

COMBINACIONES DE LÍPIDOS

CAMPO

[1] La presente invención se relaciona en general con combinaciones de lípidos marinos. En particular, la invención se relaciona con una combinación de lípidos obtenidos de *Perna canaliculus* y kril, composiciones y preparaciones que comprenden estas combinaciones y el uso de las combinaciones y las composiciones en la terapia. La invención también se relaciona con procesos para manufacturar aceite de kril y su uso en las combinaciones y las composiciones.

ANTECEDENTES

[2] En la presente, la cita de cualquier publicación precedente (o información derivada de ella) o cualquier contenido conocido no es ni debe interpretarse como un reconocimiento, una admisión ni una sugerencia en cualquier aspecto de que la publicación precedente (o la información derivada de ella) o el contenido conocido en cuestión formen parte del conocimiento general común en el área pertinente.

[3] La inflamación es una respuesta fisiológica adaptativa necesaria ante lesiones e infecciones, sin la cual los seres humanos y otros animales no podrían sobrevivir. Su función es eliminar la causa inicial de las lesiones, eliminar los factores ofensivos e iniciar la reparación de la estructura y la función de los tejidos. Su fase aguda temprana típicamente se caracteriza por calor, dolor, enrojecimiento e hinchazón. El resultado habitual de una inflamación aguda es la restauración y la reparación de los daños, pero las respuestas inflamatorias crónicas desproporcionadas y agudas a largo plazo bajo condiciones como la sepsis pueden ser perjudiciales.

[4] Vale destacar que la inflamación crónica ha sido asociada a la patología de numerosas enfermedades que afectan a todos los tejidos y los órganos, incluyendo osteoartritis, artritis reumática, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades respiratorias, enfermedades autoinmunes y sarcopenia. Más aun, la inflamación crónica ha sido asociada al propio proceso de envejecimiento.

[5] Como respuesta a los procesos inflamatorios, se han desarrollado diversos fármacos, de los cuales los más eficaces son los esteroides glucocorticoides que pueden suprimir las inflamaciones excesivas. Sin embargo, el uso clínico generalizado de terapias farmacológicas con esteroides está limitado debido a los efectos secundarios significativos, por lo cual éstas tienden a circunscribirse a aplicaciones a corto plazo. También se ha desarrollado una segunda clase de fármacos antiinflamatorios denominados fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID), tales como el ibuprofeno (véase la tabla 1). Se reconoce que la aspirina tiene actividad antiinflamatoria y forma parte de esta segunda clase de fármacos antiinflamatorios. Estos fármacos son más seguros que los esteroides y pueden usarse para tratar afecciones inflamatorias más crónicas como la osteoartritis.

Tabla 1. Lista de fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID) de uso habitual

Nombre genérico	Marcas
Celecoxib	Celebrex
Diclofenac	Cambia, Cataflam, Dyloject, Flector, Pennsaid, Solaraze, Voltaren, Voltaren-XR, Zipsor, Zorvolex, Arthrotec (combinación con misoprostol)

Diflunisal	Ninguna marca comercializada en la actualidad
Etodolac	Ninguna marca comercializada en la actualidad
Fenoprofeno	Nalfon
Flurbiprofeno	Ansaid
Ibuprofeno	Advil, Caldolor, Children's Advil, Children's Elixsure IB, Children's Motrin, Ibu-Tab, Ibuprohm, Motrin IB, Motrin Migraine Pain, Profen, Tab-Profen, Duexis (combinación con famotidina), Reprexain (combinación con hidrocodona), Vicoprofen (combinación con hidrocodona)
Indometacina	Indocin, Tivorbex
Ketoprofeno	Ninguna marca comercializada en la actualidad
Ketorolac	Sprix
Ácido mefenámico	Ponstel
Meloxicam	Mobic
Nabumetona	Ninguna marca comercializada en la actualidad
Naproxeno	Aleve, Anaprox, Anaprox DS, EC-Naprosyn, Naprelan, Naprosyn, Treximet (combinación con sumatriptan), Vimovo (combinación con esomeprazol)
Oxaprozina	Daypro
Piroxicam	Feldene
Sulindac	Clinoril
Tolmetina	Ninguna marca comercializada en la actualidad

[6] Las prostaglandinas tienen una participación fundamental en la respuesta inflamatoria, ya que su presencia se incrementa significativamente en el tejido

inflamado y contribuyen al dolor y la fiebre al incrementar la temperatura y dilatar los vasos sanguíneos, lo que causa enrojecimiento e hinchazón en el sitio de liberación. Los NSAID son inhibidores competitivos de los sitios de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), por lo que disminuyen la síntesis de prostaglandinas. Al disminuirse la producción de prostaglandinas, los NSAID ayudan a aliviar el malestar de la fiebre y reducen la inflamación y el dolor asociado. Los NSAID suelen usarse para tratar afecciones agudas o crónicas caracterizadas por dolor e inflamación, por ejemplo, osteoartritis, artritis reumática, dolor de cabeza, migraña o fiebre. Sin embargo, los NSAID también tienen problemas considerables con relación a la seguridad y pueden presentar toxicidad gastrointestinal, renal o cardiovascular. Por ejemplo, la aspirina puede inducir hemorragias gástricas cuando se la usa durante varios días, y en Julio de 2015, la FDA repitió una advertencia previa sobre los peligros para el corazón de los analgésicos NSAID comunes, excluyendo la aspirina. Éstos abarcan ibuprofeno (Advil, Motrin), naproxeno (Aleve) y los NSAID que se comercializan bajo receta.

[7] Por consiguiente, existe la necesidad de terapias antiinflamatorias alternativas adicionales.

RESUMEN

[8] Se ha descubierto que determinadas combinaciones de lípidos de mejillón y aceite de kril pueden proveer ventajosamente un efecto inhibidor aditivo o sinérgico contra la producción o la liberación de uno o más mediadores proinflamatorios que participan en el proceso inflamatorio. En algunas formas de realización, las combinaciones de la presente invención pueden proveer nuevos tratamientos terapéuticos para trastornos con componentes inflamatorios o

caracterizados por inflamación. En algunas formas de realización, las combinaciones de la presente invención pueden proveer nuevos tratamientos terapéuticos para el dolor, por ejemplo, dolor asociado a inflamación.

[9] Por consiguiente, en un aspecto, se provee una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril. La combinación de lípidos de mejillón y aceite de kril es apta para una administración separada o simultánea en un sujeto. En algunas formas de realización, la combinación es una composición que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril.

[10] En otro aspecto, se provee una combinación que consiste o consiste esencialmente en lípidos de mejillón y aceite de kril. La combinación de lípidos de mejillón y aceite de kril es apta para una administración separada o simultánea en un sujeto. En algunas formas de realización, la combinación es una composición que consiste o consiste esencialmente en lípidos de mejillón y un aceite de kril.

[11] En otro aspecto, se provee una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril para usar en terapia. En algunas formas de realización, se provee una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril para usar en el tratamiento de la inflamación en un sujeto. También se provee una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril para usar en el tratamiento del dolor en un sujeto. La combinación de lípidos de mejillón y aceite de kril es apta para una administración separada o simultánea en un sujeto. En algunas formas de realización, la combinación es una composición que comprende lípidos de mejillón y un aceite de kril.

[12] En otro aspecto, en la invención se provee un método para tratar la inflamación en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle al sujeto

una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril. En la invención también se provee un método para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle al sujeto una combinación que comprende lípidos de mejillón y aceite de kril. La combinación de lípidos de mejillón y aceite de kril es apta para una administración separada o simultánea en un sujeto. En algunas formas de realización, la combinación es una composición que comprende lípidos de mejillón y un aceite de kril.

[13] En otro aspecto, en la invención se provee el uso de lípidos de mejillón y aceite de kril en la manufactura de un medicamento combinado para tratar la inflamación. En la invención también se provee el uso de lípidos de mejillón y aceite de kril en la manufactura de un medicamento combinado para tratar el dolor. El medicamento es apto para una administración separada o simultánea. En algunas formas de realización, la combinación es una composición que comprende lípidos de mejillón y un aceite de kril.

[14] En otro aspecto, en la invención se provee un agente combinado para tratar la inflamación, donde la combinación comprende lípidos de mejillón y aceite de kril. En la invención también se provee un agente combinado para tratar el dolor, donde la combinación comprende lípidos de mejillón y aceite de kril. Los lípidos de mejillón y el aceite de kril son aptos para una administración separada o simultánea en un sujeto. En algunas formas de realización, el agente combinado es una composición que comprende lípidos de mejillón y un aceite de kril.

[15] En algunas formas de realización, los lípidos de mejillón toman la forma de polvo de mejillón seco. En otras formas de realización, los lípidos de mejillón toman la forma de extractos lipídicos obtenidos de mejillón (“extractos lipídicos de mejillón”). En otras formas de realización, los lípidos de mejillón pueden tomar

la forma de combinaciones o composiciones de polvo de mejillón seco y extracto lipídico de mejillón.

[16] En algunas formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de fosfolípidos en el rango aproximado de 40%-99% p/p, y en otras formas de realización, tiene un contenido de fosfolípidos en el rango aproximado de 50%-99% p/p, tal como aproximadamente 60%-80% p/p.

[17] En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden ser útiles para tratar uno o más trastornos con componentes inflamatorios en un sujeto, por lo cual la inhibición de una o más moléculas proinflamatorias resulta terapéuticamente beneficiosa. En algunas formas de realización, las combinaciones pueden ser apropiadas para tratar uno o más trastornos crónicos.

[18] En algunas formas de realización, por ejemplo, para tratar una inflamación crónica, las combinaciones pueden eliminar, impedir o mitigar de otro modo la extensión, la gravedad o la duración de uno o más efectos adversos asociados a los NSAID disponibles habitualmente.

[19] En otro aspecto, se provee un proceso para preparar aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 50% o más, tal como aproximadamente 60% o más, que comprende los siguientes pasos:

(a) poner en contacto un material de biomasa de kril de partida con una mezcla de CO₂ y etanol para extraer un aceite de kril; y

(b) poner en contacto el aceite de kril con CO₂ para extraer al menos una proporción de los componentes lipídicos no polares, de modo tal que el aceite tenga un contenido de fosfolípidos de al menos el 50% p/p.

[20] En algunas formas de realización, el aceite de kril obtenido con este proceso tiene un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 60% p/p o más, tal como

al menos aproximadamente 65% p/p, 70% p/p, 75% p/p, 80% p/p, 85% p/p o 90% p/p.

[21] La invención también se relaciona con procesos para incrementar el contenido de fosfolípidos en un aceite de kril.

[22] Por lo tanto, en otro aspecto, se provee un proceso para incrementar el contenido de fosfolípidos en un aceite de kril con un contenido de fosfolípidos inferior a 50% p/p hasta 50% p/p o más, que comprende el paso de poner en contacto un aceite de kril con un contenido de fosfolípidos inferior a 50% p/p con CO₂ para eliminar selectivamente los componentes lipídicos no polares.

[23] En algunas formas de realización, el aceite de kril preliminar tiene un contenido de fosfolípidos inferior a aproximadamente 50% p/p, por ejemplo, inferior a aproximadamente 40% o inferior a aproximadamente 30% p/p o 20% p/p. En algunas formas de realización, el aceite enriquecido obtenido tiene un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 55% p/p, al menos aproximadamente 60% p/p, al menos aproximadamente 65% p/p, al menos aproximadamente 70% p/p, al menos aproximadamente 75% p/p, al menos aproximadamente 80% p/p, al menos aproximadamente 85% p/p o al menos aproximadamente 90% p/p.

[24] En otra forma de realización, se provee aceite de kril con un contenido en fosfolípidos de aproximadamente 50% p/p o más (por ejemplo, $\geq 60\%$ p/p), que ha sido obtenido con un proceso como el descrito.

