(19) OFICIUL DE STAT PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI ROMÂNIA

(11) RO/EP 2370088 T2

(51) Int.Cl.
A61K 38/10 (2006.01) *C07K 7/04* (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)

TRADUCEREA (97)BREVETULUI DE INVENŢIE EUROPEAN NR. EP2370088 CU EFECTE ÎN ROMÂNIA în conformitate cu Legea nr.611/2002

(54) NANOPEPTIDE DERIVATE DIN COLOSTRU DE MAMIFERE PENTRU INFECŢII VIRALE ŞI RECURENTE CU SPECTRU LARG, CU PROCEDEU DE IZOLARE A ACESTORA

(96) Nr. cerere de brevet european: **09827010.1**
(96) Data de depozit a cererii de brevet european: **29/12/2009**

(80) Data publicării de către OEB a menţiunii eliberării brevetului european: **24/08/2016**
(45) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european: **30/03/2017**
(30) Prioritate:
IN MU13532008 27/12/2008
(97) Nr. de publicare a cererii de către O.E.B.: **EP 2370088**
(97) Data publicării cererii de către O.E.B.: **05/10/2011**
(97) Limba folosită pentru proceduri în faţa O.E.B.: **Engleza**
(84) State desemnate:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR
(87) Nr. publicare internaţională: **WO 2010/079511**
(87) Data publicării cererii internaţionale: **15/07/2010**

(73) Titular:
Saharan, Pawan, A-2101-04 Mansarovar Neelkanth Heights Pokhran Road No 1 Thane (west) 400 601, Maharashtra, IN

(72) Inventator:
Saharan, Pawan, A-2101-04 Mansarovar Neelkanth Heights Pokhran Road No 1 Thane (west) 400 601, Maharashtra, IN

(74) Mandatar:
ROMINVENT S.A., BUCURESTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO-A1-01/55199, WO-A2-01/62785, WO-A2-2005/081628, KR-A- 20020 024 902, US-A- 5 683 878, US-A1- 2002 127 279, US-A1- 2005 175 597, US-A1- 2007 212 367

- DATABASE UniProt [Online] 2 August 2005 (2005-08-02), Hong, S.Y. and Qin, Z.B.: "Inhibitor of binding 3" XP002586928 retrieved from EBI Database accession no. Q4JQP9
- STRUFF W G ET AL: "Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: a review--Part II: clinical studies", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, DUSTRI-VERLAG, DEISENHOFEN-MUENCHEN, DE, vol. 46, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 211-225, XP009150270, ISSN: 0946-1965
- Nord J; Ma P; Dijohn D; Tzipori S; Tacket C O: "Treatment with bovine hyperimmune colostrum of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients.", AIDS, vol. 4, no. 6, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 581-584, XP055114700, GB ISSN: 0269-9370

NOTĂ:
În termen de nouă luni de la publicarea de către OEB a menţiunii eliberării brevetului european, orice persoană poate înştiinţa Oficiul European de Brevete despre opoziţia faţă de brevetul european eliberat. Înştiinţarea despre opoziţie trebuie înregistrată în scris şi motivată. Aceasta nu va fi considerată ca fiind înregistrată până la plata taxei de opoziţie (Art.99(1) din Convenţia Brevetului European).
Traducerea a fost depusă de către titular în conformitate cu prevederile art.6 alin (2) sau alin (4) din Legea 611/2002. Oficiul de Stat pentru Invenţii şi Mărci nu verifică traducerea!
Toate încălcările brevetului european cu efecte extinse în România sunt apreciate în conformitate cu prevederile legislaţiei naţionale.

EP2370088

NANOPEPTIDE DERIVATE DIN COLOSTRU DE MAMIFERE PENTRU INFECȚII VIRALE ȘI RECURENTE CU SPECTRU LARG, CU PROCEDEU DE IZOLARE A ACESTORA

Descriere

Domeniul invenției

[0001] Prezenta invenție se referă la nanopeptide izolate din colostru de mamifere cu activitate de imunodulator și antivirală de tip vaccin, prin construirea propriului sistem imunitar al organismului și inhibarea fixării pe receptorii celulari de suprafață.

STADIUL TEHNICII

[0002] Colostrul este substanța de pre-lapte produsă din sânii mamei tuturor mamiferelor în timpul primelor 24 de ore de lactație, de obicei primele 3 mese de lapte. Colostrul a fost cunoscut ca potențator imunitar din cele mai vechi timpuri. Colostrul declanșează cel puțin 50 de procese la nou-născut, inclusiv transferul tuturor factorilor imunitari și întreaga memorie din propriul sistem imunitar al mamei. Colostrul de bovine este de până la de 40 de ori mai bogat în factori imuni decât colostrul uman, incluzând peptide nanoinformaționale, polipeptide bogate în prolină, imunoglobuline, citokine, interferon, lactoferină și factor de transfer. Ele sunt produse de limfocite T și pot transfera capacitatea de a recunoaște un agent patogen către celulele naive. Cu toate acestea, până în prezent nimeni nu a fost în măsură să izoleze ingredientele active, în special nanopeptidele cu greutate moleculară mică nano informaționale și să formuleze un produs care să prezinte același efect cu cel al primelor 3 mese de lapte matern, după nașterea copilului.

[0003] „Colostrul stimulează țesutul limfoid oferind beneficii în cazul persoanelor în vârstă sau cu imunodeficiență ".... Dr. Bocci, Bremen, Corradeschi, Luzzi și Paulesu; Journal Biology.

[0004] „Cercetătorii au raportat că respectiv colostrul stimulează maturarea Limfocitelelor B (tip de globule albe din sânge) și le primează pentru producerea de anticorpi, stimulează creșterea și diferențierea celulelor albe din sânge. Activitatea similară din colostrul de vacă și uman poate activa, de asemenea, macrofagele "... Dr. M. Julius, Universitatea McGill, Montreal: Science News.

[0005] „Colostrul bovin conține niveluri ridicate de factori de creștere care promovează creșterea celulară normală și sinteza ADN-ului" ... Dr. Oda, Shinnichi, și alții;

[0006] Fiziologie biochimică comparativă. „Doctorii sugerează că un rol important pentru factorii de creștere stă în promovarea vindecării rănilor. Vindecarea accelerată este posibilă ca tratament în traume și răni chirurgicale "... Dr. Bhora, și alții; Journal. Surg. Res.

[0007] US 20070212367 - Această cerere de brevet descrie un PRP imunologic activ izolat din fluide de colostru de la mamifere pentru tratamentul bolilor virale și non-virale, o metodă și un sistem de prelucrare a fluidelor de colostru de la mamifere și o formulare farmaceutică.

[0008] US 2005/175597 - Această cerere de brevet de invenție a fost publicată la data de 11 august 2005 și se referă la compoziții care conțin materiale bioactive și colostru de la mamifere, și la procedee pentru fabricarea acestora.

[0009] US 2002/127279 - Această cerere de brevet a fost publicată la data de 12 septembrie 2002 și se referă la un procedeu pentru izolarea peptidelor și produselor obținute folosind aceleași.

