эта предшествующая публикация (или полученная из нее информация) или известный объект формирует часть общеизвестного уровня техники в области, к которой относится настоящее описание.

[0003] Воспаление является необходимым физиологическим адаптивным ответом на повреждение и инфекцию, без которого человек и животные не могли бы выживать. Его функцией является устранение первоначальной причины повреждения, удаление провоцирующих факторов и инициация репарации структуры и функции ткани. Его ранняя острая фаза, как правило, характеризуется жаром, болью, покраснением и отеком. Обычным исходом острого воспаления является восстановление и репарация повреждения, однако, непропорциональные острые и длительные хронические воспалительные ответы при таких состояниях, как сепсис, могут быть опасными.

[0004] Важно, что хроническое воспаление в настоящее время связали с патологией широкого множества заболеваний, поражающих все ткани и органы, включая остеоартрит, ревматоидный артрит, сердечно-сосудистое заболевание, цереброваскулярное заболевание, респираторное заболевание, аутоиммунное заболевание и саркопению; действительно, хроническое воспаление связали собственно с процессом старения.

[0005] В качестве ответа на процесс воспаления, разработан ряд лекарственных средств, наиболее эффективными из которых являются глюкокортикоидные стероидные лекарственные средства, способные супрессировать избыточное воспаление. Однако, терапия стероидными лекарственными средствами ограничена в широком распространении клинического применения из-за значительных побочных эффектов, и, как правило, ограничена только кратковременным применением. Разработан второй класс лекарственных средств против воспаления, называемых нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами (NSAIDS), таких как ибупрофен и т.д. - см. таблицу 1. Известно, что аспирин имеет противовоспалительную активность, и что он являлся частью этого второго класса противовоспалительных лекарственных

средств. Эти лекарственные средства были более безопасными, чем стероидные лекарственные средства, и могли быть использованы для более хронических воспалительных состояний, таких как остеоартрит.

Таблица 1: Список общепринятых нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (NSAID)

Родовое наименование	Торговое наименование(наименования)
целекоксиб	Целебрекс
диклофенак	Камбиа, катафлам, дилоджект, флектор, пеннсейд, солараз, вольтарен, вольтарен-XR, зипсор, зорволекс, артротек (комбинация с мизопростолом)
дифлунизал	В настоящее время нет торгового наименования на рынке
этодолак	В настоящее время нет торгового наименования на рынке
фенопрофен	Налфон
флубипрофен	Ансейд
ибупрофен	Адвил, калдолор, детский адвил, детский эликсир IB, детский мотрин, ибу-таб, ибупром, мотрин IB, мотрин от мигренозной боли, профен, таб-профен, дуэксис (комбинация с фамотидином), репрексаин (комбинация с гидрокодоном), викопрофен (комбинация с гидрокодоном)
индометацин	Индоцин, тиворбекс
кетопрофен	В настоящее время нет торгового наименования на рынке
кеторолак	Сприкс
мефенамовая кислота	Понстел
мелоксикам	Мобик
набуметон	В настоящее время нет торгового наименования на рынке
напроксен	Алеве, анапрокс, анапрокс DS, ЕС-напросин, напрелан, напросин, трексимет (комбинация с суматриптаном), вимово (комбинация с эзомепразолом)
оксапрозин	Дейпро
пироксикам	Фелден
сулиндак	Клинорил
толметин	В настоящее время нет торгового наименования на рынке

[0006] Простагландины играют ключевую роль в воспалительном ответе, где их присутствие значительно увеличено в пораженной воспалением ткани, внося вклад в боль

и лихорадку посредством повышения температуры и расширения кровеносных сосудов, что вызывает красноту и отек в том месте, где они высвобождаются. NSAID являются конкурентными ингибиторами активного участка как циклооксигеназы-1 (COX-1), так и циклооксигеназы-2 (COX-2), и таким образом, уменьшают синтез простагландинов. Посредством уменьшения продукции простагландинов, NSAID помогают облегчать дискомфорт от лихорадки и уменьшать воспаление и ассоциированную боль. NSAIDS обычно используют для лечения острых и хронических состояний, характеризующихся болью и воспалением, таких как остеоартрит, ревматоидный артрит, головная боль и мигрень, и лихорадка. Однако, NSAIDS также представляют значительные проблемы относительно безопасности, и могут иметь токсичность для желудочно-кишечного тракта, почек и сердечно-сосудистой системы. Например, аспирин может вызывать желудочное кровотечение при использовании в течение нескольких суток, и в июле 2015 г., FDA повторно выдвинуло предшествующее предостережение относительно опасности для сердца общепринятых NSAID обезболивающих, исключая аспирин. Они включают ибупрофен (адвил, мотрин) и напроксен (алеве) и отпускаемые только по рецептам NSAID.

[0007] Соответственно, существует необходимость в дополнительных альтернативных видах противовоспалительной терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В настоящее время обнаружено, что конкретные комбинации липида мидии и крилевого масла могут преимущественным образом оказывать аддитивный или синергический ингибирующий эффект против продукции или высвобождения одного или нескольких провоспалительных медиаторов, вовлеченных в процесс воспаления. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению могут, таким образом, обеспечивать новые виды терапевтического лечения против нарушений, характеризующихся воспалением, или имеющих воспалительный компонент. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению могут обеспечивать новые виды терапевтического лечения против боли, такой как боль, ассоциированная с воспалением.

[0009] Таким образом, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей липид мидии и крилевого масла. Комбинацию липида мидии и крилевого масла можно адаптировать для отдельного или одновременного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой композицию, содержащую липид мидии и крилевого масла.

[0010] В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей, или в основном состоящей из липида мидии и крилевого масла. Комбинацию липида мидии и крилевого масла можно адаптировать для отдельного или одновременного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой композицию, состоящую или в основном состоящую из липида мидии и крилевого масла.

[0011] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей липид мидии и крилевое масло, для использования в терапии. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей липид мидии и крилевое масло, для использования в лечении воспаления у субъекта. Настоящее изобретение относится также к комбинации, содержащей липид мидии и крилевое масло, для использования в лечении боли у субъекта. Комбинацию липида мидии и крилевого масла можно адаптировать для отдельного или одновременного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой композицию, содержащую липид мидии и крилевое масло.

[0012] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения воспаления у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение указанному субъекту комбинации, содержащей липид мидии и крилевое масло. Настоящее изобретение относится также к способу лечения боли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение указанному субъекту комбинации, содержащей липид мидии и крилевое масло. Комбинацию липида мидии и крилевого масла можно адаптировать для отдельного или одновременного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой композицию, содержащую липид мидии и крилевое масло.

[0013] В другом аспекте настоящее изобретение относится к использованию липида мидии и крилевого масла в изготовлении комбинированного лекарственного средства для лечения воспаления. Настоящее изобретение относится также к использованию липида мидии и крилевого масла в изготовлении комбинированного лекарственного средства для лечения боли. Лекарственное средство можно адаптировать для отдельного или одновременного введения. В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой композицию, содержащую липид мидии и крилевое масло.

[0014] В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинированному средству для лечения воспаления, где указанная комбинация содержит липид мидии и крилевое масло. Настоящее изобретение относится также к комбинированному средству для лечения боли, где указанная комбинация содержит липид мидии и крилевое масло. Липид мидии и крилевое масло можно адаптировать для отдельного или одновременного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, комбинированное средство представляет собой композицию, содержащую липид мидии и крилевое масло.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, липид мидии находится в форме порошка из высушенных мидий. В других вариантах осуществления, липид мидии находится в форме экстракта липида, полученного из мидии («экстракт липида мидии»). В следующих вариантах осуществления, липид мидии может находиться в форме комбинации или композиции порошка из высушенных мидий и экстракта липида мидии.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание фосфолипидов в диапазоне приблизительно 40-99% масс./масс., и в следующих вариантах

осуществления, содержание фосфолипидов в диапазоне приблизительно 50-99% масс./масс., например, приблизительно 60-80% масс./масс.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению можно использовать в лечении одного или нескольких нарушений у субъекта, где нарушение имеет воспалительный компонент, и таким образом, ингибирование одной или нескольких провоспалительных молекул обеспечивает терапевтическое преимущество. В некоторых вариантах осуществления, комбинации могут являться пригодными для лечения одного или нескольких хронических нарушений.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, например, для использования в лечении хронического воспаления, комбинации могут прекращать, исключать или иным образом смягчать степень, тяжесть или длительность одного или нескольких неблагоприятных эффектов, ассоциированных с общедоступными NSAID.

[0019] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов приблизительно 50% или более, например, приблизительно 60% или более, включающему стадии:

(а) приведения подаваемого материала биомассы криля в контакт со смесью CO₂ и этанола, для экстракции крилевого масла; и

(b) приведения указанного крилевого масла в контакт с CO₂ для экстракции по меньшей мере части неполярных липидных компонентов, таким образом, чтобы масло имело содержание фосфолипидов по меньшей мере 50% масс./масс.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло, полученное этим способом, имеет содержание фосфолипидов приблизительно 60% масс./масс. или более, например, по меньшей мере приблизительно 65% масс./масс., или 70% масс./масс., или 75% масс./масс., или 80% масс./масс., или 85% масс./масс. или 90% масс./масс.

[0021] Настоящее изобретение относится также к способу обогащения содержания фосфолипидов крилевого масла.

[0022] Таким образом, в следующем аспекте, настоящее изобретение относится к способу увеличения содержания фосфолипидов крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов менее 50% масс./масс., до приблизительно 50% масс./масс. или более, включающего стадию приведения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов менее 50% масс./масс., в контакт с CO₂ для избирательного удаления неполярных липидных компонентов.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, предварительно полученное крилевое масло имеет содержание фосфолипидов менее приблизительно 50%, масс./масс., например, менее приблизительно 40% или менее приблизительно 30% масс./масс., или 20% масс./масс. В некоторых вариантах осуществления, полученное таким образом обогащенное масло имеет содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 55% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 65% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 70% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 75% масс./масс., или по меньшей мере

приблизительно 80% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 85% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 90% масс./масс.

[0024] Следующий вариант осуществления относится к крилевому маслу, имеющему содержание фосфолипидов приблизительно 50% масс./масс. или более, (например, $\geq 60\%$ масс./масс.), полученному способом по настоящему изобретению.

[0025] Следующие варианты осуществления относятся к крилевому маслу, имеющему содержание фосфолипидов приблизительно 50% или 60% масс./масс. или более, для использования в комбинациях и композициях, описанных в настоящем описании.

ФИГУРЫ

[0026] На **фигуре 1A** графически изображен эффект ингибирования NO в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, оливкового масла и N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидина (1400W).

[0027] На **фигуре 1B** графически изображено высвобождение NO (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, оливкового масла и N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидина (1400W).

[0028] На **фигуре 2A** графически изображен эффект ингибирования TNF α в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, оливкового масла и дексаметазона.

[0029] На **фигуре 2B** графически изображено высвобождение TNF α (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, и оливкового масла.

[0030] На **фигуре 3A** графически изображен эффект ингибирования IL-6 в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, оливкового масла и дексаметазона.

[0031] На **фигуре 3B** графически изображено высвобождение IL-6 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, и оливкового масла.

[0032] На **фигуре 4A** графически изображен эффект ингибирования PGE2 в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7

для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, оливкового масла и диклофенака.

[0033] На **фигуре 4В** графически изображено высвобождение PGE2 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла, каждого из экстракта липида мидии и крилевого масла отдельно, и оливкового масла.

[0034] На **фигуре 5А** графически изображено высвобождение NO (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY50).

[0035] На **фигуре 5В** графически изображено высвобождение NO (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY50-LY10).

[0036] На **фигуре 6А** графически изображено высвобождение NO (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY75-LY60).

[0037] На **фигуре 6В** графически изображено высвобождение NO (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY60-LY45).

[0038] На **фигуре 7** графически изображена изоболограмма синергического ингибирования NO посредством различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY10).

[0039] На **фигуре 8А** графически изображено высвобождение TNF α (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY60).

[0040] На **фигуре 8В** графически изображено высвобождение TNF α (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY60-LY30).

[0041] На **фигуре 8С** графически изображено высвобождение TNF α (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY40-LY10).

[0042] На **фигуре 9А** графически изображено высвобождение TNF α (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IF γ) клетках RAW264.7

для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY70-LY55).

[0043] На **фигуре 9B** графически изображено высвобождение $\text{TNF}\alpha$ (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ ($\text{IF}\gamma$) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY50-LY35).

[0044] На **фигуре 10** графически изображена изоболограмма синергического ингибирования $\text{TNF}\alpha$ посредством различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY10).

[0045] На **фигуре 11A** графически изображено высвобождение IL-6 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ ($\text{IF}\gamma$) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY50).

[0046] На **фигуре 11B** графически изображено высвобождение IL-6 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ ($\text{IF}\gamma$) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY50-LY10).

[0047] На **фигуре 12A** графически изображено высвобождение IL-6 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ ($\text{IF}\gamma$) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY70-LY50).

[0048] На **фигуре 12B** графически изображено высвобождение IL-6 (%) в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ ($\text{IF}\gamma$) клетках RAW264.7 для различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY50-LY30).

[0049] На **фигуре 13** графически изображена изоболограмма синергического ингибирования IL-6 посредством различных концентраций комбинаций экстракта липида мидии и крилевого масла (LY90-LY10).

ОПИСАНИЕ

[0050] На протяжении этого описания и следующей ниже формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», понимают как предусматривающий включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий.

[0051] На протяжении этого описания и следующей ниже формулы изобретения, если контекст не требует иного, фразу «в основном состоящий из» и варианты, такие как «в основном состоит из» понимают как указывающую на то, что перечисленный элемент(ы) является/являются основными, т.е., необходимыми элементами по изобретению. Фраза позволяет присутствие других не перечисленных элементов, которые не оказывают существенного влияния на характеристики изобретения, но исключает

дополнительные не указанные элементы, которые могут влиять на основные и новые характеристики определенного изобретения.

[0052] Формы единственного числа включают аспекты множественного числа, если контекст явно не требует иного.

[0053] Термин «изобретение» включает все раскрытия, аспекты, варианты осуществления и примеры, как описано в настоящем описании.

[0054] В рамках изобретения, «приблизительно» относится к количеству, значению или параметру, которые могут меняться на 10%, 5% или 2-1% от указанного количества, значения или параметра, и включает по меньшей мере допустимые отклонения, принятые в данной области. При использовании применительно к указанному полному числовому значению, «приблизительно» может включать отклонение на одно целое число в каждую сторону от указанного значения, например, «50%» может включать 49% и 51%. Когда предшествует перечисленному диапазону значений, оно предназначено для применения как к верхнему, так и нижнему пределам диапазона.

[0055] Если контекст не указывает на иное, признаки, описанные ниже, можно применять независимо к любому аспекту или варианту осуществления.

[0056] В рамках изобретения, «липид мидии» относится к липидному компоненту, экстрагированному или полученному из новозеландской зеленогубой (NZGL) (или зеленой) мидии (*Perna canaliculus*). Липид мидии может содержать одно или несколько из полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью (PUFA), таких как ALA, ETA, EPA и DHA, стеролов, сложных эфиров стеролов, триглицеридов, неполярных липидов, каротеноидов и других компонентов мяса мидии (NZGL). Липид мидии может находиться в форме порошка из высушенных мидий, или липидной фракции, экстрагированной из мяса мидии («экстракт липида мидии»). Предусматривают также, что «липид мидии» включает смесь порошка мидии и экстракта липида мидии, например, липид мидии можно дополнять посредством добавления порошка мидии или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, липид мидии представляет собой выделенную липидную фракцию.

[0057] Порошок липида мидии можно получать из свежего (сырого), замороженного или обработанного нагреванием мяса мидии NZGL посредством любых пригодных способов сушки (например, лиофилизации, сушки распылением или вакуумной сушки) и способов измельчения в порошок. В дополнение к жирным кислотам (включающим ALA, ETA, EPA и DHA), порошок мидии, полученный из высушенного мяса мидии, может также содержать другие, потенциально обеспечивающие преимущество компоненты, включая минералы, аминокислоты, пептиды, белки и гликозаминогликаны (например, хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат). Способы получения порошка мидии известны в данной области.

[0058] Экстракт липида мидии можно получать из свежего (сырого), замороженного, обработанного нагреванием или высушенного (например, высушенного посредством лиофилизации, сушки распылением или вакуумной сушки) мяса мидии NZGL (например, в порошкообразной, высушенной распылением или измельченной в

порошок форме) посредством любого подходящего способа, такого как экстракция растворителем (например, ацетоном или этанолом - см., например, WO2005073354 A1, содержание которого приведено в качестве ссылки), обработка ферментом (см., например, WO2006128244, содержание которого приведено в качестве ссылки) или сверхкритическая флюидная экстракция. В некоторых вариантах осуществления, экстракт липида мидии преимущественным образом получают посредством экстракции с использованием сверхкритического CO₂ из высушенного (например, лиофилизированного) мяса мидии (необязательно, стабилизированного для предотвращения окисления). Иллюстративный способ получения экстракта липида мидии описан в WO 97/09992 A1, содержание которого приведено в качестве ссылки. Другие способы известны в данной области.

[0059] В предпочтительных вариантах осуществления, способы осуществляют в таких условиях, чтобы обеспечивающие преимущество компоненты, такие как жирные кислоты, существенно не разрушались и в значительной степени сохранялись, например, с обработкой на холоде.

[0060] Один иллюстративный экстракт липида мидии, полученный в соответствии со способом, описанным в WO 97/09992 A1, известен также как PCSO-524[®] (Pharmalink International Limited, Hong Kong). PCSO-524[®] содержит добавленный витамин Е (0,15% масс./масс., добавленный в качестве противоокисляющего консерванта), и содержит комбинацию свободных жирных кислот, триглицеридов, сложных эфиров стеролов, неполярных липидов и каротеноидов (Sinclair, A. J. et al, 2000), и является источником омега-3-полиненасыщенных жирных кислот с длинной цепью, эйкозапентаеновой кислоты (ЕРА) и докозагексаеновой кислоты (DHA), так же как других жирных кислот с длинной цепью, таких как 5,9,12,15-октадекатетраеновая кислота, 5,9,12,16-нонадекатетраеновая кислота, 7,11,14,17-эйкотетраеновая кислота и 5,9,12,15,18-хенейкозапентаеновая кислота. PCSO-254[®] (составленный вместе с оливковым маслом в инкапсулированной пероральной лекарственной форме), продается на рынке под наименованием Lyprinol[®] и Omega XL[®], (для употребления человеком) и Antinol[®] (для собак и кошек).

[0061] В некоторых вариантах осуществления, экстракт липида мидии, использованный в комбинациях по настоящему изобретению, составляют с витамином Е, (добавленным, например, в количестве приблизительно 0,2% масс./масс. или 0,15% масс./масс., или 0,1% масс./масс., или 0,05% масс./масс., или приблизительно 0,03% масс./масс., или приблизительно 0,01% масс./масс.). В некоторых вариантах осуществления, липид мидии используют в форме PCSO-254[®], т.е., экстракта липида мидии, содержащего 0,15% масс./масс. витамина Е. В некоторых вариантах осуществления, липид мидии, необязательно, содержащий витамин Е, дополнительно составляют с маслом-носителем, таким как оливковое масло. В то время как, в некоторых вариантах осуществления, липид мидии представляет собой экстракт липида мидии и содержит добавленный витамин Е, добавление витамина Е является необязательным, и

таким образом, в некоторых вариантах осуществления, экстракт липида мидии используют без примесей, т.е., он не содержит никаких других дополнительных ингредиентов, таких как витамин Е.

[0062] Липид мидии, в различных формах, можно также закупать из коммерческих источников.

[0063] Крилевое масло можно получать из любого пригодного вида криля, включая *Euphausia superba* (антарктический криль), *Euphausia pacifica* (тихоокеанский криль), *Maganycitiphanes norvegica* (северный криль), *Euphausia crystallorophias* (ледяной криль), *Euphausia frigida*, *Euphausia longirostris*, *Euphausia triacantha* и *Euphausia vallentini*. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, крилевое масло получают из *Euphausia superba*.

[0064] Морские липиды содержат жирные кислоты, в частности, омега-3-жирные кислоты, такие как EPA и DHA, в свободной и триглицеридной форме. Подобным образом, крилевое масло также является богатым омега-3-жирными кислотами, однако, крилевое масло содержит значительные количества фосфолипидов, где жирные кислоты присоединены к группе фосфатной головки через группу глицерина. Эта связанная с фосфолипидом форма жирных кислот более эффективно поглощается клеточными мембранами, чем триглицеридная форма, и таким образом, является более легко биодоступной. Типичные фосфолипиды, обнаруженные в крилевом масле, могут включать: фосфатидилхолин, алкилацилфосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, лизофосфатидилхолин, лизоалкилацилфосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, алкилацилфосфатидилэтаноламин, кардиолипин+N-ацилфосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилэтаноламин, и лизоалкилацилфосфатидилэтаноламин. Крилевое масло также содержит заметные количества астаксантина, антиоксиданта, ответственного также за его красный цвет.

[0065] В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло содержит по меньшей мере приблизительно 1% масс./масс., 5% масс./масс., 10% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 20% масс./масс. фосфолипидов. В следующих вариантах осуществления, масло содержит по меньшей мере приблизительно 25% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 30% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 35% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 40% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 45% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 55% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 65% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 70% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 75% масс./масс., или по меньшей мере приблизительно 80% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 85% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 90% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 95% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 97% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 98% масс./масс.

фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 99%, масс./масс. фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание фосфолипидов в диапазоне приблизительно 40-99% масс./масс. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание фосфолипидов в диапазоне приблизительно 60-99% масс./масс., например, в диапазоне приблизительно 65-90% масс./масс. В рамках изобретения, «обогащенное» крилевое масло относится к крилевому маслу, имеющему содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. Содержание фосфолипидов можно определять любыми пригодными в данной области способами, например, анализом ^{31}P ЯМР.

[0066] Способы получения крилевого масла, включая крилевое масло, обогащенное фосфолипидами, известны в данной области. Как правило, свежую, замороженную и/или обработанную нагреванием биомассу криля (например, *Euphasia superba* или *Euphasia pacifica*) можно подвергать экстракции с использованием растворителей (например, спиртов, таких как этанол; кетонов, таких как ацетон; или диметоксиэтана) и/или сверхкритической жидкости (например, CO_2). Некоторые неограничивающие иллюстративные способы получения крилевого масла описаны в Патенте США No. 9028877, Патенте США No. 9375453, Патенте США No. 6800299, Патенте США No. 8828447, Патенте США No. 9150815, Патенте США No. 8383845, WO2007/123424, WO2011/050474, WO2015/104401 и WO2015/121378, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Дополнительные способы также описаны в настоящем описании. Крилевое масло можно также закупать от коммерческих поставщиков.

[0067] В некоторых преимущественных вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло имеет остаточное содержание растворителя для экстракции приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. В следующих вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4 или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее, и остаточное содержание растворителя для экстракции приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. Воду и растворитель можно удалять любыми пригодными способами, такими как очень короткое или осторожное нагревание (например, 30 мин или 1 час, или 2 часа, или 3 часа, при температуре приблизительно или менее приблизительно 60°C или 50°C, или 40°C, и предпочтительно, такое, чтобы целостность составляющих не была существенно нарушена), использование потока азота или лиофилизация (сублимация).