[25] En otras formas de realización, se provee aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 50% p/p, 60% p/p o más para usar en combinaciones y composiciones como las descritas en la presente.

FIGURAS

[26] En la figura 1A se representa gráficamente el efecto de inhibición del NO en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo, aceite de oliva o N-(3-(aminometil)bencil)acetamidina (1400W).

[27] En la figura 1B se representa gráficamente la liberación de NO (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo, aceite de oliva o N-(3-(aminometil)bencil)acetamidina (1400W).

[28] En la figura 2A se representa gráficamente el efecto de inhibición del TNF α en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo, aceite de oliva o dexametasona.

[29] En la figura 2B se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo o aceite de oliva.

[30] En la figura 3A se representa gráficamente el efecto de inhibición de la IL-6 en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo, aceite de oliva o dexametasona.

[31] En la figura 3B se representa gráficamente la liberación de IL-6 (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo o aceite de oliva.

[32] En la figura 4A se representa gráficamente el efecto de inhibición de la PGE₂ en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo, aceite de oliva o diclofenaco.

[33] En la figura 4B se representa gráficamente la liberación de PGE₂ (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril, cada extracto lipídico de mejillón y aceite de kril por sí solo o aceite de oliva.

[34] En la figura 5A se representa gráficamente la liberación de NO (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY50).

[35] En la figura 5B se representa gráficamente la liberación de NO (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY50-LY10).

[36] En la figura 6A se representa gráficamente la liberación de NO (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en

presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY75-LY60).

[37] En la figura 6B se representa gráficamente la liberación de NO (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY60-LY45).

[38] En la figura 7 se provee un isoblograma para la inhibición sinérgica del NO en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY10).

[39] En la figura 8A se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY60).

[40] En la figura 8B se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY60-LY30).

[41] En la figura 8C se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY40-LY10).

[42] En la figura 9A se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY70-LY55).

[43] En la figura 9B se representa gráficamente la liberación de TNF α (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY50-LY35).

[44] En la figura 10 se provee un isoblograma para la inhibición sinérgica del TNF α en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY10).

[45] En la figura 11A se representa gráficamente la liberación de IL-6 (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY50).

[46] En la figura 11B se representa gráficamente la liberación de IL-6 (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY50-LY10).

[47] En la figura 12A se representa gráficamente la liberación de IL-6 (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY70-LY50).

[48] En la figura 12B se representa gráficamente la liberación de IL-6 (%) en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IF γ) en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY50-LY30).

[49] En la figura 13 se provee un isoblograma para la inhibición sinérgica de la IL-6 en presencia de diversas concentraciones de combinaciones de extractos lipídicos de mejillón y aceites de kril (LY90-LY10).

DESCRIPCIÓN

[50] En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que del contexto surja lo contrario, el verbo “comprender” y sus conjugaciones implican la inclusión de uno o más elementos o pasos, pero no la exclusión de cualquier cantidad de elementos o pasos diferentes.

[51] En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que del contexto surja lo contrario, el verbo “consistir” modificado por el adverbio “esencialmente” denota que los uno o más elementos mencionados son esenciales (es decir, necesarios) para la invención. En este contexto, se permite la presencia de otros elementos no mencionados que no afecten materialmente las características de la invención, pero se excluyen aquellos elementos no especificados que pudieran afectar las características básicas y novedosas definidas por la invención.

[52] Los determinativos “uno” y “el” en singular también pueden tener una denotación en plural, a menos que del contexto surja claramente lo contrario.

[53] El término “invención” abarca todo el contenido, los aspectos, las formas de realización y los ejemplos que se proveen en la presente.

[54] Según se lo emplea en la presente, “aproximadamente” denota una variación de hasta 10%, 5% o 2%-1% en una cantidad, un valor o un parámetro establecido, y abarca las tolerancias aceptadas en la técnica. En referencia a un valor entero establecido, “aproximadamente” puede abarcar un rango de variación equivalente a un número entero, por ejemplo, “50%” puede abarcar

entre 49% y 51%. Cuando se lo aplica a un rango de valores, abarca tanto el límite superior como el límite inferior.

[55] A menos que del contexto surja lo contrario, las características que se describen más adelante pueden aplicarse independientemente a cualquier aspecto o forma de realización.

[56] Según se los emplea en la presente, los “lípidos de mejillón” hacen referencia a componentes lipídicos extraídos u obtenidos de mejillones de labios verdes (o concha verde) de Nueva Zelanda (NZGL; *Perna canaliculus*). Los lípidos de mejillón pueden comprender uno o más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), por ejemplo, ALA, ETA, EPA o DHA, esteroides, ésteres de esteroides, triglicéridos, lípidos carotenoides no polares u otros componentes de la carne de mejillón (NZGL). Los lípidos de mejillón pueden tomar la forma de polvo de mejillón seco o fracciones lipídicas extraídas de carne de mejillón (“extractos lipídicos de mejillón”). También se prevé que los “lípidos de mejillón” abarquen mezclas de polvo de mejillón y extractos lipídicos de mejillón, por ejemplo, lípidos de mejillón complementados con la adición de polvo de mejillón, o viceversa. En algunas formas de realización, los lípidos de mejillón son fracciones lipídicas aisladas.

[57] Un polvo lipídico de mejillón puede prepararse a partir de carne de mejillón NZGL fresca (cruda), congelada o tratada térmicamente con cualquier método de secado (por ejemplo, secado por congelación, secado instantáneo o secado al vacío) o pulverización apropiado. Además de los ácidos grasos (incluyendo ALA, ETA, EPA y DHA), el polvo de mejillón obtenido al secar la carne de mejillón también contiene otros componentes potencialmente beneficiosos, por ejemplo, minerales, aminoácidos, péptidos, proteínas o glicosaminoglicanos (por ejemplo,

condroitin-4-sulfato o condroitin-6-sulfato). Los procesos para preparar polvo de mejillón son conocidos en la técnica.

[58] Los extractos lipídicos de mejillón pueden obtenerse a partir de carne de mejillón NZGL (por ejemplo, en polvo, secada por aspersion o pulverizada) fresca (cruda), congelada, tratada con calor o secada (por ejemplo, por congelación, instantáneamente o al vacío) con cualquier método apropiado, por ejemplo, extracción con solventes (por ejemplo, acetona o etanol; véase, por ejemplo, WO2005073354 A1, cuyo contenido se incorpora como referencia), tratamiento enzimático (véase, por ejemplo, WO2006128244, cuyo contenido se incorpora como referencia) o extracción con fluido supercrítico. En algunas formas de realización, los extractos lipídicos de mejillón se obtienen ventajosamente mediante una extracción con CO₂ supercrítico a partir de carne de mejillón seca (por ejemplo, deshidratada por congelación y opcionalmente estabilizada para evitar la oxidación). Se describe un ejemplo de un método para obtener extractos lipídicos de mejillón en WO 97/09992 A1, cuyo contenido se incorpora como referencia. En la técnica se conocen otros métodos.

[59] En formas de realización preferidas, los procesos se realizan bajo condiciones tales que los componentes beneficiosos, tales como los ácidos grasos, no se destruyen sustancialmente y se retienen significativamente, por ejemplo, procesamiento en frío.

[60] Un ejemplo de un extracto lipídico de mejillón se obtuvo según el proceso descrito en WO 97/09992 A1, y también se lo conoce como PCSO-524® (Pharmalink International Limited, Hong Kong). PCSO-524® contiene vitamina E agregada (0,15% p/p, agregada como conservante antioxidante), comprende una combinación de ácidos grasos libres, triglicéridos, ésteres de estero, lípidos

no polares y carotenoides (Sinclair, A. J., et al., 2000) y es una fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), así como otros ácidos grasos de cadena larga, por ejemplo, ácido 5,9,12,15-octadecatetraenoico, ácido 5,9,12,16-nonadecatetraenoico, ácido 7,11,14,17-eicotetraenoico o ácido 5,9,12,15,18-heneicosapentaenoico. PCSO-254® (formulado con aceite de oliva y encapsulado en una forma de dosificación oral) se comercializa bajo las marcas Lyprinol® y Omega XL® (para consumo humano) y Antinol® (para perros y gatos).

[61] En algunas formas de realización, el extracto lipídico de mejillón usado en las combinaciones de la invención está formulado con vitamina E (agregada, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 0,2% p/p, 0,15% p/p, 0,1% p/p, 0,05% p/p, aproximadamente 0,03% p/p o aproximadamente 0,01% p/p). En algunas formas de realización, los lípidos de mejillón se emplean en forma de PCSO-254®, es decir, un extracto lipídico de mejillón con 0,15% p/p de vitamina E. En algunas formas de realización, los lípidos de mejillón, que opcionalmente contienen vitamina E, también se formulan con un aceite portador, tal como aceite de oliva. Si bien en algunas formas de realización los lípidos de mejillón son extractos lipídicos de mejillón que contienen vitamina E agregada, la adición de vitamina E es opcional, por lo que en algunas formas de realización, se usa un extracto lipídico de mejillón solo, es decir, sin otros ingredientes como la vitamina E.

[62] Los lípidos de mejillón, en diversas formas, también pueden adquirirse en proveedores comerciales.

[63] El aceite de kril puede prepararse a partir de cualquier especie de kril apropiada, incluyendo *Euphausia superba* (kril antártico), *Euphausia pacifica* (kril del Pacífico), *Maganycitiphanes norvegica* (kril del Norte), *Euphausia crystallorophias* (kril del hielo), *Euphausia frigida*, *Euphausia longirostris*, *Euphausia triacantha* y *Euphausia vallentini*. En algunas formas de realización preferidas, el aceite de kril se obtiene de *Euphausia superba*.

[64] Los lípidos marinos contienen ácidos grasos, particularmente ácidos grasos omega-3, por ejemplo, EPA o DHA, en formas libres o como triglicéridos. El aceite de kril también es rico en ácidos grasos omega-3, aunque contiene cantidades significativas de fosfolípidos, donde los ácidos grasos están unidos a grupos principales de fosfato a través de una unidad de glicerol. Esta forma unida a fosfolípidos de los ácidos grasos se absorbe más eficazmente a través de las membranas celulares que la forma de triglicéridos, por lo que está más fácilmente biodisponible. Los fosfolípidos hallados típicamente en el aceite de kril abarcan fosfatidilcolina, alquil acil fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, liso alquil acil fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, alquil acil fosfatidiletanolamina, cardiolipina más N-acil fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y liso alquil acil fosfatidiletanolamina. Adicionalmente, el aceite de kril contiene cantidades apreciables de astaxantina, un antioxidante, que también es responsable de su color rojo.

[65] En algunas formas de realización, el aceite de kril contiene al menos aproximadamente 1% p/p, 5% p/p, 10% p/p o al menos aproximadamente 20% p/p de fosfolípidos. En otras formas de realización, el aceite contiene al menos aproximadamente 25% p/p, al menos aproximadamente 30% p/p, al menos

aproximadamente 35% p/p, al menos aproximadamente 40% p/p, al menos aproximadamente 45% p/p, al menos aproximadamente 50% p/p, al menos aproximadamente 55% p/p, al menos aproximadamente 60% p/p, al menos aproximadamente 65% p/p, al menos aproximadamente 70% p/p, al menos aproximadamente 75% p/p, al menos aproximadamente 80% p/p, al menos aproximadamente 85% p/p, al menos aproximadamente 90% p/p, al menos aproximadamente 95% p/p, al menos aproximadamente 97% p/p, al menos aproximadamente 98% p/p o al menos aproximadamente 99% p/p de fosfolípidos. En algunas formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de fosfolípidos en el rango aproximado de 40%-99% p/p. En algunas otras formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de fosfolípidos en el rango aproximado de 60%-99% p/p, por ejemplo, aproximadamente 65%-90% p/p. En la presente, el aceite de kril “enriquecido” es aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 60% p/p. El contenido de fosfolípidos puede determinarse con cualquier medio apropiado en la técnica, por ejemplo, un análisis de RMN con ^{31}P .