[0010] KR 2002 0024902 - Această cerere de brevet a fost publicată la data de 3 aprilie 2002 și se referă un potențiator de imunitate care conține o fracțiune de colostru și la procedee de preparare a acestuia.

[0011] Struff, W. G. și colab., International Journal of Clinical Pharmacology and Therapy, 46 (5), 211-225 (2008) - Acest articol oferă o revizuire privind utilizarea de colostru de la bovine în medicina clinică.

[0012] Colostrul ca atare conține sute de peptide mici care servesc unor scopuri numeroase. Segregarea și izolarea lor va facilita colectarea de informații suplimentare în ceea ce privește funcția lor individuală și va ajuta la formularea de terapii specifice și specifice pentru numeroase boli care sunt vindecate prin intermediul colostrului. Studiile au documentat prezența numărului de peptide bioactive, dar nu a fost făcută nici o mențiune cu privire la utilizarea acestor fragmente de peptide, la succesiunea lor specifică sau informații referitoare la izolarea acestora. Peptidele sunt extrem de sensibile la temperatură, pH, stres și factori de forfecare care ridică mai multe dificultăți în izolarea lor și păstrarea activității biologice, precum și la metoda de colectare de colostru, astfel încât să-l asigure pacientului în discuție menținându-i activitatea biologică completă.

[0013] Prezenta invenție se adresează acestor neajunsuri prin furnizarea de nanopeptide izolate din colostru, a metodei lor de izolare și a utilizărilor terapeutice ale fragmentelor de nano-peptide izolate.

Rezumatul invenției

[0014] Prezenta invenție este definită în revendicările anexate.

[0015] Un exemplu de realizare a prezentei invenții asigură o formulare care cuprinde peptide izolate din colostru de la mamifere având secvențe așa cum este expus în SECV ID 1-8 denumită în continuare peptide din seria Radha 108, în care peptidele funcționează pentru a modula imunitatea celulară și asigură inhibarea fixării pentru antigene străine / virusuri asupra receptorilor de suprafață celulari, împreună cu traversarea de BBB (bariera hematoencefalică) și tratarea gazdei bolilor în creier.

[0016] Colostrul este substanța de pre-lapte produsă din sânii mamei tuturor mamiferelor în timpul primelor 24 de ore de lactație, de obicei primele 3 mese de lapte. Într-un exemplu de realizare, colostrul utilizat în prezenta invenție este de origine bovină. Colostrul bovin are de 40 de ori mai mulți factori imunitari decât colostrul uman și are capacitatea de a vindeca o serie de afecțiuni virale, imune și autoimune.

[0017] Într-un alt exemplu de realizare, se asigură o metodă de tratament a tulburărilor legate de imunitate, inclusiv boli autoimune, metoda cuprinzând adiministrarea unui pacient care suferă de astfel de afecțiuni a unei cantități eficiente terapeutic de formulare care cuprinde peptide cu SECV ID 108.

[0018] Într-un alt exemplu de realizare, se furnizează o metodă de tratament a sindromul imunodeficienței dobândite sau SIDA, metoda cuprinzând administrarea unui pacient care suferă de SIDA, a unei cantități eficiente terapeutic de formulare care cuprinde peptide cu SECV ID 1-8.

[0019] Formularea poate fi furnizată într-un lichid, gel pulverulent și orice alte forme farmaceutice de livrare. Acesta poate fi administrat oral, intravanos sau prin plasture dermic pentru absorbție prin piele.

[0020] Prezenta invenție este ilustrată cu ajutorul desenelor însoțitoare și prin descrierea detaliată și exemplele prezentate mai jos. Desenele și exemplul sunt pentru explicații și în scopul clarității.

[0021] Aspectele de mai sus și avantajele prezentei invenții vor deveni mai clare și apreciate prin descrierea detaliată și prin exemplu.

Scurtă descriere Figurilor

[0022] Figura 1: Rezoluția eșantionului de colostru bovin utilizat în prezenta invenție, prin spectre MS pentru a se obține diferite fragmente de proteine de greutăți moleculare diferite.

DESCRERE PE SCURT A INVENȚIEI

[0023] Prezenta dezvăluire se referă la peptide izolate din colostru, la metodele inovatoare de colectare, transport, depozitare, izolare și la utilizările terapeutice ale acestora.

[0024] Un exemplu de realizare a prezentei invenții se referă la peptide izolate din colostru de mamifere. Mamiferul poate fi bovin, de exemplu vacă, capră, bivol sau orice alt mamifer adecvat. Într-un exemplu preferat a prezentei invenții, peptidele izolate sunt obținute de la vaci și bivoli, în particular. Peptidele sunt secvențe de aminoacizi cu lanț scurt care sunt fragile, sensibile la temperatură, pH și efort de forfecare și sunt dificil de izolat. Aceste peptide sunt într-o formă separată. Ele nu sunt legate de nici o altă moleculă. Peptidele izolate cuprind grupul de SECV ID (1-8) și vor fi denumite în continuare Radha 108. Peptidele Radha 108 nu coagulează, având greutate moleculară redusă. Ele sunt izolate din zer fără grăsimi obținut din colostru. Peptidele Radha 108 au o greutate moleculară în intervalul 826-2990 Da.

[0025] Conform unei realizări a prezentei dezvăluiri, se prezintă o metodă de colectare și prelucrare a colostrului și izolarea secvențelor de aminoacizi mici cuprinzând SECV ID (1-8), metoda cuprinzând etapele de separare de grăsimi, brânză și zer de colostru, trecerea zerului printr-o serie de filtre pentru a elimina solidele în suspensie și pentru a reduce încărcătura microbiană, urmată de ultra și nano filtrare pentru a obține o fracție de proteină având o greutate moleculară mai mică de 10000 Da, mai precis sub 3500 Da, în care filtrarea se face la o presiune scăzută, cu forfecare și temperatură minime pentru a conserva nano peptidele Radha 108. Chiar și mijloacele de pompare utilizate pentru pomparea lichidului prin sistem este format din pompe cu turație mică. Într-un exemplu de realizare, filtrele nano și ultra sunt proiectate să funcționeze la forfecare și presiune scăzute, mai mici de 5 kg / cm^2. Într-un alt exemplu preferat de realizare, filtrele sunt proiectate să

funcționeze în intervalul de la 0,5 kg / cm^2 la 4kg / cm^2. Într-un alt exemplu preferat de realizare, filtrele sunt proiectate să funcționeze într-un interval de presiune între 0,5 kg / cm^2 și 2,0 kg / cm^2. Nano și ultra filtrarea de proteine la astfel de presiuni scăzute este practic nemaiauzită din cauza dificultăților practice în obținerea de cantități eficiente de proteină în limite de timp acceptabile. Prezenta invenție rezolvă astfel problema din stadiul tehnicii în ceea ce privește izolarea și separarea moleculelor peptidice mici.

