

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235821**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410058**

(22) Data zgłoszenia: **04.11.2014**

(51) Int.Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(54) **Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zaburzeń i stanów wymagających podwyższania i/lub modulacji poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego jako oznaczonego w osoczu krwi biomarkera i zawierający go preparat**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

09.05.2016 BUP 10/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

02.11.2020 WUP 17/20

(73) Uprawniony z patentu:

**GEO-POLAND SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WŁODZIMIERZ PIOTR DOBRZYŃSKI,
Poznań, PL**

MAGDALENA ANNA BEDNAREK, Poznań, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Krzywdzińska

PL 235821 B1

Opis wynalazku

Dziedzina wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków do zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zaburzeń i stanów wymagających podwyższenia i/lub modulacji poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) jako oznaczanego w osoczu krwi biomarkera i zawierający go preparat. W szczególności, wynalazek dotyczy profilaktyki i wspomagania leczenia zaburzeń odpowiadających na zwiększanie poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany jako dodatek do żywności dla dorosłych, dzieci i niemowląt jako środek stymulujący rozwój i zachowanie funkcji układu nerwowego i odpornościowego. Kompleks ma także zastosowanie w suplementacji mleka modyfikowanego dla niemowląt, umożliwiając zbliżenie jego właściwości do naturalnego pokarmu kobiecego.

Tło wynalazku

Działanie siary (*colostrum*) i jej właściwości odżywcze i wspomagające układ odpornościowy noworodków i niemowląt ssaków są powszechnie znane. Siara jest gęstym płynem wydzielanym przez matki ssaków przez pierwsze 3 dni po porodzie, bogatym w składniki odżywcze, przeciwciała, czynniki wzrostu, cytokiny i specyficzne komórki układu immunologicznego, między innymi limfocyty T, komórki B, neutrofile i makrofagi (Borysewicz-Sańczyk i Szczepański. *Postępy neonatologii*. 15(1), 2009).

Wśród różnych czynników pochodzących z siary, wyodrębniony został kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę (PRP, ang. Proline-rich Polypeptide) o ciężarze cząsteczkowym 18000, zbudowany z trzech połączonych niekowalencyjnie podjednostek. Kompleks ten, zawierający 22% reszt proliny, który nazwano kolostryną, został po raz pierwszy wyizolowany z siary owiec i opisany przez M. Janusz i wsp. (*FEBS Lett.* 49(2), 1974). Następnie stwierdzono, że analogi tego polipeptydu są także składnikiem siary ssaków innych niż owca.

Na podstawie badań przeprowadzonych na izolowanej ludzkiej krwi obwodowej dowiedziono, iż preparaty zawierające PRP są mocnym induktorem wydzielania kluczowych dla układu immunologicznego cytokin, a mianowicie: interferonu INF- γ , TNF- α , jak również interleukiny IL-6 i IL-1 β , stymulując mało aktywny bądź hamując zbyt aktywny układ immunologiczny. Mogą też indukować dojrzewanie i różnicowanie tymocytów mysich i tworzenie limfocytów.

Właściwości biologiczne w zestawieniu z wiedzą na temat patogenezы choroby Alzheimera, a szczególnie potwierdzony hamujący wpływ cytokin oraz interleukin na powstawanie złogów amyloidu β (Griffin i wsp. *Brain Pathol.* 8(1), 1998), wskazują na terapeutyczne właściwości tego kompleksu wobec schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym. Nie poznano dokładnego neuroprotektoryjnego mechanizmu działania peptydów bogatych w prolinę w chorobie Alzheimera. Choroba Alzheimera jest demencją, pod pojęciem której kryje się wiele symptomów towarzyszących chorobom i zaburzeniom, prowadzącym do pogorszenia funkcji mózgu (m.in. pamięć, racjonalność, rutyna). 50–70% przypadków demencji jest wynikiem choroby degeneracyjnej wywoływanej neurologicznymi zmianami w strukturze mózgu, takimi jak tworzenie amyloidowych płytek starczych z fragmentów β -amyloidu 1-42 ($A\beta$ 1-42) powstającego w wyniku proteolitycznej degradacji białka prekursorowego β APP w wyniku działania enzymów (sekretaz) oraz nadmierna fosforylacja białka tau prowadząca do tworzenia się splotów neurofibrilarnych (NFT, ang. Neurofibrillary Tangles).

Udowodniona została także aktywność psychotropowa kompleksów bogatych w prolinę *in vivo*. Podawanie starym szczurom kompleksu peptydów bogatych w prolinę prowadziło do usprawnienia funkcji pamięciowych charakterystycznych dla osobników młodych, a w szczególności polepszenia pamięci przestrzennej i incydentalnej (Popik i wsp. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 64(1), 1999).

Kolejną właściwością kompleksu PRP jest jego zdolność stymulacji wzrostu neurytów, proliferacji i różnicowania komórek poprzez kontrolę ekspresji genów, co może wskazywać na możliwość jego wykorzystania w odbudowie tkanek i problemach skórnych. Ponadto polipeptydy bogate w reszty proliny uczestniczą we wzroście, zachowaniu i regeneracji neuronów ośrodkowego układu nerwowego, procesów kluczowych dla zmian patologicznych typowych dla schorzeń neurodegeneracyjnych.

Zbadany został także wpływ PRP na poprawę funkcji poznawczych. Większość informacji związanych z prokognitywnym oddziaływaniem preparatów białek o wysokiej zawartości proliny opartych

jest o modele zwierzęce, tj. stare lub młode szczury, kurczaki, a także wyniki 3 badań klinicznych z udziałem osób dotkniętych chorobą Alzheimera. Wyniki badań *in vitro* dowiodły, że kompleks PRP znacząco obniża toksyczność amyloidu β ($A\beta$) w hodowli pierwotnej neuronów, m.in. poprzez obniżenie poziomu enzymu antyoksydacyjnego – SOD1 (Froud i wsp. J. Alzheimers Dis. 20(2), 2010).

Wykazano ponadto, iż PRP nie ma działania alergizującego, a nawet może zapobiegać alergicznym stanom zapalnym wywołanym przez obecne w otoczeniu alergeny.

Dodatkowo PRP posiada dobrze udokumentowane działanie antyoksydacyjne polegające na obniżeniu produkcji wolnych rodników i tlenku azotu (NO), hamowanie stresu oksydacyjnego, a przez to opóźnianie procesów starzenia się i obumierania komórek nerwowych. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że polipeptydy wysokoprolinowe mogą wydłużać okres życia komórek wyizolowanych ze wsobnie hodowanych myszy wykazujących skłonności do szybszego starzenia się i przedwczesnej śmierci. Również badania przeprowadzone na komórkach ludzkich i komórkach chomików pokazały, że kompleks PRP, poprzez obniżenie częstotliwości mutacji DNA komórek związanych ze starzeniem się organizmu, może odgrywać istotną rolę w opóźnianiu procesów starzenia. Również w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu, polipeptydy wysokoprolinowe obniżają częstotliwość mutacji wywołanych przez reaktywne formy tlenu (ROS) oraz dwa czynniki mutagenne, tj. metanosulfonian metylu i mitomycynę, stosowane w chemioterapii nowotworów. Dodatkowo zbadano ochronny wpływ kompleksu PRP w powstawaniu mutacji wywołanych promieniami UVA i UVB. Promienie UVA odpowiadają za rozwój złośliwego czerniaka, a promienie UVB są główną przyczyną kolczystokomórkowego raka skóry.