[0068] Ингибирующую активность комбинаций против одного или нескольких воспалительных медиаторов, таких как оксид азота (NO), цитокины, такие как интерлейкины, (например, IL-6), простагландины (например, PG-E₂) и TNF α , можно

использовать в лечении одного или нескольких нарушений или симптомов у субъекта, таким образом, ингибирование одной или нескольких из таких молекул обеспечивает терапевтическое преимущество. В частности, комбинации по настоящему изобретению можно использовать в лечении избыточного острого или хронического воспаления, и/или одного или нескольких из ассоциированных с ним симптомов, таких как боль, лихорадка, покраснение и отек. В некоторых вариантах осуществления, комбинации можно использовать в лечении воспаления при нарушениях, патология которых включает воспалительный компонент, и/или боли, ассоциированной с такими нарушениями. Некоторые неограничивающие примеры нарушений, включающих воспалительный аспект, включают атеросклероз, аллергию, астму, аутоиммунное заболевание (например, целиакию, псориаз, ревматоидный артрит, псориатический артрит), фибромиалгию, подагру, мигрень, остеоартрит, язвенный колит, злокачественную опухоль, ухудшение когнитивной деятельности, включая болезнь Альцгеймера, диабет типа 2, синдром отсроченной мышечной болезненности (DOMS), болезнь Крона и анкилозирующий спондилит. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению можно использовать в лечении боли в суставах или в улучшении подвижности суставов в связи с остеоартритом или ревматоидным артритом. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению можно использовать в лечении нарушения, при котором ингибирование PGE_2 может обеспечивать преимущество, такого как ревматоидный артрит, мигрень и боль (которая может представлять собой ноцицептивную (соматическую или висцеральную) боль, и/или нейропатическую боль).

[0069] Понятно, что комбинации, описанные в настоящем описании, можно адаптировать для отдельного или одновременного введения. При адаптации для одновременного введения, комбинацию можно предоставлять и/или вводить в форме однородной композиции или смеси, содержащей как экстракт липида мидии, так и крилевое масло, или в виде дискретных лекарственных форм каждого компонента комбинации. Когда каждое из экстракта липида мидии и крилевого масла предоставляют и/или вводят отдельно, их можно вводить одновременно, одно за другим или каждое в разное время.

[0070] В следующих вариантах осуществления, липид мидии и крилевое масло можно, необязательно, составлять, либо вместе, либо индивидуально, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или добавками. Некоторые примеры пригодных носителей представляют собой пищевые масла, такие как оливковое масло, касторовое масло, льняное масло, виноградное масло, рыбий жир (например, тунцовый жир), масло канолы, растительное масло, подсолнечное масло, масло чиа, соевое масло, кунжутное масло, водорослевое масло и их смеси. Одну или несколько необязательных добавок, таких как антиокислители, витамины (такие как жирорастворимые витамины (A, D, E и K) или водорастворимые витамины (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C), пищевые минеральные вещества, аминокислоты, маскирующие

запах и вкус средства, эмульгаторы, фармацевтически приемлемые спирты, (например, этанол, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль) или другие модификаторы вязкости, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты), суспендирующие средства, лактоза, декстроза, сахароза, маннит, сорбит, глюкоза, смазывающие средства, связующие средства, крахмалы, усилители абсорбции и консерванты, и т.д., также можно включать. Носитель или добавка может осуществлять одну или несколько функций. Липид мидии и/или крилевое масло можно, необязательно, далее дополнять или комбинировать с использованием одного или нескольких дополнительных очищенных или частично очищенных компонентов мидии и крилевого масла, таких как астаксантин и его сложные эфиры, жирные кислоты (например, ЕРА, DHA), в форме свободной кислоты, сложного эфира кислоты, триглицерида или фосфолипида, стеролы, сложные эфиры стеролов, аминокислоты, пептиды и белки, и гликозаминогликаны (например, хондроитинсульфаты). Другие противовоспалительные пищевые продукты, например, их цельномолотую форму или экстракты, например, куркуму (куркумин), имбирь, чеснок, гвоздику и т.д., также можно, необязательно, включать.

[0071] Составы комбинаций можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Такие способы включают стадию однородного смешивания экстракта липида мидии и/или крилевого масла с носителем, необязательно, вместе с одним или несколькими дополнительными ингредиентами. Понятно, что любой носитель или добавка должны являться фармацевтически приемлемыми.

[0072] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, липид мидии и крилевое масло составляют, либо отдельно, либо вместе, с маслом-носителем, таким как оливковое масло. В некоторых вариантах осуществления, масло-носитель составляет от приблизительно 10% масс./масс. до приблизительно 90% масс./масс., например, от приблизительно 20% масс./масс. до приблизительно 80% масс./масс. комбинации или композиции. В следующих вариантах осуществления, масло-носитель составляет приблизительно 25% масс./масс. или приблизительно 30% масс./масс., или приблизительно 35% масс./масс., или приблизительно 40% масс./масс., или приблизительно 45% масс./масс., или приблизительно 50% масс./масс., или приблизительно 55% масс./масс., или приблизительно 60% масс./масс., или приблизительно 65% масс./масс., или приблизительно 70% масс./масс., или приблизительно 75% масс./масс. комбинации или композиции. В некоторых вариантах осуществления, соотношение массы масла-носителя и объединенного количества липида мидии и крилевого масла составляет приблизительно 3:1 или приблизительно 2,5:1, или приблизительно 2:1, или приблизительно 1,5:1, или приблизительно 1:1, или приблизительно 1:1,5, или приблизительно 1:2, или приблизительно 1:2,5, или приблизительно 1:3.

[0073] В то время как любая форма введения предусмотрена по настоящему изобретению, например, пероральная, парентеральная, местная, чрескожная или подкожная, преимущественным образом, в некоторых вариантах осуществления,

комбинации по настоящему изобретению можно предоставлять и/или вводить в пероральной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления, комбинации можно представлять в нерасфасованной форме, например, в форме жидкостей, сиропов, паст, полутвердых восков, дисперсий, суспензий, эмульсий (например, вода-в-масле или масло-в-воде), тонко измельченных порошков или микроинкапсулированных порошков, из которых можно отмерять индивидуальные дозы. Отмеривание и/или введение можно осуществлять с помощью любых средств, таких как ложка или лопатка, шприц, пипетка или мерный стаканчик. Отмеренные дозы можно вводить непосредственно субъекту или смешивать с пищевыми продуктами или напитками, наливать в них или опрыскивать их.

[0074] В других вариантах осуществления, комбинации преимущественным образом представляют в единичных пероральных дозированных формах, т.е., в фиксированных дозированных формах. Некоторые примеры пригодных единичных пероральных дозированных форм включают индивидуально упакованные ампулы, пробирки, заполненные шприцы, саше, жевательные таблетки и капсулы (включая твердые и мягкие желатиновые капсулы).

[0075] Одним примером пригодной единичной пероральной дозированной формы является капсула, в форме твердой или мягкой оболочки. Оболочка может содержать одно или несколько из желатина, пуллулана, гипромеллозы, сополимера PVA, каррагинана или другого сахаридного компонента, такого как крахмал или целлюлоза, или их смеси, и могут дополнительно включать красители, замутняющие средства, пластификаторы (например, сорбит, ксилозу, мальтит и глицерин) и т.д.. Способы инкапсуляции морских масел и липидов, таких как липид мидии и крилевое масло, известны в данной области. См., например, WO2015/121378, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, когда крилевое масло инкапсулируют отдельно, крилевое масло можно инкапсулировать в отсутствие необязательных дополнительных средств, таких как модифицирующие вязкость средства, иными словами, наполнение капсулы в основном состоит из крилевого масла.

[0076] В некоторых преимущественных вариантах осуществления, комбинации липида мидии и крилевого масла по настоящему изобретению представлены в форме мягкой желатиновой капсулы, например, мягкой желатиновой капсулы, содержащей как липид мидии, так и крилевое масло, или индивидуальных мягких желатиновых капсул, где липид мидии и крилевое масло инкапсулированы по отдельности, необязательно, вместе с пригодными носителями и/или добавками. Пригодные мягкие желатиновые капсулы можно получать из желатина (или альтернативных источников сахара, таких как пуллулан и гипромеллоза), необязательно, с одним или несколькими пластификаторами, такими как сорбит и глицерин (глицерол), и добавками, такими как окрашивающие и замутняющие средства. В одном примере, оболочка мягкой желатиновой капсулы может содержать желатин, и один или оба из сорбита и глицерина.

[0077] Микроинкапсуляция представляет собой способ, посредством которого небольшие капельки или частицы окружают покрывающей стенкой или погружают в

матрикс для формирования порошка, где покрытие или матрикс формирует функциональный барьер, который исключает или уменьшает подверженность химическим реакциям, таким как окисление. Кроме того, они могут играть потенциальную роль маскировки вкуса или запаха. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, липид мидии и/или крилевое масло можно микроинкапсулировать, либо по отдельности, либо совместно, для формирования порошка. Общепринятые способы микроинкапсуляции включают эмульгацию, сушку распылением, сублимацию, коаксиальное электрораспыление, экструзию, коацервацию, сверхкритическую флюидную технологию и полимеризацию *in situ*. Материалы покрытия включают природные и синтетические полимеры, углеводы (например, крахмалы, глюкозу), белки (например, казеин, желатин) и их смеси. (См., например, Bakry, A. M., et al, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143, 2016, и процитированные в этом документе ссылки, WO2014/170464 и WO2014/169315, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки). Липид мидии и/или крилевое масло можно микроинкапсулировать с одним или несколькими носителями или добавками, как описано выше. Порошок микроинкапсулированного липида мидии и/или крилевого масла можно далее инкапсулировать, например, в единичной дозированной форме капсулы с твердой оболочкой. Порошкообразные микроинкапсулированные липид или масло можно, необязательно, комбинировать с одним или несколькими носителями или добавками.

[0078] В некоторых вариантах осуществления комбинации по настоящему изобретению можно принимать с пищевыми продуктами или напитками, например, посредством опрыскивания, перемешивания, смешивания или других способов нанесения или введения комбинации экстракта липида мидии и крилевого масла на или в пищевой продукт или напиток. Таким образом, комбинации можно предоставлять в формате для включения в или нанесения на напиток или пищевой продукт. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию можно также вносить в состав при получении пищевых продуктов и напитков для получения функциональных пищевых продуктов.

[0079] В некоторых вариантах осуществления, липид мидии и крилевое масло составляют, либо отдельно, либо совместно, с маслом-носителем, таким как оливковое масло, необязательно, с антиоксидантом (например, витамином Е).

[0080] Субъекты, подлежащие лечению посредством комбинаций по настоящему изобретению, включают субъектов-млекопитающих, таких как люди, приматы, кошачьи, собачьи, бычьи, лошадиные, свиньи, большие летучие мыши, овечьи и козы, и включают сельскохозяйственных животных (например, коров, лошадей, овец, свиней и коз), домашних животных (например, собак, кошек, кроликов, морских свинок) и содержащихся в неволе диких животных. Лабораторные животные, такие как кролики, мыши, крысы, морские свинки и хомяки, также предусмотрены, поскольку они могут обеспечивать удобную систему тестирования.

[0081] Любая из лекарственных форм, описанных выше, может являться применимой для человека или для ветеринарного использования, при необходимости.

[0082] Эффективное для лечения количество предназначено для включения количества комбинации, которое, при введении в соответствии с желательным режимом дозирования, является совместно эффективным для по меньшей мере частичного достижения желательного терапевтического эффекта, включая одно или несколько из: облегчения, прекращения или уменьшения длительности, тяжести и/или частоты воспаления, и/или одного или нескольких симптомов воспаления (например, жара, боли, отека, покраснения), предотвращения или задержки начала, ингибирования прогрессирования, или остановки или обращения (частичного или полного) начала или прогрессирования конкретного нарушения или состояния, подвергаемого лечению.

[0083] Пригодные уровни дозы и режимы дозирования может определять лечащий терапевт или ветеринар, и они могут зависеть от конкретного состояния/симптомов, подвергаемых лечению, тяжести состояния, так же как общих параметров возраста, состояния здоровья и массы субъекта. Пригодные ежесуточные уровни дозы липида мидии и/или крилевого масла могут независимо лежать в диапазоне от приблизительно 10 мг до приблизительно 10 г, например, приблизительно 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г или приблизительно 9,5 г. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, ежесуточные дозы комбинации могут лежать в диапазоне от приблизительно 20 мг до приблизительно 15 г, например, приблизительно 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г, 9,5 г, 10,0 г, 10,5 г, 11,0 г, 11,5 г, 12,0 г, 12,5 г, 13,0 г, 13,5 г, 14,0 г или 14,5 г.

[0084] В некоторых вариантах осуществления, индивидуальные единичные дозы (например, мягкая желатиновая капсула) могут содержать приблизительно 10 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 275 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 310 мг, 320 мг, 325 мг, 330 мг, 340 мг, 350 мг, 360 мг, 365 мг, 370 мг, 375 мг, 380 мг, 390 мг, 400 мг, 410 мг, 420 мг, 425 мг, 430 мг, 440 мг, 450 мг, 460 мг, 465 мг, 470 мг, 475 мг, 480 мг, 490 мг или приблизительно 500 мг комбинации, необязательно, составленные вместе с маслом-носителем (например, оливковым маслом). В некоторых дополнительных вариантах ее осуществления, комбинация дополнительно содержит витамин Е. В некоторых дополнительных вариантах их осуществления, комбинации содержат липид мидии (например, такой как PCSO-524) в количестве в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 90% масс./масс. от общего суммарного количества липида мидии и

крилевого масла, и содержат крилевое масло в количестве в диапазоне от приблизительно 90% до приблизительно 10% масс./масс. от общего количества липида мидии и крилевого масла, то есть, соотношение массы липида мидии и крилевого масла от приблизительно 10:90 до 90:10, например, липид мидии и крилевое масло в соотношении массы приблизительно 15:85 или приблизительно 20:80, или приблизительно 25:75, или приблизительно 30:70, или приблизительно 35:65, или приблизительно 40:60, или приблизительно 45:55, или приблизительно 50:50, или приблизительно 55:45, или приблизительно 60:40, или приблизительно 65:35, или приблизительно 70:30, или приблизительно 75:25, или приблизительно 80:20, или приблизительно 85:15.

[0085] Дозы можно удобным образом вводить один раз в сутки, или ежедневные дозы можно дробить и вводить множество раз (например, два, три или четыре раза) ежедневно. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению можно вводить один, два, три или более раз еженедельно, например, на чередующиеся сутки. В некоторых вариантах осуществления, лечение может являться непрерывным или долгосрочным, например, в течение периода по меньшей мере 6-12 месяцев или по меньшей мере 2-3 лет, или текущим.

[0086] Комбинации по настоящему изобретению, например, в любом из ежедневных уровнях дозирования, могут содержать липид мидии в количестве в диапазоне от приблизительно 1% до приблизительно 99% масс./масс. от общего суммарного количества липида мидии и крилевого масла, и содержат крилевое масло в количестве в диапазоне от приблизительно 99% до приблизительно 1% от общего количества липида мидии и крилевого масла, то есть, соотношение массы липида мидии и крилевого масла от приблизительно 1:99 до 99:1. В некоторых вариантах осуществления, комбинации содержат липид мидии в количестве в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 95% масс./масс. от общего суммарного количества липида мидии и крилевого масла, и содержат крилевое масло в количестве в диапазоне от приблизительно 95% до приблизительно 5% от общего количества липида мидии и крилевого масла, то есть, соотношение массы липида мидии и крилевого масла от приблизительно 5:95 до 95:5. В некоторых вариантах осуществления, комбинации содержат липид мидии в количестве в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 90% масс./масс. от общего суммарного количества липида мидии и крилевого масла, и содержат крилевое масло в количестве в диапазоне от приблизительно 90% до приблизительно 10% масс./масс. от общего количества липида мидии и крилевого масла, то есть, соотношение массы липида мидии и крилевого масла от приблизительно 10:90 до 90:10. В следующих вариантах осуществления, комбинации содержат липид мидии и крилевое масло в соотношении массы приблизительно 15:85 или приблизительно 20:80, или приблизительно 25:75, или приблизительно 30:70, или приблизительно 35:65, или приблизительно 40:60, или приблизительно 45:55, или приблизительно 50:50, или приблизительно 55:45, или приблизительно 60:40, или приблизительно 65:35, или

приблизительно 70:30, или приблизительно 75:25, или приблизительно 80:20, или приблизительно 85:15.

[0087] В то время как комбинации по настоящему изобретению можно вводить в качестве единственной противовоспалительной терапии против любого одного или нескольких нарушений, их можно также вводить в сочетании с режимом введения одного или нескольких NSAID, таких как целекоксиб, диклофенак, дифлунизал, этодолак, фенопрофен, флубипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, телоролак, мефенамик, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксапрозин, пироксикам, сулиндак и толметин. В некоторых вариантах осуществления, комбинации по настоящему изобретению могут прекращать или уменьшать потенциальные неблагоприятные эффекты, ассоциированные с NSAID, например, посредством устранения или в основном устранения необходимости дополнительной терапии NSAID, или посредством уменьшения уровней доз и/или частоты дозирования NSAID, необходимых для достижения преимущественного терапевтического эффекта

[0088] Как обсуждали выше, в одном или нескольких вариантах осуществления, крилевое масло, используемое в комбинациях, описанных в настоящем описании, может преимущественным образом иметь содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс., или выше, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс., или выше. Во многих способах предшествующего уровня техники, для экстракции крилевого масла с высоким содержанием фосфолипидов (например, более приблизительно 50% или 60% масс./масс.) из мяса криля используют комбинацию CO₂ и CO₂/этанола. Однако, хорошо известно, что чем выше содержание фосфолипидов крилевого масла, тем более вязким является крилевое масло, где крилевые масла, имеющие содержание приблизительно 60% или более, как правило, присутствуют в форме вязкой пасты при температуре окружающей среды. Это представляет сложности для изготовления, в частности, в промышленном или коммерческом масштабе получения масла, поскольку более высокие температуры являются необходимыми для выпаривания растворителей, используемых в способе экстракции, из вязкого материала, с более вероятным возникновением связанного с нагреванием разрушением масла. Кроме того, затем необходимы более высокие уровни давления для переноса масла из баков для экстракции в баки для упаковки.

[0089] Один иллюстративный способ предшествующего уровня техники описан в WO2007123424. В этом документе описан двухстадийный способ, посредством которого подаваемый материал сначала подвергают экстракции с использованием чистого CO₂ для удаления посредством экстракции только нейтральных липидов (т.е., неполярных триглицеридов), оставляя материал, который является, благодаря удалению неполярных триглицеридов, обогащенным фосфолипидами. Затем этот обогащенный фосфолипидами материал подвергают экстракции с использованием CO₂+≥ 10% соразтворителя этанола для совместной экстракции полярных фосфолипидов и оставшихся неполярных триглицеридов из подаваемой биомассы криля. В этом способе неэффективно используют

мощность предприятия в коммерческом масштабе, поскольку в ходе обеих стадий способа большая часть объема в экстракторах высокого давления заполнена не поддающимися экстракции компонентами белков, углеводов и золы в подаваемой биомассе. Он также представляет собой принципиально менее эффективный периодический режим (по сравнению с более эффективным непрерывным режимом), который может неблагоприятным образом влиять на стоимость процесса. Эффективным является то, что обогащение для достижения конечного содержания полярных фосфолипидов в конечном масле достигают на первой стадии, непосредственно в нерасфасованном неомогенном твердом сыром материале в промышленном масштабе. Точное предварительное знание содержания полярных и неполярных липидов в подаваемом твердом веществе, и того, насколько хорошо каждый из них можно впоследствии экстрагировать, необходимо для точного обогащения конечного масла. На практике, неопределенность в коммерческом масштабе может переходить в дорогостоящее избыточное обогащение, которое затем требует смешивания для возвращения к спецификациям, по необходимости. И снова, это оказывает неблагоприятное влияние на экономику процесса.

[0090] В US 9735453, US 9078905, US 9028877, US 9320765 и US 9072752 описана экстракция криля с использованием CO₂ или CO₂ плюс приблизительно 5% этанола для экстракции нейтральных липидов (неполярных триглицеридов), с последующим CO₂/~20% этанолом для экстракции из нерасфасованного неомогенного твердого материала крилевого масла с высокими количествами фосфолипидов, сложных эфиров астаксантина и/или омега-3-жирных кислот. Эти способы разделяют недостатки, описанные выше.

[0091] В настоящем описании в настоящее время описан способ, который, в некоторых вариантах осуществления, может уменьшать, минимизировать или устранять один или несколько из недостатков, обсуждаемых выше, при получении крилевого масла с высоким или обогащенным содержанием фосфолипидов, в соответствии со способами предшествующего уровня техники, в частности, в промышленном или коммерческом масштабе (например, при изготовлении партий масла порядка по меньшей мере приблизительно 50, 100, 200, 300 или 500 кг и более). Таким образом, настоящее изобретение относится также к способу получения крилевого масла с содержанием фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс. или выше, предпочтительно, на уровне по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. или выше, и к способу обогащения масла с более низким содержанием фосфолипидов (менее приблизительно 50% масс./масс.) до уровня по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс. или выше, предпочтительно, до уровня по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. или выше.

[0092] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к 2-стадийному способу получения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс., где первая стадия включает экстракцию первого крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов менее приблизительно 50% масс./масс., из биомассы криля и затем удаление по меньшей мере

части неполярных липидных компонентов (например, триглицеридов) из первого крилевого масла для получения второго крилевого масла, которое является обогащенным фосфолипидами (т.е., имеет более высокое содержание фосфолипидов), по сравнению с первым крилевым маслом.

[0093] в отличие от способов предшествующего уровня техники, обсуждаемых выше, некоторые варианты осуществления этого способа начинают с неизбирательной экстракции масла из подаваемого материала биомассы криля. Экстракцию как полярных (например, фосфолипидов), так и неполярных (например, триглицеридов) липидов из подаваемого твердого мяса можно осуществлять с использованием смеси CO_2 и этанола (например, азеотропного этанола - смеси вода-этанол, содержащей приблизительно 95% этанола).

[0094] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, можно использовать соотношение массы по меньшей мере приблизительно 15% масс./масс. или приблизительно 20% масс./масс. этанола в CO_2 , например, в диапазоне приблизительно 17-22% масс./масс. В следующих вариантах осуществления, можно использовать соотношение массы по меньшей мере приблизительно 25% масс./масс. этанола в CO_2 , например, используют по меньшей мере приблизительно 26% масс./масс. этанола или по меньшей мере приблизительно 27% масс./масс. этанола, или по меньшей мере приблизительно 28% масс./масс. этанола, или по меньшей мере приблизительно 29% масс./масс. этанола, или по меньшей мере приблизительно 30% масс./масс. этанола в CO_2 .