[0026] Colostrul este colectat după livrarea de la mamifere și răcit la o temperatură cuprinsă în jur de -20 ° C în decurs de 3 ore, pentru a păstra activitatea biologică a nano peptidelor serie Radha 108. Trebuie avută grijă să se păstreze aceste peptide sensibile din faza de colectare prin asigurarea de pungi de plastic non reactive speciale, realizate personalizat, care să ajute la colectarea aseptică non-reactivă a laptelui de vacă. Manipulanții și colectorul de lapte trebuie să fie instruiți special pentru colectare, în scopul de a evita modificări drastice ale peptidelor sensibile, astfel încât acestea să nu își piardă activitatea. Colostrul este apoi decongelat treptat la temperatura camerei peste noapte pentru a aduce temperatura la 4 până la 5 ° C, și pompat la un separator de smântână pentru îndepărtarea grăsimilor la 4000 rpm la 45 ° C, apoi este pasteurizat prin creșterea temperaturii la 72 ° C timp de 15 secunde, urmat de răcire la 48 ° C. Colostrul este apoi plasat în cuva de brânză și tratat cu cheag enzimatic timp de 45-60 minute pentru a forma cașul și zerul. Zerul este răcit și trecut printr-o serie de filtre până la nano și ultra-filtrare de excludere moleculară la presiune și temperatură joasă, pentru separarea la peptide având o greutate moleculară mai mică de 10000 Da. După procedeu se are grijă să se ajusteze pH-ul și să se păstreze constant în intervalul dintre pH 4 și pH 6, pentru a se evita degradarea și pierderea activității biologice a peptidelor Radha 108. Fracțiunea de proteină conține peptide sub 10000 Da.

[0027] Într-un alt exemplu de realizare a prezentei invenții, se prezintă o metodă de tratare a Sindromul Imunodeficienței Dobândite sau SIDA, metoda cuprinzând administrarea unui pacient care suferă de SIDA, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-o formulare care cuprinde peptide cu SECV ID 1-8.

[0028] Peptidele din prezenta invenție blochează receptorii GP120, 160, 180, 41 și alte situsuri ale receptorilor celulari prin care un antigen străin / virus pătrunde în sistemul imunitar și alte tipuri de celule. Topografic, aceste peptide sunt similare cu dimensiunea virusului și, atunci când ajung pe aceste situsuri de receptori, mimează

virusul / antigenul, limitând astfel intrarea agenților infecțioși străini prin inhibare competitivă de fixare. Produsul are, de asemenea, un efect similar vaccinului prin furnizarea de memorie la Celulele B la nivel de celule stem și de a preveni izbucnirea viitoare a bolii.

[0029] Într-un alt exemplu de realizare a prezentei dezvăluiri, se prezintă o metodă de tratare a gripei porcine la mamifere, metodă care cuprinde administrarea către un pacient care suferă de gripă porcină, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-o formulare care cuprinde peptide de Radha 108.

[0030] Într-un alt exemplu de realizare a prezentei invenții, se prezintă o metodă pentru tratarea tulburărilor imune incluzând afecțiunile autoimune, cuprinzând administrarea către un pacient care suferă de astfel de afecțiuni a unei doze / cantități eficiente farmaceutic din formularea care cuprinde peptide de Radha 108.

[0031] Acțiunea imuno-modulatoare a peptidelor Radha 108 are loc prin stimularea maturării timocitelor imature în celulele T helper sau supresoare, în funcție de nevoia organismului. Celulele T helper prezintă antigene (cum ar fi proteina virală) la limfocitele B, care produc anticorpi pentru acel antigen. Celulele T helper ajută, de asemenea, la producerea de celule T de memorie, care păstrează memoria unui antigen, în scopul de a accelera producerea de anticorpi, în cazul în care antigenul este re-întâlnit în viitor, creând o memorie de tip vaccin pentru prima dată în istoria de utilizare a colostrului. Celulele T supresoare, pe de altă parte, dezactivează alte limfocite după ce o infecție a fost eliminată, pentru a evita deteriorarea țesuturilor sănătoase. Peptidele din prezenta invenție promovează, de asemenea, creșterea și diferențierea celulelor B în răspunsul la o infecție și diferențierea și maturarea macrofagelor și monocitelor. Activitatea celulelor Natural Killer din glanda timus prin serie Radha 108 de peptide care traversează BBB (Bariera hematoencefalică), celulele citotoxice ale sistemului imunitar înnăscut, a fost crescută până la 5 ori prin peptidele (Radha 108) conform prezentei invenții.

[0032] Peptidele din prezenta dezvăluire sunt cunoscute că modulează sistemul de citokine, de asemenea. Stimulează producerea unei game largi de citokine, inclusiv imuno modulatori ai factorului de necroză tumorală al citokinelor pro-inflamatorii - alfa (TNF-alfa) și gamma (INF - interleukina citokinelor inflamatorii (IL1, IL2, IL6, IL10, IL11, IL12).

[0033] Peptidele din prezenta dezvăluire sunt nanopeptide mici, cuprinse între 800 și 3200 daltoni și, prin urmare, sunt capabile să traverseze bariera

hematoencefalică, și să trateze infecțiile virale și tulburările neuronale în creier prin semnalizarea glandei pituitare localizate în creier.

[0034] De asemenea, ele acționează asupra căilor de semnalizare prin intermediul glandei pituitare, care trimite semnale la timus în gât și în celulele stem din măduva osoasă, construind propriul sistem imunitar al organismului în mod natural, fără ajutorul altor medicamente externe.

[0035] Conform unui alt exemplu de realizare a prezentei invenții, se asigură o formulare farmaceutică care cuprinde peptidele din prezenta invenție ca ingredient activ farmaceutic (API) și purtători acceptabili farmaceutic. Opțional, formularea mai cuprinde Polipeptide cu conținut ridicat de prolină sau PRP, întâlnite frecvent în colostru ca ingredient activ suplimentar. Formularea este utilizată pentru tratamentul unei game largi de boli, cum ar fi virale, bacteriene, micobacteriene, fungice, parazitare, tulburări ale sistemului imunitar, inclusiv boli autoimune, etc.

[0036] Conform unei alte realizări a prezentei dezvăluiri, se prezintă o metodă pentru tratarea unei persoane care suferă de tulburări legate de imunitate, metodă care cuprinde administrarea unei dozei de formulare care cuprinde peptide conform prezentei invenții în intervalul de la 2 mL la 5 mL sub formă de pulverizare în interiorul gurii, pe mucoasa bucală, sau pe orice altă suprafață a pielii corpului sau în cavitatea nazală (de 4 ori pe zi).

[0037] Conform unei alte realizări a prezentei dezvăluiri, formularea poate fi aplicată local sau ca plasture pe piele / trans-dermic sau pe cale nazală sau intravenoasă.