Powyższe doniesienia wraz z wynikami badań aktywności induktorowej kolostryliny *in vitro* w próbkach krwi pacjentów obarczonych różnymi chorobami, ujawnione w opisie patentu PL 185442 B1, wskazują na możliwość zastosowania PRP do wytwarzania leku immuno- i psychotropowego do leczenia przewlekłych chorób o etiologii bakteryjnej i wirusowej oraz niedoborów immunologicznych powstałych po chemioterapii i radioterapii nowotworów.

W publikacji zgłoszenia międzynarodowego WO 98/14473 i wywodzącym się z niego patencie PL 195627 B1 zastrzeżono zastosowanie kolostryliny do leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego, takich jak zaburzenia neurologiczne, zaburzenia umysłowe, otępienie, choroby neurodegeneracyjne, psychoza i nerwice, a zwłaszcza do leczenia choroby Alzheimera. Zasygnalizowano, że kolostrylinę można stosować do poprawy rozwoju układu odpornościowego u noworodków oraz korekcji niedoborów odpornościowych u dzieci. W tym samym opisie ujawnione zostały kompozycje doustne kolostryliny do zastosowania jako dodatki żywieniowe dla niemowląt, małych dzieci i dorosłych poddawanych chemioterapii i/lub dorosłych cierpiących na kacheksję albo utratę masy ciała z powodu przewlekłej choroby.

Sekwencje peptydów wywodzących się z kolostryliny i ich zastosowanie do leczenia zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego ujawniono w publikacji międzynarodowego zgłoszenia WO 00/75173.

W patencie EP 1238058 B1 opisane zostało zastosowanie konstytutywnych składników kolostryliny jako regulatorów różnicowania komórek neuronalnych *in vitro*.

W opisie zgłoszenia WO 02/13851 zaproponowano zastosowanie kolostryliny lub wchodzących w jej skład peptydów i aktywnych pochodnych o wysokiej zawartości proliny jako promotorów różnicowania komórek neuronalnych, na przykład komórek pluripotentnych, *in vitro* lub *in vivo*. Wpływ kolostryliny i pochodnych na zmiany morfologiczne w komórkach neuronalnych wykazano na komórkach PC12, wskazując na istotną rolę procesu różnicowania i czynników neurotroficznych, zwłaszcza czynnika wzrostu nerwów NGF, w odbudowie uszkodzonych komórek układu nerwowego.

W opisie zgłoszenia US 2011/0098216 ujawniono zastosowania kolostryliny do zapobiegania i leczenia otyłości i związanych z nią zaburzeń, w tym cukrzycy typu 2, hipercholesterolemii, miażdżycy, udaru i chorób serca, a także stanów chorobowych zapalnych, jak zespół drażliwego jelita czy choroba Crohn'a. Autorzy powołują się na mechanizm działania kolostryliny poprzez wpływ na leptynę i rezylinę.

Kompleks białkowy o wysokiej zawartości proliny wyizolowano także z siary bydlęcej pozyskiwanej do 48 godz. po porodzie, z wykorzystaniem technologii polegającej na ekstrakcji mieszaniny białek acetonem, co zostało opisane w polskim patencie PL 218693 B1 (P-388408). Wyizolowany preparat o nazwie COLOCO prp stanowi kompleks o innej, w porównaniu do opisanych we wcześniejszych pracach badawczych, masie cząsteczkowej oraz strukturze polipeptydów wysokoprolinowych. COLOCO prp składa się z peptydów o dominujących masach cząsteczkowych nieprzekraczających 10 kDa, charakteryzuje się około 20%-ową zawartością proliny, obecnością aminokwasów kwaśnych (~18%) oraz

nieaktywnej biologicznie frakcji β -laktoglobuliny (17 kDa) i towarzyszących substancji niebiałkowych, nie mających wpływu na aktywność biologiczną.

W badaniach *in vitro* na komórkach pełnej krwi obwodowej wykazano, że COLOCO prp jest silnym induktorem wydzielania kluczowych dla układu odpornościowego interleukin tj. IL-1 β oraz IL-6, w stopniu porównywalnym z wysokoprolinowym produktem otrzymywanym sposobem opisanym w publikacji M. Janusz i wsp. (FEBS Lett. 49(2), 1974).

Badania z wykorzystaniem komórek pełnej krwi obwodowej wykazały zdolność COLOCO prp do hamowania generacji NO oraz silne właściwości antyoksydacyjne preparatu, mierzone metodą TEAC w porównaniu z aktywnością preparatu referencyjnego (kolostryliną krowią i/lub owczą).

Udokumentowana w badaniach własnych przeprowadzonych w warunkach abiotycznych zdolność COLOCO prp do wiązania się do monomerów A β w miejscach kluczowych do oddziaływania między cząsteczkami A β , warunkującymi powstawanie złogów A β , jak również jego wpływ na dezintegrację już istniejących fibryli A β , stanowi o możliwości zapobiegania zarówno wczesnym jak i zaawansowanym zmianom neurodegeneracyjnym typowym dla choroby Alzheimera.

Z dotychczas opublikowanych danych wynika, iż kompleksy białkowe izolowane z siary modulują układ odpornościowy, wykazują działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne, posiadając jednocześnie właściwości neuroprotektoryjne. Jednakże, jak dotąd, brak było empirycznych rezultatów badań związanych z czysto medycznym mechanizmem działania substancji bogatych w prolinę, mogącym tłumaczyć efekt terapeutyczny preparatów wysokoprolinowych.

W publikacji H. Shimada i in. „A large, cross-sectional observational study of serum BDNF, cognitive function, and mild cognitive impairment in the elderly”, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15.04.2014, 15, 6:69, doi:10.3389/fnagi.2014.00069, omówiono wyniki badań przeprowadzonych w celu określenia związku między neurotropowym czynnikiem pochodzenia mózgowego (ang. Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) w osoczu krwi a funkcją poznawczą lub łagodnym zaburzeniem poznawczym (ang. Mild Cognitive Impairment, MCI) oraz dla ustalenia, czy poziom BDNF w osoczu krwi może być użytecznym biomarkerem do oceny ryzyka MCI u osób starszych. Niski poziom BDNF był związany z gorszymi wynikami testów funkcji poznawczych i MCI. Mimo iż nie ustalono stanowiącej różnicę wartości BDNF dla oceny ryzyka MCI, to BDNF oznaczany w osoczu krwi może pełnić rolę biomarkera w łagodnym zaburzeniu poznawczym.