[0095] В некоторых вариантах осуществления, включая любой из других вариантов осуществления, описанных в этом разделе, температуры экстракции равны или ниже приблизительно 60°C , например, равны или ниже приблизительно 55°C , или равны или ниже приблизительно 50°C , или равны или ниже приблизительно 45°C , или равны или ниже 40°C , или равны или ниже 35°C , или равны или ниже 30°C , для уменьшения или минимизации преимущественным образом риска деградации продукта. Давление экстракции можно устанавливать для обеспечения сверхкритических, субкритических и/или близких к критическим условий для выбранных температуры и соотношения CO_2 и этанола. В некоторых вариантах осуществления, давление лежит в диапазоне приблизительно 200-350 бар (20-35 МПа), например, приблизительно 250-300 бар (25-30 МПа), хотя более высокое давление например, 400 бар (40 МПа) и более, является технически эффективным и также может быть использовано. В некоторых вариантах осуществления, значение или диапазон давления приводит к адекватной плотности растворителя для обеспечения того, что экстракция неполярных липидов не становится ограничивающей скоростью процесса. В некоторых вариантах осуществления, условия давления экстракции можно корректировать на протяжении процесса экстракции для перемещения между сверхкритическими, субкритическими или близкими к критическим условиями. В некоторых вариантах осуществления, используют субкритические и/или близкие к критическим условия, условия которых могут меняться в зависимости от соотношения двойной смеси CO_2 и этанола (или соотношения тройной смеси, в случае

азеотропного этанола, который также содержит воду). Периоды времени экстракции может определять специалист в данной области, и они могут зависеть, среди прочего, от условий экстракции и желательной экономической оптимизации. В некоторых вариантах осуществления, периоды времени экстракции, как правило, лежат в диапазоне приблизительно 1-15 часов, например, приблизительно 2-10 часов, например, приблизительно 2-5 часов или приблизительно 3-6 часов, или приблизительно 4-5 часов. Это, в свою очередь, может зависеть, среди прочего, от количества и размера частиц подаваемого материала биомассы. Более крупные частицы могут позволять использование более высоких скоростей потока растворителя, в то же время сохраняя статичную биомассу и равномерный контакт с растворителем. Однако, более крупные частицы, также представляют повышенные требования к диффузии растворителя для достижения центра частиц, когда необходимо большее количество растворителя. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, размер частиц подаваемого материала составляет приблизительно 1-5 мм, например, приблизительно 2-3 мм.

[0096] В некоторых дополнительных вариантах осуществления, давление экстракции составляет приблизительно 300 бар (30 МПа), и температура экстракции составляет приблизительно 60°C.

[0097] Разделение масла можно осуществлять при более низких температуре (например, приблизительно 25-35°C) и давлении (например, приблизительно 25-60 бар (2,5-6,0 МПа))

[0098] Полученное экстрагированное масло содержит как полярные (например, фосфолипиды), так и неполярные (например, триглицериды) липиды, и может иметь содержание фосфолипидов менее приблизительно 50%, масс./масс. или менее приблизительно 45% масс./масс., или менее приблизительно 40% масс./масс., или менее приблизительно 35% масс./масс., или менее приблизительно 30% масс./масс., или менее приблизительно 25% масс./масс., или менее приблизительно 20% масс./масс., или менее приблизительно 10% масс./масс.

[0099] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, воду и этанол, присутствующие в масле, можно затем удалять с использованием любого пригодного способа, такого как выпаривание в вакууме (необязательно, с осторожным нагреванием, например, при приблизительно 65°C или менее), использование потока азота или лиофилизация. В некоторых вариантах осуществления, масло подвергают выпариванию в вакууме, optionally с осторожным нагреванием. За этим может следовать короткое время удержания (например, 1-3 секунд) при более высокой температуре, (например, приблизительно 70°C, приблизительно 75°C или приблизительно 80°C) для удаления воды и сорастворителя этанола из смеси полярных и неполярных липидов с низкой вязкостью, где высокая доля неполярных липидов обеспечивает низкую вязкость. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, температура преимущественно не превышает приблизительно 60°C на протяжении осторожного нагревания в вакууме, чтобы исключать или минимизировать деградацию компонентов экстрагированного

масла. В следующих вариантах осуществления, температура на протяжении осторожного нагревания в вакууме преимущественно не превышает приблизительно 55°C или приблизительно 50°C, или приблизительно 45°C, или приблизительно 40°C, или приблизительно 35°C, или приблизительно 30°C, или приблизительно 25°C.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, остаточное содержание летучих веществ (воды и этанола) после выпаривания составляет приблизительно или менее приблизительно 3% масс./масс., поскольку это может минимизировать возможность неблагоприятного влияния остаточного этанола и воды на разделение липидов на более поздней стадии обогащения. В следующих вариантах осуществления, остаточное содержание летучих веществ составляет приблизительно или менее приблизительно 2,5% масс./масс., или приблизительно или менее приблизительно 2,0% масс./масс., или приблизительно или менее приблизительно 1,5% масс./масс., или приблизительно или менее приблизительно 1,0% масс./масс., или менее приблизительно 0,5% масс./масс., или менее приблизительно 0,3% масс./масс., или менее приблизительно 0,1% масс./масс.

[0101] На этой стадии, после выпаривания, из-за присутствия неполярных липидных компонентов, масло все еще является жидким и может быть легко проанализировано, например, по содержанию фосфолипидов и/или омега-3-жирных кислот. Это является важным, поскольку точный анализ необходим для расчета желательной степени обогащения, и таким образом, содержания фосфолипидов в конечном масле, получаемого на следующей стадии. В частности, когда желательно высокое конечное содержание фосфолипидов, сверхобогащение (т.е. дополнительное удаление неполярных липидов), даже в небольшой степени, может приводить к проблемам с переработкой из-за избыточной вязкости. Масло после выпаривания можно тщательно перемешивать для обеспечения гомогенности, необязательно, после переноса в промежуточные баки для продуктов. Необязательно, масло можно осторожно нагревать (например, при температуре менее или приблизительно 60°C, 55°C или приблизительно 50°C, или приблизительно 45°C, или приблизительно 40°C, или приблизительно 35°C, или приблизительно 30°C, или приблизительно 25°C), чтобы способствовать поддержанию жидкого и гомогенного материала для анализа. Менее вязкий характер необогащенного масла, полученного на первой стадии экстракции CO₂/EtOH, по сравнению с нерасфасованной твердой биомассой с первой стадии, используемой в способах предшествующей области техники, обсуждаемых выше, может, в некоторых вариантах осуществления, преимущественным образом обеспечивать более точный анализ состава, поскольку объемную однородность можно достигать более просто. В некоторых вариантах осуществления это может преимущественным образом исключать, минимизировать или иным образом уменьшать сверхобогащение фосфолипидов при последующей избирательной экстракции неполярных липидов, которое может в ином случае приводить к нежелательно вязкому или неподвижному твердому продукту.

[0102] Вторая стадия способа включает предпочтительную или избирательную экстракцию неполярных (триглицеридов) липидов из масла, полученного на первой

стадии. Если небогащенное масло, полученное на первой стадии экстракции, переносят в промежуточные баки, его возвращают в установку для экстракции. Масло далее подвергают экстракции с использованием CO_2 , в некоторых предпочтительных вариантах осуществления, в сверхкритических условиях, например, при или более приблизительно 300 бар (30 МПа) и при приблизительно 60°C, для избирательной экстракции неполярных (триглицеридов) липидов. В некоторых вариантах осуществления, экстракцию можно начинать с более низкого давления и затем постепенно увеличивать до желательного уровня (например, приблизительно 300 бар (30 МПа)). Неполярные (триглицериды) липиды можно экстрагировать в увеличивающейся степени, таким образом, обогащая оставшийся рафинат, до достижения требуемого целевого состава, например, содержания фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс. или по меньшей мере приблизительно 55% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс., фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 65% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 70% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 75% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 80% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 85% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 90% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 95% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 97% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 98% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 99% масс./масс. фосфолипидов.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, после экстракции необходимого количества неполярного липида для достижения желательного уровня обогащения фосфолипида, частичное снижение давления в сосуде для экстракции позволяет оставшемуся давлению способствовать выгрузке в настоящее время обогащенного (и более вязкого) рафината, по необходимости. Можно получать более высокую степень устойчивости к дренированию обогащенного масла с высокой вязкостью посредством дренирования из экстрактора, все еще частично находящегося под давлением. Этим способом, необычайно вязкие материалы можно переносить для последующего смешивания и включения в состав.

[0104] В одном или нескольких вариантах осуществления, способ может позволять полунепрерывную переработку, где индивидуальные сосуды для экстракции заменяют при непрерывном обороте, но по одному за один раз, в то время как другие сосуды для экстракции продолжают функционировать. По этому способу, остановку для замены множества партий в экстракторе можно исключать.

[0105] В других вариантах осуществления, вторую стадию, описанную в настоящем описании, можно использовать для обогащения содержания фосфолипидов в любом крилевом масле, имеющем содержание фосфолипидов менее приблизительно 50%, масс./масс., для получения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс.

[0106] В некоторых вариантах осуществления, начальное крилевое масло имеет содержание фосфолипидов приблизительно 45% масс./масс. или менее, или приблизительно 40% масс./масс. или менее, или приблизительно 35% масс./масс. или менее, или приблизительно 30% масс./масс. или менее, или приблизительно 25% масс./масс. или менее, или приблизительно 20% масс./масс. или менее, или приблизительно 10% масс./масс., или менее. В некоторых вариантах осуществления, конечное обогащенное масло может иметь содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 55% масс./масс. фосфолипидов или по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 65% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 70% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 75% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 80% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 85% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 90% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 95% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 97% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 98% масс./масс. фосфолипидов, или по меньшей мере приблизительно 99% масс./масс. фосфолипидов.

[0107] В некоторых вариантах осуществления, обогащенное крилевое масло имеет конечное содержание воды приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. В некоторых вариантах осуществления, крилевое масло имеет остаточное содержание растворителя для экстракции приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. В следующих вариантах осуществления, крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее, и остаточное содержание растворителя для экстракции приблизительно 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1, или 0,5% масс./масс., или менее. В следующих вариантах осуществления, обогащенный криль имеет остаточное содержание растворителя (воды и этанола) 5% масс./масс. или менее, или приблизительно 4, или 3, или 2, или 1,5, или 1, или 0,5, или 0,3, или 0,1% масс./масс., или менее.

[0108] В других вариантах осуществления, конечное обогащенное крилевое масло имеет содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс. фосфолипидов, и остаточное содержание растворителя приблизительно 3% масс./масс. или менее.

[0109] Другие варианты осуществления, относящиеся к крилевому маслу, как описано в настоящем описании, можно также, при необходимости, применять к крилевому маслу, полученному способом по настоящему изобретению.

[0110] Следующие примеры представлены с целью иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения общих принципов, описанных выше в настоящем описании.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Получение крилевого масла с 62% масс./масс. фосфолипида

1. Экстракция крилевого масла из мяса криля

[0111] Мясо криля подвергали экстракции с использованием CO₂/этанола (соотношение подачи этанола и мяса криля приблизительно 3,0-3,5:1 масс./масс.), с массой фракции этанола в диапазоне приблизительно 17-22% масс./масс., при температуре 60°C и давлении 300 бар (30 МПа). Стадия экстракции с использованием этанола/CO₂ имела длительность между 10 и 15 часами. Экстрагированную смесь масла/CO₂/EtOH отделяли при давлении 45 бар (4,5 МПа) и 25°C.

[0112] Несколько партий масла, полученных этим способом, смешивали для получения крилевого масла, содержащего как полярные, так и неполярные компоненты, и имеющего содержание фосфолипидов приблизительно 42% (см. таблицу 1-1 ниже).

Таблица 1-1: Анализ ³¹P ЯМР PL в образце крилевого масла

Фосфолипид (PL)		% масс. от общего содержания PL	г/100 г образца
Фосфатидилхолин	PC	76,0	32,3
Алкилацилфосфатидилхолин	AAPC	9,6	4,1
Фосфатидилинозитол	PI	0,6	0,3
Фосфатидилсерин	PS	0,3	0,1
Лизофосфатидилхолин	LPC	7,4	3,1
Лизоалкилацилфосфатидилхолин	LAAPC	0,5	0,2
Фосфатидилэтаноламин	PE	1,3	0,5
Алкилацилфосфатидилэтаноламин	AAPE	0,9	0,4
Кардиолипин+N-ацилфосфатидилэтаноламин	CL/NAPE	2,6	1,1
Лизофосфатидилэтаноламин	LPE	0,9	0,4
Лизоалкилацилфосфатидилэтаноламин	LAAPE	<0,1	<0,1
Общее содержание PL			42,5

2. Избирательная экстракция триглицеридов из крилевого масла, полученного со стадии 1.

[0113] 5,9 кг подаваемого крилевого масла (имеющего состав, как указано в таблице 1-1 выше) загружали непосредственно в один 10,7 л сосуд для экстракции (диаметр 155 мм). Подаваемый материал подвергали экстракции с использованием CO₂ при температуре 60°C и давлении 300 бар (30 МПа).

[0114] Экстракты, содержащие по большей части триглицериды, выделяли, и они являлись значительно менее вязкими, чем подаваемое крилевое масло, загруженное в сосуд для экстракции.

[0115] Процесс снижения давления в сосуде для экстракции начинали, когда общая масса экстрагированного материала достигала 97% от теоретического количества материала, которое можно экстрагировать. Установку подвергали снижению давления с постоянной скоростью линейного изменения в течение периода 15 минут, от 300 до 100 бар (от 30 до 10 МПа) с продолжающейся циркуляцией CO₂, хотя и при 50% от скорости потока при экстракции. На протяжении этого времени, измеренная температура на выходе из экстрактора уменьшалась от рабочей температуры 60°C до 50°C. Затем экстрактор далее подвергали снижению давления от 100 до 75 бар (от 10 до 7,5 МПа), в течение периода следующих 15 минут без работы насоса. После этого, сосуд для разделения освобождали от его содержимого.

[0116] В то время как сосуд для экстракции все еще находился при рабочей температуре и давлении 75 бар (7,5 МПа), сосуд освобождали от его содержимого обогащенного крилевого масла из основания сосуда для экстракции, сильно ниже уровня поверхности рафината, таким образом, исключая потерю CO₂ высокого давления с дренируемым рафинированным маслом. Выделение обогащенного масла занимало приблизительно час, и в это время давление в сосуде уменьшалось от 75 до 54 бар (от 7,5 до 5,4 МПа), по мере того, как оставшийся CO₂ в сосуде для экстракции расширялся, занимая пространство, ранее занятое рафинированным маслом.

[0117] По окончании выгрузки обогащенного масла, наблюдали, что некоторое количество обогащенного крилевого масла оставалось в сосуде для экстракции на распределительной и нижней поверхности сосуда, как оценено, составлявшее менее 2% от общей массы обогащенного масла. В коммерческом масштабе, любое такое оставшееся масло выделяют в следующей партии крилевого масла в этом экстракторе.

[0118] Перед анализом астаксантина и фосфолипида, обогащенное масло нагревали в печи в течение 55°C в течение 1 часа. Это позволяло образцу являться достаточно жидким для перемешивания для получения гомогенного образца для анализа.

[0119] В таблице 1-2 обобщена масса и содержание фосфолипида (PL) и астаксантина (Аста) для подаваемого, экстрагированного и обогащенного масла. Очень небольшое количество фосфолипида (<1 г/100 г экстракта) и астаксантина (<2 мг/100 г экстракта) подвергались совместной экстракции. Всего, масса экстракта, полученная после процесса обогащения, составляла 98% от теоретического экстракта, необходимого для обогащения до 62% фосфолипида.

Таблица 1-2: Обобщение содержания фосфолипида (PL) и астаксантина (Аста)

	Масса (г)	Масса (% от подачи)	%PL (г/100 г)	PL, масса (г)	PL (%) от подачи)	Аста (мг/100 г)	Аста, масса (мг)	Аста (%) от подачи)
Подача	5870,0	100	42,5	2494,8	100	21	1232,7	100
Экстракт	1939,0	33	1,0	19,4	0,8	1,7	32,3	2,6
Обогащенное	3835,6	65,3	62,0	2378,1	95,3	24	902,5	74,7

Всего из	5774,6	98,4		2397,5	96,1		952,9	77,3
-----------------	--------	------	--	--------	------	--	-------	------

В таблицах 1-3 и 1-4 обобщен композиционный состав обогащенного масла

Таблица 1-3: Анализ ^{31}P ЯМР PL в образце крилевого масла

Фосфолипид (PL)		% масс. от общего содержания PL	г/100 г образца
Фосфатидилхолин	PC	72,9	45,2
Алкилацилфосфатидилхолин	AAPC	10,0	6,2
Фосфатидилинозитол	PI	1,3	0,8
Фосфатидилсерин	PS	0,7	0,4
Лизофосфатидилхолин	LPC	7,6	4,7
Лизоалкилацилфосфатидилхолин	LAAPC	0,6	0,4
Фосфатидилэтаноламин	PE	1,1	0,7
Алкил ацил фосфатидилэтаноламин	AAPE	1,3	0,8
Кардиолипин+N-ацилфосфатидилэтаноламин	CL/NAPE	3,8	2,4
Лизофосфатидилэтаноламин	LPE	0,5	0,3
Лизоалкилацилфосфатидилэтаноламин	LAAPE	0,2	0,1
Общее содержание PL			62,0

Таблица 1-4: Анализ GC жирных кислот

<u>Жирная кислота</u>	<u>г/100 г образца (выражено как FFA)</u>
14:0	4,3
15:0	0,3
16:0	14,9
16:1 n-9	0,3
16:1 n-7	2,4
16:1 n-5	0,4
i17:0	0,2
16:2	0,7
17:1	0,2
i18:0	0,3
16:4 n-1	0,3
18:0	0,8
18:1 n-9	6,2
18:1 n-7	4,4

18:1 n-5	0,2
18:2 n-6	1,3
18:3 n-3	0,9
18:4 n-3	2,2
20:1 n-9	0,5
20:1 n-7	0,2
20:4 n-6	0,3
20:4 n-3	0,3
20:5 n-3 (EPA)	13,6
22:1 n-11	0,6
21:5 n-3	0,4
22:5 n-3	0,4
22:6 n-3 DHA	8,2
Прочие	1,1
Общее содержание n-3	26,0
Общее содержание жирных кислот	66,5

Пример 2 -

[0120] Экстракт липида мидии получали в соответствии с WO97/09992 и использовали в форме PCSO-524[®] (Pharmalink International Limited, Hong Kong). Способом из примера 1 получали крилевое масло, имеющее композиционный состав, как указано в таблицах 1-3 и 1-4 выше.

Получение образцов

[0121] Свежие образцы получали ежедневно. Образцы перемешивали переворачиванием перед отбором образцов. Образцы взвешивали в 1,5 мл пробирки для центрифугирования и доводили до 100 мг/мл этанолом для получения раствора для хранения. Смеси для хранения получали посредством взвешивания масел в правильном соотношении и затем доведения концентрации с использованием этанола. Получали серийные разведения раствора для хранения в этаноле. Затем серийные разведения разводили (1 к 100) в культуральной среде до добавления к клеткам (в трех повторах) в конечных разведениях 1 к 10. Это приводило к концентрации этановой кислоты 0,1% для всех доз и видов контроля. Крилевое масло содержало приблизительно 62% масс./масс. фосфолипидов. Экстракт липида мидии использовали в форме PCSO-524[®].

[0122] Сокращенные обозначения, использованные при представлении результатов, приведены в таблице 2-1 ниже:

Таблица 2-1: Сокращенные обозначения

Сокращенное обозначение	Описание
-------------------------	----------

LY	PCSO-524 [®]
Криль	Обогащенное крилевое масло (62%PL)
90%	Смесь, содержащая 90% масс./масс. LY и 10% масс./масс. криля.
75%	Смесь, содержащая 75% LY масс./масс. и 25% масс./масс. криля
50%	Смесь, содержащая 50% LY масс./масс. и 50% масс./масс. криля
Оливк.	Оливковое масло пищевой квалификации
1400W	CAS No 214358-33-5
Декса	Дексаметазон
Дикло	Диклофенак

Анализы

[0123] Противовоспалительную активность определяли в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IFN γ)-мышинных макрофагах, клетках RAW264.7, культивированных в стандартных культуральных средах и инкубированных с LPS и IFN γ в присутствии или в отсутствие различных тестируемых соединений/экстрактов и положительного контроля. Продукцию воспалительных медиаторов, включая NO, PGE₂ и LTB₄, цитокины TNF α и IL-6, измеряли разработанными способами с использованием коммерческих наборов. Каждый образец тестировали с использованием по меньшей мере 3 концентраций (с использованием 3 повторов, максимальная концентрация составляла 100 мкг/мл)(n=9), с соответствующим внутренним контролем (таблица 2-2). Цитотоксичность для каждого образца также определяли посредством анализа МТТ. Цитотоксичности не детектировали ни для одной тестируемой концентрации.

[0124] Параметры анализа для каждого анализа обобщены в таблице 2-2. Кратко, для проведения противовоспалительного анализа, культивированные клетки RAW264.7 подсчитывали и рассеивали (0,8X10⁵ клеток/лунку) в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение указанного времени посева. Затем среду отбирали и заменяли на свежую среду, с последующим добавлением тестируемых соединений. Соединения инкубировали в течение 1 час перед добавлением стимулятора. Затем планшеты инкубировали в течение между 4-18 час, и супернатант анализировали по представляющему интерес медиатору, жизнеспособность оставшихся клеток определяли посредством МТТ.

[0125] Виды положительного контроля выбирали на основании их широкого применения в сходных анализах, включая N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин (1400W), медленно, прочно связывающийся ингибитор индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) (Garvey, E. P., et al, J Biol Chem, 1997,21:272(8):4959-63, и дексаметазон, общепринятый ингибитор цитокинов. Диклофенак является общепринятым нестероидным противовоспалительным средством и известным ингибитором циклооксигеназы (COX), образующей PGE₂.

Таблица 2-2: - Параметры анализа

Анализ	Время рассева	Стимуляция	Время инкубации	Поставщик набора	Используемый контроль
NO	48 час	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 единиц/мл)	18 час	Реагент Грисса	1400W (Cayman)
TNF α	48 час	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 единиц/мл)	18 час	Peprotech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
IL-6	48 час	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 единиц/мл)	18 час	Peprotech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
PGE ₂	24 час	LPS (50 нг/мл), IF γ (50 единиц/мл)	18 час	Cayman Chemical (USA)	Диклофенак (Sigma)

Результаты**1. Анализ оксида азота**

[0126] NO представляет собой радикальный метаболит, как показано, имеющий многочисленные физиологические функции как в качестве передающей сигналы молекулы, так и в качестве токсического агента при воспалении (Coleman, 2001). NO образуется при окислении L-аргинина тремя типами синтаз оксида азота (NOS); конститутивными формами, нейрональной NOS и эндотелиальной NOS, и индуцируемой формой, iNOS, первоначально описанными в мышечных макрофагах (Nathan & Xie, 1994; Stuehr & Marletta, 1985). Индуцируемая форма все время подвергается активации после экспрессии, и таким образом, поддается регуляции на уровне транскрипции посредством NF- κ B, стимулированного воспалительными молекулами, подобными LPS и IFN- γ . Продукция NO посредством iNOS имеет латентный период несколько часов до продукции NO на намного более высоких (нМ) постоянных уровнях (Nathan & Xie, 1994). Индуцируемая форма NOS наиболее вероятно вовлечена в воспаление, и из-за более высоких уровней продуцируемого NO, ее более просто оценивать in-vitro.

[0127] NO является необычной передающей сигналы молекулой. Поскольку не существует специфического рецептора поверхности клеток для NO, он входит в клетки не делая различий, где эффект зависит от типа клетки и концентрации NO, таким образом, вызывая широкий диапазон физиологических ответов. NO вызывает увеличенную проницаемость сосудов, расширение сосудов и образование радикалов, вызывающие повреждение тканей и уничтожение патогенов (Guzik, Korb, & Adamek-Guzik, 2003). Эти физиологические изменения ассоциированы с воспалением с увеличенным кровотоком, позволяющим большему количеству иммунных клеток проникать в пораженную ткань, таким образом, разрушая патоген.