[0038] Formularea din prezenta dezvăluire este cunoscută ca vindecând în jurul a 108 boli care includ SIDA, alergii, boală Alzheimer, hiperplazie benignă de prostată, cancer, hipertensiune arterială, lupus, afte, autism, boala Perth, sindromul premenstrual și endometrioza, boala prion, psoriazis, sindromul Sjogren, atrofie musculară spinală, trombocitopenie, arsuri, infecții de la mușcături de insecte, erupții cutanate datorate purtării de scutece, leziuni herpetice, boala perther, faringită, porfirie, fenomenul Raynaud, sarcoidoză, boala celiacă, pancitopenie cronică, boala Crohn, diabet zaharat de tip II, fibromialgie reumatismală, mononucleoză, scleroză multiplă, artrită reumatoidă, artrită Osten, atrofie musculară spinală, mușcătură de păianjen Brown, regenerare corneană, diaree, sindrom Guillain Barre, anemie hemolitică, purpură trombocitopenică idiopatică, miastenia gravis, lupus, tuberculoză, HIV, hepatită A & C, rabie la câini, infecții virale acute, febra dengue, virus Papiloma uman, Parvo, faringită, rabie, SARS, Shingles, infecții virale ale

tractului respirator, negi plantari, răceli și gripă, limfom și Herpes simplex I & II, vindecarea rănilor, construirea densității osoase și elasticitatea pielii, factori de creștere de tip insulină, anti-îmbătrânire etc.

[0039] Beneficii suplimentare de sănătate de la seria Radha 108 includ anabolizanți, anti-îmbătrânire, anti-fungice, anti-inflamator, anti-microbiene, asimilare, performanță atletică, culturism, densitate osoasă, creștere de citokine, digestie, factori de creștere epitelială, deazvoltarea florei bacteriene folositoare, factori de creștere de tip insulină, sporire a imunității, imunoglobulină, interferon, interleukine, permeabilitate intestinală, lactoferină, MSM, tonifiere musculară, elasticitate a pielii, vitalitate, factori de creștere de transformare, vindecarea rănilor și pierdere în greutate pentru obezi.

[0040] Invenția va fi acum descrisă cu ajutorul exemplului oferit aici.

Exemplu

[0041] Bovine gestante au fost identificate din diverse turme din districtul Kheda Amul a Anand din Gujarat, India, prin intermediul unor sisteme computerizate de evidență a lactatelor Amul. Colostrul obținut de la bovine la scurt timp după naștere a fost colectat și depozitat în vase aseptice de colectare cu temperatură controlată, la o temperatură de 4 ° C, pentru a păstra activitatea biologică a peptidelor. A fost congelat în continuare la -20 ° C până la procesarea ulterioară. Pentru separarea peptidelor din prezenta invenție, colustrul a fost decongelat treptat la temperatura camerei peste noapte pentru a aduce temperatura la 4 până la 5 grade C. Acesta a fost apoi pompat în separatorul de smântână pentru îndepărtarea grăsimilor la 4000 rpm la 45 grade C. A fost urmat de pasteurizare la o temperatură de 72 ° C timp de 15 secunde, urmat de răcire la 48 ° C și plasarea colostrului pasteurizat în cuva de brânză. Cheag enzimatic a fost adăugat la cuva de brânză și se lasă să reacționeze timp de 60 min, după care cheagul format a fost separat de zerul de colostru. Zerul a fost răcit la 4 până la 10 ° C. Apoi a fost trecut printr-o serie de filtre, pentru a elimina solidele în suspensie și încărcătura microbiană până la nano ultra-filtrare de excludere moleculară pentru separarea peptidelor cu greutate moleculară sub 10 kDa, cu scopul de a obține peptidele conform prezentei invenții într-un amestec, împreună cu seria Radha 108 și PRP prezent în colostru. În timpul procesului se realizează diafiltrarea, prin adăugarea a 10% apă purificată din cantitatea totală a șarjei. Prezența peptidelor din SECV ID 1-8 a fost verificată folosind tehnici HPLC.

[0042] La fracția obținută după ultra-filtrare se adaugă conservanți și pH-ul este ajustat între 4 și 6. Formularea a fost asigurată sub formă de pulverizare, în scopul de a testa eficacitatea acesteia în studii umane.

[0043] Pacienții cărora li s-a administrat formularea cuprinzând peptidele din prezenta invenție nu au fost expuși nici înainte, nici nu se aflau sub tratament cu orice alte medicamente, în special, terapii cu anti-retrovirale și antibiotice la momentul administrării medicamentului. Astfel, formularea conform prezentei invenții poate fi utilizată în mod eficient ca terapie de sine stătătoare.

[0044] Punctele finale aprobate de OMS pentru a evalua utilizarea terapeutică a formulării conform prezentei invenții au fost analizate științific prin intermediul studiului sponsorizat și monitorizat de guvernul indian pe 2 seturi de pacienți, la spitalul municipal terțiar LTMMC și LTMG din Sion, Mumbai, cu analiza de punct final pentru creștere în greutate și simptome clinice efectuată la Spitalul Sion și cele viralogice (încărcătură virală) și imunologice (analiza numărului de celule CD4 absolute), fiind realizate la două centre separate, recunoscute pe plan internațional (Institutul de imunohematologie, Consiliul Indian al Institutului de cercetare medicală din Mumbai și Laboratorul Central Metropolis din Mumbai, India, având aprobarea din partea Asociației patologice SUA și acreditare de la NABL, Departamentul de Știință și Tehnologie, Guvernul Indiei.

[0045] S-a realizat analiza statistică a ambelor seturi de studii la institutul de cercetare medical primar din India; All India Institute of Medical Sciences din New Delhi.

[0046] **A.** Inițial, 50 de participanți au fost evaluați în clinică o dată pe săptămână în primele 4 săptămâni de tratament, apoi la fiecare 2 săptămâni timp de 8 săptămâni rămase ale studiului. Ei au fost evaluați cu privire la simptomele clinice și fizice prin intermediul formularului de evaluare a simptomurilor, examen fizic, efect secundar al tratamentului și acceptabilitate a medicamentului pe bază de vizite de urmărire. Au fost efectuate teste de sânge pentru a măsura numărul de celule CD4, încărcătura virală cu HIV, hemoglobina, numărul de celule albe din sânge, testul funcției hepatice și testul funcției renale la momentul inițial și la sfârșitul studiului de 12 săptămâni.

[0047] Numărul de celule CD4 și CD8 a fost analizat prin citometrie în flux, iar încărcătura virală prin Reacție în lanț de polimerază la începutul și la sfârșitul celor 12 săptămâni.

[0048] Punctele finale principale de eficacitate a studiului au fost efectul acestei terapii asupra markerilor bolii HIV, inclusiv simptome clinice și constatări fizice, creștere / pierdere în greutate, împreună cu starea generală a pacienților și încărcătura virală HIV și numarul de celule CD4, care au arătat în mod constant rezultate pozitive în ambele studii clinice efectuate începând cu anul 2005.

[0049] Creștere în greutate: O creștere în greutate consistentă a fost observată la toți pacienții la vizitele de urmărire, care a fost unul dintre principalele puncte finale (Tabelul 1). Câștigul în greutate medie după 12 săptămâni de tratament a fost de 4,73 kg per pacient, fiind deosebit de semnificativ statistic ($p < 0,001$).