[66] Los métodos para preparar aceite de kril, incluyendo aceite de kril enriquecido en fosfolípidos, son conocidos en la técnica. Típicamente, se somete biomasa de kril (por ejemplo, *Euphasia superba* o *Euphasia pacifica*) fresco, congelado y/o tratado térmicamente a una extracción con solventes (por ejemplo, alcoholes, por ejemplo, etanol, cetonas, por ejemplo, acetona, o dimetoxietano) y/o fluido supercrítico (por ejemplo, CO_2). Se describen algunos ejemplos no limitativos de procesos para preparar aceite de kril en las Patentes de los EEUU N° 9028877, 9375453, 6800299, 8828447, 9150815 y 8383845, WO2007/123424, WO2011/050474, WO2015/104401 y WO2015/121378, cuyo

contenido se incorpora en la presente como referencia. En la presente también se describen otros métodos. El aceite de kril también se puede adquirirse en proveedores comerciales.

[67] En algunas formas de realización ventajosas, el aceite de kril tiene un contenido de agua de aproximadamente 5% o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. En algunas formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de solvente de extracción residual de aproximadamente 5% o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. En otras formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de agua de aproximadamente 5% o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos y un contenido de solvente de extracción residual de aproximadamente 5% o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. El agua y el solvente pueden eliminarse con cualquier método apropiado, por ejemplo, un calentamiento con una duración muy breve o suave (por ejemplo, 30 minutos, 1 hora, 2 horas o 3 horas, a una temperatura de aproximadamente 60°C, 50°C, 40°C o menos, preferiblemente de manera tal que la integridad de los constituyentes no se vea sustancialmente comprometida), con una corriente de nitrógeno o por liofilización (secado por congelación).

[68] La actividad inhibidora de las combinaciones sobre uno o más mediadores inflamatorios, por ejemplo, óxido nítrico (NO), citoquinas, por ejemplo, interleuquinas (por ejemplo, IL-6), prostaglandinas (por ejemplo, PGE₂) o TNF α puede ser útil en el tratamiento de uno o más trastornos o síntomas en un sujeto donde la inhibición de una o más de estas moléculas es terapéuticamente beneficiosa. En particular, las combinaciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación aguda o crónica y/o uno o más de los síntomas

asociados, por ejemplo, dolor, fiebre, enrojecimiento o hinchazón. En algunas formas de realización las combinaciones pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación y/o el dolor asociado a ella en trastornos cuya patología comprende un componente inflamatorio. Algunos ejemplos no limitativos de trastornos con aspectos inflamatorios abarcan aterosclerosis, alergia, asma, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, enfermedad celíaca, psoriasis, artritis reumática, artritis psoriásica), fibromialgia, gota, migraña, osteoartritis, colitis ulcerosa, cáncer, cognición deteriorada, incluyendo enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo 2, dolor de aparición tardía (DOMS), enfermedad de Crohn y espondilitis anquilosante. En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden ser útiles para tratar el dolor articular o mejorar la movilidad articular asociada a la osteoartritis o la artritis reumática. En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos donde la inhibición de PGE₂ puede ser beneficiosa, por ejemplo, artritis reumática, migraña o dolor (que puede ser nociceptivo, somático o visceral, y/o neuropático).

[69] Ha de apreciarse que las combinaciones descritas en la presente pueden ser aptas para una administración separada o simultánea. Cuando una combinación es apta para una administración simultánea, puede proveérsela y/o administrársela como una composición íntima o una mezcla que comprende tanto un extracto lipídico de mejillón como un aceite de kril, o como formas de dosificación discretas con cada componente. Cuando el extracto lipídico de mejillón y el aceite de kril se proveen y/o se administran por separado, la administración puede ser simultánea, consecutiva o en momentos diferentes.

[70] En otras formas de realización, los lípidos de mejillón y el aceite de kril pueden formularse, juntos o combinados, con uno o más vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos de vehículos apropiados abarcan aceites comestibles, por ejemplo, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de linaza, aceite de semilla de uva, aceite de pescado (por ejemplo, aceite de atún), aceite de canola, aceite vegetal, aceite de girasol, aceite de chía, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de algas o mezclas de éstos. También pueden incluirse uno o más aditivos opcionales, por ejemplo, antioxidantes, vitaminas (por ejemplo, vitaminas solubles en grasa, A, D, E o K, o vitaminas solubles en agua, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12 o C), minerales dietéticos, aminoácidos, agentes para enmascarar el olor o el sabor, emulsionantes, alcoholes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, etanol, glicerol, propilenglicol o polietilenglicol), otros modificadores de la viscosidad, agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos), agentes de suspensión, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, glucosa, lubricantes, aglutinantes, almidones, potenciadores de la absorción, conservantes, etcétera. Un vehículo o un aditivo pueden realizar una o más funciones. Los lípidos de mejillón y/o el aceite de kril pueden complementarse o combinarse con uno o más componentes adicionales purificados o parcialmente purificados de aceite de mejillón y kril, por ejemplo, astaxantina, ésteres de astaxantina, ácidos grasos (por ejemplo, EPA, DHA), ya sea como ácidos libres, ésteres ácidos, triglicéridos o fosfolípidos, esteroides, ésteres de esteroles, aminoácidos, péptidos, proteínas o glicosaminoglicanos (por ejemplo, condroitin-sulfatos). También pueden incorporarse otros alimentos antiinflamatorios, por ejemplo, en formas trituradas o extractos, por ejemplo, cúrcuma, jengibre, ajo, clavos, etcétera.

[71] Las combinaciones formuladas pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica. Los métodos comprenden el paso de asociar íntimamente el extracto lipídico de mejillón y/o el aceite de kril al vehículo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Ha de comprenderse que cualquier vehículo o aditivo será farmacéuticamente aceptable.

[72] Por ende, en algunas formas de realización, los lípidos de mejillón y el aceite de kril se formulan, por separado o juntos, con un aceite portador, por ejemplo, aceite de oliva. En algunas formas de realización, el aceite portador representa entre aproximadamente 10% p/p y aproximadamente 90% p/p de la combinación o la composición, por ejemplo, entre aproximadamente 20% p/p y aproximadamente 80% p/p. En otras formas de realización, el aceite portador representa aproximadamente 25% p/p, aproximadamente 30% p/p, aproximadamente 35% p/p, aproximadamente 40% p/p, aproximadamente 45% p/p, aproximadamente 50% p/p, aproximadamente 55% p/p, aproximadamente 60% p/p, aproximadamente 65% p/p, aproximadamente 70% p/p o aproximadamente 75% p/p de la combinación o la composición. En algunas formas de realización, la proporción en peso entre el aceite portador y la cantidad combinada de lípidos de mejillón y aceite de kril es de aproximadamente 3:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:2,5 o aproximadamente 1:3.

[73] Aunque en la presente se contempla cualquier forma de administración, por ejemplo, oral, parenteral, tópica, transdérmica o subdérmica, en algunas formas de realización, las combinaciones de la invención ventajosamente se proveen y/o se administran en una forma de dosificación oral. En algunas formas de

realización, las combinaciones pueden presentarse en formas masivas, por ejemplo, líquidos, jarabes, pastas, ceras semisólidas, dispersiones, suspensiones, emulsiones (por ejemplo, de agua en aceite o aceite en agua), polvos triturados o polvos microencapsulados, a partir de las cuales pueden medirse dosis individuales. La medición y/o la administración pueden realizarse con cualquier dispositivo, por ejemplo, una cuchara, una paleta, una jeringa, un gotero o un vaso medidor. Las dosis medidas pueden administrarse en los sujetos directamente o combinadas, vertidas o rociadas en alimentos o bebidas.

[74] En otras formas de realización, las combinaciones ventajosamente se presentan en formas de dosificación orales individuales, es decir, formas de dosificación fijas. Algunos ejemplos de formas de dosificación orales individuales abarcan ampollas, tubos, jeringas llenas, sobres, masticables y cápsulas envasadas individualmente (incluyendo cápsulas de gel duro o blando).

[75] Un ejemplo de una forma de dosificación oral individual apropiada es una cápsula, que puede ser dura o blanda. La cubierta puede comprender uno o más elementos como gelatina, pululano, hipromelosa, copolímeros de PVA, carragenina u otros componentes sacáridos, por ejemplo, almidón o celulosa, o mezclas de éstos, y también puede comprender agentes colorantes, agentes opacantes, plastificantes (por ejemplo, sorbitol, xilosa, maltitol o glicerina), etcétera. En la técnica se conocen métodos para encapsular aceites y lípidos marinos, tales como lípidos de mejillón y aceite de kril. Véase, por ejemplo, WO2015/121378, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia. En algunas formas de realización, cuando el aceite de kril se presenta por separado, puede encapsulárselo en ausencia de agentes adicionales

opcionales, por ejemplo, agentes modificadores de la viscosidad, por lo cual el relleno de la cápsula puede consistir esencialmente en aceite de kril.

[76] En algunas formas de realización ventajosas, las combinaciones de lípidos de mejillón y aceite de kril de la invención se presentan en forma de cápsulas de gel blando, que por ejemplo, pueden comprender tanto lípidos de mejillón como aceite de kril, o cápsulas de gel blando individuales, donde los lípidos de mejillón y el aceite de kril se encapsulan por separado, opcionalmente con vehículos y/o aditivos apropiados. Las cápsulas de gel blando pueden prepararse con gelatina (o como alternativa, fuentes de sacáridos como el pululano o la hipromelosa), opcionalmente con uno o más plastificantes como el sorbitol o la glicerina (glicerol) o aditivos como agentes colorantes u opacantes. En un ejemplo, el recubrimiento de una cápsula de gel blando puede comprender gelatina y sorbitol y/o glicerina.

[77] La microencapsulación es un método mediante el cual se rodean pequeñas gotas o partículas con una pared de recubrimiento o se las incrusta en una matriz para formar un polvo, donde el recubrimiento o la matriz forman una barrera funcional que impide o reduce la propensión a reacciones químicas como la oxidación. El recubrimiento o la matriz también pueden servir para enmascarar el sabor o el olor. Así, en algunas formas de realización, los lípidos de mejillón y/o el aceite de kril pueden microencapsularse, por separado o juntos, para formar un polvo. Los métodos de microencapsulación de uso habitual abarcan emulsificación, secado por aspersion, secado por congelación, electroatomización coaxial, extrusión, coacervación, tecnología de fluidos supercríticos y polimerización in situ. Los materiales de recubrimiento abarcan polímeros naturales o sintéticos, hidratos de carbono (por ejemplo, almidones,

glucosa), proteínas (por ejemplo, caseína, gelatina) o mezclas de éstos (véase, por ejemplo, Bakry, A. M., et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143, 2016, y las referencias citadas en esta publicación, WO2014/170464 y WO2014/169315, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia). Los lípidos de mejillón y/o el aceite de kril pueden microencapsularse con uno o más vehículos o aditivos, según se describió con anterioridad. El polvo de lípidos de mejillón y/o aceite de kril microencapsulado puede encapsularse en una forma mayor, por ejemplo, en una forma de dosificación individual como una cápsula con un recubrimiento duro. El lípido o el aceite microencapsulado en polvo puede combinarse opcionalmente con uno o más vehículos o aditivos.