[0128] Результаты анализа ингибирования NO показаны на фигурах 1A и 1B и в таблице 2-3

Таблица 2-3: IC₅₀ для ингибирования NO

	LY	Криль	90%LY	75%LY	Оливковое масло	1400W
IC ₅₀	~107	~286	44,8	40,9	Не активен	1,6

2. Фактор некроза опухолей альфа

[0129] TNF α представляет собой передающий клеточные сигналы белок (цитокин), вовлеченный в основном в воспалительный ответ острой фазы. Макрофаги являются главным источником TNF α , хотя он может высвобождаться многими другими типами клеток, такими как CD4⁺ лимфоциты, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы и нейроны. TNF α продуцируется посредством активации MAPK и NF- κ B. Он действует для увеличения своей собственной продукции и продукции других воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 бета (IL-1 β). TNF α индуцирует лихорадку, апоптотическую гибель клеток, кахексию, воспаление и ингибирует образование опухолей и репликацию вирусов. TNF α вовлечен во множество состояний заболевания, включая сепсис, травматическое повреждение, ишемию, астму, ожоги, синдром раздраженной кишки, болезнь Альцгеймера, злокачественную опухоль, глубокую депрессию, артрит и рассеянный склероз (Cairns, Panasek, Harken, & Banerjee, 2000; Dowlati et al., 2010; Swardfager et al., 2010).

[0130] Результаты анализа ингибирования TNF α показаны на фигурах 2А и 2В и в таблице 2-4.

Таблица 2-4: IC₅₀ для ингибирования TNF α

	LY	Криль	90%LY	75%LY	Оливковое масло	Декса
IC ₅₀	~238,7	~103,3	89	57	DNF*	3,328e-005

* Не соответствовал математической модели кривой зависимости ответа от дозы

3. Интерлейкин-6

[0131] Подобно TNF α , IL-6 считают провоспалительным цитокином. IL-6 секретируется Т-клетками и макрофагами, что стимулирует иммунный ответ. IL-6 является ответственным за увеличенную продукцию нейтрофилов в костном мозге. Он поддерживает рост В-клеток и является антагонистом дифференцировки Т-клеток в регуляторные Т-клетки. Он является способным пересекать гематоэнцефалический барьер и инициировать синтез PGE₂ в гипоталамусе, таким образом, изменяя установочную точку температуры тела (Banks, Kastin, & Gutierrez, 1994).

[0132] Результаты анализа ингибирования IL-6 показаны на фигурах 3А и 3В и в таблице 2-5

Таблица 2-5: IC₅₀ для ингибирования IL-6

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

4. Простагландин E₂

[0133] Простагландин E2 (PGE₂) является одним из липидных медиаторов, образуемых из арахидоновой кислоты (AA) под действием фермента циклооксигеназы (COX), и вовлечен в индукцию пирексии, ощущения боли и воспаления. Аспирин и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) ингибируют биосинтез простаноидов (включая PGE₂), приводя к жаропонижающим, анальгетическим и противовоспалительным эффектам (Kawahara, K., et al, 2015, и Kawabata, A., 2011).

[0134] Результаты показаны на фигурах 4А и 4В и в таблице 2-6.

Таблица 2-6: IC₅₀ для ингибирования PG-E₂

	LY	Криль	90%LY	75%Ly	50%LY	Диклофенак	Оливковое масло
	Не активен	Не активен	~112	~118	55,3	0,12	DNF*

* Не соответствовал математической модели кривой зависимости ответа от дозы

Обобщение результатов

[0135] В этой системе анализа было показано, что экстракт липида мидии и крилевое масло в тестированных концентрациях индивидуально ингибируют NO, TNFα и IL-6, но не PGE₂.

[0136] Комбинация экстракта липида мидии и крилевого масла являлась более эффективной, чем любое из экстракта липида мидии или крилевого масла отдельно, для ингибирования NO, TNFα и IL-6. В анализе PGE₂, ни для экстракта липида мидии, ни для крилевого масла отдельно, не показано ингибирующей активности, но в комбинации показано ингибирование.

Пример 3 - Синергизм

[0137] Экстракт липида мидии получали в соответствии с WO97/09992 и использовали в форме PCSO-524[®]. Способом из примера 1 получали крилевое масло, имеющее композиционный состав, как указано в таблице 1-3 и 1-4 выше.

Образцы, получение и комбинация

[0138] Образцы для хранения PCSO-524[®] и крилевого масла с высоким содержанием фосфолипидов перемешивали переворачиванием перед отбором экспериментальных образцов. Образцы взвешивали в 15 мл пробирки для центрифугирования и доводили до 100 мг/мл этанолом для получения раствора для хранения. Смеси получали посредством смешивания разведенных масел в правильном соотношении. Серийные разведения получали в этаноле. Затем серийные разведения разводили (1 к 100) в культуральной среде до добавления к клеткам (в трех повторях) в конечных разведениях 1 к 10. Это приводило к концентрации этановой кислоты 0,1% для всех доз и видов контроля. Эти дозы являлись свежеприготовленными ежедневно. В таблице 3-1 показаны сокращенные обозначения, использованные для каждого образца.

Таблица 3-1: Сокращенные наименования образцов

Сокращенное обозначение	Описание

Сокращенное обозначение	Описание
LY	PCSO-524 [®]
Криль	Обогащенное крилевое масло (62%PL)
LY90	Смесь, содержащая 90% масс./масс. LY и 10% масс./масс. криля.
LY80	Смесь, содержащая 80% LY масс./масс. и 20% масс./масс. криля
LY70	Смесь, содержащая 70% LY масс./масс. и 30% масс./масс. криля
LY65	Смесь, содержащая 65% LY масс./масс. и 35% масс./масс. криля
LY60	Смесь, содержащая 60% LY масс./масс. и 40% масс./масс. криля
LY55	Смесь, содержащая 55% LY масс./масс. и 45% масс./масс. криля
LY50	Смесь, содержащая 50% LY масс./масс. и 50% масс./масс. криля
LY45	Смесь, содержащая 45% LY масс./масс. и 55% масс./масс. криля
LY40	Смесь, содержащая 40% LY масс./масс. и 60% масс./масс. криля
LY35	Смесь, содержащая 35% LY масс./масс. и 65% масс./масс. криля
LY30	Смесь, содержащая 30% LY масс./масс. и 70% масс./масс. криля
LY20	Смесь, содержащая 20% LY масс./масс. и 80% масс./масс. криля
LY10	Смесь, содержащая 10% LY масс./масс. и 90% масс./масс. криля
Оливк.	Оливковое масло пищевой квалификации
1400W	CAS No 214358-33-5
Декса	Дексаметазон
CI	Доверительный интервал

Анализы

[0139] Противовоспалительную активность определяли в стимулированных липополисахаридом (LPS) и интерфероном γ (IFN γ) мышинных макрофагах, клетках RAW264.7, культивированных в стандартных культуральных средах (DMEM, эмбриональная бычья сыворотка 5%) и инкубированных в присутствии или в отсутствие различных тестируемых соединений/экстрактов и положительного контроля. Продукцию воспалительных медиаторов, включая NO, цитокины TNF α и IL-6, измеряли разработанными способами с использованием коммерческих наборов для ELISA (поставщики перечислены в

[0140]

[0141] таблице 3-2).

Каждый образец тестировали с использованием по меньшей мере 6 концентраций (с использованием 3 повторов, максимальная концентрация составляла 100 мкг/мл) (n=9), с соответствующим внутренним контролем (показанным в

[0142]

[0143] **таблице 3-2).** Цитотоксичность для каждого тестируемого образца определяли посредством анализа МТТ. Цитотоксичности не детектировали ни для одной тестируемой концентрации.

[0144] Параметры анализа для каждого анализа обобщены в

[0145]

[0146] **таблице 3-2.** Кратко, для анализов NO, TNF α и IL-6, культивированные клетки RAW264.7 подсчитывали и рассеивали ($0,8 \times 10^5$ клеток/лунку) в 96-луночные планшеты, и инкубировали в течение 48 час. Затем среду отбирали и заменяли на свежую среду, с последующим добавлением тестируемых соединений. Соединения инкубировали в течение 1 час перед добавлением стимулятора. Затем планшеты инкубировали в течение 18 час, и супернатант анализировали по представляющему интерес медиатору, жизнеспособность оставшихся клеток определяли посредством МТТ.

[0147] Виды положительного контроля выбирали на основании их широкого применения в сходных анализах, включая N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин (1400W), медленно, прочно связывающийся ингибитор индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) (Garvey et al., 1997), и дексаметазон, общепринятый ингибитор цитокинов.

Таблица 3-2: Противовоспалительные анализы и виды положительного контроля

Анализ	Время рассева	Стимуляция	Время инкубации	Поставщик набора	Положительный контроль
NO	48 час	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 единиц/мл)	18 час	Реагент Грисса	1400W (Cayman)
TNF α	48 час	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 единиц/мл)	18 час	Peprtech (USA)	Дексаметазон (Sigma)
IL-6	48 час	LPS (50нг/мл), IFN γ (50 единиц/мл)	18 час	Biogems (USA)	Дексаметазон (sigma)

Расчеты синергизма

[0148] Синергизм выражали как комбинаторный индекс. Комбинаторный индекс (CI) синергизма и взвешивание IC50 для изоболограммы рассчитывали с использованием программного обеспечения Compsyn. Кривую зависимости ответа от дозы, полученную в Graphpad Prism, трансформировали в 10 точек, представляющих кривую. Затем эти 10 точек вводили в программу Compsyn, которая строила кривую для соответствия точкам данных. Этот способ был предпочтительнее близкого воспроизведения полной кривой зависимости ответа от дозы в программе для расчета синергизма. Подобранную посредством Compsyn кривую затем использовали для расчетов синергизма. Паттерн

синергизма на протяжении тестируемого диапазона можно наблюдать с помощью изоболограммы, на которую нанесен относительный вклад каждого компонента в активность при IC₅₀. На ней присутствует прямая линия, построенная между двумя смешиваемыми лекарственными средствами (Biavatti, 2009). Значения ниже линии указывают на синергизм, значения на линии считают аддитивными, и значения выше линии являются антагонистическими.

Результаты

1. Анализ оксида азота

[0149] Комбинации анализировали, чтобы определить, показано ли для них синергическое ингибирование передающей сигналы воспаления молекулы NO. Сначала комбинации тестировали с шагом увеличения на 10%. Наиболее активной наблюдаемой комбинацией являлась LY60. Затем тестировали дополнительные увеличения на 5% около LY60.

[0150] Кривые зависимости ответа от дозы для тестируемых комбинаций LY90-LY10 показаны на фигурах 5A, 5B, 6A и 6B. Значения IC₅₀ для ингибирования NO и комбинаторный индекс представлены в таблицах 3-3 и 3-4. Комбинаторный индекс менее 1 указывает на синергизм. Изоболограмма для увеличения с шагом 10% показана на фигуре 7.

Таблица 3-3: Значения IC₅₀ для ингибирования NO для комбинаций LY90-LY10

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10	1400 W
IC₅₀ (мкг/мл)	204	265	105	109	74	67	83	85	111	125	134	25
95% CI (мкг/мл)	136-392	144-1108	87-136	88-144	63-90	59-77	64-117	68-115	81-183	98-194	98-248	21-32

Таблица 3-4: IC₅₀ (CI) и комбинаторный индекс для ингибирования NO для комбинаций LY75-LY45

	LY75	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45
IC₅₀ (мкг/мл)	123	68	84	65	86	79	84
95% CI для IC₅₀ (мкг/мл)	97-160	65-85	69-96	60-73	70-90	69-89	73-100
Комбинаторный индекс	0,80	0,50	0,55	0,48	0,54	0,77	0,61

2. Анализ TNFα

[0151] Комбинации анализировали, чтобы определить, показано ли для них синергическое ингибирование провоспалительного цитокина TNFα. Сначала комбинации тестировали с шагом увеличения на 10%. Наиболее активной наблюдаемой комбинацией являлась LY50. Затем тестировали дополнительные увеличения на 5% около LY50.

[0152] Кривые зависимости ответа от дозы для тестируемых комбинаций LY90-LY10 показаны на фигурах 8А, 8В, 8С, 9А и 9В. Значения IC50 для ингибирования TNF α и комбинаторный индекс представлены в таблицах 3-5 и 3-6. Комбинаторный индекс менее 1 указывает на синергизм. Изоболограмма для увеличения с шагом 10% показана на фигуре 10.

Таблица 3-5: Значения IC50 для ингибирования TNF

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10
IC50	~606	~966	-	56	64	53	43	48	64	61	77
95% CI	-	-	-	49-67	--75	44-64	35-50	37-58	--71	39-90	56-134

*- невозможно провести оценку

Таблица 3-6: IC50 и CI для LY70-LY35 (n=9)

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35
IC50	91	80	78	68	69	90	70	73
95% CI	64-189	60-137	64-98	54-87	60-80	68-128	57-89	59-92
Комбинаторный индекс	0,14	0,12	0,114	0,097	0,096	0,123	0,094	0,095

3. Анализ IL-6

[0153] Комбинации анализировали, чтобы определить, показано ли для них синергическое ингибирование провоспалительного цитокина IL-6. Сначала комбинации тестировали с шагом увеличения на 10%. Наиболее активной наблюдаемой комбинацией являлась LY60. Затем тестировали дополнительные увеличения на 5% около LY60.

[0154] Кривые зависимости ответа от дозы для тестируемых комбинаций LY90-LY10 показаны на фигурах 11А, 11В, 12А и 12В. Значения IC50 для ингибирования IL-6 и комбинаторный индекс представлены в таблицах 3-7 и 3-8. Комбинаторный индекс менее 1 указывает на синергизм. Изоболограмма для увеличения с шагом 10% показана на фигуре 13.

Таблица 3-7: IC50 для ингибирования IL-6 (n=3)

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10	Декса
IC50 (мкг/мл)	173	114	~100	53	36	34	37	52	41	60	~60	0,010
95% CI (мкг/мл)	104-131	1192-191		41-61	29-45	27-42	30-44	44-60	32-51	50-72		0,004-0,03

Таблица 3-8: IC50 и комбинаторный индекс для ингибирования IL-6

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35	LY30
IC50	36	39	34	43	37	49	52	41	41
95% CI	29-45	33-45	27-42	37--	30-44	40-58	44-60	30-54	32-51
Комбинаторный индекс		0,27	0,23	0,31	0,27	0,37	0,4	0,32	0,32

Обобщение результатов

[0155] В этой системе анализа показано, что экстракт липида мидии и крилевое масло, использованные в комбинации, удовлетворяют математическим критериям синергизма для ингибирования NO, TNF α и IL-6.

Пример 4 - Исследование для пациентов

[0156] Пациентам, страдающим от множества видов боли/воспалительных состояний, вводили комбинацию экстракта липида мидии (в форме PCSO-542) и крилевого масла (61% PL), в соотношении PCSO-542 и крилевого масла 75:25, в форме капсул. Состав указанных капсул представлен в таблице 4-1.

Таблица 4-1: Состав 150 мг капсул со смесью масел

Ингредиент	Масса %
Компонент наполнения	
Оливковое масло	66,67%
PCSO-542*, масло мидии (<i>Perna canaliculus</i>)	25% (37,5 мг)
Масло криля* (<i>Euphausia superba</i>)	8,33% (12,5 мг)
Компонент оболочки (до сушки)	
Желатин (бычий)	46,5
Глицерин	12,6
Сорбит	6,00
вода	34,9

*содержит 0,15% масс./масс. витамина Е
(т.е., приблизительно 0,056 мг/капсулу)

[0157] Доза, как правило, лежала в диапазоне 2-8 капсул в сутки, за одно, два или три дозирования. До начала лечения с использованием этой комбинации, пациенты, как правило, принимали одно или несколько NSAID, включая парацетамол или ибупрофен, для управления течением боли. Результаты показаны в таблице 4-2.

Таблица 4-2: Обобщение результатов для пациентов

Пациент (пол/возраст)	Состояние	Уровень боли до лечения (1-10)	Уровень боли после лечения (1-10)	Другие комментарии
Ж, 80-84	Тяжелая боль в колени и плечах	8	4	Состояния присутствуют в течение 3-12 лет. Улучшение после 2-3 недель лечения (2 капсулы в сутки).
М, 60-64	Стеноз поясничного отдела позвоночника	6-8	0	Состояние присутствует в течение 2-3 лет. Улучшение после 4-5 суток лечения (6-8

				капсул/сутки).
М, 40-44	Боль в пояснице	7	4	Состояние присутствует в течение 15 лет. Улучшение после 7 суток лечения (3 капсулы/сутки).
Ж, 45-49	Хроническая боль в спине	8	4-5	Состояние присутствует в течение 2 лет. Улучшение после 2-3 недель лечения (3 капсулы/сутки).
М, 50-54	Боль в суставах рук - повреждение нерва/раздутость суставов пальцев кисти	6	2	Состояние присутствует в течение 2 лет. Улучшение после 1 недели лечения (3 капсулы/сутки).
М, 50-54	Хроническая боль в спине - грыжа межпозвонкового диска	2-8, в зависимости от активности	2-3	Состояние присутствует в течение 25 лет. Улучшение после 3 суток лечения (4 капсулы/сутки).
Ж, 65-69	Хроническая боль в колене и плече	10	5	Состояние присутствует в течение 5 лет. Улучшение после 2 недель лечения (4 капсулы/сутки).
М, 20-24	Тяжелая аллергия - кашель, воспаление носового канала и вытекание слизи из носа	8	5	Состояние присутствует в течение 4 лет. Улучшение после 3 недель лечения (4 капсулы/сутки).
М, 40-44	Боль в спине - грыжа межпозвонкового диска	9	5	Состояние присутствует в течение 8 лет. Улучшение после 3 недель лечения
Ж, 50-54	Боль в спине	7	01-1	Состояние присутствует в течение 1 месяца.

				Улучшение после 1 недели лечения
Ж, 55-59	Остеопороз - боль изменяется с активностью	7-8	1-3	Состояние присутствует в течение 15 лет. Улучшение после 1½ недель лечения (4 капсулы/сутки).
М, 65-69	Боль в колене	8-10	2-3	Состояние присутствует в течение 14 лет. Улучшение после 1½ недель лечения (4 капсулы/сутки).
М, 50-54	Боль в шее, скованность в колене	5	3	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 3 недель лечения (3 капсулы/сутки).
М, 50-54	Боль в теле и боль в коленях и локте после хирургической операции	7-8	2-3	Улучшение после нескольких суток лечения
Ж, 65-69	Артрит/тендинит в суставах пальцев	6	2	Состояние присутствует в течение нескольких месяцев. Улучшение после нескольких суток лечения (6 капсул/сутки).
Ж	Ревматоидный артрит	7	Ломота и боль в суставах резко уменьшились	Состояние присутствует в течение 10+ лет. Улучшение после нескольких суток лечения (4 капсулы/сутки)
Ж, 50-54	Волчанка/фибромиалгия	8	4	Состояние присутствует в течение 10+ лет. Улучшение после 7-8 суток лечения
М, 30-34	Боль в плече, увеличивающаяся	7	4	Улучшение после 2 недель лечения (4

	после физических упражнений			капсулы/сутки)
Ж	Предсуществующее повреждение колена и щиколотки	5	3	Улучшение после 2-3 недель лечения (4 капсулы/сутки)
М, 45-49	Грыжи межпозвонковых дисков, повреждения плеча и руки	10	Общее улучшение	Состояние присутствует в течение нескольких месяцев. Улучшение после 1 недели лечения (2 капсулы/сутки).
Ж, 40-44	Дискомфорт в колене (ощущение хруста)	4	0	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 2 недель лечения (2 капсулы/сутки)
Ж	Скованность сустава и боль в спине	Меняется ежедневно	5, улучшена подвижность руки	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 1 недель лечения (2 капсулы/сутки)
Ж, 55-59	Боль в спине	6	4	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 2 недель лечения (3 капсулы/сутки)
М (пожилой)	Боль в суставах	6	2	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 4 недель лечения (2 капсулы/сутки)
М	Боль в плече и колене	8	4	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после 1 недели лечения (2 капсулы/сутки)

М	Боль в колене	8	0	Улучшение после 1 недели лечения (4 капсулы/сутки).
Ж	Артрит	8	5	Улучшение после лечения (4 капсулы/сутки)
М	Артрит	8	5	Состояние присутствует в течение нескольких лет. Улучшение после лечения (пациент отмечал увеличенное улучшение, по сравнению с использованием Omega XL) (4 капсулы/сутки)
Ж	Артрит	6	3	Улучшение после лечения (пациент отмечал увеличенное улучшение, по сравнению с использованием Omega XL) (4 капсулы/сутки)

Список литературы

Biavatti, M. W. (2009). Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 371-378.

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

Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8), 1397-1406.

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, K. L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 67(5), 446-457. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033

Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R., & Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4959-4963.

Guzik, T. J., Korbout, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in

inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54(4), 469-487.

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

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

Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-918.

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

Stuehr, D. J., & Marletta, M. A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(22), 7738-7742.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация, содержащая липид мидии и крилевое масло, где комбинация адаптирована для отдельного или последовательного введения.
2. Комбинация по п.1 в форме композиции, содержащей липид мидии и крилевое масло.
3. Комбинация по п.1 или 2, где крилевое масло имеет содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 40% масс./масс.
4. Комбинация по п.3, где крилевое масло имеет содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 60% масс./масс.
5. Комбинация по любому из пп. 1-4, где крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 5% масс./масс. или менее.
6. Комбинация по п.5, где крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 3% масс./масс. или менее.
7. Комбинация по п.5, где крилевое масло имеет содержание воды приблизительно 1% масс./масс. или менее.
8. Комбинация по любому из пп. 1-7, где крилевое масло имеет содержание растворителя для экстракции приблизительно 5% масс./масс. или менее.
9. Комбинация по п.8, где крилевое масло имеет содержание растворителя для экстракции приблизительно 3% масс./масс. или менее.
10. Комбинация по п.8, где крилевое масло имеет содержание растворителя для экстракции приблизительно 1% масс./масс. или менее.
11. Комбинация по любому из пп. 1-10, где липид мидии находится в форме порошка мидии.
12. Комбинация по любому из пп. 1-10, где липид мидии находится в форме экстракта липида мидии, необязательно, содержащего витамин Е.
13. Комбинация по любому из пп. 1-12, где соотношение массы липида мидии и крилевого масла лежит в диапазоне от 1:99 до 99:1.
14. Комбинация по п.13, где соотношение массы липида мидии и крилевого масла составляет приблизительно 5:95 или приблизительно 10:90, или приблизительно 15:85, или приблизительно 20:80, или приблизительно 25:75, или приблизительно 30:70, или приблизительно 35:65, или приблизительно 40:60, или приблизительно 45:55, или приблизительно 50:50, или приблизительно 55:45, или приблизительно 60:40, или приблизительно 65:35, или приблизительно 70:30, или приблизительно 75:25, или приблизительно 80:20, или приблизительно 85:15, или приблизительно 90:10, или приблизительно 95:5.
15. Комбинация по любому из пп. 1-14 в единичной пероральной дозированной форме.
16. Комбинация по п.15, где единичная пероральная дозированная форма представляет собой мягкую желатиновую капсулу.
17. Комбинация по п.15 или 16, где единичная пероральная дозированная форма

содержит от приблизительно 10 мг до приблизительно 10 г липида мидии.