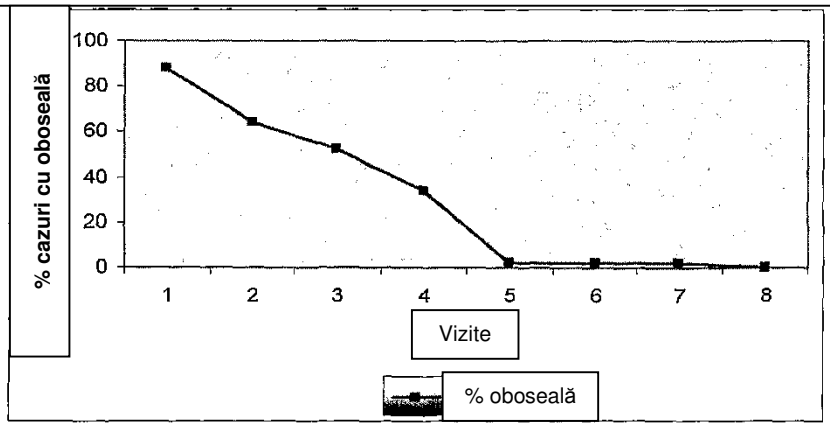
Tabelul 1: modificări ale greutății corporale medii după tratament

Durata în săptămâni	Greutate medie (N = 50)
Inițial	50,48 ± 10,97
2	50,77 ± 11,26
3	51,38 ± 10,94
4	52,33 ± 10,73
6	53,89 ± 11,17
8	54,59 ± 10,89
10	55,44 ± 11,07
12	55,21 ± 9,42

[0050] Parametrii clinici: toate simptomele clinice au dispărut în timpul celor 12 săptămâni de tratament. Aceste reduceri sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

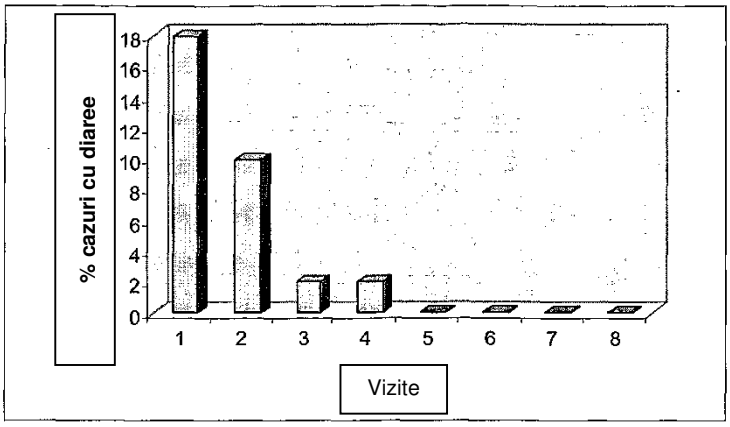
[0051] Oboseală / stare generală de rău: 88% din totalul cazurilor din studiu au avut inițial simptome de oboseală. După tratament, la sfârșitul celei de a 2^{-a} săptămâni, proporția de simptome de oboseală a avut o scădere semnificativă de la valoarea inițială. După cea de a 6^{-a} săptămână încolo doar unul sau doi pacienți au manifestat oboseală (Figura 1).

Figura 1: procent de cazuri cu oboseală / stare generală de rău după tratament



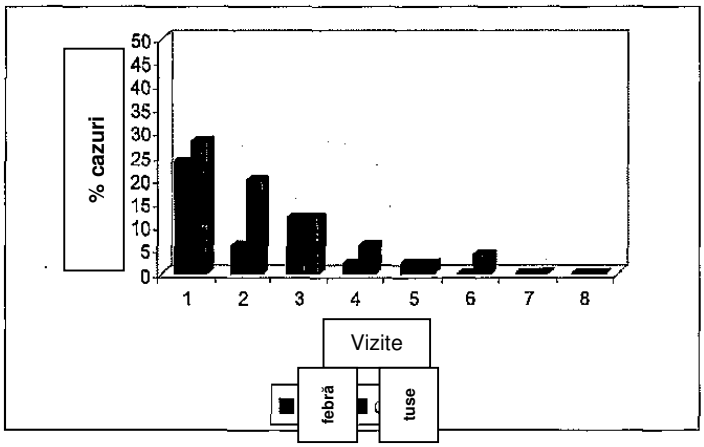
[0052] Diareea: 18% din totalul cazurilor din studiu au avut diaree inițial și după tratamentul din cea de a 5^{-a} săptămână încolo toți pacienții au avut atenuare a diareei (Figura 2).

Figura 2: procent de cazuri cu diaree după tratament



[0053] Febra: Febra a fost raportată la 24% din totalul cazurilor din studiu la momentul inițial și din cea de a 7^{-a} săptămână încolo nici un pacient nu a avut febră, cu scădere semnificativă din a 4^{-a} săptămână încolo. Tuse: 28% din totalul cazurilor din studiu au avut un simptom al tusei la momentul inițial, cu eradicare din cea de a 3^{-a} săptămână încolo și toți au cunoscut o îmbunătățire din a 10^{-a} săptămână încolo (Figura 3).

Figura 3: procent de cazuri cu febră / tuse după tratament

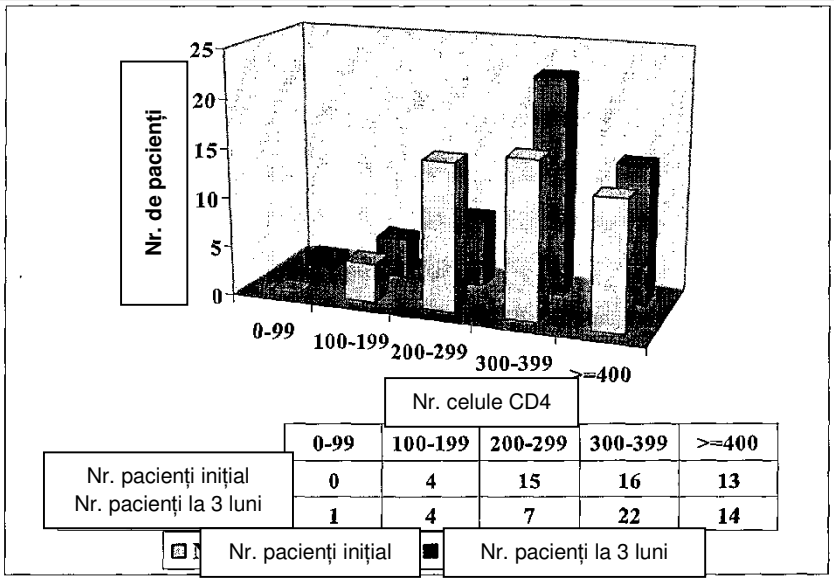


[0054] Erupții cutanate și Herpes zoster: 14% și 12% din totalul cazurilor de studiu au avut erupții cutanate și herpes zoster la momentul inițial, respectiv, și din cea de a 4-a săptămână încolo nici un singur pacient nu a suferit de erupții cutanate.

[0055] În mod similar, greața, vărsăturile și tulburările de somn s-au îmbunătățit semnificativ în timpul tratamentului cu formularea conform prezentei invenții.