Ujawnienie wynalazku

U podłoża obecnego wynalazku leżą wyniki badań przeprowadzonych przez Zgłaszającego, które pozwoliły określić wpływ podawania kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny na poziom neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego w osoczu krwi zdrowych osobników.

Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego jest neurotrofiną odpowiedzialną za różnicowanie neuronów i komórek gleju, a także ich ochronę przed działaniem czynników toksycznych, A β . Z uwagi na istotną rolę BDNF w prawidłowym działaniu układu nerwowego, czynnik ten jest uznawany za biomarker zmian patologicznych zachodzących w obrębie mózgu w modelach chorób autoimmunologicznych związanych z demielinizacją włókien nerwowych, jak np. stwardnienie rozsiane oraz innych schorzeń neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera, płasawicy Huntingtona oraz choroby Parkinsona.

Znana jest także rola BDNF w stanach niedoboru odporności, zwłaszcza u nosicieli wirusa zespołu nabytego niedoboru odporności HIV. Wykazano bowiem, iż w wyniku leczenia polegającego na podawaniu memantyny dochodzi do wzrostu produkcji BDNF o znaczeniu neuroprotektoryjnym, co w efekcie zapobiega uszkodzeniom neuronów oraz brakom pamięci. Ponadto, odnotowano zależne od BDNF zwiększenie poziomu dopaminy i serotoniny w mózgu, a w efekcie eliminację zachowań depresyjnych oraz stanów chorobowych obniżonego nastroju. Z kolei w badaniach nad etiologią depresji wykazano, iż stan zapalny oraz wzrost produkcji cytokin prozapalnych towarzyszący temu schorzeniu, obniża poziom BDNF w pewnych obszarach mózgu, a tym samym nasila stany lękowe. Stąd, jedna z form farmakoterapii chorób lękowych, polega na stymulacji produkcji BDNF.

Obecność BDNF stwierdzono również poza ośrodkowym układem nerwowym, przy czym główną jego rolą jest modulacja aktywności komórek układu immunologicznego, jak limfocyty T i monocyty, w odpowiedzi na procesy patologiczne zachodzące w mózgu, wpływ na migrację makrofagów do uszkodzonych obszarów mózgu w celu aktywacji procesów naprawczych.

BDNF jest ponadto czynnikiem odpowiedzialnym za regulację łaknienia, obniżenie poziomu glukozy we krwi, przemiany energetyczne w tkance tłuszczowej. Obniżony poziom tego czynnika we krwi często towarzyszy zaburzeniom odżywiania.

Doniesienia naukowe wskazują na fakt, iż w okresie starzenia się organizmu dochodzi do istotnego spadku poziomu BDNF w hipokampie, co istotnie obniża zdolności poznawcze. Udowodniono, iż odpowiednio skomponowana dieta, np. wzbogacona w naturalne substancje o działaniu przeciwrodnikowym, oraz wzmożona aktywność fizyczna nasilają ekspresję BDNF w wybranych strukturach mózgu, co zapobiega procesom starzenia i korzystnie wpływa na pracę mózgu.

Rola czynników neurotroficzných, w tym BDNF, w procesie neurogenezy, a więc różnicowania się komórek nerwowych, tworzenia nowych połączeń synaptycznych pomiędzy neuronami, formowania się osłonki mielinowej wokół aksonów, decydujących o szybkości przekazywania impulsów nerwowych, jest znana (Park i Poo, *Nat. Rev. Neurosci.* 14(1), 2013). Wyniki badań naukowych wskazują na fakt, iż w następstwie demielinizacji włókien nerwowych, jaka ma miejsce np. w stwardnieniu rozsianym, dochodzi do wzmożonej produkcji BDNF, który odpowiada za odtworzenie osłonki mielinowej wokół włókien nerwowych, umożliwiającą przewodzenie sygnałów pomiędzy komórkami nerwowymi.

Badanie kliniczne poświęcone ocenie wpływu żywienia niemowląt na poziom BDNF we krwi zostało przeprowadzone przez grupę prof. Nassar i wsp. (*Matern. Child. Nutr.* 7(2), 2011). Autorzy wykazali ścisłą współzależność między sposobem karmienia niemowląt w pierwszych miesiącach życia a poziomem BDNF i oceną rozwoju neurologicznego w skali Bayley'a (BSID-II). Najwyższe wyniki w skali BSID-II obserwowano w grupie karmionych piersią, niższe w grupie mieszanej, a najniższe w grupie otrzymującej mleko modyfikowane, chociaż te wyniki były statystycznie istotne jedynie w odniesieniu do skali oceniającej ogólne zachowanie i wartości oceny procentowej zdolności manualnych. Podwyższone poziomy BDNF w surowicy krwi w grupie karmionej mlekiem matki autorzy przypisują procesowi naturalnego karmienia, który wyzwała sekrecję BDNF w wyniku większego komfortu psychicznego i silniejszego ssania towarzyszącego procesowi karmienia w sposób naturalny.

Istnieje także doniesienie, iż czynnik BDNF naturalnie występuje w mleku kobiet i może być produkowany między innymi przez obecne w mleku matki leukocyty (Li i wsp. *PLoS One.* 6(6), 2011). Badanie to pokazuje, iż poziom BDNF w mleku matki utrzymuje się na stałym poziomie począwszy od 3. do 90. dnia laktacji. Dodatkowo, stężenie BDNF jest wyższe w mleku kobiet karmiących niż w ich surowicy, co wskazuje na szczególną rolę tego czynnika w diecie niemowląt.

W świetle powyższego, nawet modyfikowane pokarmy przeznaczone dla niemowląt dostępne na rynku nie pokrywają w pełni zapotrzebowania dziecka na substancje zapewniające jego prawidłowy rozwój.

Obecny wynalazek pozwala zaspokoić wciąż istniejące zapotrzebowanie na preparat biologiczny o działaniu stymulującym rozwój i zachowanie funkcji układu nerwowego i immunologicznego, który gwarantowałby bezpieczeństwo stosowania ze względu na swoje naturalne pochodzenie i jednocześnie byłby w pełni standaryzowany, zapewniając przy określonych dawkach korzystne działanie zarówno w populacji dzieci jak i dorosłych.

Istotę wynalazku stanowi wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 (10 kDa) i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, do zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zaburzeń i stanów wymagających podwyższenia i/lub modulacji poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) jako oznaczonego w osoczu krwi biomarkera, które to zaburzenia i stany obejmują zaburzenia związane ze wzmożoną aktywnością umysłową, stany obniżonego nastroju, zaburzenia koncentracji, łagodne zaburzenie poznawcze oraz wspomaganie procesu rozwoju układu nerwowego i stymulacji funkcji poznawczych u niemowląt i małych dzieci.