18. Комбинация по п.17 где единичная пероральная дозированная форма содержит приблизительно 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г или приблизительно 9,5 г липида мидии.

19. Комбинация по любому из пп. 15-18, где единичная пероральная дозированная форма содержит от приблизительно 10 мг до приблизительно 10 г крилевого масла.

20. Комбинация по п.19, где единичная пероральная дозированная форма содержит приблизительно 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1 г, 1,1 г, 1,2 г, 1,3 г, 1,4 г, 1,5 г, 1,6 г, 1,7 г, 1,8 г, 1,9 г, 2,0 г, 2,1 г, 2,2 г, 2,3 г, 2,4 г, 2,5 г, 2,6 г, 2,7 г, 2,8 г, 2,9 г, 3,0 г, 3,2 г, 3,5 г, 3,7 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г или приблизительно 9,5 г крилевого масла.

21. Комбинация по любому из пп.15-20, где единичная пероральная дозированная форма содержит приблизительно 10-500 мг комбинации.

22. Комбинация по п.21, где единичная пероральная дозированная форма содержит приблизительно 50-300 мг комбинации.

23. Комбинация по любому из пп. 1-22, дополнительно содержащая один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или добавок.

24. Комбинация по любому из пп. 1-22, состоящая или состоящая по существу из липида мидии и крилевого масла.

25. Композиция, содержащая липид мидии и крилевое масло.

26. Композиция по п.25, где крилевое масло имеет содержание фосфолипидов по меньшей мере приблизительно 50% масс./масс.

27. Композиция по п.25 или 26, где липид мидии находится в форме экстракта липида мидии, необязательно, содержащего витамин Е.

28. Композиция по любому из пп. 25-27, где соотношение массы липида мидии и крилевого масла составляет приблизительно 5:95 или приблизительно 10:90, или приблизительно 15:85, или приблизительно 20:80, или приблизительно 25:75, или приблизительно 30:70, или приблизительно 35:65, или приблизительно 40:60, или приблизительно 45:55, или приблизительно 50:50, или приблизительно 55:45, или приблизительно 60:40, или приблизительно 65:35, или приблизительно 70:30, или приблизительно 75:25, или приблизительно 80:20, или приблизительно 85:15, или приблизительно 90:10, или приблизительно 95:5.

29. Композиция по любому из пп. 25-28, дополнительно содержащая масло-носитель.

30. Композиция по п.29, где масло-носитель составляет от приблизительно 10% масс./масс. до приблизительно 90% масс./масс. от общей массы композиции.

31. Композиция по п.29, где соотношение массы масла-носителя к объединенному количеству липида мидии и крилевого масла составляет от приблизительно 3:1 до приблизительно 1:3.

32. Композиция по любому из пп. 25-31 в единичной дозированной форме.

33. Композиция по п.32, инкапсулированная в мягкой желатиновой капсуле.

34. Композиция по п.32 или 33, содержащая приблизительно 10-500 мг объединенного липида мидии и крилевого масла.

35. Комбинация по п.34, содержащая приблизительно 50-300 мг объединенного липида мидии и крилевого масла.

36. Комбинация по любому из пп. 1-24 или композиция по любому из пп. 25-35 для применения в лечении воспаления у субъекта.

37. Способ лечения воспаления у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту комбинации по любому из пп. 1-24 или композиции по любому из пп. 25-35.

38. Применение липида мидии и крилевого масла для изготовления комбинированного лекарственного средства для лечения воспаления.

39. Применение по п.38, где лекарственное средство адаптировано для отдельного или одновременного введения.

40. Применение по п.39, где лекарственное средство находится в форме композиции липида мидии и крилевого масла

41. Комбинированное средство для лечения воспаления, содержащее липид мидии и крилевоe масло,

42. Средство по п.41, адаптированное для отдельного или одновременного введения.

43. Комбинация по любому из пп. 1-24 или композиция по любому из пп. 25-35 для применения в лечении боли у субъекта.

44. Способ лечения боли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту комбинации по любому из пп. 1-24 или композиции по любому из пп. 25-35.

45. Применение липида мидии и крилевого масла для изготовления комбинированного лекарственного средства для лечения боли.

46. Применение по п.45, где лекарственное средство адаптировано для отдельного или одновременного введения.

47. Применение по п.46, где лекарственное средство находится в форме композиции липида мидии и крилевого масла

48. Комбинированное средство для лечения воспаления, содержащее липид мидии и крилевоe масло,

49. Средство по п.48, адаптированное для отдельного или одновременного введения.

50. Способ получения крилевого масла, имеющего содержание фосфолипидов

приблизительно 50% или более, включающий стадии:

(а) приведения подаваемого материала биомассы криля в контакт со смесью CO_2 и этанола для экстракции крилевого масла; и

(b) приведения указанного крилевого масла в контакт с CO_2 для экстракции по меньшей мере части неполярных липидных компонентов, таким образом, чтобы масло имело содержание фосфолипидов по меньшей мере 50% масс./масс.

51. Способ по п.50, где подаваемый материал биомассы криля приводят в контакт со смесью от приблизительно 15% масс./масс. до приблизительно 30% масс./масс. этанола в CO_2 .

52. Способ по п.50 или 51, где стадию (а) осуществляют при температуре приблизительно 60° или менее.

53. Способ по любому из пп. 50-52, где стадию (а) осуществляют при давлении, равном или большем приблизительно 300 бар (30 МПа).

54. Способ по любому из пп. 50-53, где стадию (b) осуществляют при температуре приблизительно 60° или менее.

55. Способ по любому из пп. 50-54, где стадию (а) осуществляют при давлении, равном или большем приблизительно 300 бар (30 МПа).

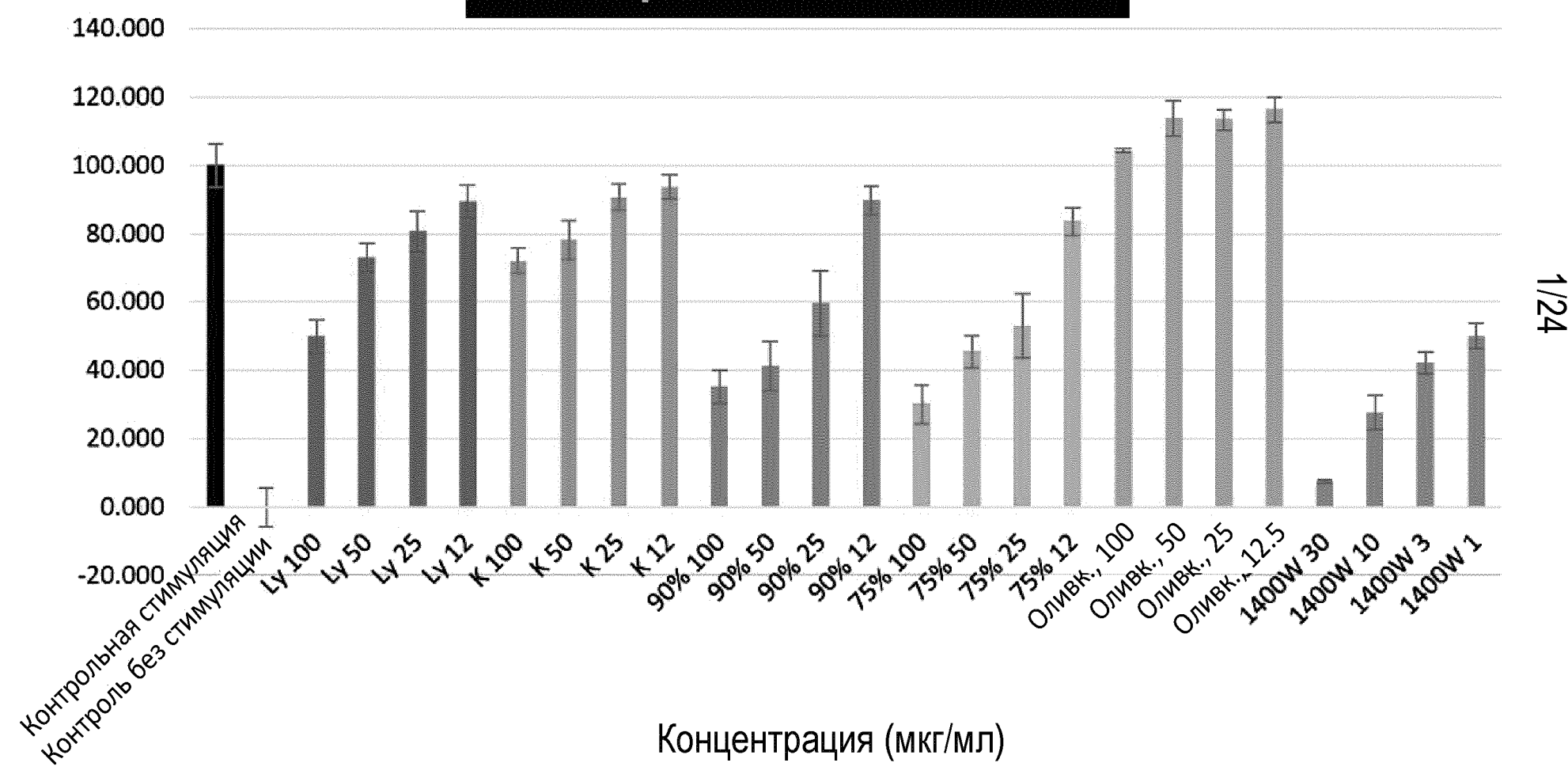
56. Способ по любому из пп. 50-55, где масло, полученное со стадии (b), имеет содержание фосфолипидов в диапазоне от приблизительно 60% масс./масс. до приблизительно 90% масс./масс.

57. Способ по любому из пп. 50-56, где этанол удаляют из экстрагированного масла, полученного на стадии (а).

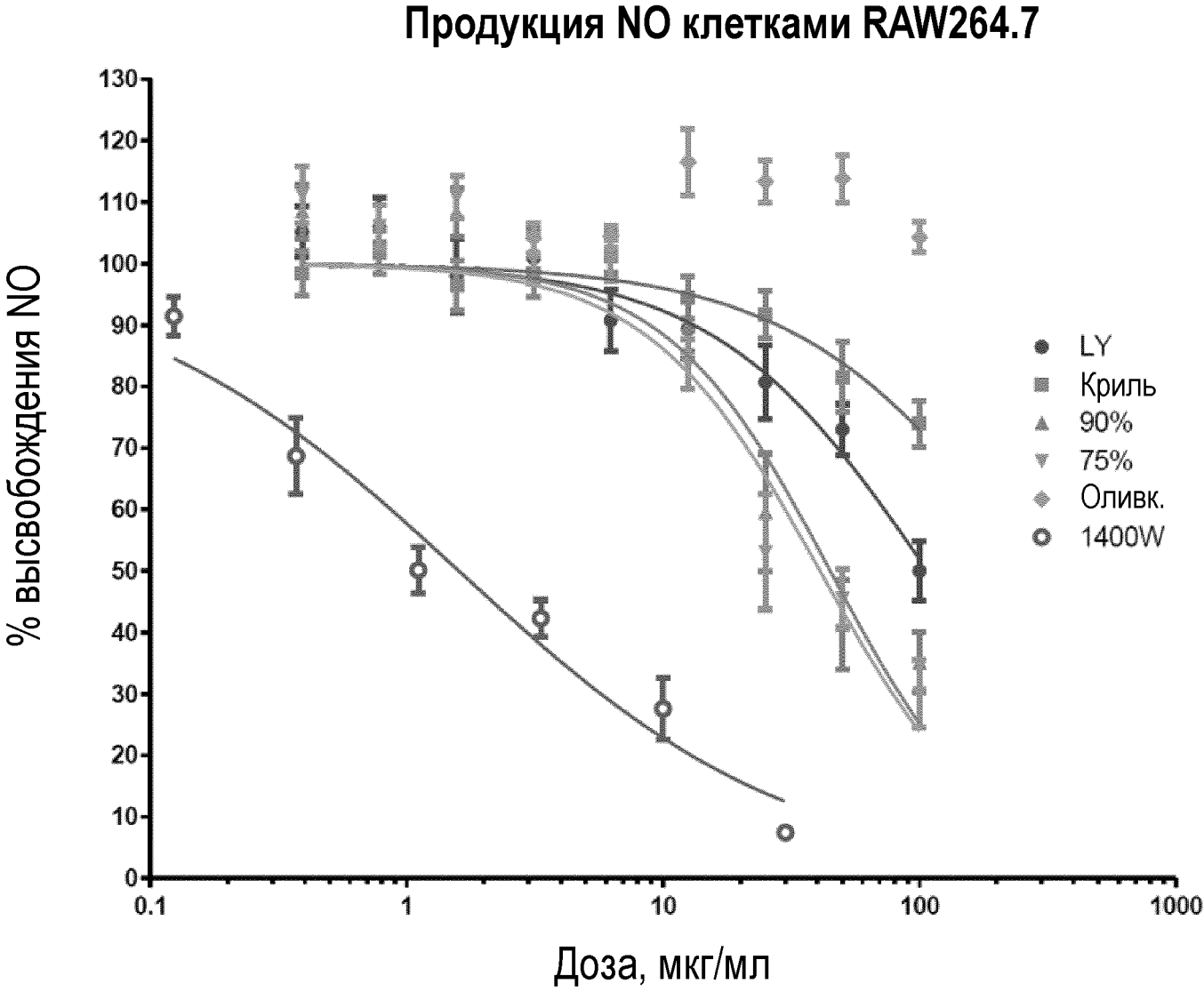
58. Способ по п.57, где этанол удаляют в вакууме при температуре приблизительно 60°C или менее.