[0056] Numărul absolut de celule CD4 și încărcătura virală cu HIV: numărul de celule CD4 a fost disponibil pentru 48 pacienți cu valori pre și post tratament. A existat o creștere a numărului de celule CD4 în medie cu 51 (medie a numărului de celule CD4 de la 312 la 363). Acest lucru are o semnificație statistică la limită (p = 0,06). 30 din 48 (62,5%) pacienți au prezentat creștere a numărului de celule CD4 și 18 pacienți (37,5%) au prezentat o scădere a numărului de celule CD4. Intervalul numărului de celule CD4 cu număr de pacienți la momentul inițial și la sfârșitul studiului este prezentat în figura 4.

Figura 4: Nr. de pacienți la momentul inițial și la sfârșitul tratamentului cu interval de numărare a celulelor CD4



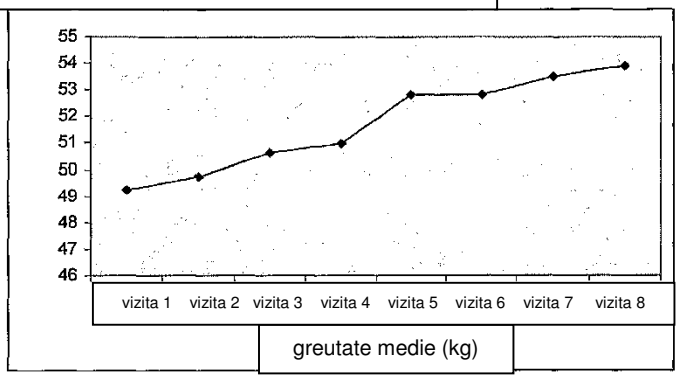
Nr. celule CD4	0-99	100-199	200-299	300-399	>=400
Nr. pacienți inițial	0	4	15	16	13
Nr. pacienți la 3 luni	1	4	7	22	14

[0057] Valoarea medie a încărcăturii virale HIV log a scazut semnificativ statistic de la 4,63 la 4,18 după 12 săptămâni de tratament (p = 0,03). O tendință similară a fost observată în încărcătura virală medie pre-tratament și post-tratament (de la 92458 *vs*. 25,332, p <0,001).

B. Un alt studiu a fost efectuat cu 51 de pacienți pozitivi la HIV prin administrarea formulării cuprinzând peptidele conform prezentei invenții, timp de douăsprezece săptămâni. Rezultatele obținute sunt următoarele:

[0058] Creșterea în greutate: greutatea monitorizată la fiecare vizită a arătat un câștig semnificativ la toți cei 51 pacienți cu HIV, cu o creștere în greutate medie de 4,68 ± 1,9 kg după 12 săptămâni (Figura 5)

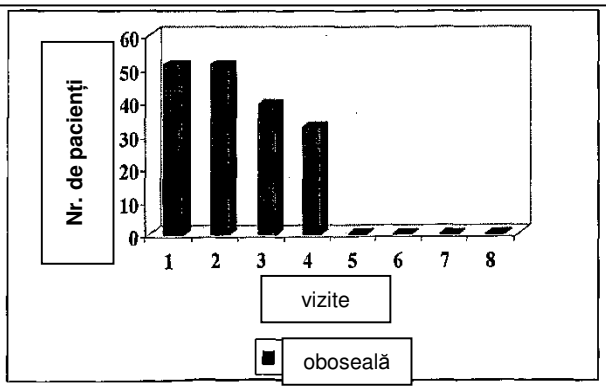
Figura 5: greutate medie în kg în timpul terapiei



[0059] Parametrii clinici: Toate simptomele clinice au dispărut în timpul celor 12 săptămâni de tratament (cele mai multe dintre ele au dispărut în termen de 3 săptămâni). Aceste reduceri sunt semnificative din punct de vedere statistic (p <0,05).

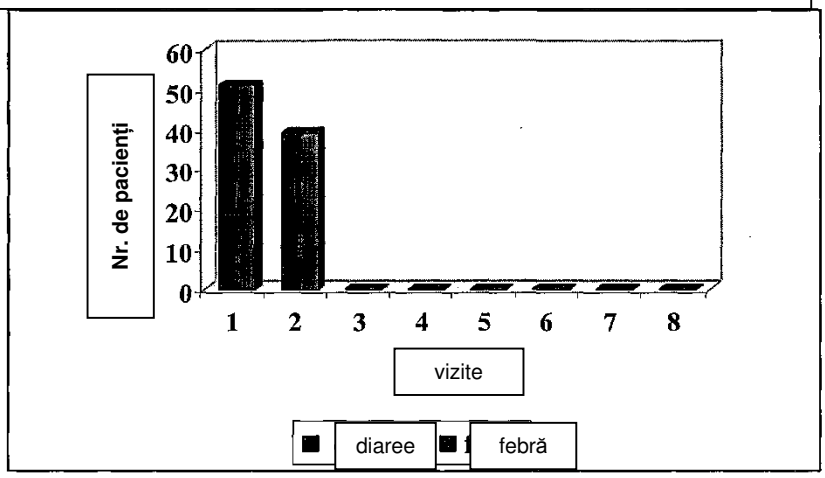
[0060] Oboseală / stare generală de rău: 100% din numărul total de cazuri din studiu au avut simptome de oboseală la momentul inițial. După tratament, la sfârșitul celei de a 2^{-a} săptămâni, proporția de simptome de oboseală au avut o scădere semnificativă față de momentul inițial. După cea de a 6^{-a} săptămână încolo toți pacienții au avut o eradicare a oboselii (Figura 6).

Figura 6: Nr. de pacienți cu oboseală / stare generală de rău după tratament



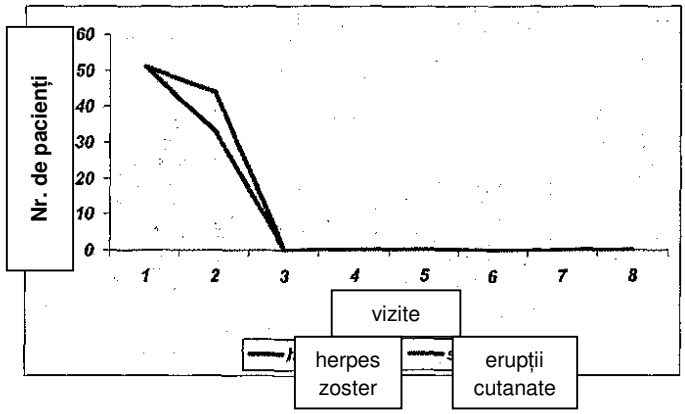
[0061] Febră și diaree: 100% din totalul cazurilor din studiu au avut febră și diaree la momentul inițail și după tratament din cea de a 3^{-a} săptămână încolo toți pacienții au avut o eradicare a diareei și febrei (Figura 7).