[78] En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden tomarse con alimentos o bebidas, por ejemplo, por medios como el rociado, la agitación, la mezcla u otros, para aplicar o incorporar la combinación del extracto lipídico de mejillón y el aceite de kril en un alimento o una bebida. Por consiguiente, las combinaciones pueden proveerse en un formato apropiado para incorporarlas en una bebida o un producto alimenticio o sobre cualquiera de ellos. En algunas formas de realización, la combinación también puede formularse para preparar productos alimenticios o bebidas funcionales.

[79] En algunas formas de realización, los lípidos de mejillón y el aceite de kril se formulan, por separado o juntos, con un aceite portador como el aceite de oliva, opcionalmente con un antioxidante (por ejemplo, vitamina E).

[80] Los sujetos que pueden tratarse con las combinaciones de la invención abarcan sujetos mamíferos, por ejemplo, seres humanos, primates, felinos, caninos, bovinos, equinos, porcinos, leporinos, ovinos o caprinos,

particularmente animales de ganado (por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, cerdos o cabras), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, conejos o cobayos) o animales salvajes cautivos. También se contemplan animales de laboratorio como conejos, ratones, ratas, cobayos o hámsteres, que pueden servir como sistemas de evaluación.

[81] Cualquiera de las formas de dosificación descritas con anterioridad puede aplicarse a un ser humano o cualquier otro animal, según corresponda.

[82] La cantidad eficaz para el tratamiento es una cantidad de una combinación que, al administrarla según el régimen de dosificación deseado, es eficaz para obtener al menos parcialmente un efecto terapéutico deseado, lo que puede abarcar uno o más de los siguientes objetivos: aliviar, eliminar o disminuir la duración, la gravedad y/o la frecuencia de la inflamación y/o uno o más de sus síntomas (por ejemplo, calor, dolor, hinchazón, enrojecimiento) o prevenir, demorar la aparición, inhibir el progreso, interrumpir o revertir (parcial o completamente) el inicio o el progreso del trastorno o la afección particular que se está tratando.

[83] Las dosis y los regímenes de dosificación apropiados pueden ser determinados por el médico o el veterinario a cargo y pueden depender de la afección/los síntomas particulares que se desea tratar, la gravedad de la afección o la edad, la salud general o el peso del sujeto. Las dosis diarias apropiadas de los lípidos de mejillón y/o el aceite de kril pueden estar independientemente en el rango de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 10 g, por ejemplo, aproximadamente 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1 g, 1,1 g, 1,2 g, 1,3 g,

1,4 g, 1,5 g, 1,6 g, 1,7 g, 1,8 g, 1,9 g, 2,0 g, 2,1 g, 2,2 g, 2,3 g, 2,4 g, 2,5 g, 2,6 g, 2,7 g, 2,8 g, 2,9 g, 3,0 g, 3,2 g, 3,5 g, 3,7 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g o aproximadamente 9,5 g. En algunas otras formas de realización, las dosis diarias de una combinación pueden estar en el rango de entre aproximadamente 20 mg y aproximadamente 15 g, por ejemplo, aproximadamente 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1 g, 1,1 g, 1,2 g, 1,3 g, 1,4 g, 1,5 g, 1,6 g, 1,7 g, 1,8 g, 1,9 g, 2,0 g, 2,1 g, 2,2 g, 2,3 g, 2,4 g, 2,5 g, 2,6 g, 2,7 g, 2,8 g, 2,9 g, 3,0 g, 3,2 g, 3,5 g, 3,7 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g, 10,5 g, 11,0 g, 11,5 g, 12,0 g, 12,5 g, 13,0 g, 13,5 g, 14,0 g o 14,5 g.

[84] En algunas formas de realización, las dosis individuales (por ejemplo, para cápsulas de gel blando) pueden abarcar aproximadamente 10 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 165 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 260 mg, 265 mg, 270 mg, 275 mg, 280 mg, 290 mg, 300, mg310 mg, 320 mg, 325 mg, 330 mg, 340 mg, 350 mg, 360 mg, 365 mg, 370 mg, 375 mg, 380 mg, 390 mg, 400 mg, 410 mg, 420 mg, 425 mg, 430 mg, 440 mg, 450 mg, 460 mg, 465 mg, 470 mg, 475 mg, 480 mg, 490 mg o aproximadamente 500 mg de una combinación, formulada opcionalmente con un aceite portador (por ejemplo, aceite de oliva). En algunas otras formas de realización, la combinación también comprende vitamina E. En otras formas de realización, las combinaciones comprenden lípidos de mejillón (por ejemplo, PCSO-524) en una cantidad en el

rango de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, y comprenden aceite de kril en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 90% y aproximadamente 10% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, es decir, una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de entre aproximadamente 10:90 y aproximadamente 90:10, por ejemplo, una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de aproximadamente 15:85, aproximadamente 20:80, aproximadamente 25:75, aproximadamente 30:70, aproximadamente 35:65, aproximadamente 40:60, aproximadamente 45:55, aproximadamente 50:50, aproximadamente 55:45, aproximadamente 60:40, aproximadamente 65:35, aproximadamente 70:30, aproximadamente 75:25, aproximadamente 80:20 o aproximadamente 85:15.

[85] Las dosis pueden administrarse convenientemente una vez al día, aunque las dosis diarias también pueden dividirse y administrarse en más de una ocasión (por ejemplo, dos, tres o cuatro). En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden administrarse una, dos, tres o más veces por semana, por ejemplo, en días alternados. En algunas formas de realización, el tratamiento puede ser continuo o a largo plazo, por ejemplo, durante un período de al menos 6-12 meses o al menos 2-3 años, o persistente.

[86] Las combinaciones de la invención, por ejemplo, en cualquier dosis diaria, pueden comprender lípidos de mejillón en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 99% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, y comprenden aceite de kril en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 99% y aproximadamente 1% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, es decir,

una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de entre aproximadamente 1:99 y aproximadamente 99:1. En algunas formas de realización, las combinaciones comprenden lípidos de mejillón en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, y comprenden aceite de kril en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 95% y aproximadamente 5% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, es decir, una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de entre aproximadamente 5:95 y aproximadamente 95:5. En algunas formas de realización, las combinaciones comprenden lípidos de mejillón en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, y comprenden aceite de kril en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 90% y aproximadamente 10% p/p, con relación a la cantidad total de lípidos de mejillón y aceite de kril, es decir, una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de entre aproximadamente 10:90 y 90:10. En otras formas de realización, las combinaciones comprenden una proporción en peso entre lípidos de mejillón y aceite de kril de aproximadamente 15:85, aproximadamente 20:80, aproximadamente 25:75, aproximadamente 30:70, aproximadamente 35:65, aproximadamente 40:60, aproximadamente 45:55, aproximadamente 50:50, aproximadamente 55:45, aproximadamente 60:40, aproximadamente 65:35, aproximadamente 70:30, aproximadamente 75:25, aproximadamente 80:20 o aproximadamente 85:15.

[87] Si bien las combinaciones de la invención pueden administrarse como único tratamiento antiinflamatorio para combatir uno o más trastornos, también pueden

administrarse en combinación con un régimen de administración con uno o más NSAID, por ejemplo, celecoxib, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, telorolaco, mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, sulindac o tolmetina. En algunas formas de realización, las combinaciones de la invención pueden ser útiles para eliminar o reducir los efectos adversos posibles asociados a los NSAID, por ejemplo, pueden eliminar completa o sustancialmente la necesidad de una terapia adicional con NSAID, o pueden ser útiles para disminuir la dosis y/o la frecuencia de administración de los NSAID necesarias para obtener un efecto terapéutico beneficioso

[88] Según se indicó con anterioridad, en una o más formas de realización, el aceite de kril usado en las combinaciones de la invención ventajosamente puede tener un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 50% p/p o más, preferiblemente al menos aproximadamente 60% p/p o más. En diversos procesos de los antecedentes técnicos para extraer aceite de kril rico en fosfolípidos (por ejemplo, con más de aproximadamente 50% o 60% p/p de fosfolípidos) a partir de harina de kril, se emplea una combinación de CO₂ y CO₂/etanol. Sin embargo, se sabe que cuanto mayor es el contenido de fosfolípidos de un aceite de kril, mayor es su viscosidad, y que los aceites de kril que tienen un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 60% o más típicamente se presentan como pastas viscosas a temperatura ambiente. Esto implica desafíos para la manufactura, particularmente a escala industrial o comercial, ya que se requieren temperaturas más altas para evaporar los solventes empleados en el proceso de extracción del material viscoso, y es más probable que se produzcan daños en el aceite debido al calor. Además, se

requieren mayores presiones para transferir el aceite de los tanques de extracción a los tanques de empaque.

[89] Un ejemplo de un proceso de los antecedentes técnicos es el que se describe en WO2007123424. Se trata de un proceso con dos pasos mediante el cual primero se extrae un material de partida con CO₂ puro para separar solamente los lípidos neutros (es decir, los triglicéridos no polares), con lo que se obtiene un material que, debido a la eliminación los triglicéridos no polares, está enriquecido en fosfolípidos. Este material enriquecido en fosfolípidos se extrae posteriormente con CO₂ más $\geq 10\%$ de etanol como solvente adicional, para extraer los fosfolípidos y los triglicéridos no polares remanentes en la biomasa de kril de partida. En este método, se emplea ineficientemente la capacidad de la planta a escala comercial, ya que durante los dos pasos, gran parte del volumen de los extractores a presión elevada se llena con proteínas, hidratos de carbono y componentes de ceniza no extraíbles de la biomasa de partida. Por otro lado, se trata fundamentalmente de una operación en lotes menos eficiente (en comparación con una operación continua más eficiente), lo cual puede tener un impacto negativo sobre el costo del proceso. A escala industrial, el enriquecimiento para obtener un contenido final de fosfolípidos polares en el aceite final efectivamente se obtiene en el primer paso, directamente a partir de un material de partida sólido, no homogéneo y en bruto. Se requiere un conocimiento previo preciso del contenido de lípidos polares y no polares del material de partida sólido y de cuán bien podrá realizarse la extracción para obtener el enriquecimiento deseado del aceite. En la práctica, la incertidumbre a escala comercial puede traducirse en un enriquecimiento excesivo costoso, lo cual eventualmente implica una mezcla recurrente hasta

obtener las especificaciones deseadas. Una vez más, esto tiene un impacto adverso sobre la economía del proceso.

[90] En US 9735453, US 9078905, US 9028877, US 9320765 y US 9072752 se describe la extracción de kril con CO₂ o CO₂ más aproximadamente 5% de etanol, para extraer los lípidos neutros (triglicéridos no polares), a lo que sigue una extracción con CO₂/aproximadamente 20% de etanol para separar el material sólido no homogéneo en bruto de un aceite de kril con un contenido elevado de fosfolípidos, ésteres de astaxantina y/o ácidos grasos omega-3. Estos procesos también tienen las desventajas descriptas con anterioridad.

[91] En la presente invención se describe un proceso que, en algunas formas de realización, puede ser útil para disminuir, minimizar o eliminar una o más de las desventajas mencionadas en la preparación de aceite de kril con un contenido elevado de fosfolípidos o rico en ellos, particularmente a escala industrial o comercial (por ejemplo, cuando se preparan lotes de aceite del orden de al menos 50, 100, 200, 300, 500 kg o más). Por lo tanto, en la presente invención también se provee un proceso para preparar aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 50% p/p o más, preferiblemente al menos aproximadamente 60% p/p o más, y un proceso para incrementar el contenido de fosfolípidos menor (menos de aproximadamente 50% p/p) de un aceite hasta obtener aproximadamente 50% p/p o más, preferiblemente al menos aproximadamente 60% p/p o más.