ФИГ.1А

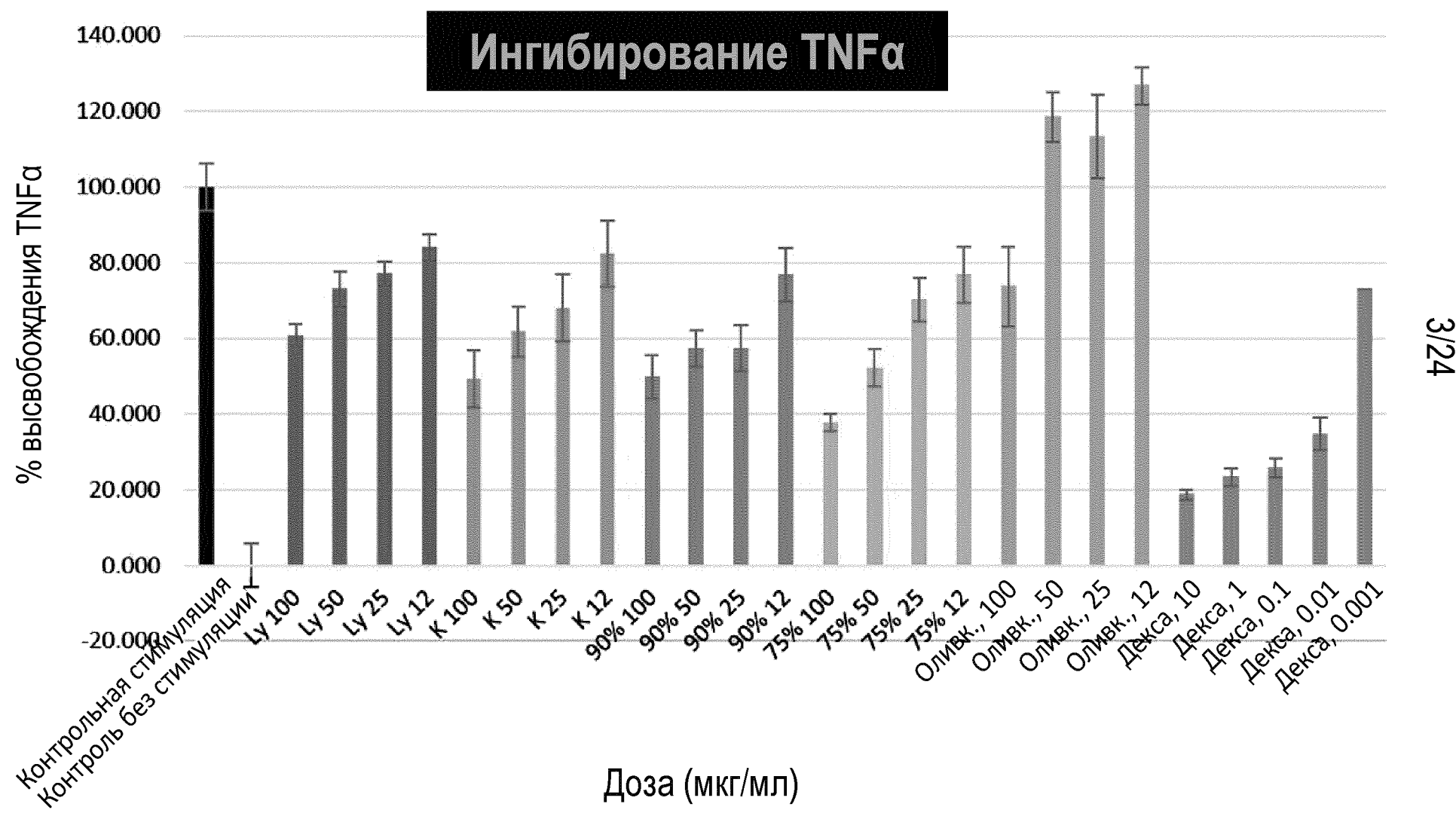
Ингибирование оксида азота



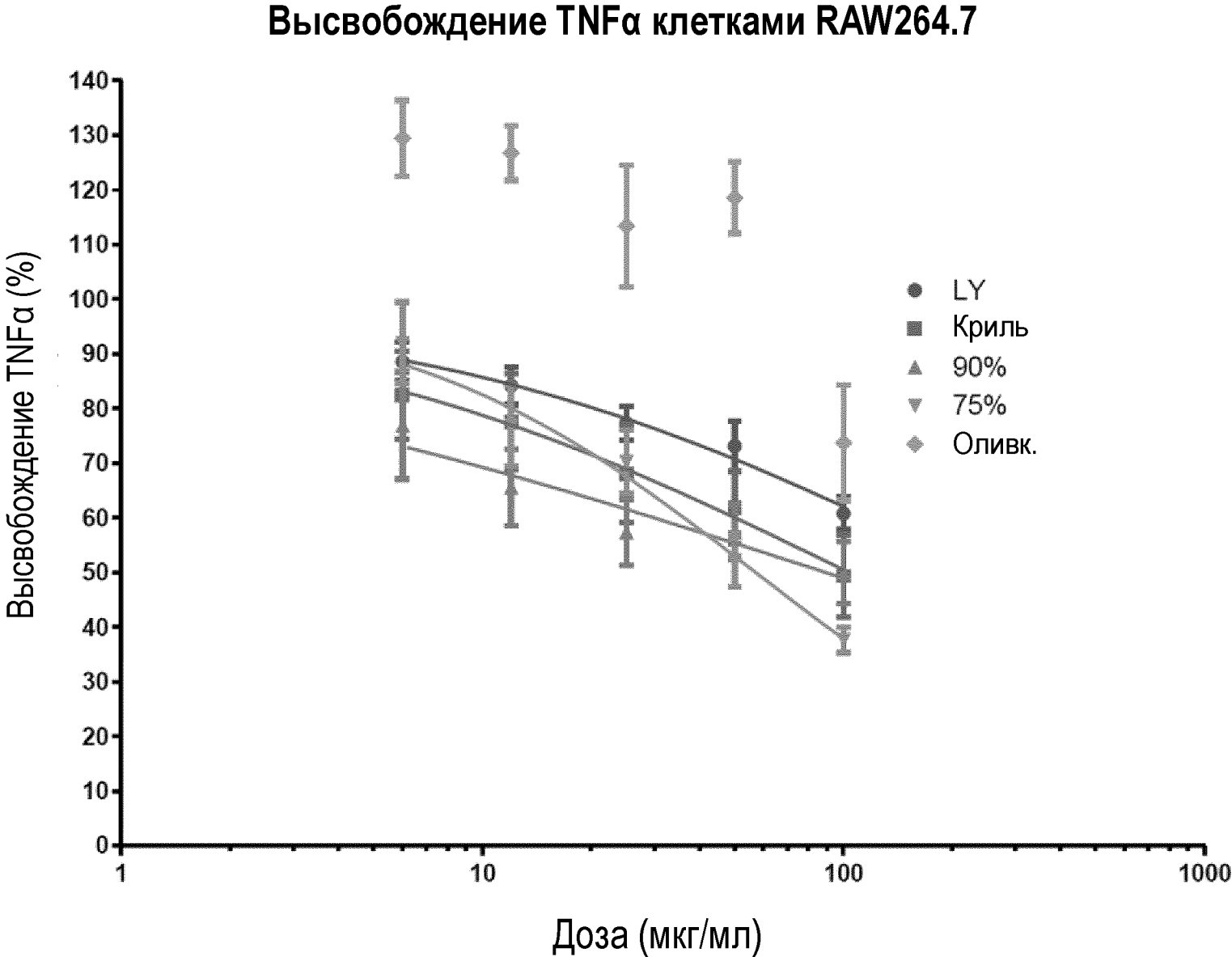
ФИГ.1В



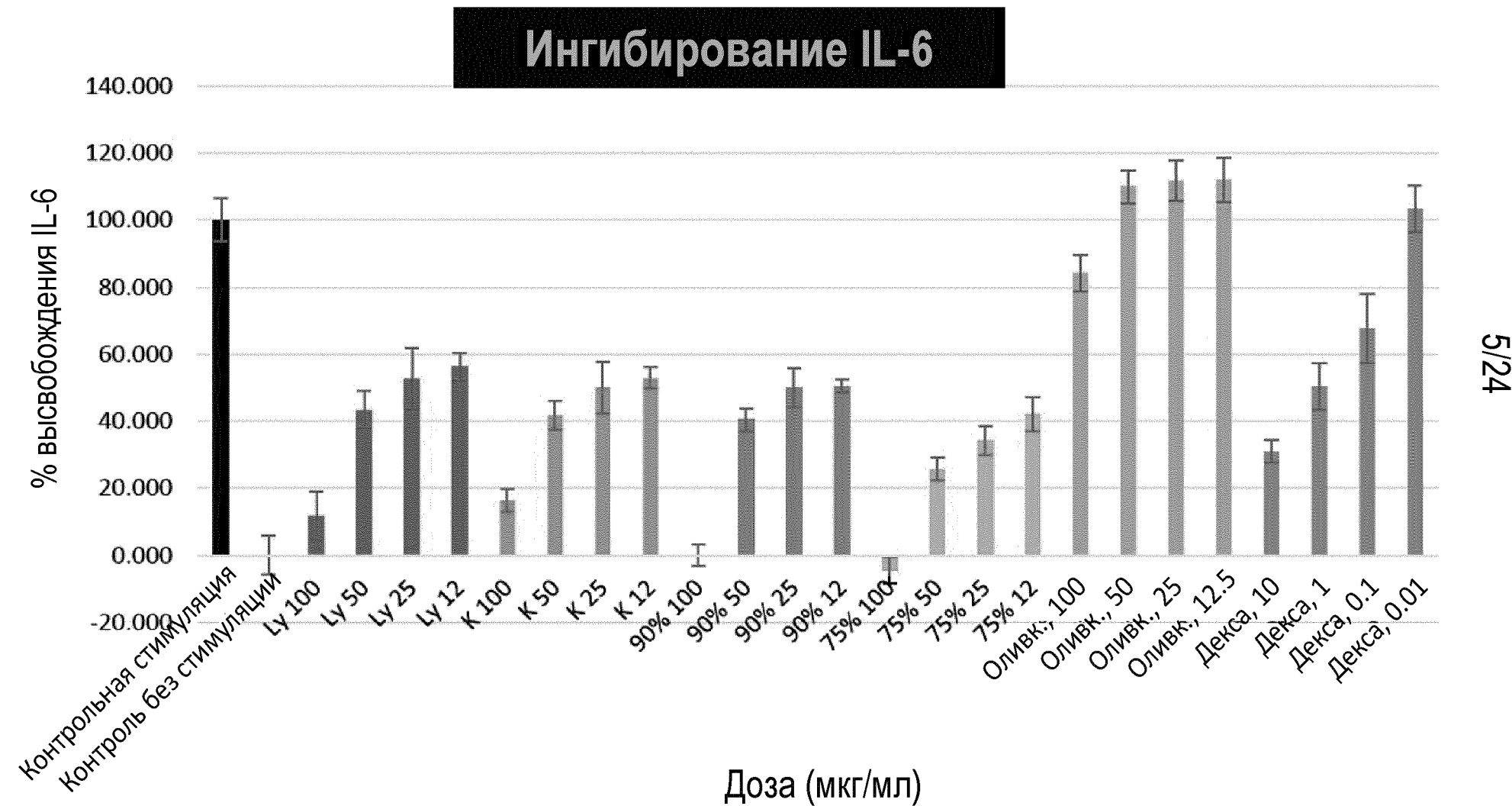
ФИГ.2А



ФИГ.2В

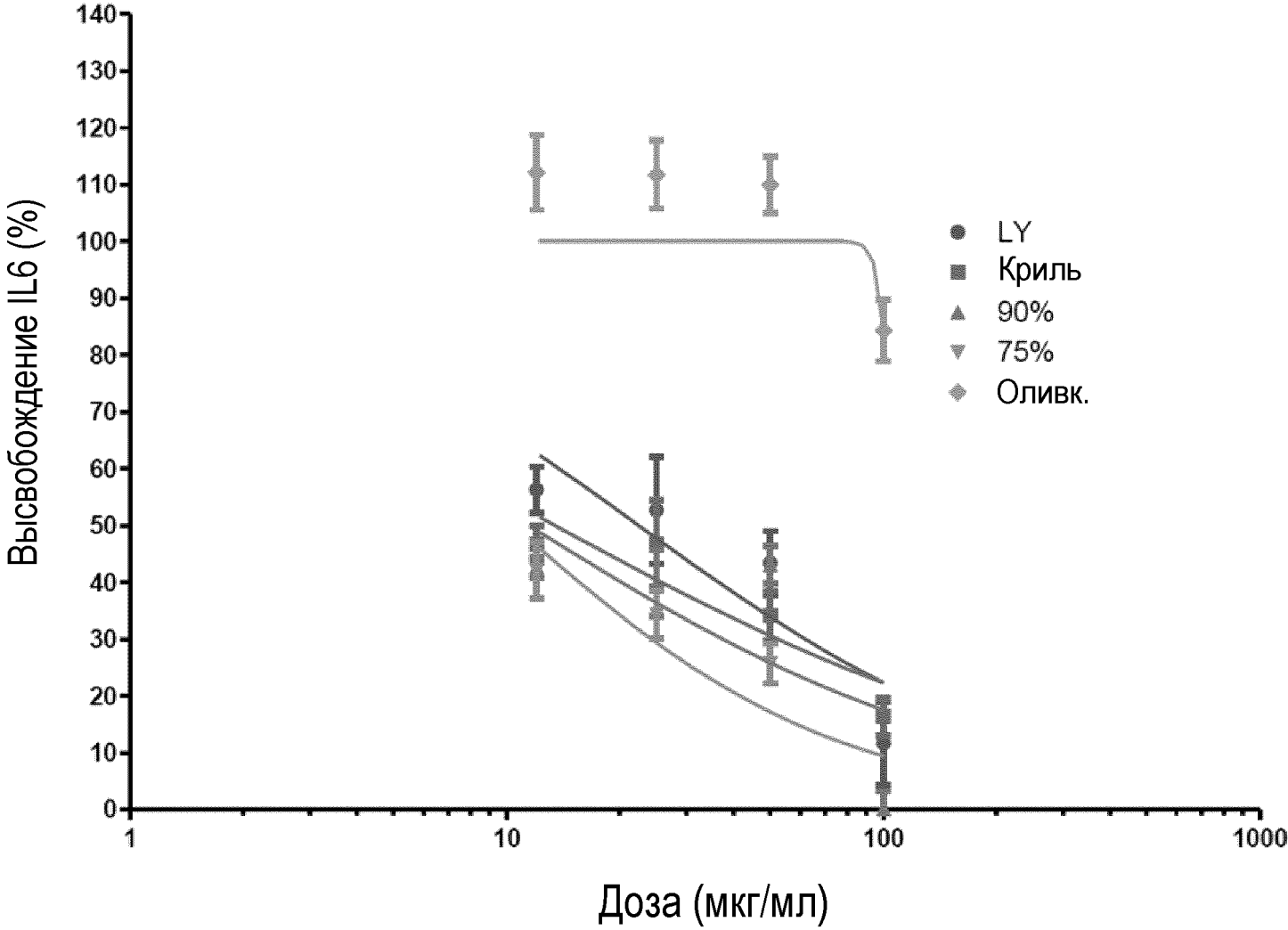


ФИГ.3А

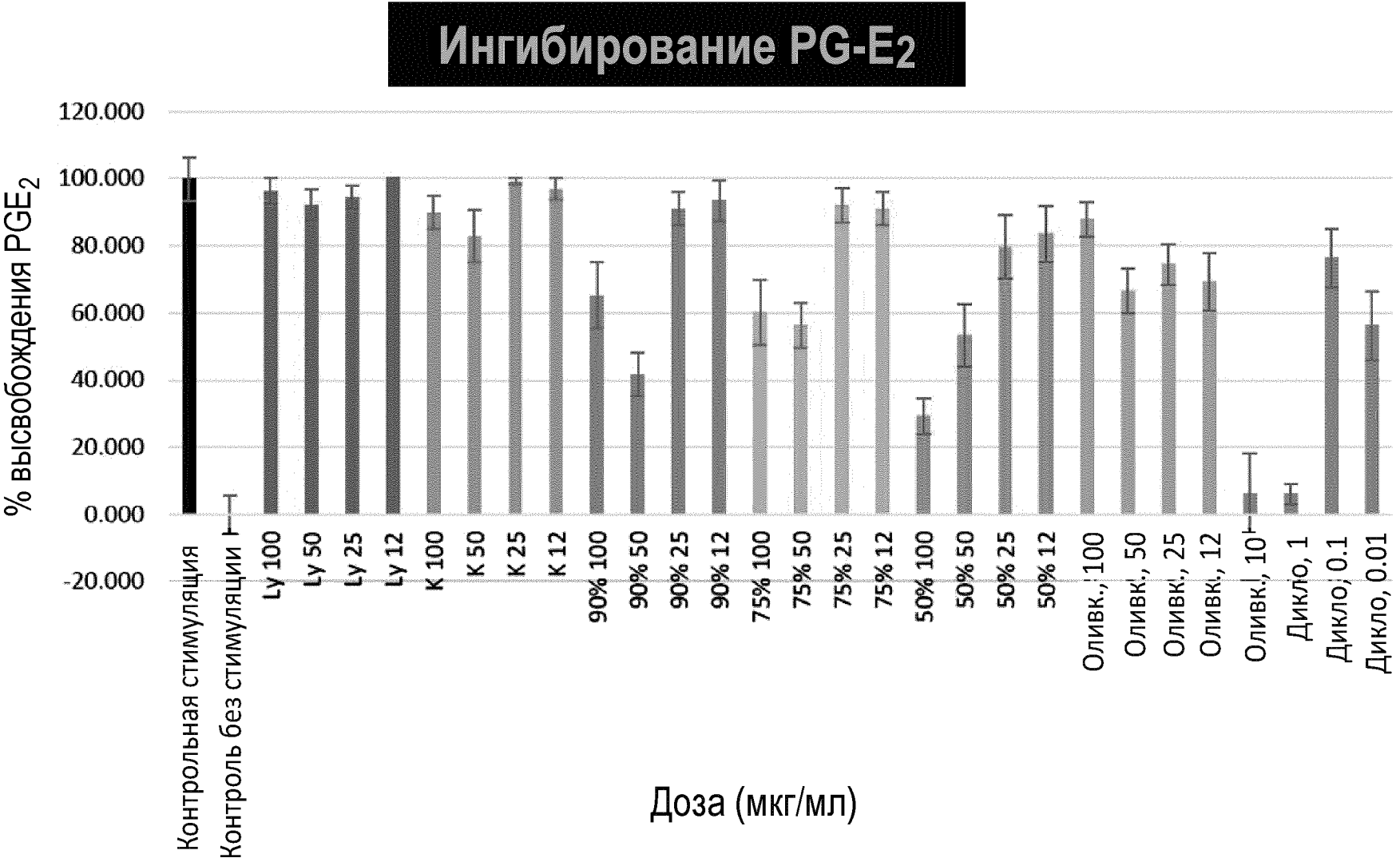


ФИГ.3В

Высвобождение IL6 клетками RAW264.7

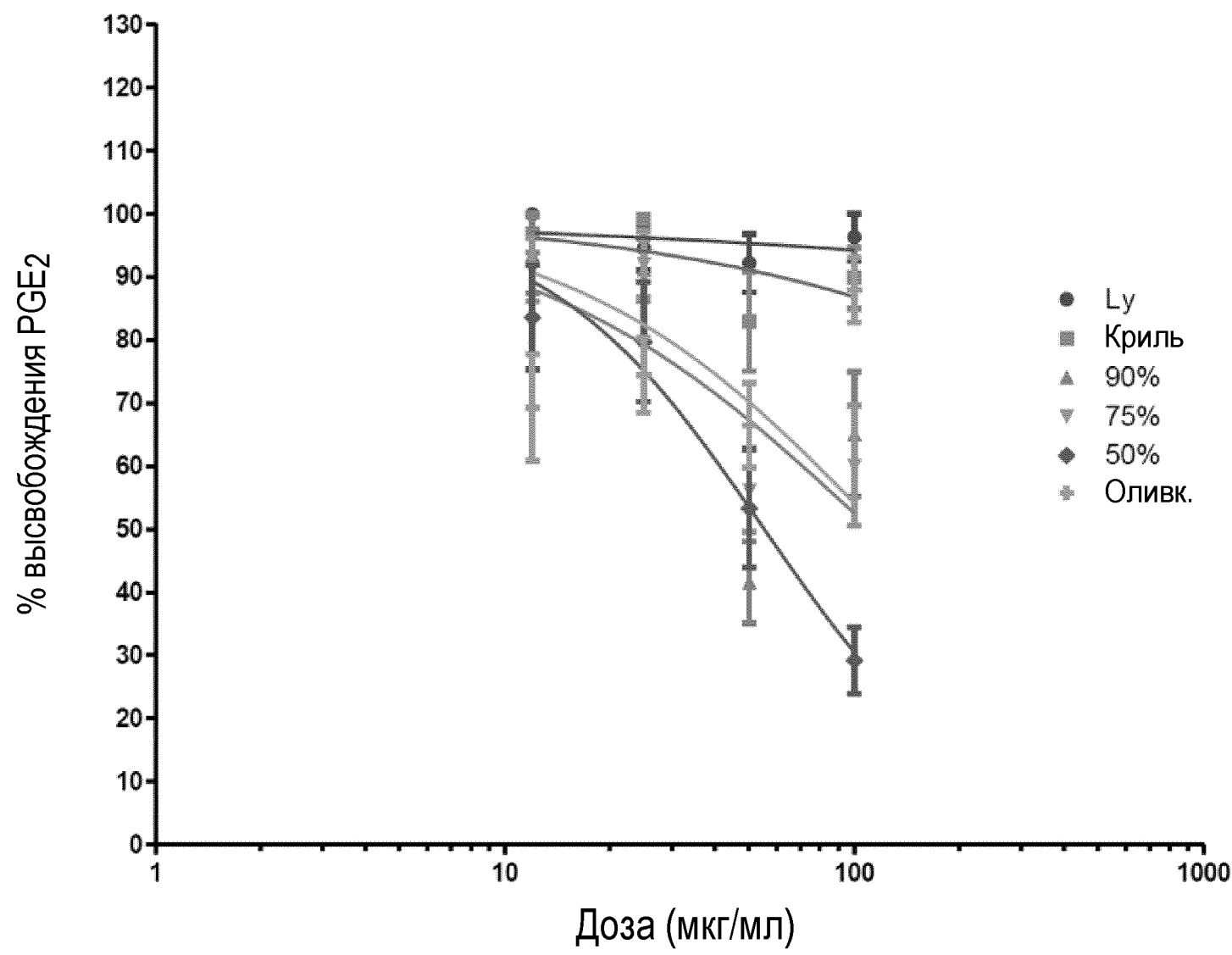


ФИГ.4А



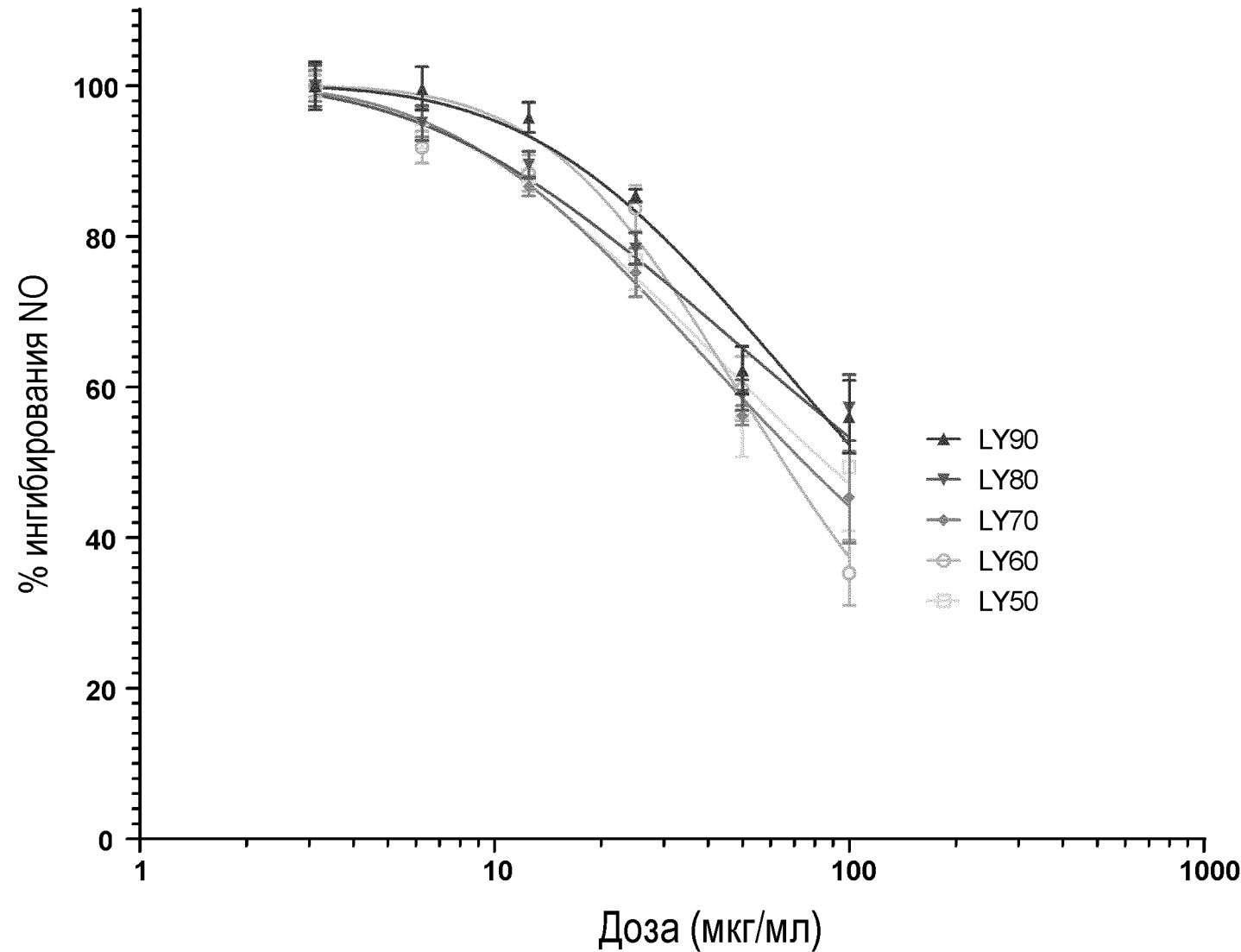
ФИГ.4В

Высвобождение PGE₂ клетками RAW264.7



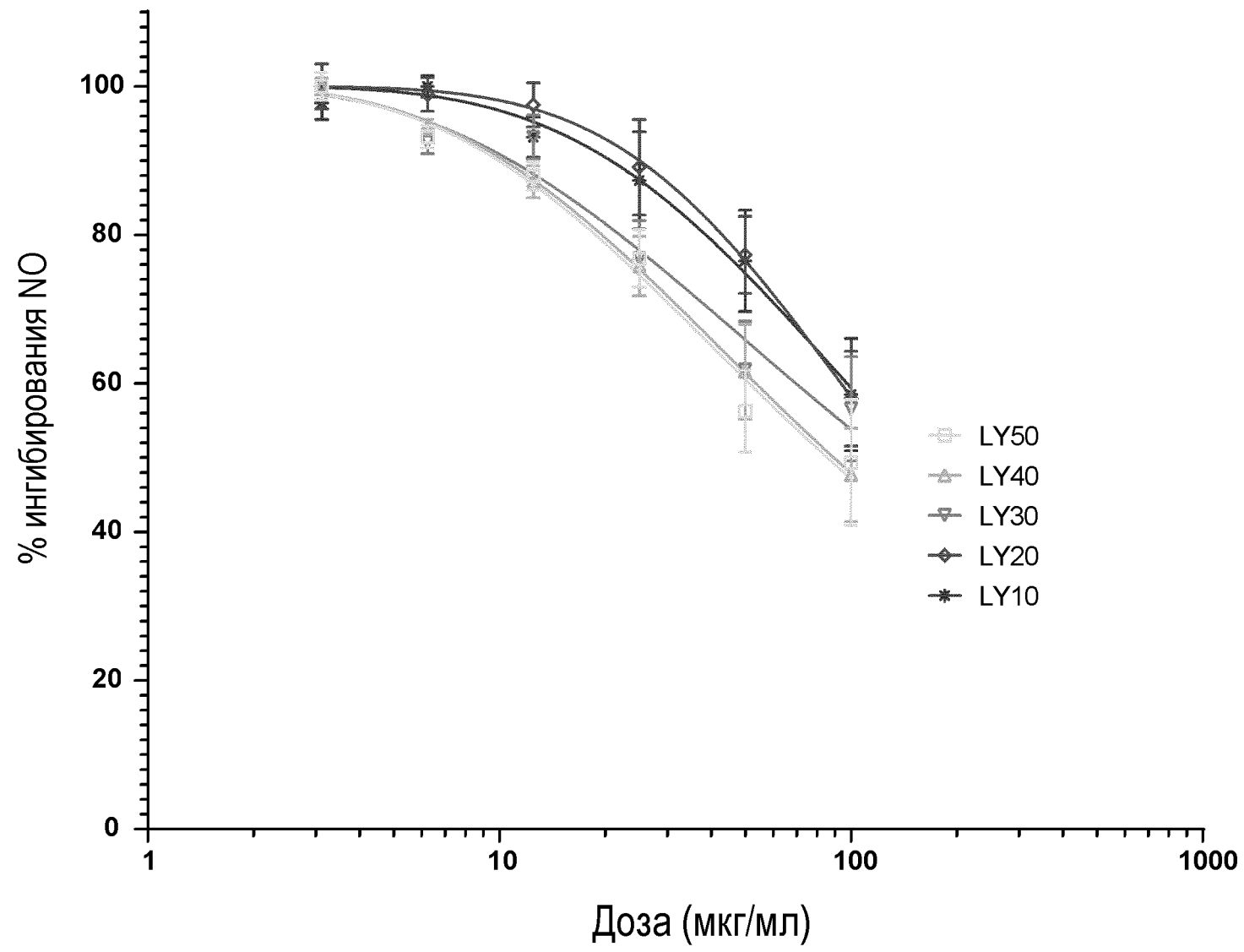