Wymienione zaburzenia i stany obejmują pogorszenie sprawności krótkotrwałej pamięci wzrokowej, pogorszenie zdolności uczenia się oraz pamięci przestrzennej, spowolnienie reakcji w odpowiedzi na bodziec i/lub pogorszenie koncentracji uwagi.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest przeznaczony do podawania doustnego.

W zastosowaniu według wynalazku, kompleks jest formułowany jako składnik środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety.

W jednym wykonaniu wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego do mleka modyfikowanego i odżywek dla niemowląt i małych dzieci,

niekarmionych od urodzenia lub po zakończeniu karmienia mlekiem matki, mającego na celu podwyższenie poziomu BDNF do poziomu porównywalnego z poziomem u niemowlęcia karmionego naturalnym mlekiem matki.

W innym wykonaniu wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego dla dzieci starszych po okresie karmienia piersią i/lub mlekiem modyfikowanym i dla dorosłych, w celu stymulacji i/lub aktywności układu nerwowego oraz uzyskania efektu prokognitywnego.

W kolejnym wykonaniu wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego dla kobiet w ciąży w celu podwyższenia poziomu BDNF w osoczu krwi matki i dziecka w okresie prenatalnym.

Korzystnie, wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według wynalazku jest pozbawiony frakcji β -laktoglobuliny.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto preparat zawierający wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, do zastosowania jak określono powyżej, charakteryzujący się tym, że ma postać środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety.

Preparat zawiera skuteczną terapeutycznie dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego dla osoby dorosłej od 50 do 1000 μ g.

Korzystnie preparat zawiera dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego od 80 do 160 μ g.

Bardziej korzystnie preparat zawiera dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego 120 μ g.

W jednym wykonaniu wynalazku, preparat jest przeznaczony dla kobiet w ciąży i zawiera terapeutycznie skuteczną dawkę wysokoprolinowego kompleksu peptydowego od 50 do 140 μ g.

W innym wykonaniu wynalazku, preparatem jest formuła modyfikowanego mleka maternizowanego dla niemowląt wzbogaconego przez dodatek wysokoprolinowego kompleksu peptydowego w ilości zaspokajającej zapotrzebowanie dzienne od 1 do 5 mikrogramów na 1 kg masy ciała.

Szczegółowy opis wynalazku

Kompleks peptydowy do zastosowania według wynalazku stanowi kompleks wyodrębniany z siary ssaków o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 (10 kDa) i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, korzystnie około 20% reszt proliny.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest wyodrębniany z siary dużych ssaków, korzystnie z siary bydlęcej. Kompleks może być też pozyskiwany z siary owiec, kóz i innych ssaków hodowlanych.

W korzystnym wykonaniu wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy stanowi kompleks wyodrębniany z siary bydlęcej metodą opisaną w patencie PL 218693 B1. Preparat o nazwie COLOCO prp składa się z peptydów o dominujących masach cząsteczkowych nieprzekraczających 10 000 i zawiera od 18 do 22%, korzystnie około 20% proliny, około 18% aminokwasów kwaśnych oraz nieaktywną biologicznie frakcję β -laktoglobuliny (17 000 g/mol) i towarzyszące substancje niebiałkowe.

W innym korzystnym wykonaniu, kompleks peptydowy stanowi kompleks peptydowy pozbawiony frakcji β -laktoglobuliny, pozyskiwany z COLOCO prp metodą rozdziału na frakcje masowe.

Kompleks peptydowy może też stanowić kompleks białek serwatkowych wyodrębniany z siary bydlęcej metodą opisaną w patencie PL 218708 B1, zawierający odcięte frakcje o masie cząsteczkowej poniżej 1 g/mol i od 7 do 12,5% reszt proliny. Zastosowanie kompleksu białek serwatkowych w miejsce COLOCO prp wymaga przeliczenia zawartości reszt proliny na standardową zawartość od 16 do 22% wymaganą w zastosowaniu zgodnym z wynalazkiem i znormalizowania jej z nośnikiem na odpowiedni poziom białka.

W zastosowaniu zgodnym z wynalazkiem, modulacja neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego obejmuje zarówno indukowane przez wysokoprolinowy kompleks peptydowy podwyższenie jego stężenia do poziomu niezbędnego dla zapewnienia właściwego funkcjonowania układu nerwowego i odpornościowego, jak również zapobieganie jego okresowym wahaniom wskutek czynników wewnętrznych i środowiskowych, takich jak niewłaściwe odżywianie, zmęczenie lub stres.

W badaniach na grupie zdrowych ochotników przeprowadzonych przez obecnego Zgłaszającego wykazano, że wysokoprolinowy kompleks peptydowy wywiera korzystny wpływ na zwiększenie produkcji neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego u osób dorosłych.

W oparciu o stwierdzoną w badaniach własnych, opisanych w części doświadczałnej niniejszego opisu, aktywność wysokoprolinowego kompleksu peptydowego w zwiększaniu poziomu BDNF w osoczu oraz aktualny stan wiedzy na temat związku pomiędzy rozwojem pewnych stanów chorobowych i zaburzeń a zbyt niskim poziomem BDNF w organizmie można stwierdzić, iż podawanie kompleksu osobom dorosłym i dzieciom będzie zapobiegać rozwojowi tych stanów chorobowych i zaburzeń.

Zdolność do podwyższenia poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego w krwi w połączeniu z działaniem zabezpieczającym przed wolnymi rodnikami sprawia, że wysokoprolinowy kompleks peptydowy może znaleźć zastosowanie jako preparat usprawniający procesy poznawcze, poprawiający zdolność koncentracji oraz pamięć osób zdrowych z niewielkimi deficytami pamięci.

Inny aspekt wynalazku stanowi zastosowanie wysokoprolinowego kompleksu peptydowego we wspomaganiu procesu rozwoju układu nerwowego i stymulacji funkcji poznawczych u noworodków i niemowląt. Kluczowa rola, jaką odgrywa BDNF w rozwoju dziecka, szczególnie w pierwszych etapach jego życia i zdolność wysokoprolinowego kompleksu peptydowego do podwyższania stężenia BDNF w organizmie dowodzi, że kompleks może pełnić rolę swoistego stymulatora procesu mielinizacji włókien nerwowych u niemowląt i małych dzieci, a tym samym wspomagać proces rozwoju układu nerwowego.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany jako dodatek żywieniowy dla niemowląt i małych dzieci, szczególnie nie karmionych od urodzenia mlekiem matki, a karmionych pokarmem modyfikowanym, pozbawionym białek o wysokiej zawartości proliny. Karmienie mlekiem modyfikowanym z dodatkiem wysokoprolinowego kompleksu peptydowego według wynalazku, samym lub w połączeniu z naturalnym mlekiem matki, podwyższa stężenie BDNF we krwi dziecka do poziomu zbliżonego do poziomu charakterystycznego dla dziecka karmionego wyłącznie mlekiem matki.