[92] En algunas formas de realización, en la invención se provee un proceso con dos pasos para preparar un aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 50% p/p, donde en un primer paso se extrae un primer aceite de kril con un contenido de fosfolípidos inferior a 50% p/p a partir de una

biomasa de kril, y luego se elimina al menos una proporción de los componentes lipídicos no polares (tales como los triglicéridos) para obtener un segundo aceite de kril enriquecido en fosfolípidos (es decir, con un contenido mayor de fosfolípidos) en comparación con el primero.

[93] En contraste con los procesos de los antecedentes técnicos descritos con anterioridad, algunas formas de realización del proceso comienzan con una extracción no selectiva del aceite a partir del material de biomasa de kril de partida. La extracción de los lípidos polares (tales como los fosfolípidos) y no polares (tales como los triglicéridos) del material de partida sólido puede realizarse con una mezcla de CO₂ y etanol (por ejemplo, etanol azeotrópico: una mezcla de agua y etanol que comprende aproximadamente 95% de etanol).

[94] En algunas formas de realización preferidas, se emplea una proporción en masa entre etanol y CO₂ de al menos aproximadamente 15% p/p o aproximadamente 20% p/p, por ejemplo, en el rango aproximado de 17%-22% p/p. En otras formas de realización, se emplea una proporción en masa entre etanol y CO₂ de al menos aproximadamente 25% p/p, tal como al menos aproximadamente 26% p/p, al menos aproximadamente 27% p/p, al menos aproximadamente 28% p/p, al menos aproximadamente 29% p/p o al menos aproximadamente 30% p/p.

[95] En algunas formas de realización, incluyendo cualquiera de las otras formas de realización descritas, la extracción se realiza a una temperatura de a lo sumo 60°C, por ejemplo, a lo sumo aproximadamente 55°C, a lo sumo aproximadamente 50°C, a lo sumo aproximadamente 45°C, a lo sumo 40°C, a lo sumo 35°C o a lo sumo 30°C, para disminuir o minimizar ventajosamente el riesgo de degradación del producto. La presión de la extracción puede

configurarse para garantizar condiciones súper, sub y/o casi críticas para la temperatura y la proporción entre CO₂ y etanol seleccionadas. En algunas formas de realización, la presión está en el rango aproximado de 200-350 bar, por ejemplo, aproximadamente 250-300 bar, aunque técnicamente también pueden usarse presiones mayores, por ejemplo, 400 bar o más. En algunas formas de realización, el valor o el rango de presión inducen una densidad de solvente apropiada para garantizar que la extracción de los lípidos no polares no se convierta en una limitación para la velocidad del proceso. En algunas formas de realización, las condiciones de presión para la extracción pueden ajustarse durante el proceso para cambiar entre condiciones súper, sub o casi críticas. En algunas formas de realización, se emplean condiciones subcríticas y/o casi críticas, que pueden variar en función de la proporción entre CO₂ y etanol en la mezcla binaria (o la mezcla ternaria en el caso del etanol azeotrópico, que también contiene agua). La duración de la extracción puede ser determinada por aquellos versados en la técnica y puede depender, entre otros factores, de las condiciones de la extracción y la optimización económica deseada. En algunas formas de realización, la duración de la extracción típicamente está el rango aproximado de 1-15 horas, por ejemplo, aproximadamente 2-10 horas, aproximadamente 2-5 horas, aproximadamente 3-6 horas o aproximadamente 4-5 horas. La duración puede depender, entre otros factores, de la cantidad o el tamaño de partícula del material de partida de biomasa. Con partículas más grandes, pueden usarse mayores velocidades de flujo del solvente mientras se mantiene una biomasa estática y un contacto uniforme con el solvente. Sin embargo, las partículas más grandes también tienen requisitos de difusión mayores para que el solvente alcance el centro, por lo que se requiere más

solvente. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el tamaño de partícula del material de partida es de aproximadamente 1-5 mm, tal como aproximadamente 2-3 mm.

[96] En algunas otras formas de realización, la presión de extracción es de aproximadamente 300 bar y la temperatura de extracción es de aproximadamente 60°C.

[97] El aceite puede separarse con valores menores de temperatura (por ejemplo, aproximadamente 25-35°C) y presión (por ejemplo, aproximadamente 25-60 bar).

[98] El aceite extraído resultante contiene lípidos polares (por ejemplo, fosfolípidos) y no polares (por ejemplo, triglicéridos), y puede tener un contenido de fosfolípidos inferior a aproximadamente 50% p/p, inferior a aproximadamente 45% p/p, inferior a aproximadamente 40% p/p, inferior a aproximadamente 35% p/p, inferior a aproximadamente 30% p/p, inferior a aproximadamente 25% p/p, inferior a aproximadamente 20% p/p o inferior a aproximadamente 10% p/p.

[99] En algunas formas de realización ventajosas, el agua y el etanol en el aceite pueden eliminarse con cualquier método apropiado, por ejemplo, evaporación al vacío (opcionalmente con un calentamiento suave, por ejemplo, a aproximadamente 65°C o menos), con una corriente de nitrógeno o por liofilización. En algunas formas de realización, el aceite se somete a una evaporación al vacío, opcionalmente con un calentamiento suave. Esto también puede ser seguido por un período de residencia breve (por ejemplo, 1-3 segundos) a una temperatura mayor (por ejemplo, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C o aproximadamente 80°C) para eliminar el agua y el solvente adicional, el etanol, de la mezcla de lípidos polares de baja viscosidad

y lípidos no polares, donde una proporción elevada de lípidos no polares provee una viscosidad baja. En algunas formas de realización preferidas, la temperatura ventajosamente no supera aproximadamente 60°C durante todo el calentamiento suave al vacío para impedir o minimizar la degradación de los componentes del aceite extraído. En otras formas de realización, la temperatura durante el calentamiento suave al vacío ventajosamente no supera aproximadamente 55°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 30°C o aproximadamente 25°C.

[100] En algunas formas de realización, el contenido de componentes volátiles residuales (agua y etanol) después de la evaporación es de a lo sumo aproximadamente 3% p/p, con lo cual puede minimizarse la posibilidad de que el etanol y el agua residuales afecten negativamente la separación de los lípidos en el paso de enriquecimiento posterior. En otras formas de realización, el contenido de componentes volátiles residuales es de a lo sumo aproximadamente 2,5% p/p, a lo sumo aproximadamente 2,0% p/p, a lo sumo aproximadamente 1,5% p/p, a lo sumo aproximadamente 1,0% p/p, menos de aproximadamente 0,5% p/p, menos de aproximadamente 0,3% p/p o menos de aproximadamente 0,1% p/p.

[101] En este paso, después de la evaporación, debido a la presencia de los componentes lipídicos no polares, el aceite todavía es fluido y puede analizárselo fácilmente, por ejemplo, para determinar el contenido de fosfolípidos y/o ácidos grasos omega-3. Esto es importante, ya que se requiere un análisis preciso para calcular el grado de enriquecimiento deseado, y con ello, el contenido de fosfolípidos del aceite obtenido en el paso subsiguiente. En particular, cuando se

desea un contenido final de fosfolípidos elevado, un enriquecimiento excesivo (es decir, la eliminación de los lípidos no polares), incluso en márgenes pequeños, puede provocar problemas en el procesamiento a causa de una viscosidad excesiva. El aceite evaporado puede mezclarse completamente para asegurar la homogeneidad, opcionalmente después de colocarlo en tanques para productos intermedios. Opcionalmente, el aceite puede calentarse suavemente (por ejemplo, a una temperatura de a lo sumo aproximadamente 60-55°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 30°C o aproximadamente 25°C) para ayudar a mantener un material fluido y homogéneo para el análisis. En algunas formas de realización, la naturaleza menos viscosa del aceite no enriquecido obtenido en el primer paso de extracción con CO₂/EtOH ventajosamente permite un análisis más preciso de la composición, en comparación con el primer paso con biomasa sólida en bruto de los procesos de los antecedentes técnicos descritos con anterioridad, ya que puede obtenerse una mayor homogeneidad más fácilmente. En algunas formas de realización, de esta manera ventajosamente puede impedirse, minimizarse o disminuirse cualquier enriquecimiento excesivo de fosfolípidos en la extracción selectiva posterior de los lípidos no polares, con lo que podrían obtenerse productos sólidos indeseablemente viscosos o inamovibles.

[102] El segundo paso del proceso abarca la extracción preferida o selectiva de los lípidos no polares (triglicéridos) del aceite obtenido en el primer paso. Si el aceite no enriquecido obtenido en el primer paso de extracción ha sido colocado en tanques intermedios, se lo transporta nuevamente hasta la instalación de extracción. En algunas formas de realización preferidas, el aceite también se

somete a una extracción con CO₂ bajo condiciones supercríticas, por ejemplo, a aproximadamente 300 bar y aproximadamente 60°C o más, para extraer selectivamente los lípidos no polares (triglicéridos). En algunas formas de realización, la extracción puede comenzar con una presión más baja, que luego puede incrementarse gradualmente hasta el nivel deseado (por ejemplo, aproximadamente 300 bar). Los lípidos no polares (triglicéridos) pueden extraerse progresivamente, con lo que puede enriquecerse el producto refinado restante, hasta que se obtiene la composición deseada, por ejemplo, un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 50% p/p, al menos aproximadamente 55% p/p, al menos aproximadamente 60% p/p, al menos aproximadamente 65% p/p, al menos aproximadamente 70% p/p, al menos aproximadamente 75% p/p, al menos aproximadamente 80% p/p, al menos aproximadamente 85% p/p, al menos aproximadamente 90% p/p, al menos aproximadamente 95% p/p, al menos aproximadamente 97% p/p, al menos aproximadamente 98% p/p o al menos aproximadamente 99% p/p.

[103] En algunas formas de realización, una vez que se ha extraído la cantidad de lípidos no polares necesaria para obtener el nivel deseado de fosfolípidos, al despresurizarse parcialmente el recipiente de extracción, la presión restante puede ayudar en la descarga de la fracción refinada enriquecida (y más viscosa), de ser necesario. El drenaje del aceite enriquecido altamente viscoso puede tolerarse mejor al realizarse un drenaje desde un extractor parcialmente presurizado. Así, pueden transferirse materiales extremadamente viscosos a la mezcla y la formulación ulteriores.

[104] En una o más formas de realización, el proceso puede permitir un procesamiento semi-continuo, donde los recipientes de extracción se cambian

individualmente en una rotación continua mientras otros operan. De este modo, se evita la necesidad de realizar interrupciones para cambiar lotes de múltiples extractores.

[105] En otras formas de realización, el segundo paso descrito en la presente puede usarse para incrementar el contenido de fosfolípidos de un aceite de kril con un contenido de fosfolípidos inferior a aproximadamente 50% p/p, de manera tal de obtener aceite de kril con un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 50% p/p.

[106] En algunas formas de realización, el aceite de kril de partida tiene un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 45% p/p o menos, aproximadamente 40% p/p o menos, aproximadamente 35% p/p o menos, aproximadamente 30% p/p o menos, aproximadamente 25% p/p o menos, aproximadamente 20% p/p o menos o aproximadamente 10% p/p o menos. En algunas formas de realización, el aceite enriquecido final puede tener un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 55% p/p, al menos aproximadamente 60% p/p, al menos aproximadamente 65% p/p, al menos aproximadamente 70% p/p, al menos aproximadamente 75% p/p, al menos aproximadamente 80% p/p, al menos aproximadamente 85% p/p, al menos aproximadamente 90% p/p, al menos aproximadamente 95% p/p, al menos aproximadamente 97% p/p, al menos aproximadamente 98% p/p o al menos aproximadamente 99% p/p.