ФИГ.5А

Высвобождение NO стимулированными LPS и $INF\gamma$ клетками RAW264.7



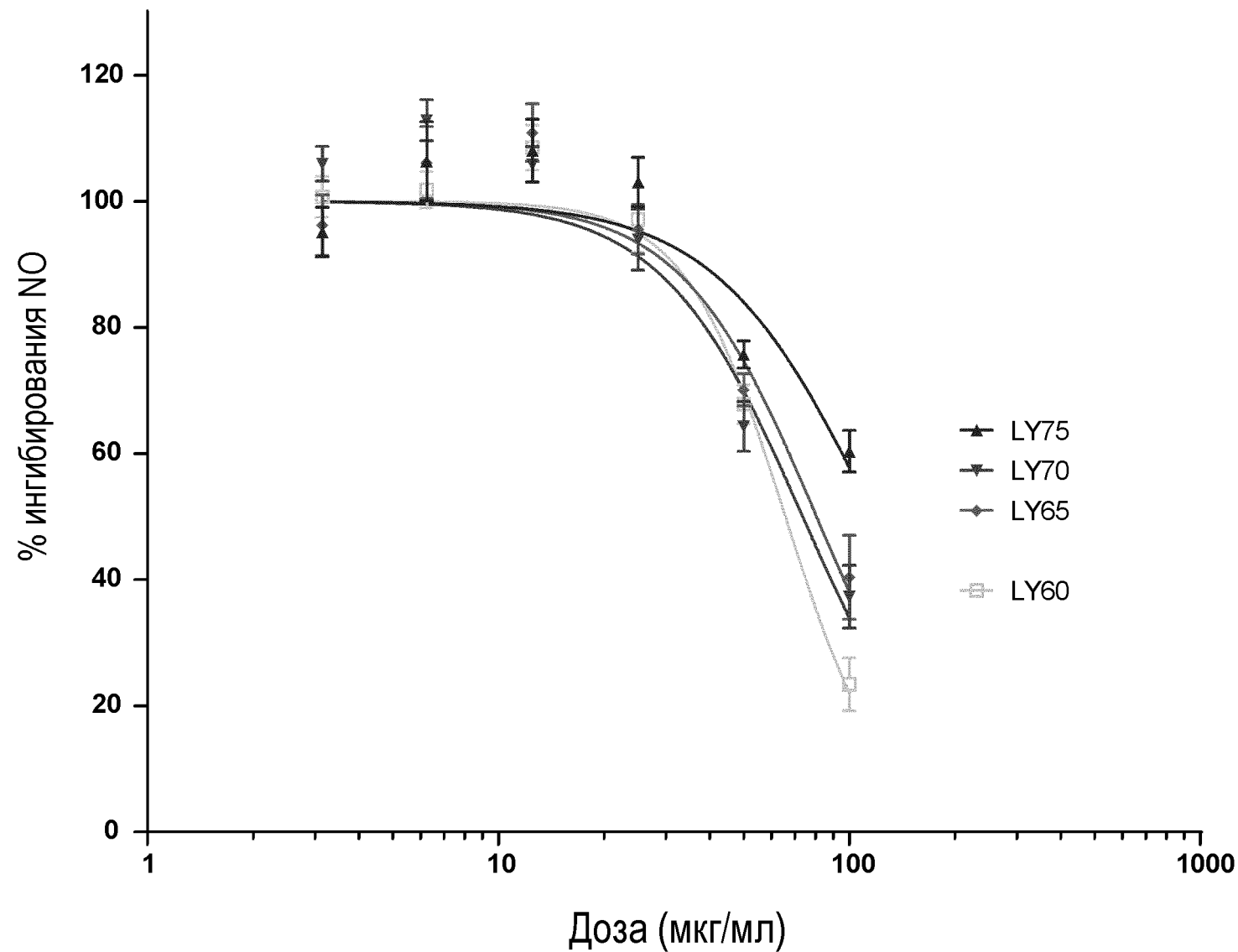
ФИГ.5В

Высвобождение NO стимулированными LPS и $\text{INF}\gamma$ клетками RAW264.7



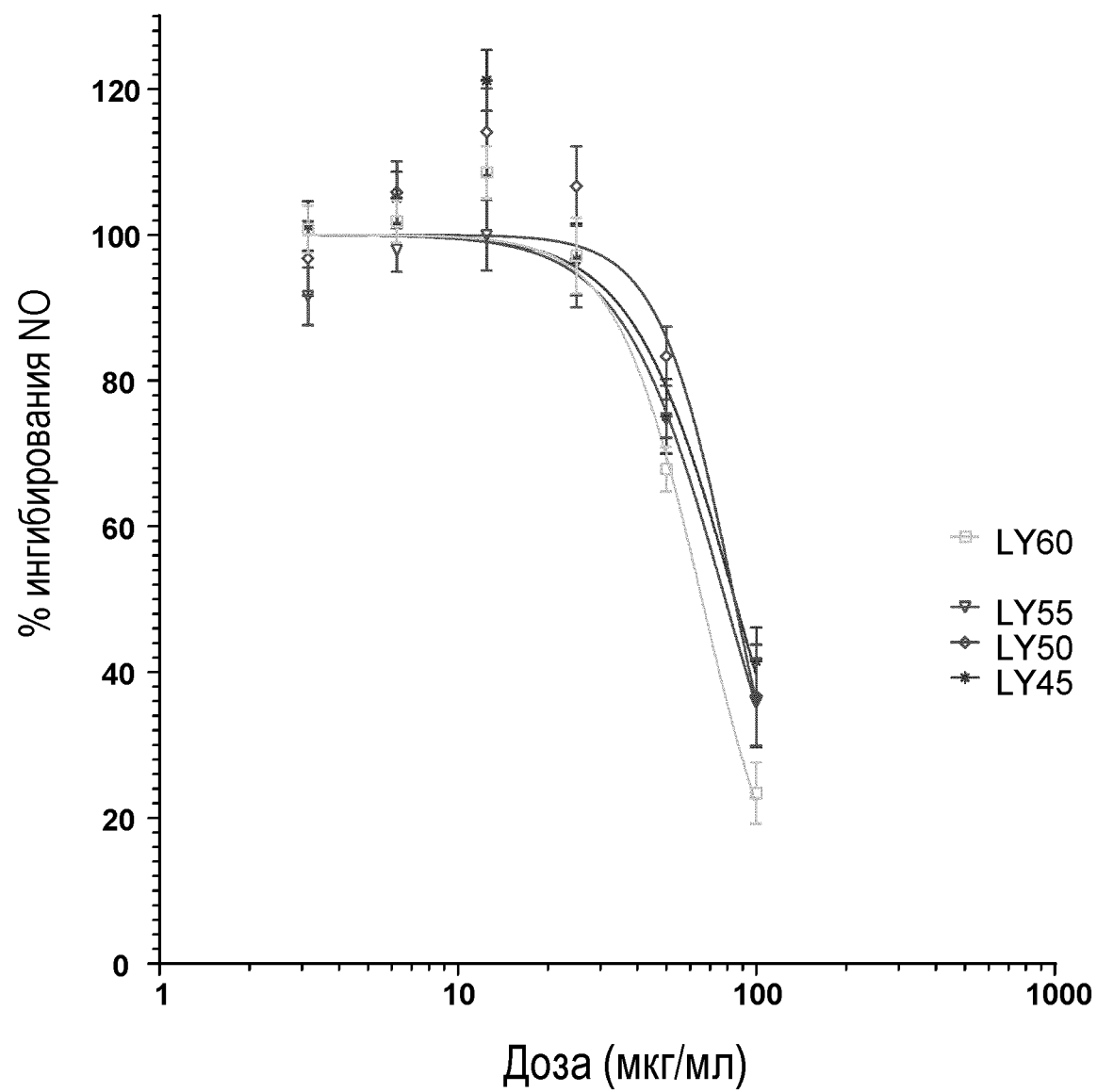
ФИГ.6А

Высвобождение NO стимулированными LPS и $INF\gamma$ клетками RAW264.7

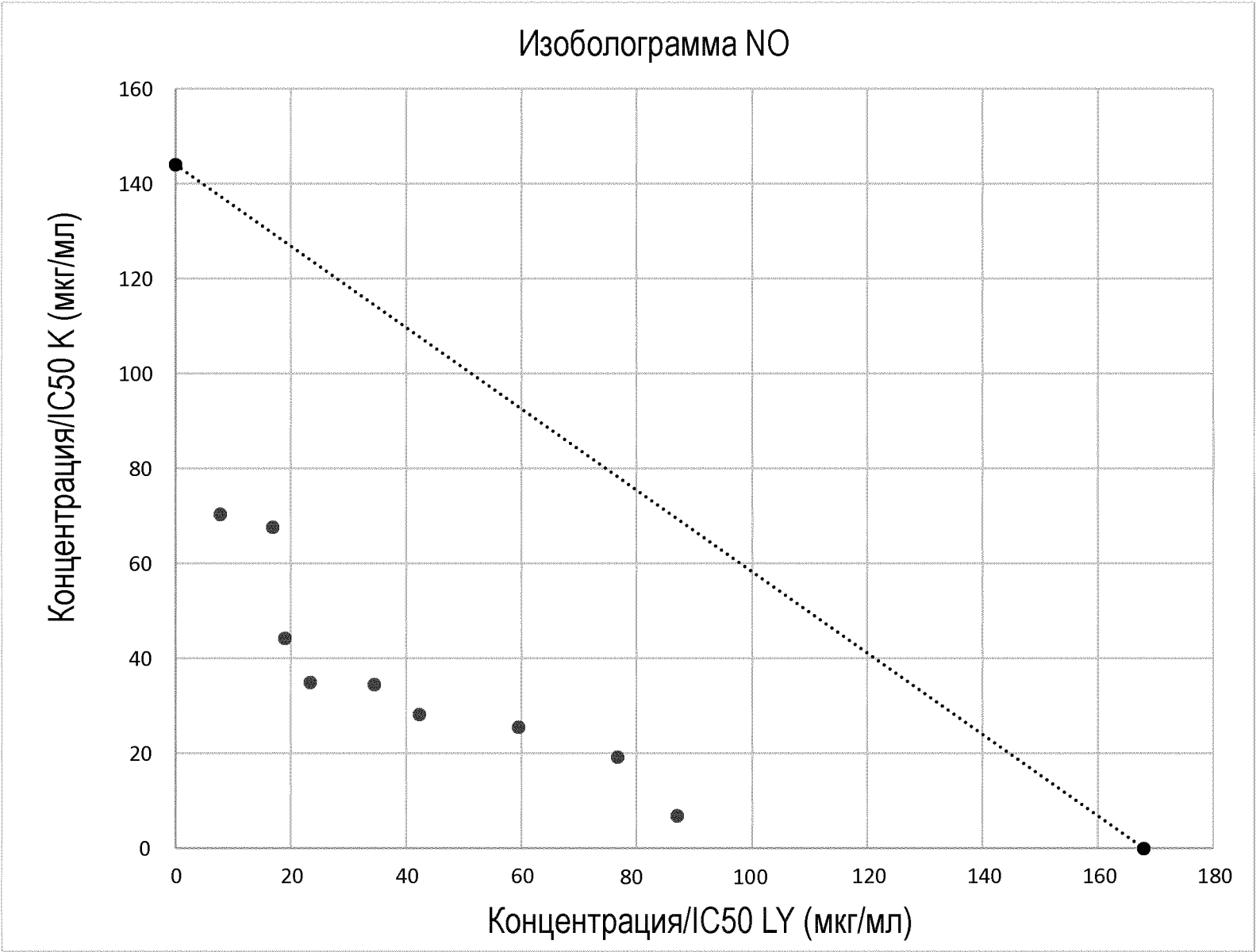


ФИГ.6В

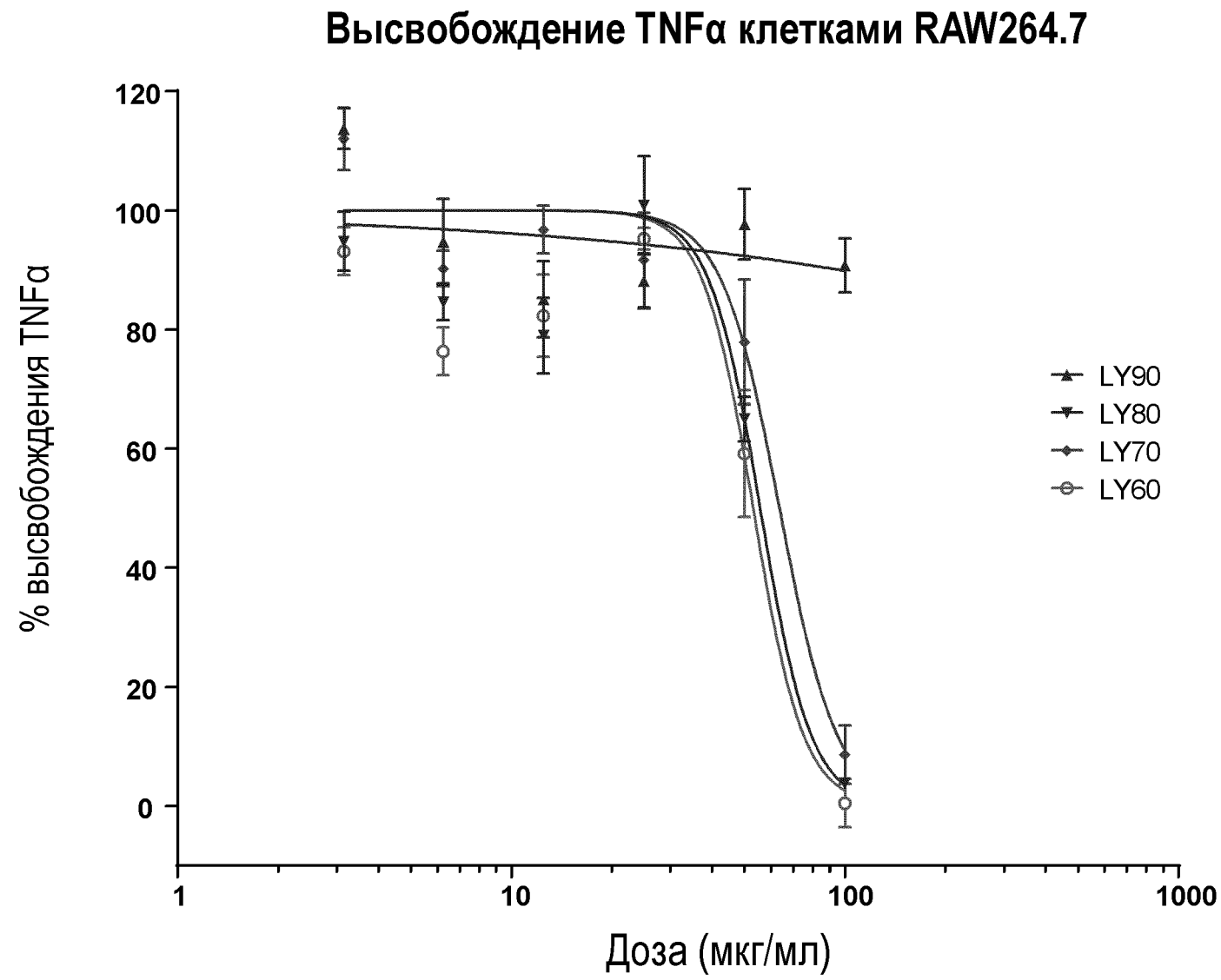
Высвобождение NO стимулированными LPS и $INF\gamma$ клетками RAW264.7