Preparat zawierający wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, może mieć postać środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety.

W szczególnym przykładzie wykonania wynalazku preparatem jest formuła mleka modyfikowanego dla niemowląt wzbogaconego przez dodatek wysokoprolinowego kompleksu peptydowego wyodrębnianego z siary bydłej o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 i zawierającego od 16% do 22% reszt proliny.

Formuła modyfikowanego mleka maternizowanego korzystnie zawiera wysokoprolinowy kompleks peptydowy w ilości zaspokajającej zapotrzebowanie dzienne od 1 do 5 mikrogramów na 1 kg masy ciała.

Wzbogacona wysokoprolinowym kompleksem peptydowym formuła modyfikowanego mleka krowiego o unikalnym składzie, naśladującym skład mleka matki i wykazująca działanie podwyższające poziom BDNF zgodnie z obecnym ujawnieniem, nosi nazwę mleka modyfikowanego maternizowanego COLOCO (ang. Coloco Mathernized Formula, CMF).

Mleko modyfikowane maternizowane o wzbogaconej formule zapewnia poziom BDNF we krwi dziecka zgodny lub wyższy niż obserwowany przy karmieniu naturalnym mlekiem matki, tym samym przyczyniając się do szybszego i lepszego rozwoju układu nerwowego dziecka. Suplementowanie formuły modyfikowanego mleka maternizowanego dodatkiem wysokoprolinowego kompleksu peptydowego zapewnia również inne korzystne oddziaływania na układ odpornościowy dziecka, a mianowicie immunomodulację, wzrost odporności, działanie przeciwalergiczne i ochronę przed autoimmunoagresją.

Formuła mleka modyfikowanego wzbogaconego przez dodatek wysokoprolinowego kompleksu peptydowego według wynalazku wykazuje przewagę nad formułami mleka modyfikowanych dostępnych aktualnie na rynku, jako maksymalnie zbliżona pod względem sposobu oddziaływania na BDNF do sytuacji karmienia wyłącznie naturalnym mlekiem matki.

W kolejnym aspekcie wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest przeznaczony do zastosowania u kobiet w ciąży w celu podwyższenia poziomu BDNF we krwi matki i dziecka. Dodatek kompleksu do diety kobiet w ciąży przyczynia się do uzyskania efektu immunomodulacyjnego, przeciwalergicznego oraz wzrostu odporności.

W jeszcze innym aspekcie wynalazku, wysokoprolinowy kompleks peptydowy jest przeznaczony do zastosowania u dzieci starszych po okresie karmienia piersią i/lub mlekiem modyfikowanym oraz u dorosłych w celu uzyskania efektu prokognitywnego – poprawy pamięci i koncentracji.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być podawany w zastosowaniu zgodnym z wynalazkiem osobie, u której spodziewane jest wywołanie odpowiedzi na podwyższenie poziomu lub modulację BDNF, w terapeutycznie lub profilaktycznie skutecznej dawce, zgodnie z ustalonym na podstawie przeprowadzonych badań schematem podawania.

Skuteczna terapeutycznie dawka dobowego kompleksu peptydowego zależy od konkretnego stanu lub zaburzenia podlegającego leczeniu wspomagającemu bądź profilaktyce, wieku, wagi i stanu ogólnego osoby otrzymującej terapię oraz zamierzonego efektu działania terapii, i może być ustalona przez osobę biegłą w dziedzinie na podstawie wyników badań klinicznych.

Skuteczna terapeutycznie dawka dobowego kompleksu peptydowego dla osoby dorosłej wynosi od 50 do 1000 μg , korzystnie od 80 do 160 μg , i może być podawana w dawce jednorazowej lub podzielona na porcje.

Korzystnie, dawka dobowego wysokoprolinowego kompleksu peptydowego wynosi 120 μg .

Skuteczny schemat dawkowania kompleksu COLOCO prp u osób dorosłych obejmuje podawanie zawierającego go preparatu przez okres 2–4 tygodni, najkorzystniej przez 4 tygodnie, po których zaleca się zaprzestanie przyjmowania preparatu na okres 1–4 tygodni, najkorzystniej 2 tygodni, a następnie co najmniej jednokrotne, korzystnie kilkukrotne powtórzenie terapii.

Dawka dobowego kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny w zastosowaniu jako suplement mleka i odżywek dla niemowląt wynosi od 1 do 5 mikrogramów na 1 kg masy ciała.

Dawka dobowego w zastosowaniu u kobiet w ciąży wynosi od 50 do 140 mikrogramów.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być podawany *per se* w postaci, w jakiej został wyodrębniony z siary płynnej lub liofilizowanej, albo jako składnik preparatu zawierającego skuteczną terapeutycznie (leczniczo lub profilaktycznie) ilość kompleksu w połączeniu z fizjologicznie dopuszczalnym nośnikiem i/lub substancjami pomocniczymi.

Preparaty zawierające wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania zgodnie z wynalazkiem mogą mieć postać środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety, zależnie od leczonego zaburzenia lub choroby, oraz grupy odbiorców dla których preparaty są przeznaczone.

Środek farmaceutyczny do zastosowania zgodnie z wynalazkiem zawiera terapeutycznie skuteczną ilość kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny jako składnik aktywny oraz farmaceutycznie dopuszczalne nośniki i/lub substancje pomocnicze, odpowiednie dla danej postaci farmaceutycznej, nie wywierające własnego działania farmakologicznego i nie wchodzące w niepożądane reakcje z substancją aktywną.

Środek farmaceutyczny może być sporządzany w postaci odpowiedniej do podawania ogólnoustrojowego, na przykład doustnego, jak tabletki, kapsułki, kapsułki skrobiowe, tabletki powlekane lub tabletki dojelitowe; jako proszki lub granulki; jako roztwór, zawiesina bądź emulsja. Tabletki i kapsułki do podawania doustnego mogą zawierać tradycyjne substancje pomocnicze, takie jak substancje wiążące, wypełniacze, substancje zwilżające, rozsadzające lub zwilżające. Tabletki mogą być powlekane z wykorzystaniem metod dobrze znanych w tej dziedzinie. Ciekłe preparaty doustne mogą być w postaci, na przykład, zawiesin wodnych lub olejowych, roztworów, emulsji, syropów lub eliksirów, lub mogą występować jako liofilizat do odtwarzania wodą lub innym odpowiednim nośnikiem przed użyciem. Takie preparaty ciekłe mogą zawierać tradycyjne dodatki, takie jak środki dyspergujące, środki emulgujące, nośniki niewodne (które mogą obejmować oleje jadalne) lub konserwanty. Dobór i ilość nośników i substancji pomocniczych zależy od postaci i drogi podawania środka. W celu wytworzenia odpowiedniej postaci leku wykorzystuje się techniki dobrze znane specjalistom, stosując dowolne farmaceutycznie dopuszczalne nośniki, rozcieńczalniki, wypełniacze i inne substancje pomocnicze.