[107] En algunas formas de realización, el aceite de kril enriquecido tiene un contenido final de agua de aproximadamente 5% p/p o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. En algunas formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de solvente de extracción residual

de aproximadamente 5% p/p o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. En otras formas de realización, el aceite de kril tiene un contenido de agua de aproximadamente 5% p/p o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos y un contenido de solvente de extracción residual de aproximadamente 5% p/p o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% p/p o menos. En otras formas de realización, el aceite de kril enriquecido tiene un contenido de solvente residual (agua y etanol) de 5% p/p o menos o aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,1% p/p o menos.

[108] En otras formas de realización, el aceite de kril enriquecido final tiene un contenido de fosfolípidos de al menos aproximadamente 60% p/p y un contenido de solvente residual de aproximadamente 3% p/p o menos.

[109] Otras formas de realización relacionadas con el aceite de kril descrito en la presente también pueden aplicarse al aceite de kril producido con el proceso de la invención, según corresponda.

[110] Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar algunas formas de realización de la invención, y no para limitar la generalidad descrita con anterioridad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de aceite de kril con 62% p/p de fosfolípidos

1. Extracción de aceite de kril a partir de harina de kril

[111] Se extrajo harina de kril con CO₂/etanol (con una proporción inicial entre etanol y harina de kril de aproximadamente 3,0-3,5:1 p/p), con una fracción de masa de etanol en el rango aproximado de 17%-22% p/p, a una temperatura de 60°C y una presión de 300 bar. El paso de extracción con etanol/CO₂ tuvo una

duración de entre 10 y 15 horas. La mezcla de aceite extraído/CO₂/EtOH se separó a una presión de 45 bar y 25°C.

[112] Se mezclaron varios lotes de aceite obtenidos con este método para obtener un aceite de kril que contenía componentes polares y no polares y tenía un contenido de fosfolípidos de aproximadamente 42% (véase la tabla 1-1 a continuación).

Tabla 1-1. Análisis de RMN con ³¹P de los PL en una muestra de aceite de kril

Fosfolípidos (PL)		% en peso de PL en total	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	76,0	32,3
Alquil acil fosfatidilcolina	AAPC	9,6	4,1
Fosfatidilinositol	PI	0,6	0,3
Fosfatidilserina	PD	0,3	0,1
Lisofosfatidilcolina	LPC	7,4	3,1
Liso alquil acil fosfatidilcolina	LAAPC	0,5	0,2
Fosfatidiletanolamina	PE	1,3	0,5
Alquil acil fosfatidiletanolamina	AAPE	0,9	0,4
Cardiolipina más N-acil fosfatidiletanolamina	CL/NAPE	2,6	1,1
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	0,9	0,4
Liso alquil acil fosfatidiletanolamina	LAAPE	<0,1	<0,1

Contenido total de PL			42,5
-----------------------	--	--	------

2. Extracción selectiva de los triglicéridos del aceite de kril obtenido en el paso 1

[113] Se cargaron 5,9 kg del aceite de kril de partida (con la composición indicada en la tabla 1-1 anterior) directamente en un solo recipiente de extracción de 10,7 litros (diámetro: 155 mm). El material de partida se extrajo con CO₂ a una temperatura de 60°C y una presión de 300 bar.

[114] Los extractos, que contenían en gran medida triglicéridos, se recuperaron y fueron significativamente menos viscosos que el aceite de kril de partida que se cargó en el recipiente de extracción.

[115] El proceso de despresurización del recipiente de extracción comenzó una vez que la masa total del material extraído alcanzó 97% de la cantidad teórica de material que podría extraerse. La instalación se despresurizó a una velocidad constantemente creciente durante un período de 15 minutos, desde 300 hasta 100 bar, con una circulación continua de CO₂ y 50% de la velocidad de flujo de extracción. Durante este período, la temperatura medida en la salida del extractor se redujo desde la temperatura de operación de 60°C hasta 50°C. Luego se despresurizó el extractor desde 100 hasta 75 bar durante otros 15 minutos sin la bomba en funcionamiento. Posteriormente, se vació el recipiente de separación.

[116] Mientras el recipiente de extracción estaba a la temperatura de procesamiento, a una presión de 75 bar, se vació el aceite de kril enriquecido desde la base, muy por debajo del nivel superficial de la fracción refinada, para evitar la pérdida de CO₂ a presión elevada con el aceite refinado drenado. La recuperación del aceite enriquecido demoró aproximadamente una hora, y en este momento, la presión en el recipiente de extracción disminuyó desde 75

hasta 54 bar, a medida que el CO₂ restante se expandió hasta llenar el espacio ocupado previamente por el aceite refinado.

[117] Una vez terminada la descarga del aceite enriquecido, se observó que quedaba algo de aceite de kril enriquecido en el distribuidor y la superficie inferior del recipiente de extracción: se estimó que representaba menos de 2% de la masa total del aceite enriquecido. A escala comercial, el aceite restante se recuperaría en el siguiente lote de aceite de kril en el extractor.

[118] Antes de analizar la astaxantina y los fosfolípidos, el aceite enriquecido se calentó en un horno a 55°C durante 1 hora. Así, la muestra fue suficientemente fluida para poder homogeneizarla por agitación para el análisis.

[119] En la tabla 1-2 se resume la masa y el contenido de fosfolípidos (PL) y astaxantina (Asta) en el aceite de partida, el aceite extraído y el aceite enriquecido. Se extrajeron muy pocos fosfolípidos (<1 g/100 g de extracto) y astaxantina (<2 mg/100 g de extracto). En general, la masa de extracto obtenida con el proceso de enriquecimiento fue 98% del extracto teórico requerido para el enriquecimiento hasta obtener 62% de fosfolípidos.

Tabla 1-2. Resumen del contenido de fosfolípidos (PL) y astaxantina (Asta)

	Masa (g)	Masa (% del materi al de partida)	% de PL (g/10 0 g)	Masa de PL (g)	PL (%) del materi al de partida)	Asta (mg/10 0 g)	Masa de Asta (mg)	Asta (% del materi al de partida)
Material de partida	5870, 0	100	42,5	2494, 8	100	21	1232, 7	100

Extracto	1939,0	33	1,0	19,4	0,8	1,7	32,3	2,6
Aceite enriquecido	3835,6	65,3	62,0	2378,1	95,3	24	902,5	74,7
Total	5774,6	98,4		2397,5	96,1		952,9	77,3

En las tablas 1-3 y 1-4 se resume la composición del aceite enriquecido.

Tabla 1-3. Análisis de RMN con ^{31}P de los PL en muestras de aceite de kril

Fosfolípidos (PL)		% en peso de PL en total	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	72,9	45,2
Alquil acil fosfatidilcolina	AAPC	10,0	6,2
Fosfatidilinositol	PI	1,3	0,8
Fosfatidilserina	PD	0,7	0,4
Lisofosfatidilcolina	LPC	7,6	4,7
Liso alquil acil fosfatidilcolina	LAAPC	0,6	0,4
Fosfatidiletanolamina	PE	1,1	0,7
Alquil acil fosfatidiletanolamina	AAPE	1,3	0,8
Cardiolipina más N-acil fosfatidiletanolamina	CL/NAPE	3,8	2,4
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	0,5	0,3

Liso alquil acil fosfatidiletanolamina	LAAPE	0,2	0,1
Contenido total de PL			62,0

Tabla 1-4. Análisis de GC de los ácidos grasos

Ácidos grasos	g/100 g de muestra (expresados como FFA)
14:0	4,3
15:0	0,3
16:0	14,9
16:1 n-9	0,3
16:1 n-7	2,4
16:1 n-5	0,4
i17:0	0,2
16:2	0,7
17:1	0,2
i18:0	0,3
16:4 n-1	0,3
18:0	0,8
18:1 n-9	6,2
18:1 n-7	4,4
18:1 n-5	0,2
18:2 n-6	1,3
18:3 n-3	0,9
18:4 n-3	2,2
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
Otros	1,1
Total n-3	26,0
Ácidos grasos totales	66,5

Ejemplo 2

[120] Se preparó un extracto lipídico de mejillón según WO97/09992 y se lo usó en forma de PCSO-524® (Pharmalink International Limited, Hong Kong). El aceite de kril se preparó según el proceso del ejemplo 1, con la composición indicada en las tablas 1-3 y 1-4 anteriores.

Preparación de las muestras

[121] Se prepararon muestras frescas diariamente. Las muestras se mezclaron por inversión antes del análisis. Se las pesó en tubos para centrífuga de 1,5 ml y se las completó con etanol hasta 100 mg/ml para preparar las mezclas madre. En otras palabras, para preparar las mezclas madre se pesaron los aceites en la proporción correcta y se completó la concentración con etanol. Las diluciones en serie de las soluciones madre se realizaron con etanol. Las diluciones en serie se combinaron (1 en 100) con un medio de cultivo celular antes de agregarse a las células (por triplicado), con una dilución final de 1 en 10. Así, se obtuvo una concentración en etanol de 0,1% para todas las dosis y los controles. El aceite

de kril contenía aproximadamente 62% p/p de fosfolípidos. El extracto lipídico de mejillón se usó como PCSO-524®.

[122] Las abreviaturas empleadas para presentar los resultados se detallan en la tabla 2-1 a continuación.

Tabla 2-1. Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
LY	PCSO-524®
Kril	Aceite de kril enriquecido (62% de PL)
90%	Mezcla con 90% p/p de LY y 10% p/p de kril
75%	Mezcla con 75% p/p de LY y 25% p/p de kril
50%	Mezcla con 50% p/p de LY y 50% p/p de kril
Aceite de oliva	Aceite de oliva de grado alimenticio
1400W	CAS N° 214358-33-5
Dexa	Dexametasona
Diclo	Diclofenaco

Estudios

[123] La actividad antiinflamatoria se determinó en macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IFN γ), células RAW264.7 cultivadas en medios de cultivo convencionales e incubadas con LPS e IFN γ , en presencia o ausencia de diversos compuestos/extractos de prueba y controles positivos. La producción de mediadores inflamatorios, incluyendo NO, PGE₂, LTB₄ y las citoquinas TNF α e IL-6, se evaluó con métodos establecidos, usando conjuntos de elementos comerciales. Cada muestra se analizó con al menos 3 concentraciones (3 réplicas; la concentración máxima fue de 100 μ g/ml; n=9), con los controles internos relevantes (tabla 2-2). También se determinó la

citotoxicidad de cada muestra con un estudio MTT. No se detectó citotoxicidad para ninguna concentración evaluada.

[124] Los parámetros para cada estudio se resumen en la tabla 2-2. Brevemente, para realizar el estudio antiinflamatorio, las células RAW264.7 cultivadas se contaron, se sembraron en placas de 96 cavidades ($0,8 \times 10^5$ células/cavidad) y se incubaron durante el período indicado. Luego se aspiró el medio, se lo reemplazó por un medio fresco y se agregaron los compuestos de prueba. Se incubaron los compuestos durante 1 hora y se agregó el estimulante. Se incubaron las placas entre 4 y 18 horas, se analizaron los mediadores de interés en el sobrenadante y se determinó la viabilidad de las células con un análisis MTT.

[125] Los controles positivos se seleccionaron en función de su uso generalizado en estudios similares, y abarcaron N-(3-(aminometil)bencil)acetamidina (1400W), un inhibidor de la unión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS; Garvey, E. P., et al., J. Biol. Chem., 1997, 21:272(8):4959-63), y dexametasona, un inhibidor de citoquinas de uso habitual. El diclofenaco es un agente antiinflamatorio no esteroide común, que es un inhibidor conocido de la ciclooxigenasa (COX) que produce PGE₂.