ФИГ.7

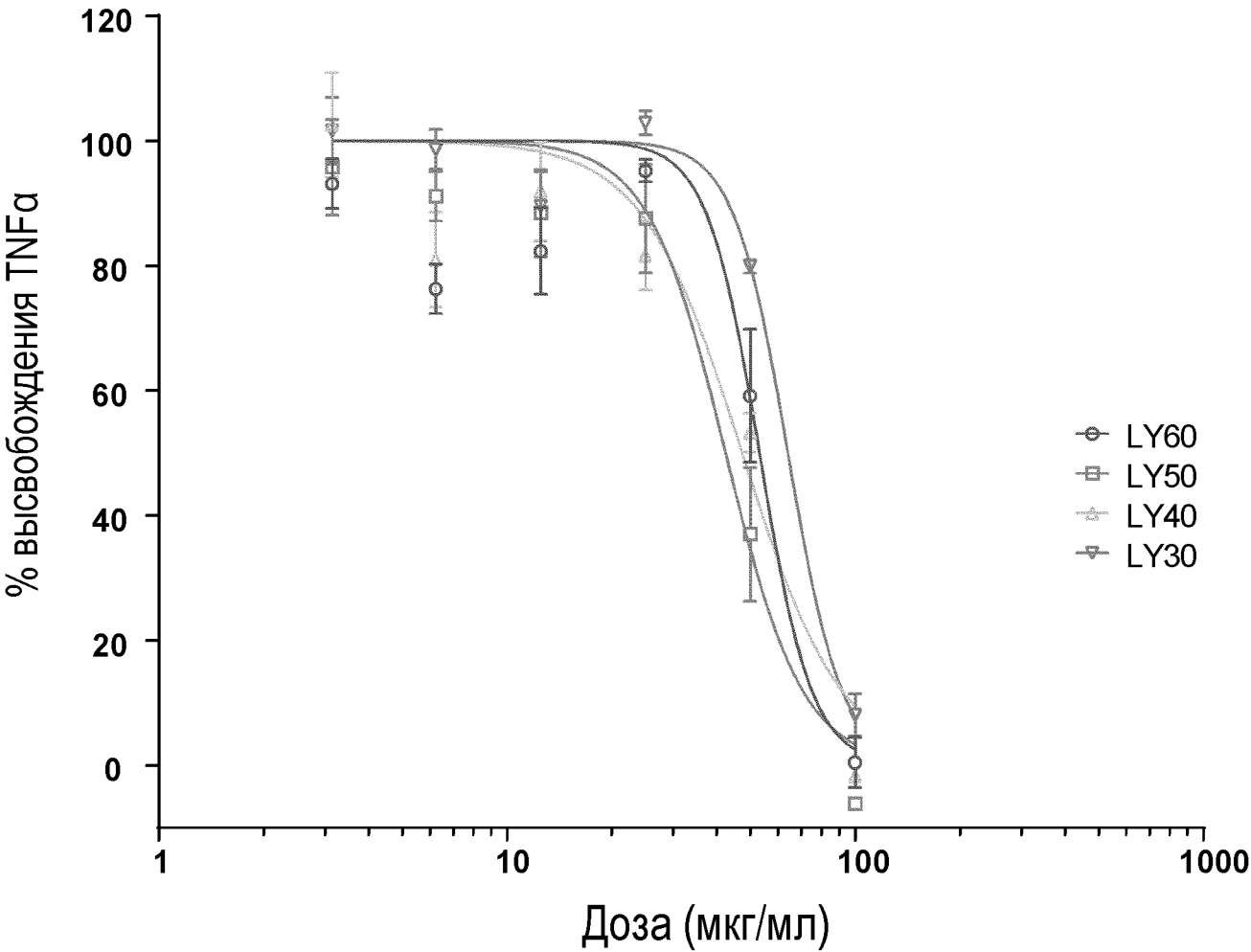


ФИГ.8А



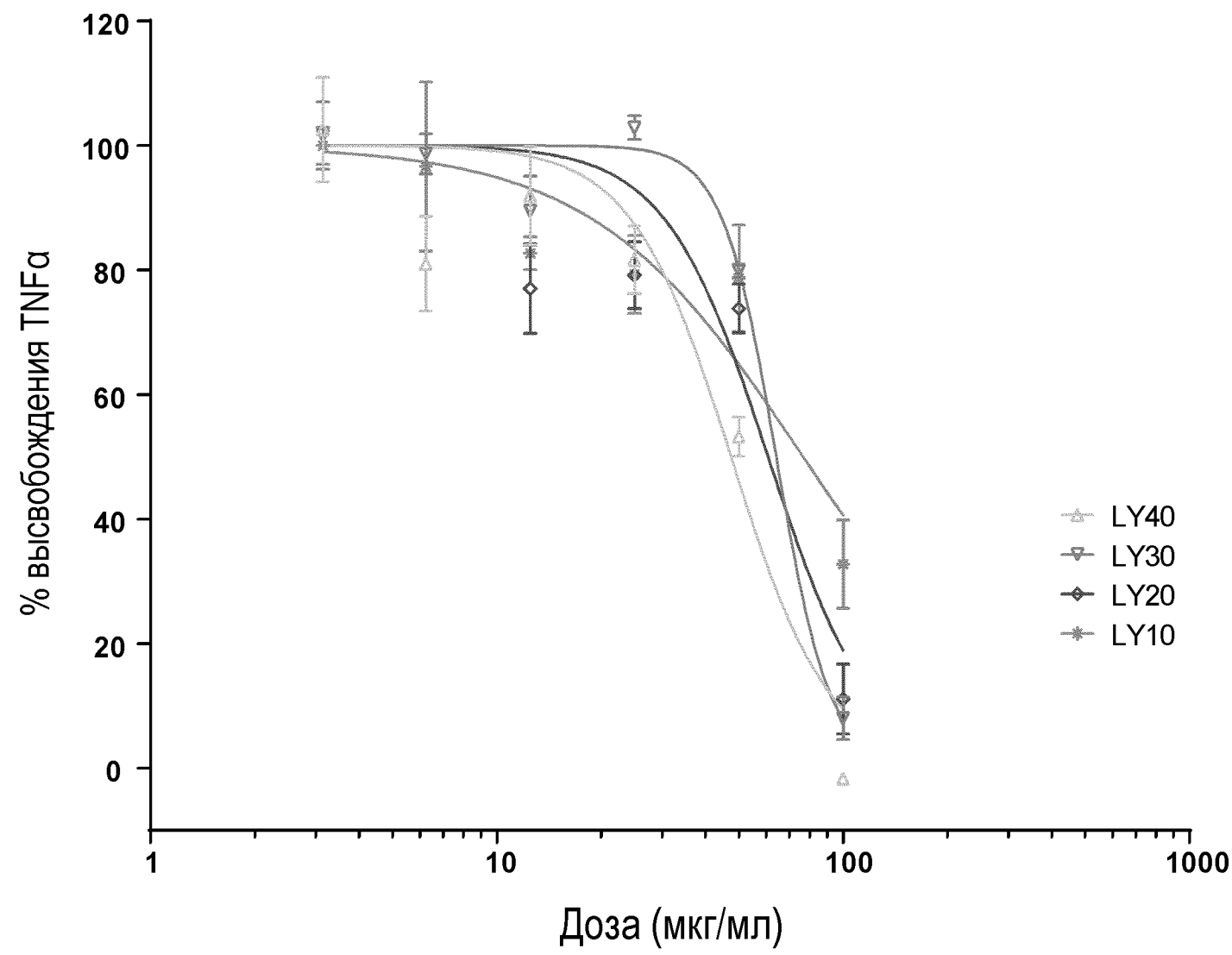
ФИГ.8В

Высвобождение TNFα клетками RAW264.7



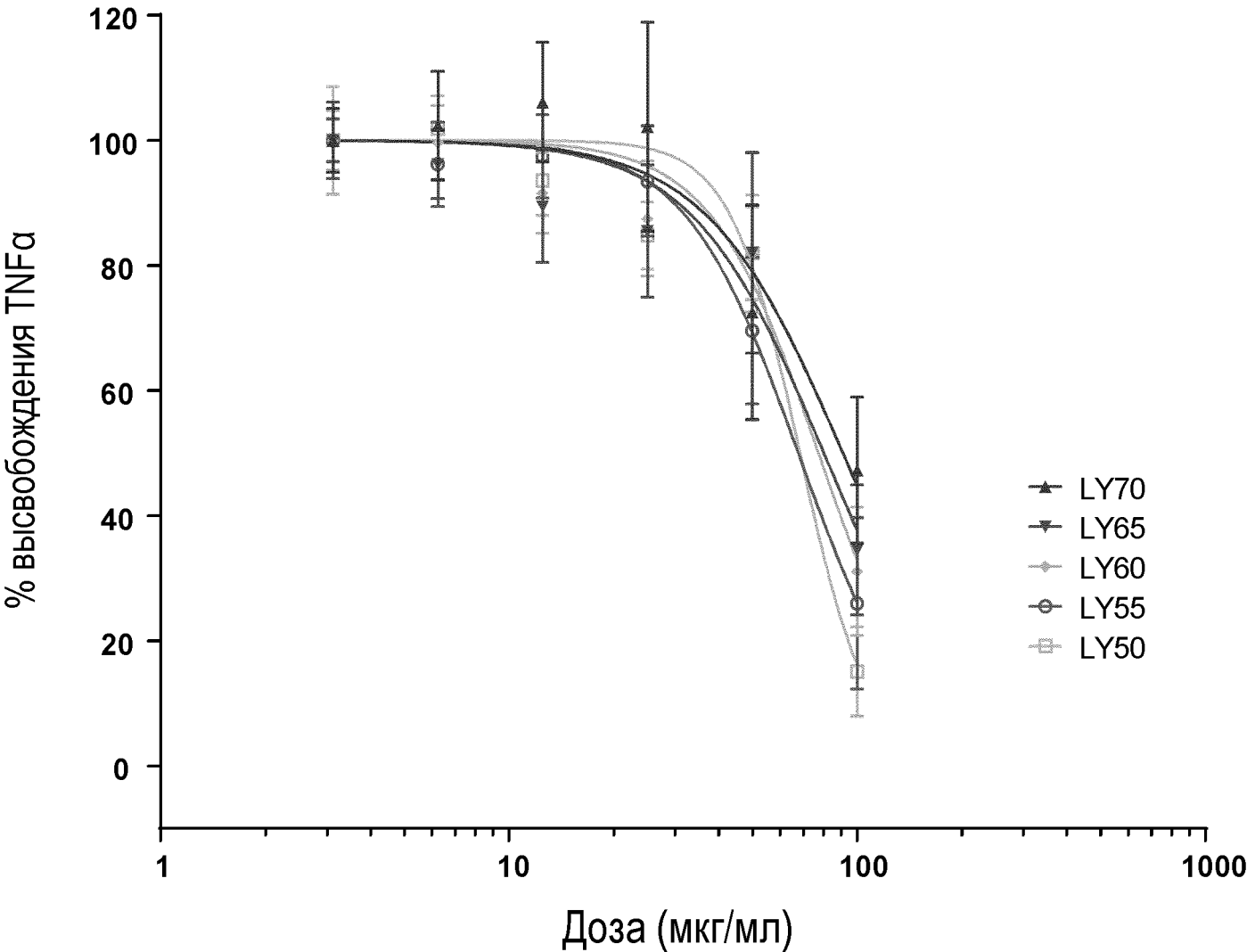
ФИГ.8С

Высвобождение TNF α клетками RAW264.7



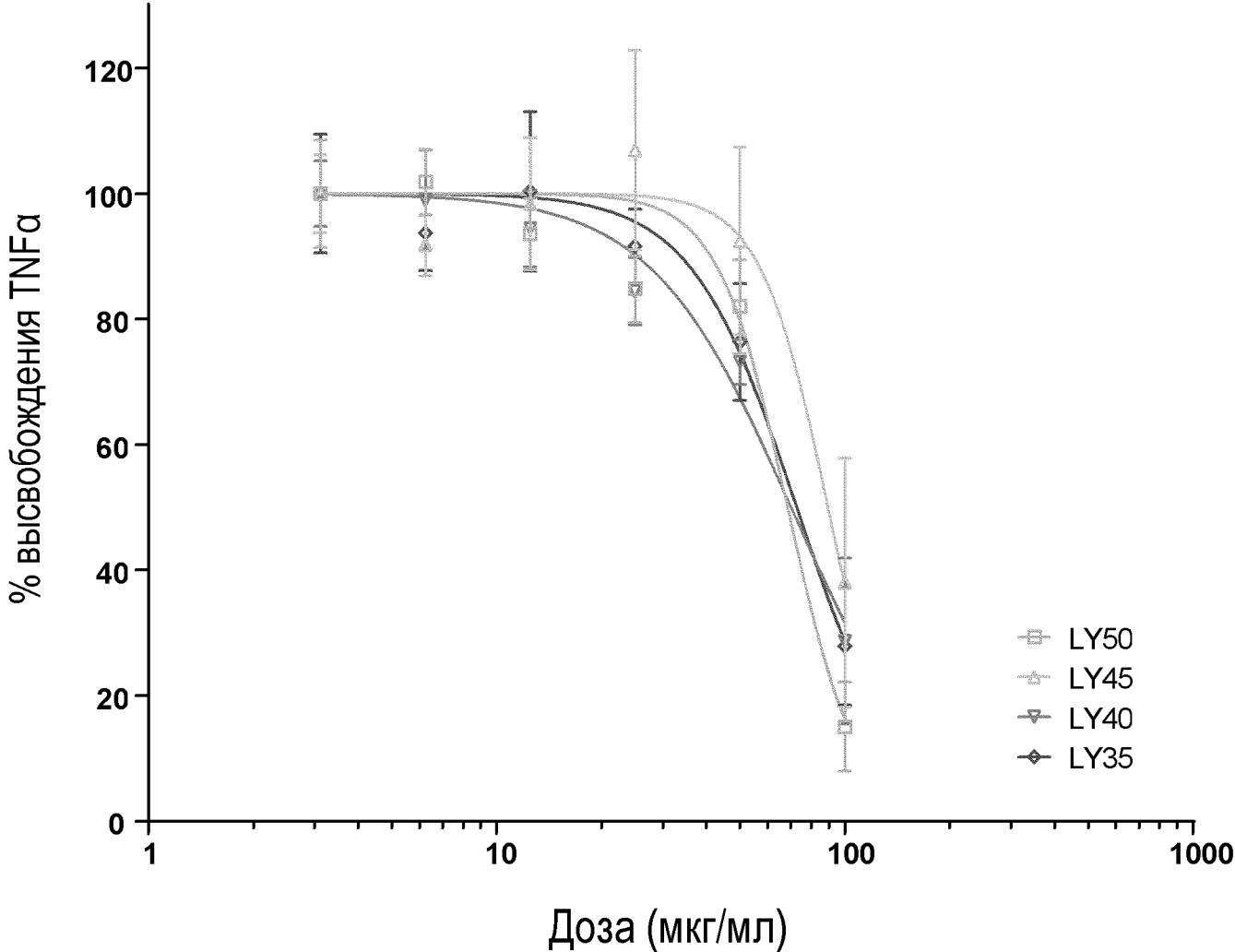
ФИГ.9А

Высвобождение TNFα клетками RAW264.7

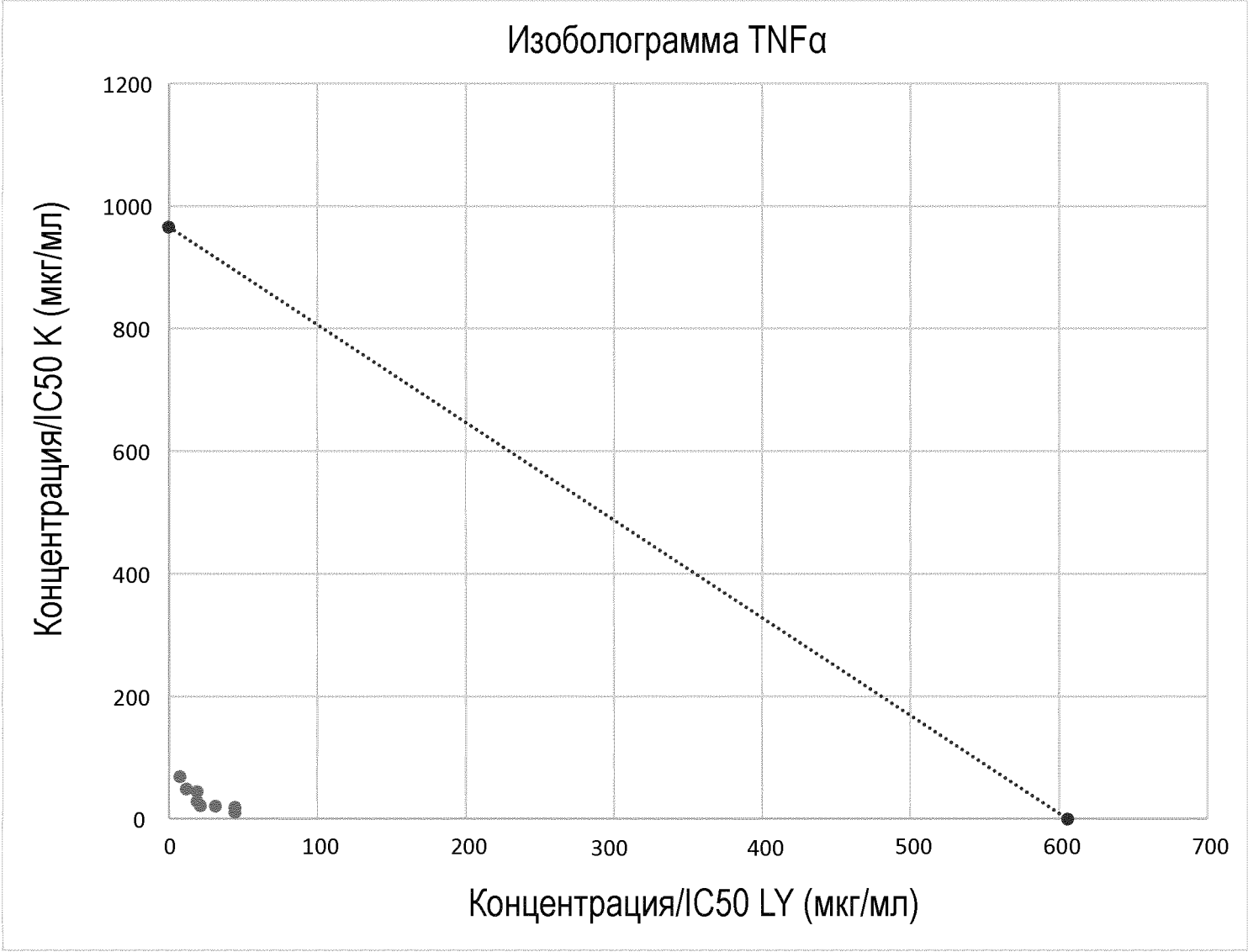


ФИГ.9В

Высвобождение TNFα клетками RAW264.7

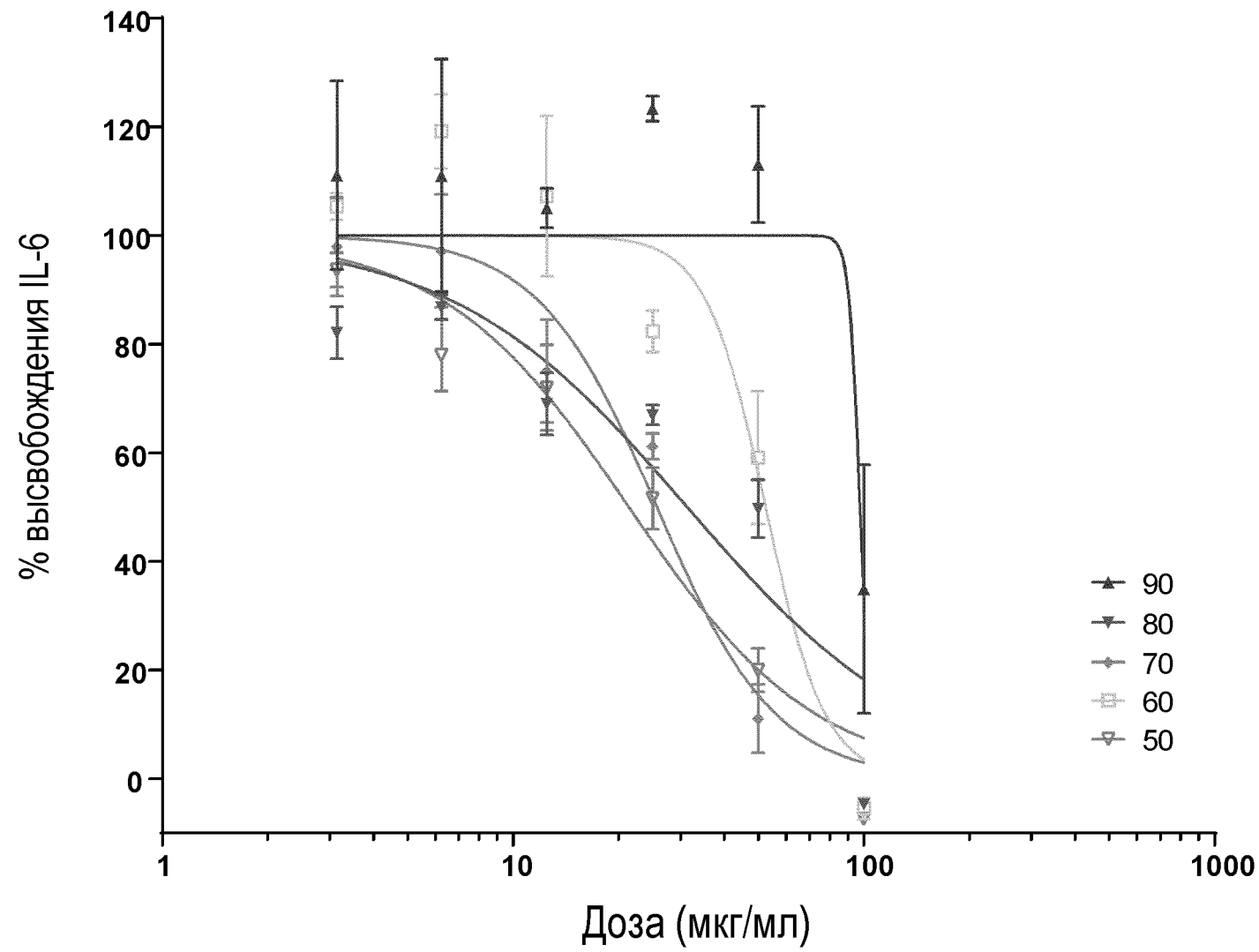


ФИГ.10



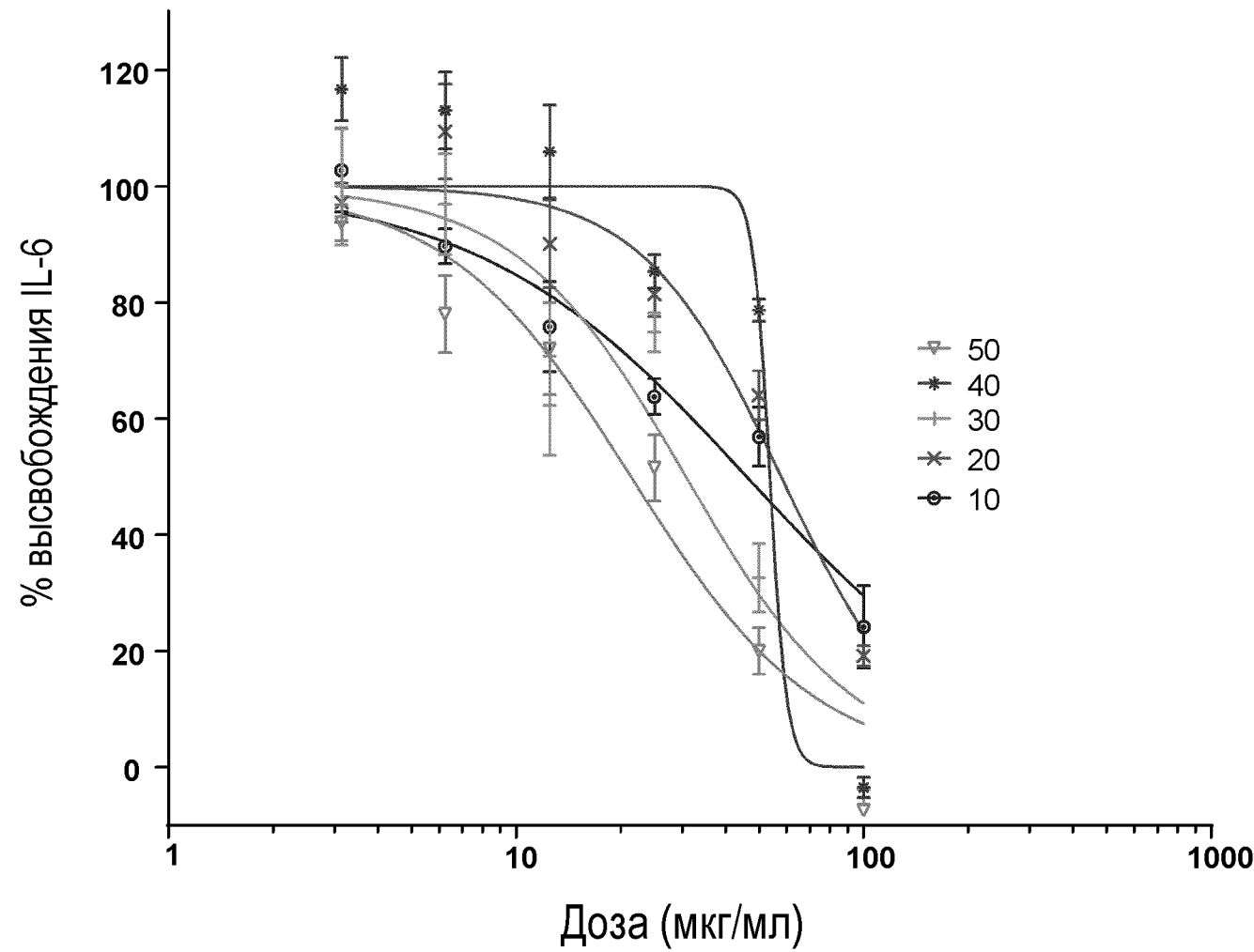
ФИГ.11А

Высвобождение IL-6 клетками RAW264.7



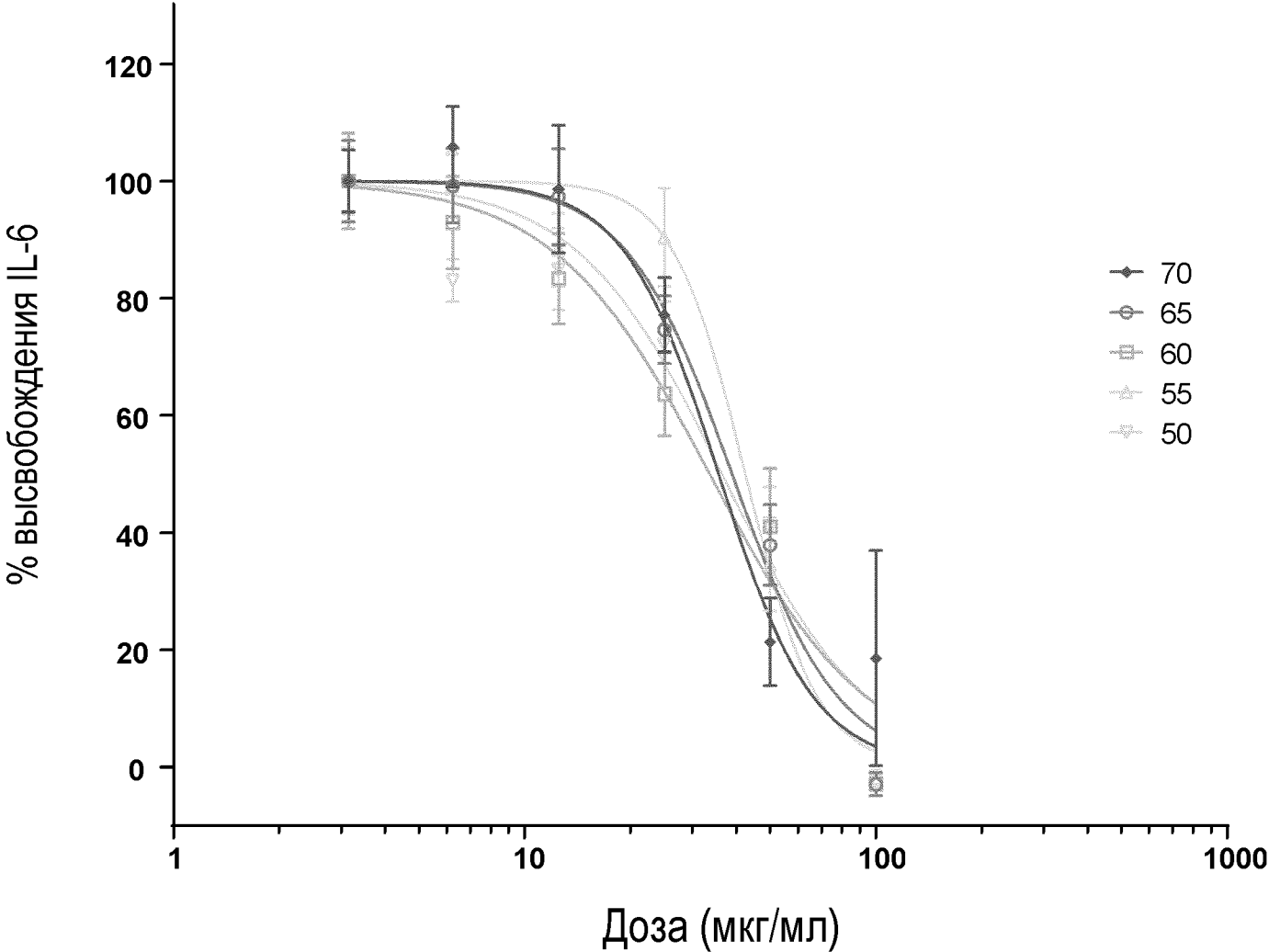
ФИГ.11В

Высвобождение IL-6 клетками RAW264.7



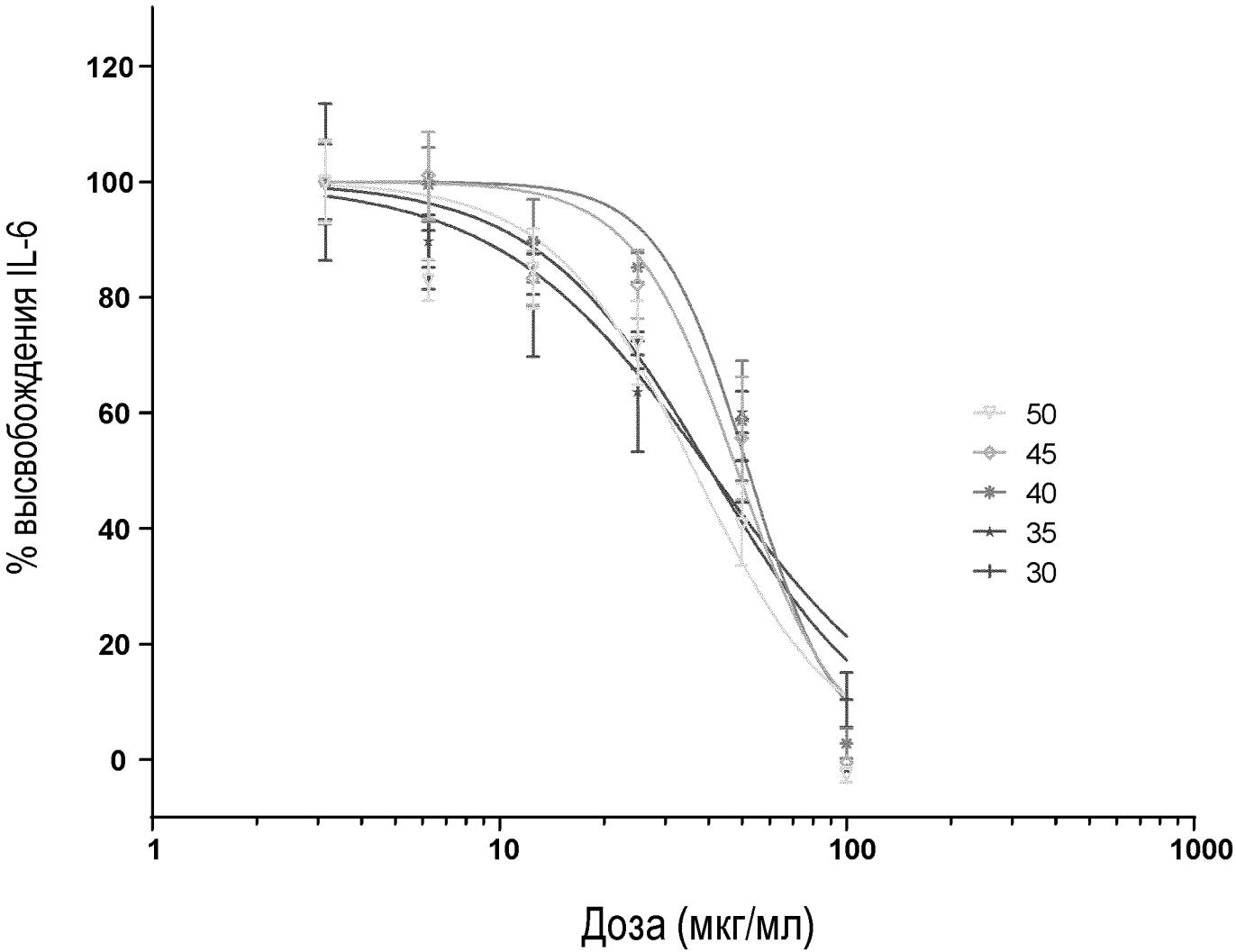
ФИГ.12А

Высвобождение IL-6 клетками RAW264.7



ФИГ.12В

Высвобождение IL-6 клетками RAW264.7



ФИГ.13