Postać farmaceutyczną można również nadać preparatom o statusie nutraceutyków, zawierającym kompleks peptydowy do zastosowania zgodnie z wynalazkiem. Nutraceutyki mogą być stosowane jako suplementy diety lub inne środki żywnościowe przynoszące korzyści zdrowotne. Nutraceutyki generalnie stosuje się w celu uzupełnienia diety o substancje pochodzenia naturalnego, które występują normalnie w żywności aczkolwiek w ograniczonych ilościach, a które wykazują właściwości sprzyjające zachowaniu zdrowia i podtrzymaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Preparaty zawierające kompleks peptydowy do zastosowania zgodnie z wynalazkiem mogą być też stosowane jako środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego (ang. Food for Special Medical Purpose), czyli żywność mająca zaspokajać specyficzne potrzeby żywieniowe określonych grup ludzi zdrowych lub chorych.

Ponadto, preparaty zawierające kompleks peptydowy do zastosowania zgodnie z wynalazkiem mogą wchodzić w skład środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego. Mianem tym określa się środek spożywczy, który ze względu na specjalny skład lub sposób przygotowania wyraźnie różni się od środków spożywczych powszechnie spożywanych i jest przeznaczony do zaspokajania szczególnych potrzeb żywieniowych osób, których procesy trawienia i metabolizmu są zachwiane lub osób, które ze względu na specjalny stan fizjologiczny mogą odnieść szczególne korzyści z kontrolowanego spożycia określonych substancji zawartych w żywności lub potrzeb żywieniowych zdrowych niemowląt i małych dzieci.

Wreszcie, preparaty zawierające kompleks peptydowy do zastosowania zgodnie z wynalazkiem mogą być stosowane jako suplementy diety, czyli dodatki zawierające niezbędne dla zdrowia składniki, których niedobór występuje w codziennej diecie.

Ze względu na niski ciężar cząsteczkowy, kompleks peptydowy o wysokiej zawartości proliny, w tym COLOCO prp, może swobodnie przenikać przez błonę śluzową między innymi jamy ustnej i gardzieli, na zasadzie dyfuzji lub za pośrednictwem znajdujących się na powierzchni nabłonka specyficznych receptorów dla substancji immunomodulacyjnych. Stąd korzystną postacią dawkowania kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny jest postać do podawania doustnego, stała lub płynna, łatwo wchłaniana przez śluzówkę jamy ustnej/nosowo-gardłowej i/lub ulegająca absorpcji w przewodzie pokarmowym.

Wybór właściwej postaci dawkowania zależy od docelowej grupy terapeutycznej dla której jest przeznaczony oraz konkretnego zastosowania. Szczególnie korzystne postacie dawkowania stanowią tabletki, tabletki do ssania, lingwetka, drażetka, kapsułka, proszek, granulat, nektar/napój lub syrop. Odpowiednie postacie dawkowania dla starszych dzieci mogą stanowić na przykład guma do żucia, batony, cukierki lub lizak. Odpowiednie postacie dawkowania dla kobiet w ciąży stanowią tabletki, kapsułki, krople, odżywki mleczne, napoje, gumy do żucia, batony, cukierki lub podobne.

W szczególnym przykładzie realizacji wynalazku wysokoprolinowy kompleks peptydowy stanowi dodatek do mleka lub odżywek dla niemowląt w pierwszym roku życia, najkorzystniej w wieku od 6 do 12 miesięcy.

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach przeprowadzonych na populacji dorosłych zdrowych ochotników należy oczekiwać podobnego działania modulującego poziom czynnika BDNF we krwi indukowanego przez wysokoprolinowy kompleks peptydowy w populacji niemowląt. Dodatek kompleksu do mleka lub odżywek, ze względu na korzystne działanie podwyższające poziom BDNF, zapewnia wspomaganie rozwoju układu nerwowego u niemowląt i małych dzieci. Dodatek kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny do formuły mleka i odżywek dla niemowląt gwarantuje bezpieczeństwo ich stosowania ze względu na wykazaną wcześniej niską toksyczność kompleksu w badaniach toksykologicznych na modelu mysim (LD50 powyżej 1,25 kg/kg masy ciała).

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary bydłowej, w rozumieniu Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, jest krowim białkiem serwatkowym rekomendowanym do stosowania w żywieniu niemowląt i małych dzieci, co dodatkowo wskazuje na wysokie bezpieczeństwo stosowania zawierających go preparatów.

Nowa formuła modyfikowanego mleka maternizowanego według wynalazku zawiera wysokoprolinowy kompleks peptydowy w ilości zaspokajającej zapotrzebowanie dzienne od 1 do 5 mikrogramów na 1 kg masy ciała i zapewniającej poziom BDNF we krwi dziecka zgodny lub wyższy niż przy naturalnym karmieniu mlekiem matki.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany jako samodzielna substancja terapeutyczna lub w połączeniu z innymi substancjami terapeutycznymi lub suplementami diety.

Tak więc, wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany w skojarzeniu z witaminami z grupy B, w szczególności witaminą B1, w dawce 0,9 mg–5 mg, korzystnie 1,1 mg dziennie.

W innym wykonaniu, wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany w skojarzeniu ze składnikami o działaniu antyoksydacyjnym, w tym antyoksydantami mitochondrialnymi jak N-acetylo-L-karnityna, w dawce 250–2000 mg, korzystnie 1000 mg.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być też stosowany w skojarzeniu z kwasem liponowym.

Ponadto, wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być stosowany w skojarzeniu z kwasem dokozaheksaenowym (DHA). DHA, jeden z powszechnie stosowanych dodatków do żywności dla niemowląt, stanowi wielonienasycony kwas tłuszczowy omega-3, cechujący się wieloma korzystnymi działaniami dla organizmu, m.in. pełni rolę budulca podczas tworzenia tłuszczowej otoczki neurytów i wspomaga rozwój układu nerwowego. Niedobór DHA może mieć związek z występowaniem u dzieci wielu schorzeń o podłożu neurologicznym, w tym ADHD. Połączenie w mleku modyfikowanym dla niemowląt kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny z DHA zapewnia zarówno substancję budulcową osłonek mielinowych i błon komórkowych neuronów (DHA), jak i induktora procesu mielinizacji (PRPs).

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy może być również stosowany w skojarzeniu z substancjami rozpuszczającymi sploty neurofibrilarne lub inhibitorami agregacji białka tau, takimi jak błękit metylenowy, specyficzny bloker agregacji białka tau.

Wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o potwierdzonym w badaniach na zdrowych ochotnikach bezpieczeństwie stosowania i skutecznie podwyższający poziom neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego we krwi, zgodnie z wynalazkiem może być wykorzystywany w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zaburzeń i stanów chorobowych powiązanych ze zmianami neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego oraz do jego modulowania. Szczególnie korzystne efekty zapewnia zastosowanie wysokoprolinowego kompleksu peptydowego jako dodatku do żywności dla dorosłych i dzieci oraz jako dodatku do żywności i mleka modyfikowanego dla niemowląt. Suplementowanie formuły modyfikowanego mleka krowiego dla niemowląt wysokobiałkowym kompleksem peptydowym pozwala, dzięki efektowi podwyższania poziomu BDNF, zbliżyć jego właściwości do mleka matki i uzyskać udoskonalony efekt żywieniowy formuły mleka maternizowanego COLOCO prp w porównaniu z tradycyjnymi formułami pozbawionymi PRP. Formuła mleka maternizowanego COLOCO prp umożliwiła niemal doskonałe zbliżenie właściwości mleka krowiego do mleka kobiety.

Opis rysunków

Fig. 1 przedstawia zmiany wartości *DMS (Delayed Match to Sample)*. *Percent Correct* w teście oceny neuropsychologicznej metody Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy AAMI.

Fig. 2 przedstawia wartości *PAL (Paired Associates Learning)*. *Total errors (adjusted)* w teście CANTAB w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy MT.

Fig. 3 przedstawia wartości *RVP.A (Rapid Visual Information Processing)* w teście CANTAB w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy ADT.

Fig. 4 przedstawia wartości wskaźnika CPI, stosowanego do oceny funkcji poznawczych, w grupie MT.

Fig. 5 przedstawia poziom BDNF w osoczu uczestników badania w poszczególnych grupach wiekowych zależnie od płci (MT – wiek ≥ 18 i ≤ 25 ; ADT – wiek > 25 i ≤ 55 ; OLD – wiek > 55 i ≤ 75).

Wynalazek ilustrują następujące przykłady.

P r z y k ł a d

Badania biologiczne

W badaniach biologicznych stosowano preparat COLOCO prp wyizolowany z siary bydłowej metodą opisaną w PL 218693 B1.

Porównanie składu kompleksu peptydowego o wysokiej zawartości proliny COLOCO prp, otrzymanego z siary bydłowej wg. PL 218693 B1 z kompleksem z siary owczej wg. M. Janusz et al. (FEBS LETTERS 1974, 49, 276–279) przedstawia Tabela 1. Profil aminokwasowy COLOCO prp oznaczono metodą analizy chromatograficznej HPLC w odwróconym układzie faz.

Tabela 1

Reszty aminokwasowe	Kompleks z siary wg. Janusz et al. (FEBS LETTERS 1974,49,276-279) (%)	Kompleks COLOCO prp (%)
Asp/Asn	2, 56	4, 81
Ser	5, 27	6, 57
Glu/Gln	14. 90	14. 01
Gly	2. 32	3. 76
His	1. 94	2. 78
Arg	1. 80	2. 96
Thr	6. 55	4. 28
Ala	1. 38	3. 27
Pro	22. 90	20. 68
Tyr	1. 62	2. 18
Val	12. 85	9. 85
Met	3. 93	3.24
Lys	7. 16	4.47
Ile	2. 48	6.36
Leu	9. 60	8. 24
Phe	4. 72	4. 31
Trp	N.D.	N.D.
Cys	1. 05	N.D.

Badanie z udziałem ludzi

Randomizowane badanie z podwójną ślepą próbą zostało przeprowadzone w celu zbadania wpływu COLOCO prp na sprawność poznawczą osób zdrowych biologicznie. Grupa zdrowych ochotników, z których badanie zakończyło 361 osób, została podzielona na 3 grupy wiekowe (zakres wieku 18–75 lat). W grupie terapeutycznej preparat COLOCO prp przyjmowany był w dziennej dawce 120 µg przez okres 4 miesiące, z uwzględnieniem 14-dniowych przerw po każdym 30-miesięcznym cyklu stosowania preparatu, analogicznie jak w grupie kontrolnej (Placebo).

Badania neuropsychologiczne:

Skuteczność preparatu COLOCO prp w kontekście funkcjonowania sfery poznawczej (kognitywnej) wśród populacji osób zdrowych została poddana ocenie za pomocą zestawu testów neuropsychologicznych. Grupa badana została podzielona na trzy mniejsze podgrupy, gdzie oczekiwano potencjalnie największej korzyści z przyjmowania preparatu:

- Grupa „MT”, osoby obu płci w wieku od 18 do 25 lat. Ostatecznie badanie ukończyło i zostało poddanych analizie 122 osoby w podziale na grupę przyjmującą placebo oraz substancję aktywną, w dwu miastach (Poznań i Warszawa). Podczas pierwszej wizyty wszyscy uczestnicy badania wypełniali kwestionariusz Multitasking Media Questionnaire, na podstawie którego po ukończeniu badania wyliczony został indeks MMI.
- Grupa „ADT”, osoby obu płci w wieku powyżej 25 do 55 lat. Ostatecznie badanie ukończyło i zostało poddanych analizie 116 osób w podziale na grupę przyjmującą placebo oraz substancję aktywną, w dwu miastach (Poznań i Warszawa). Podczas pierwszej wizyty wszyscy uczestnicy badania wypełniali kwestionariusz *Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS-v1.1) Symptom Checklist*, na podstawie którego mogli zostać włączeni do badania.
- Grupa „AAMI/OLD”, osoby obu płci w wieku powyżej 55 lat. Ostatecznie badanie ukończyło i zostało poddanych analizie 123 osoby w podziale na grupę przyjmującą placebo oraz substancję aktywną, w dwu miastach (Poznań i Warszawa). Podczas pierwszej i ostatniej wizyty wszyscy uczestnicy badania wypełniali kwestionariusz MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*), pozwalający ocenić czy mamy do czynienia z MCI (*Mild Cognitive Impairment*). Punkt odcięcia przed włączeniem do badania wynosił 26 pkt. Różnica w wartości MoCA pomiędzy pierwszą a ostatnią wizytą także została uwzględniona w ocenie skuteczności preparatu w grupie AAMI.

Do oceny funkcji poznawczych, głównie pamięci oraz uwagi, dla wszystkich trzech grup badawczych zostały zaproponowane cztery testy wybrane z zestawu CANTAB, przeprowadzone podczas trzech wizyt.

Do porównań średnich wyników między badanymi wykorzystano wieloczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami w schemacie mieszanym. Jeśli wyniki nie spełniały założenia o normalności rozkładów zmiennych oraz ze względu na niskie liczebności grup porównawczych, wyniki analizy wariancji potwierdzano testami nieparametrycznymi.