Figura 7: Nr. de pacienți cu febră / diaree în timpul tratamentului



[0062] Erupții cutanate și Herpes zoster: Toți pacienții au avut erupții cutanate asociate cu HIV și herpes zoster la momentul inițial și au devenit asimptomatici după cea de a 3^{-a} săptămână încolo, sub tratament.(Figura 8)

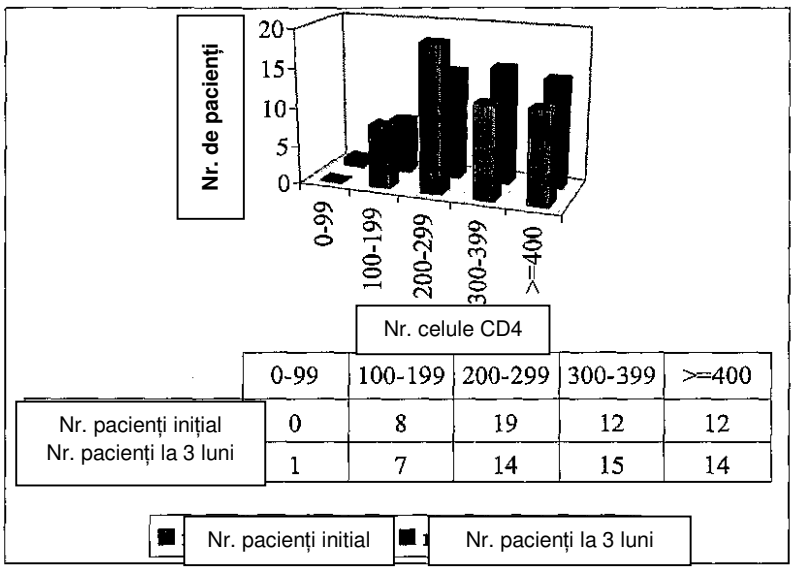
Figura 8: Nr. de pacienți cu erupții cutanate asociate cu HIV și herpes zoster după tratament



[0063] Îmbunătățire similară observată în ceea ce privește greața, vărsăturile, tusea și tulburările de somn și toti pacienții au devenit asimptomatici din cea de a 3^{-a} săptămână încolo.

[0064] Numărul absolut de celule CD4: numărul de celule CD4 a fost disponibil pentru toți cei 51 pacienți cu valori pre și post tratament. A existat o creștere a numărului de celule CD4 în medie cu 27 (numărul mediu de celule CD4 de la 276 la 305). Această valoare este semnificativă din punct de vedere statistic (p = 0,042). Intervalul numărului de celule CD4 cu numărul de pacienți inițial și la sfârșitul studiului este prezentat în figura 9. Figura 9: Nr. de pacienți și intervalul numărului de celule CD4.

Figura 9: Nr. de pacienți și interval de numărare a celulelor CD4



	0-99	100-199	200-299	300-399	>=400
Nr. pacienți inițial	0	8	19	12	12
Nr. pacienți la 3 luni	1	7	14	15	14

[0065] Încărcătura virală în HIV: După 12 săptămâni de tratament cu seria RADHA108, la sfârșitul studiului, încărcătura virală medie a arătat o scădere semnificativă (p <0,001) față de momentul inițial.

[0066] Efecte adverse: Toți pacienții au tolerat bine formularea conform prezentei invenții, fără efecte secundare.

C. Rezultatul analizelor statistice ale studiului efectuat pe 50 de pacienți pozitivi la HIV este următorul:

Sr. Nr.	Parametru	Inainte	După 12 săptămâni	Valoarea P
I. Fizic (N = 50)				
1.	Greutate	50,48 (10,97)	55,21 (9,42)	<0,001
II. Simptome clinice (N = 50)				
1.	Oboseală	44 (88%)	0 (0%)	<0,001
2.	Diaree	9 (18,0%)	0 (0%)	0,004
3.	Greaţă	8 (16%)	0 (0%)	0,008
4.	Vărsături	7 (14%)	0 (0%)	0,02
5.	Febră	12 (24%)	0 (0%)	<0,001
6.	Tuse	14 (28%)	0 (0%)	<0,001
7.	TB	6 (12%)	0 (0%)	0,03
8.	Tulburări de somn	13 (26%)	0 (0%)	<0,001
9.	Erupție cutanată	7 (14%)	0 (0%)	0,02
10.	Herpes zoster	6 (12%)	0 (0%)	0,03
III. Virusologic				
1.	Log HIV-I,	5,11 (0,090)	4,103(1,32)	<0,001
	ARN n = 34	206057	25280	<0,001
	Valoarea mediană a HIV-I	62884	1665	
	ARN	508038	87511	
	A 25^{-a} percentilă			

III. Virusologic				
	a 75-a percentilă			
IV. imunitar				
1.	CD4	312,5	363,5	0,06
	(N=48)	275,5	294,2	
	Median	430	435	
	a 25-a percentilă			
	a 75-a percentilă			

[0067] Aceste rezultate arată că formularea care conține nano-peptida din prezenta invenție reprezintă un medicament sigur și eficient în creșterea în greutate și starea generală a pacienților, cu o scădere a încărcăturii virale și creștere a numărului de celule CD4. Astfel, peptidele din prezenta invenție, ca ingrediente farmaceutice active, reprezintă o promisiune bună pentru tratamentul pacienților cu HIV în toate grupele de vârstă.

[0068] Peptidele seria Radha 108 conform prezentei invenții sunt active în tratamentul diferitelor boli și afecțiuni ca cele explicitate mai sus.

LISTA DE SECVENȚE

[0069]

<110> Sahara, Pawan

<120> Nanopeptide derivate din colostru de la mamifere pentru infecții recurente și virale cu spectru larg, cu o metodă de izolare a acestora

<130> Colostru

<140> 1353 / MUM / 2008

<141> 2008-12-27

<160> 8

<170> Patentln versiunea 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

```
Glu Leu Val Pro Gly Val Pro Arg Gly Thr Gln Leu
1               5                   10
```

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

```
Val Ala Ile Ile Gln His Met Ile Lys Lys Leu Arg
1               5                   10
```

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

```
Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe
1               5                   10
```

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 4

```
Arg Leu Asn Ala Arg Met Ala Glu Leu Arg
1               5                   10
```

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
  Ser Ser Leu Gln Val Leu Asn Met Ser His Asn

1               5                   10
```

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 6

```
Glu Tyr Gln Glu Leu Met Asn Val Lys
1               5
```

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 7

```
Val Asp Thr Leu Asn Asp Glu Ile Asn Phe Leu Arg
1               5                   10
```

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> virusul bolii de tip Yaba

<400> 8