Tabla 2-2. Parámetros de los estudios

Estudio	Período de siembra	Estímulo	Período de incubación	Proveedor del conjunto de elementos	Control empleado

NO	48 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Reactivo de Griess	1400W (Cayman)
TNF α	48 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Peprotech (EEUU)	Dexametasona (Sigma)
IL-6	48 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Peprotech (EEUU)	Dexametasona (Sigma)
PGE $_2$	24 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Cayman Chemical (EEUU)	Diclofenaco (sigma)

Resultados

1. Estudio del óxido nítrico

[126] El NO es un metabolito con numerosas funciones fisiológicas comprobadas como molécula de señalización y agente tóxico en la inflamación (Coleman, 2001). El NO deriva de la oxidación de la L-arginina por tres tipos de óxido nítrico sintetasas (NOS): las formas constitutivas, la NOS neuronal y la NOS endotelial, y la forma inducible, iNOS, originalmente descrita en macrófagos murinos (Nathan y Xie, 1994; Stuehr y Marletta, 1985). La forma inducible se activa continuamente una vez expresada, su nivel de transcripción es regulado por NF-

κ B y es estimulada por moléculas inflamatorias como los LPS y el IFN γ . Cuando la iNOS produce NO, hay una demora de varias horas hasta que se observa un nivel elevado sostenido, expresado en nM (Nathan y Xie, 1994). Es probable que la forma inducible de la NOS participe en la inflamación, y debido al nivel más alto de NO producido, es más fácil de evaluar in vitro.

[127] El NO es una molécula de señalización inusual. Debido a que no hay un receptor específico en la superficie celular para él, ingresa en las células de manera indiscriminada, y su efecto depende del tipo de célula y la concentración, con lo cual produce diversas respuestas fisiológicas. El NO induce un incremento en la permeabilidad vascular, vasodilatación y generación de radicales que provocan daño tisular y eliminan los patógenos (Guzik, Korbout y Adamek-Guzik, 2003). Estos cambios fisiológicos están asociados a la inflamación, con un incremento en el flujo sanguíneo, lo que permite que más células inmunes ingresen en el tejido afectado y destruyan los patógenos.

[128] Los resultados del estudio de inhibición del NO se proveen en las figuras 1A y 1B y la tabla 2-3.

Tabla 2-3. IC₅₀ para la inhibición del NO

	LY	Kril	90% de LY	75% de LY	Aceite de oliva	1400W
IC ₅₀	~107	~286	44,8	40,9	No activo	1,6

2. Factor de necrosis tumoral alfa

[129] El TNF α es una proteína de señalización celular (citoquina) que participa principalmente en la fase aguda de la respuesta inflamatoria. Los macrófagos son la fuente principal de TNF α , aunque también puede ser liberado por otros tipos de células, por ejemplo, linfocitos CD4+, células asesinas naturales (NK),

neutrófilos, mastocitos, eosinófilos o neuronas. El $\text{TNF}\alpha$ se produce mediante la activación de MAPK y NF- κ B. Actúa incrementando su propia producción y la de otras citoquinas inflamatorias como la interleuquina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$). El $\text{TNF}\alpha$ induce fiebre, muerte celular por apoptosis, caquexia e inflamación e inhibe la tumorigénesis y la replicación viral. El $\text{TNF}\alpha$ está asociado a diversas enfermedades, por ejemplo, sepsis, lesiones traumáticas, isquemia, asma, quemaduras, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Alzheimer, cáncer, depresión mayor, artritis o esclerosis múltiple (Cairns, Panacek, Harken y Banerjee, 2000; Dowlati et al., 2010; Swardfager et al., 2010).

[130] Los resultados del estudio de inhibición del $\text{TNF}\alpha$ se proveen en las figuras 2A y 2B y la tabla 2-4.

Tabla 2-4. IC_{50} para la inhibición del $\text{TNF}\alpha$

	LY	Kril	90% de LY	75% de LY	Aceite de oliva	Dexa
IC_{50}	~238,7	~103,3	89	57	DNF*	3,328e- 005

*no se ajustó al modelo matemático de una curva de respuesta a la dosis

3. Interleuquina 6

[131] Al igual que el $\text{TNF}\alpha$, la IL-6 se considera una citoquina proinflamatoria. Es secretada por las células T y los macrófagos e induce una respuesta inmune. La IL-6 es responsable del incremento en la producción de neutrófilos en la médula ósea. Es compatible con el crecimiento de las células B y antagoniza la diferenciación de las células T en células T reguladoras. Puede atravesar la barrera hematoencefálica e iniciar la síntesis de PGE_2 en el hipotálamo, con lo que puede alterar la temperatura del cuerpo (Banks, Kastin y Gutiérrez, 1994).

[132] Los resultados del estudio de inhibición de la IL-6 se proveen en las figuras 3A y 3B y la tabla 2-5.

Tabla 2-5. IC₅₀ para la inhibición de la IL-6

	LY	Kril	90% de LY	75% de LY	Aceite de oliva	Dexa
IC ₅₀	22,4	13,4	11,5	10,4	~106,8	1,19

4. Prostaglandina E₂

[133] La prostaglandina E₂ (PGE₂) es uno de los mediadores lipídicos que se producen a partir del ácido araquidónico (AA), mediante la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX), e induce pirexia, sensación de dolor e inflamación. La aspirina y los fármacos anti-inflamatorios no esteroides (NSAID) inhiben la biosíntesis de prostanoides (incluyendo PGE₂), por lo que tienen efectos antipiréticos, analgésicos y anti-inflamatorios (Kawahara, K., et al., 2015; Kawabata, A., 2011).

[134] Los resultados se proveen en las figuras 4A y 4B y la tabla 2-6.

Tabla 2-6. IC₅₀ para la inhibición de la PGE₂

	LY	Kril	90% de LY	75% de LY	50% de LY	Diclofenaco	Aceite de oliva
IC ₅₀	No activo	No activo	~112	~118	55,3	0,12	DNF*

*no se ajustó al modelo matemático de una curva de respuesta a la dosis

Resumen de los resultados

[135] A partir de estos estudios, se comprobó que el extracto lipídico de mejillón y el aceite de kril en las concentraciones evaluadas inhiben individualmente la NO, el TNFα y la IL-6 pero no la PGE₂.

[136] La combinación de extracto lipídico de mejillón y aceite de kril fue más eficaz que el extracto lipídico de mejillón o el aceite de kril por separado en la inhibición de la NO, el TNF α y la IL-6. En el estudio de la PGE₂, ni el extracto lipídico de mejillón ni el aceite de kril por separado presentaron actividad inhibidora, aunque sí lo hicieron combinados.

Ejemplo 3. Sinergia

[137] Se preparó un extracto lipídico de mejillón según WO97/09992 y se lo usó en forma de PCSO-524®. El aceite de kril se preparó según el proceso del ejemplo 1, con la composición indicada en las tablas 1-3 y 1-4 anteriores.

Muestras, preparación y combinación

[138] Las muestras madre de PCSO-524® y aceite de kril rico en fosfolípidos se mezclaron por inversión antes del análisis. Se las pesó en tubos para centrífuga de 1,5 ml y se las completó con etanol hasta 100 mg/ml para preparar las mezclas madre. En otras palabras, para preparar las mezclas se mezclaron los aceites diluidos en la proporción correcta. Se realizaron diluciones en serie con etanol. Las diluciones en serie se combinaron (1 en 100) con un medio de cultivo celular antes de agregarse a las células (por triplicado), con una dilución final de 1 en 10. Así, se obtuvo una concentración en etanol de 0,1% para todas las dosis y los controles. Estas dosis fueron preparadas frescas diariamente. En la tabla 3-1 se detallan las abreviaturas empleadas para cada muestra.

Tabla 3-1. Abreviaturas de los nombres de las muestras

Abreviatura	Descripción
LY	PCSO-524®
Kril	Aceite de kril enriquecido (62% de PL)
LY90	Mezcla con 90% p/p de LY y 10% p/p de kril

LY80	Mezcla con 80% p/p de LY y 20% p/p de kril
LY70	Mezcla con 70% p/p de LY y 30% p/p de kril
LY65	Mezcla con 65% p/p de LY y 35% p/p de kril
LY60	Mezcla con 60% p/p de LY y 40% p/p de kril
LY55	Mezcla con 55% p/p de LY y 45% p/p de kril
LY50	Mezcla con 50% p/p de LY y 50% p/p de kril
LY45	Mezcla con 45% p/p de LY y 55% p/p de kril
LY40	Mezcla con 40% p/p de LY y 60% p/p de kril
LY35	Mezcla con 35% p/p de LY y 65% p/p de kril
LY30	Mezcla con 30% p/p de LY y 70% p/p de kril
LY20	Mezcla con 20% p/p de LY y 80% p/p de kril
LY10	Mezcla con 10% p/p de LY y 90% p/p de kril
Aceite de oliva	Aceite de oliva de grado alimenticio
1400W	CAS N° 214358-33-5
Dexa	Dexametasona
IC	Intervalo de confianza

Estudios

[139] La actividad antiinflamatoria se determinó en macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) e interferón γ (IFN γ), células RAW264.7 cultivadas en medios de cultivo convencionales (DMEM, suero fetal bovino al 5%) e incubadas con LPS e IFN γ , en presencia o ausencia de diversos compuestos/extractos de prueba y controles. La producción de mediadores inflamatorios, incluyendo NO y las citoquinas TNF α e IL-6, se evaluó con métodos establecidos, usando conjuntos de elementos comerciales de ELISA (los proveedores se detallan en la tabla 3-2). Cada muestra se analizó con al

menos 6 concentraciones (3 réplicas; la concentración máxima fue de 100 µg/ml; n=9), con los controles internos correspondientes (tabla 3-2). También se determinó la citotoxicidad de cada muestra con un estudio MTT. No se detectó citotoxicidad para ninguna concentración evaluada.

[140] Los parámetros para cada estudio se resumen en la tabla 3-2. Brevemente, para analizar el NO, el TNFα y la IL-6, las células RAW264.7 cultivadas se contaron, se sembraron en placas de 96 cavidades ($0,8 \times 10^5$ células/cavidad) y se incubaron durante 48 horas. Luego se aspiró el medio, se lo reemplazó por un medio fresco y se agregaron los compuestos de prueba. Se incubaron los compuestos durante 1 hora y se agregó el estimulante. Se incubaron las placas durante 18 horas, se analizaron los mediadores de interés en el sobrenadante y se determinó la viabilidad de las células con un análisis MTT.

[141] Los controles positivos se seleccionaron en función de su uso generalizado en estudios similares, y abarcaron N-(3-(aminometil)bencil)acetamidina (1400W), un inhibidor de la unión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS; Garvey, E. P., et al., J. Biol. Chem., 1997, 272(8):4959-63), y dexametasona, un inhibidor de citoquinas de uso habitual.

Tabla 3-2. Estudios antiinflamatorios y controles positivos

Estudio	Período de siembra	Estímulo	Período de incubación	Proveedor del conjunto de elementos	Control positivo
NO	48 horas	LPS (50 ng/ml)	18 horas	Reactivo de Griess	1400W (Cayman)

		IFN γ (50 unidades/ml)			
TNF α	48 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Peprtech (EEUU)	Dexametasona (Sigma)
IL-6	48 horas	LPS (50 ng/ml) IFN γ (50 unidades/ml)	18 horas	Biogems (EEUU)	Dexametasona (sigma)

Cálculo de la sinergia

[142] La sinergia se expresó como un índice de combinación. El índice de combinación de sinergia (CI) y las ponderaciones por isoblograma de la IC₅₀ se calcularon con el software Compsyn. La curva de respuesta a la dosis generada con Graphpad Prism se transformó en 10 puntos representativos. Estos 10 puntos se introdujeron en el programa Compsyn, que generó una curva para ajustar los puntos de datos. Este método fue preferible para replicar fielmente toda la curva de respuesta a la dosis en el programa de sinergia. La curva de ajuste de Compsyn se usó para calcular la sinergia. El patrón de sinergia en el rango evaluado se determinó con un isoblograma, donde se representó la contribución relativa de cada componente a la actividad en la IC₅₀. Hay una línea recta dibujada entre los dos fármacos combinados (Biavatti, 2009). Los valores debajo de la línea representan sinergia, los valores en la línea se consideran aditivos y los valores sobre la línea representan antagonismo.