```
Asp Gly Ile Val Asn Glu Asn Leu Ala Glu Arg
1               5                   10
```

Revendicări

1. Formulare care cuprinde un amestec de peptide izolate din colostru de la mamifere sau peptide sintetice cu greutate moleculară mai mică de 10000 Da, în care amestecul cuprinde fiecare din peptidele având secvențe așa cum se arată în SECV ID 1-8 care funcționează pentru a modula imunitatea celulară și a asigura inhibarea fixării de antigene străine / virusuri asupra receptorilor celulari de suprafață.

2. Formulare conform revendicării 1, în care formularea cuprinde între 0,1% și 1% în volum peptide.

3. Formulare conform revendicării 1 care cuprinde, în plus, purtători acceptabili farmaceutic.

4. Formulare conform revendicării 1 care cuprinde, suplimentar, peptide izolate din colostru de mamifere și având o greutate moleculară mai mică de 10000 Da.

5. Formulare conform revendicării 1 formulată pentru a fi aplicată local, ca un plasture dermic, ca pulverizare pe piele sau ca soluție nazală sau intravenoasă.

6. Formulare conform revendicării 1 pentru utilizare ca ingredient farmaceutic activ.

7. Formulare conform revendicării 1 pentru utilizare în tratarea unei afecțiuni imune.

8. Formulare pentru utilizare conform revendicării 7, în care afecțiunea imună este sindromul imunodeficienței dobândite sau SIDA.

9. Formulare pentru utilizare conform revendicării 7 sau revendicării 8, în care afecțiunea imună este tratată prin administrarea formulării așa cum este definită în revendicarea 1, într-o cantitate de la 2 mL până la 5 mL , de patru ori pe zi.

10. Utilizare a unei formulări așa cum este definite în revendicarea 1 la fabricarea unui medicament pentru tratamentul unei afecțiuni imune.

11. Utilizare conform revendicării 10, în care afecțiunea imună este tratată prin administrarea formulării așa cum este definită în revendicarea 1, într-o cantitate de la 2 mL până la 5 mL , de patru ori pe zi.

12. Procedeu pentru izolarea unui amestec de peptide din colostru de mamifere având greutate moleculară mai mică de 10000 Da, în care amestecul cuprinde fiecare din peptidele având secvențe stabilite în SECV ID 1-8 care funcționează pentru a modula imunitatea celulară și a asigura inhibarea fixării pentru antigene străine / virusuri asupra receptorilor celulari de suprafață, în care procedeul cuprinde etapele de:

a. congelare a colostrului colectat după furnizarea sa de la un mamifer, la o temperatură de -20 °C, în decurs de 3 ore;

b. decongelare la temperatura camerei pentru a aduce temperatura la 4 până la 5 °C;

c. separare a grăsimii prin pomparea într-un separator de smântână la 4000 rpm, la 45 °C;

d. pasteurizare și tratare cu enzime pentru a se obține caș și colostru din zer;

e. trecere a zerului printr-o serie de filtre pentru îndepărtarea solidelor în suspensie și a reduce încărcătura microbiană;

f. trecere a zerului obținut din etapa (e) prin ultrafiltrare pentru a obține secvențe de aminoacizi având o greutate moleculară mai mică de 10000Da; în care ultrafiltrarea este efectuată la o presiune mai mică de 5 kg / cm^2 și temperatură scăzută, pentru a conserva secvențele de aminoacizi; și

g. ajustarea pH-ului și păstrarea constantă în intervalul de la pH 4 la pH 6.

13. Procedeu conform revendicării 12 în care ultrafiltrarea este realizată la o presiune în intervalul de la 0,5 kg / cm^2 până la 4 kg / cm^2.

14. Procedeu conform revendicării 12 în care ultrafiltrarea este efectuată la o presiune de 2,0 kg / cm^2.

15. Procedeu conform revendicării 12, în care amestecul de peptide are o greutate moleculară mai mică de 3500 Da.

16. Formulare conform revendicării 1 în care amestecul de peptide este un amestec de peptide izolate din colostru de mamifere, care pot fi obținute dintr-un procedeu conform oricăreia dintre revendicările 12 la 15.

DESEN

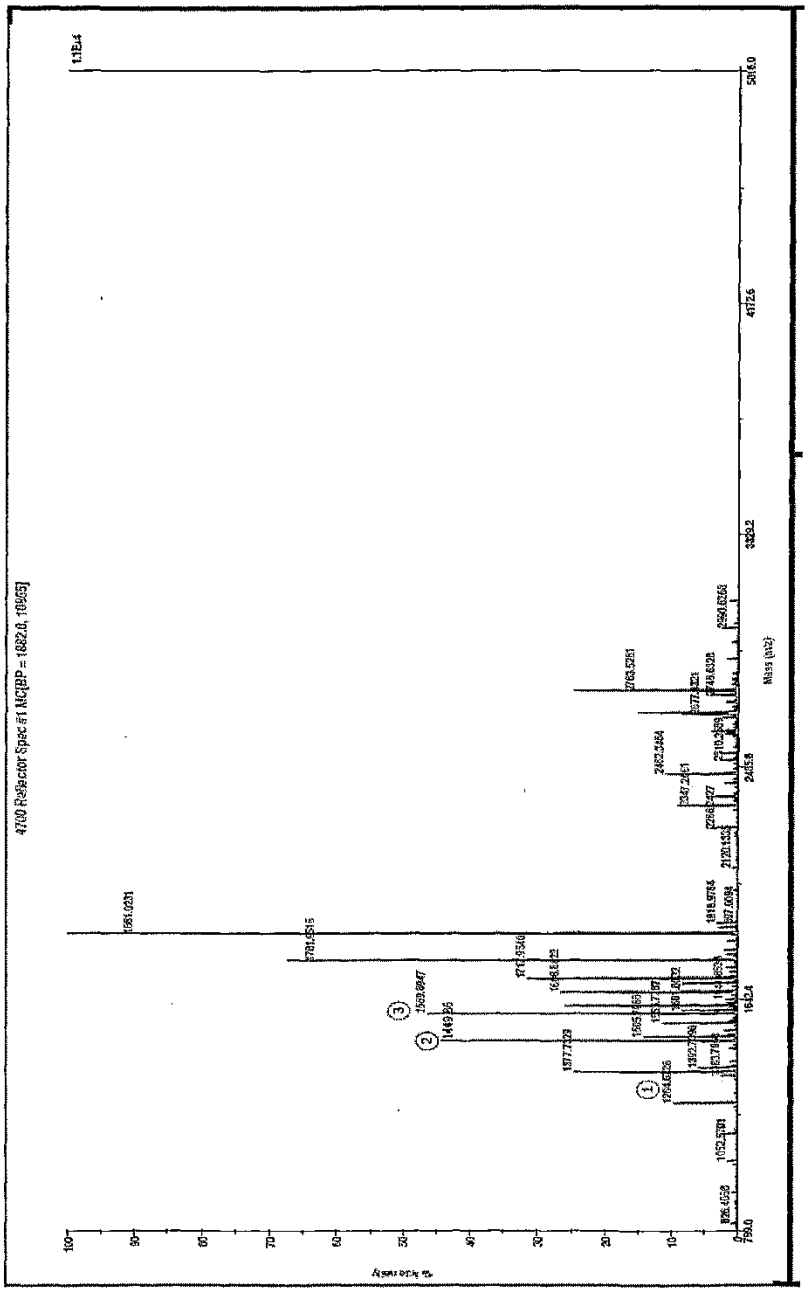

4700 Reflector Spec #1 MC[BP = 1882.0, 19905]
1.1E4
5016.0
4172.6
3329.2
2485.8
1642.4
799.0
Mass (m/z)
1661.0231
1781.6515
1449.795
1577.7329
1264.6526
1026.4556
2785.5261
2748.6328
2663.3484
2547.2451
2768.3477
1918.9784
1937.0098
1503.8947
1565.7861
1353.7787
1380.8032
1637.7748
1350.7586
1052.5379
970.5346
1646.8123
2120.1433

Fig 1