Resultados

1. Estudio del óxido nítrico

[143] Se evaluaron las combinaciones para determinar si inducían una inhibición sinérgica sobre la molécula de señalización inflamatoria NO. Las combinaciones se evaluaron primero en incrementos de 10%. La combinación más activa observada fue LY60. Luego se evaluaron incrementos adicionales de 5% alrededor de LY60.

[144] Las curvas de respuesta a la dosis de las combinaciones evaluadas LY90-LY10 se representan en las figuras 5A, 5B, 6A y 6B. Los valores de IC₅₀ para la inhibición del NO y el índice de combinación se proveen en las tablas 3-3 y 3-4. Un índice de combinación inferior a 1 representa sinergia. El isoblograma para los incrementos de 10% se provee en la figura 7.

Tabla 3-3. Valores de IC₅₀ para la inhibición del NO con las combinaciones LY90-LY10

	LY	K	LY 90	LY 80	LY 70	LY 60	LY 50	LY 40	LY 30	LY 20	LY 10	1400 W
IC ₅₀ (µg/ ml)	20 4	265	105	109	74	67	83	85	111	125	134	25
IC de 95% (µg/ ml)	13 6- 39 2	144 - 110 8	87- 136	88- 144	63- 90	59- 77	64- 117	68- 115	81- 183	98- 194	98- 248	21- 32

Tabla 3-4. IC₅₀ (IC) e índice de combinación para la inhibición del NO con las combinaciones LY75-LY45

	LY75	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45
--	------	------	------	------	------	------	------

IC ₅₀ (µg/ml)	123	68	84	65	86	79	84
IC de 95% para la IC ₅₀ (µg/ml)	97-160	65-85	69-96	60-73	70-90	69-89	73-100
Índice de combinación	0,80	0,50	0,55	0,48	0,54	0,77	0,61

2. Estudio del TNFα

[145] Se evaluaron las combinaciones para determinar si inhibían sinérgicamente la citoquina inflamatoria TNFα. Las combinaciones primero se evaluaron en incrementos de 10%. La combinación más eficaz observada fue LY50. Luego se evaluaron incrementos adicionales de 5% alrededor de LY50.

[146] Las curvas de respuesta a la dosis de las combinaciones evaluadas LY90-LY10 se representan en las figuras 8A, 8B, 8C, 9A y 9B. Los valores de IC₅₀ para la inhibición del TNFα y los índices de combinación se proveen en las tablas 3-5 y 3-6. Un índice de combinación inferior a 1 representa sinergia. El isoblograma para los incrementos de 10% se provee en la figura 10.

Tabla 3-5. Valores de IC₅₀ para la inhibición del TNFα

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

*no pudo estimarse

Tabla 3-6. IC₅₀ y CI para LY70-LY35 (n=9)

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35
IC ₅₀	91	80	78	68	69	90	70	73

IC de 95%	64- 189	60- 137	64-98	54-87	60-80	68- 128	57-89	59-92
Índice de combinación	0,14	0,12	0,114	0,097	0,096	0,123	0,094	0,095

3. Estudio de la IL-6

[147] Se evaluaron las combinaciones para determinar si inhibían sinérgicamente la citoquina inflamatoria IL-6. Las combinaciones primero se evaluaron en incrementos de 10%. La combinación más eficaz observada fue LY60. Luego se evaluaron incrementos adicionales de 5% alrededor de LY60.

[148] Las curvas de respuesta a la dosis de las combinaciones evaluadas LY90-LY10 se representan en las figuras 11A, 11B, 12A y 12B. Los valores de IC₅₀ para la inhibición de la IL-6 y los índices de combinación se proveen en las tablas 3-7 y 3-8. Un índice de combinación inferior a 1 representa sinergia. El isoblograma para los incrementos de 10% se ilustra en la figura 13.

Tabla 3-7. IC₅₀ para la inhibición de la IL-6 (n=3)

	LY	K	LY9 0	LY8 0	LY7 0	LY6 0	LY5 0	LY4 0	LY3 0	LY2 0	LY1 0	Dex a
IC ₅₀ (µg/ ml)	173	11 4	~10 0	53	36	34	37	52	41	60	~60	0,01 0
IC de 95% (µg/ ml)	104 - 131 1	92 - 19 1		41- 61	29- 45	27- 42	30- 44	44- 60	32- 51	50- 72		0,00 4- 0,03

Tabla 3-8. IC₅₀ e índice de combinación para la inhibición de la IL-6

	LY7 0	LY6 5	LY6 0	LY5 5	LY5 0	LY4 5	LY4 0	LY3 5	LY3 0
IC ₅₀	36	39	34	43	37	49	52	41	41
IC de 95%	29- 45	33- 45	27- 42	37 a	30- 44	40- 58	44- 60	30- 54	32- 51
Índice de combinación		0,27	0,23	0,31	0,27	0,37	0,4	0,32	0,32

Resumen de los resultados

[149] A partir de estos estudios, se comprobó que una combinación de extracto lipídico de mejillón y aceite de kril cumple con los criterios matemáticos para la sinergia en la inhibición del NO, el TNF α y la IL-6.

Ejemplo 4. Estudio en pacientes

[150] Se trataron pacientes con diversas afecciones dolorosas/inflamatorias con una combinación de extracto lipídico de mejillón (en forma de PCSO-542) y aceite de kril (61% de PL), con una proporción entre PCSO/542 y aceite de kril de 75:25, en forma de cápsulas. La composición de las cápsulas se provee en la tabla 4-1.

Tabla 4-1. Composición de cápsulas de 150 mg con aceites combinados

Ingrediente	% en peso
Componentes del relleno	
Aceite de oliva	66,67%
Aceite de mejillón (<i>Perna canaliculus</i>) PCSO-542*	25% (37,5 mg)
Aceite de kril* (<i>Euphausia superba</i>)	8,33% (12,5 mg)
Componentes de la cápsula (antes del secado)	

Gelatina (bovina)	46,5
Glicerina	12,6
Sorbitol	6,00
Agua	34,9

*con 0,15% p/p de vitamina E (aproximadamente 0,056 mg/cápsula)

[151] Las dosis generalmente variaron entre 2 y 8 cápsulas por día, administradas en una, dos o tres ocasiones. Antes de comenzar el tratamiento con la combinación, los pacientes típicamente habían tomando uno o más NSAID, tales como paracetamol o ibuprofeno, para controlar el dolor. Los resultados se proveen en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Resumen de los resultados en los pacientes

Paciente (sexo/edad)	Afección	Nivel de dolor previo al tratamiento (1-10)	Nivel de dolor posterior al tratamiento (1-10)	Otros comentarios
F, 80-84	Dolor severo en rodillas y hombros	8	4	Condiciones presentes por 3-12 años; mejora después de 2-3 semanas de tratamiento (2 cápsulas por día)
M, 60-64	Estenosis en la porción lumbar de la columna	6-8	0	Condición presente por 2-3 años; mejora después de 4-5 días de

				tratamiento (6-8 cápsulas/día)
M, 40-44	Dolor lumbar	7	4	Condición presente por 15 años; mejora después de 7 días de tratamiento (3 cápsulas/día)
F, 45-49	Dolor de espalda crónico	8	4-5	Condición presente por 2 años; mejora después de 2-3 semanas de tratamiento (3 cápsulas/día)
M, 50-54	Dolor articular en manos, daño nervioso, nudillos hinchados	6	2	Condición presente por 2 años; mejora después de 1 semana de tratamiento (3 cápsulas/día)
M, 50-54	Dolor crónico de espalda, hernia de disco	2-8, dependiendo de la actividad	2-3	Condición presente por 25 años; mejora después de 3 días de tratamiento (4 cápsulas/día)
F, 65-69	Dolor crónico en rodillas y hombros	10	5	Condición presente por 5 años; mejora después de 2 semanas de

				tratamiento (4 cápsulas/día)
M, 20-24	Alergia grave: tos, vía nasal inflamada y goteo nasal	8	5	Condición presente por 4 años; mejora después de 3 semanas de tratamiento (4 cápsulas/día)
M, 40-44	Dolor de espalda, hernia de disco	9	5	Condición presente por 8 años; mejora después de 3 semanas de tratamiento
F, 50-54	Dolor de espalda	7	01-1	Condición presente por 1 mes; mejora después de 1 semana de tratamiento
F, 55-59	Osteoporosis, dolor variable con la actividad	7-8	1-3	Condición presente por 15 años; mejora después de 1½ semanas de tratamiento (4 cápsulas/día)
M, 65-69	Dolor de rodilla	8-10	2-3	Condición presente por 14 años; mejora después de 1½ semanas de tratamiento (4 cápsulas/día)

M, 50-54	Dolor de cuello, rodillas rígidas	5	3	Condición presente durante varios años; mejora después de 3 semanas de tratamiento (3 cápsulas/día)
M, 50-54	Dolores corporales y dolor en rodillas y codos después de una cirugía	7-8	2-3	Mejora después de unos pocos días de tratamiento
F, 65-69	Artritis/tendinitis en las articulaciones de los dedos	6	2	Condición presente durante varios meses; mejora después de unos pocos días de tratamiento (6 cápsulas/día)
F	Artritis reumática	7	Dolor en las articulaciones y dolor general reducidos notablemente	Condición presente por más de 10 años; mejora después de unos pocos días de tratamiento (4 cápsulas/día)

F, 50-54	Lupus/fibromialgia	8	4	Condición presente por más de 10 años; mejora después de 7-8 días de tratamiento
M, 30-34	Dolor en los hombros, mayor del ejercicio	7	4	Mejora después de 2 semanas de tratamiento (4 cápsulas/día)
F	Lesiones preexistentes en rodillas y tobillos	5	3	Mejora después de 2-3 semanas de tratamiento (4 cápsulas/día)
M, 45-49	Hernias de disco, lesiones en hombros y manos	10	Mejora general	Condición presente durante varios meses; mejora después de 1 semana de tratamiento (2 cápsulas/día)
F, 40-44	Molestias en rodillas (sensación crujiente)	4	0	Condición presente durante varios años; mejora después de 2 semanas de tratamiento (2 cápsulas/día)
F	Rigidez articular y dolor de espalda	Variable diariamente	5, mejora en el movimiento de las manos	Condición presente durante varios años; mejora después de 1 semana de tratamiento (2 cápsulas/día)

F, 55-59	Dolor de espalda	6	4	Condición presente por unos pocos años; mejora después de 2 semanas de tratamiento (3 cápsulas/día)
M (paciente mayor)	Dolor en las articulaciones	6	2	Condición presente durante varios años; mejora después de 4 semanas de tratamiento (2 cápsulas/día)
M	Dolor en hombros y rodillas	8	4	Condición presente durante varios años; mejora después de 1 semana de tratamiento (2 cápsulas/día)
M	Dolor de rodilla	8	0	Mejora después de 1 semana de tratamiento (4 cápsulas/día)
F	Artritis	8	5	Mejora después del tratamiento (4 cápsulas/día)
M	Artritis	8	5	Condición presente durante varios años; mejora después del tratamiento (4

				cápsulas/día; el paciente notó una mejora mayor en comparación con el uso de Omega XL)
F	Artritis	6	3	Mejora después del tratamiento (4 cápsulas/día; el paciente notó una mejora mayor en comparación con el uso de Omega XL)

REFERENCIAS

- 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-alpha: 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., Korbust, 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., 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. USA*, 82(22), 7738-7742.

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