Wykres na Fig. 1 przedstawia różnicę w zmianie wartości DMS (*Delayed Match to Sample*). *Percent Correct* w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy AAMI. W grupie placebo średnia na wizycie 1 wynosi 82,5 przy odchyleniu standardowym 1,483, a w grupie treatment 78,333 przy odchyleniu standardowym 1,508. Na wizycie 3 wartości te dla grupy placebo wynoszą odpowiednio 84, 194 przy odchyleniu standardowym 1,359, natomiast w grupie treatment 84,083 przy odchyleniu standardowym 1,381 (wizyta 1 vs wizyta 3, $F=3,005$; $p=0,086$, $\eta^2=0,24$).

Wykres na Fig. 2 przedstawia różnicę wartości PAL (*Paired Associates Learning*). *Total errors (adjusted)* w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy MT (efekt powtarzalnych pomiarów $F=5,072$; $p=0,007$, $\eta^2=0,43$).

Wykres na Fig. 3 przedstawia różnicę w zmianie wartości RVP.A (*Rapid Visual Information Processing*) w układzie pomiarów wewnątrzgrupowych między poszczególnymi wizytami dla grupy ADT. W grupie placebo średnia na wizycie 1 wynosi 0,888 przy odchyleniu standardowym 0,006, a w grupie treatment 0,892 przy odchyleniu standardowym 0,006. Na wizycie 3 wartości te dla grupy placebo wynoszą odpowiednio 0,918 przy odchyleniu standardowym 0,007, natomiast w grupie treatment 0,936 przy odchyleniu standardowym 0,007 (wizyta 1 vs wizyta 3, $F=3,039$; $p=0,084$, $\eta^2=0,26$).

U 9 osób w wieku powyżej 55 lat z ośrodka w Warszawie (grupa AAMI/OLD) podczas wizyty kwalifikacyjnej stwierdzono niski wskaźnik MoCA (poniżej 20 pkt.), wskazujący na znaczące deficyty poznawcze, które mogłyby oznaczać wczesne etapy choroby otępiennej, tzw. łagodne zaburzenia poznawcze (ang. MCI=Mild Cognitive Impairment). Po 4-miesięcznym przyjmowaniu COLOCO prp, osoby te zostały poddane ponownemu badaniu. Na tle pozostałych uczestników badania przydzielonych do grupy AAMI/OLD i stosujących preparat COLOCO prp, u 9 wspomnianych osób odnotowano najwyższy stopień poprawy funkcji poznawczych. W tej grupie średnia wartość poprawy wyniosła 5 pkt. (u niektórych było to nawet 9 pkt.), w porównaniu do 3,5 pkt. dla pozostałych badań. Niska liczebność tej grupy nie pozwala na pełną interpretację, ale może być przesłanką, że korzystne właściwości COLOCO prp najpełniej ujawniają się w sytuacji deficytu o większym nasileniu.

Potwierdzeniem tego rozumowania jest obserwacja związana z grupą MT (najmłodszą). Wykorzystując kwestionariusz MMQ (Media Multitasking Questionnaire) oraz wyliczając indeks MMI (Media Multitasking Index) można podzielić tę grupę na tzw. Heavy Multitaskers oraz Light Multitaskers (różnią się jednym odchyleniem standardowym). Ponownie w Warszawie wśród osób z grupy terapeutycznej, zakwalifikowanych do grupy Heavy Multitaskers, średnia wartość poprawy między wizytą 1 a 3 jest większa niż w grupie Light Multitaskers. Dotyczy to wskaźnika CPI (Cognitive Performance Index), który jest obliczany na podstawie czterech testów (PAL, RTI, DMS, RVP) wchodzących w skład zestawu CANTAB. Obserwacją objęto 4 osoby.

Na Fig. 4 przedstawiono zmiany wartości wskaźnika CPI, stosowanego do oceny funkcji poznawczych, w grupie MT.

Badania biochemiczne:

Do oceny sprawności procesów kognitywnych wybrano swoisty marker, neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), mający udział w wielu procesach związanych z prawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego, m.in. w plastyczności synaptycznej, kształtowaniu się pamięci długotrwałej oraz w zachowaniu żywotności komórek nerwowych (neuroprotekcji). Pobranie próbki krwi do oznaczeń poziomu markera BDNF w osoczu wykonano dwukrotnie, na początku oraz na końcu badania.

Fig. 5 przedstawia wyniki badania, jako średnie i odchylenia standardowe wyników procentowych z 95% przedziałem ufności, w poszczególnych grupach wiekowych wraz z istotnością różnic między nimi. Uwzględniając grupy wiekowe, wśród osób przyjmujących COLOCO prp w grupie MT wzrost BDNF odnotowano u 78% badanych, w grupie ADT u 44% badanych, zaś w grupie OLD u 62,5% badanych. Z kolei w grupie Placebo wzrost stężenia BDNF w osoczu wystąpił u odpowiednio 18%, 23,5% i 30% badanych. Analiza wyników badań biochemicznych wykazała ponadto spadek poziomu BDNF u niektórych uczestników badania. I tak w grupie klinicznej (COLOCO pip) odnotowano redukcję stężenia BDNF u 36,9% badanych, zaś w grupie kontrolnej Placebo stężenie BDNF w osoczu spadło aż u 75,8% badanych.

W Tabeli 2 przedstawiono wyniki badań, jako średnie wyników procentowych w grupie klinicznej (COLOCO prp) oraz w grupie kontrolnej (Placebo). Badania wykazały istotny statystycznie wzrost poziomu BDNF ($F(1, 125) = 27,2$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,55$) w osoczu wszystkich uczestników stosujących preparat COLOCO prp w odniesieniu do grupy Placebo.

Zmiana	Grupa	
	Placebo	COLOCO prp
Pogorszenie	47 ⁽¹⁾	24 ⁽¹⁾
	75,8% ⁽²⁾	36,9% ⁽²⁾
Poprawa	15 ⁽¹⁾	41 ⁽¹⁾
	24,2% ⁽²⁾	63,1% ⁽²⁾
Razem	62 ⁽¹⁾	65 ⁽¹⁾

Tabela 2. Stężenie czynnika neurotroficznego BDNF w osoczu zdrowych ochotników stosujących preparat COLOCO prp w stosunku do grupy kontrolnej (Placebo). ⁽¹⁾ liczba badanych, u których nastąpiła poprawa/pogorszenie/bez zmian; ⁽²⁾ procentowy udział uczestników, u których nastąpiła poprawa/pogorszenie/bez zmian względem wszystkich badanych (n=125).

Tabela 3 przedstawia wyniki badań morfologicznych. Porównanie wykazało różnicę pomiędzy grupą kliniczną (COLOCO prp) a grupą kontrolną (Placebo) dla % udziału limfocytów względem ogólnej liczby białych krwinek.

Zmiana	Grupa	
	Placebo	COLOCO prp
Pogorszenie	11 ⁽¹⁾	1 ⁽¹⁾
	13% ⁽²⁾	1% ⁽²⁾
Poprawa	5 ⁽¹⁾	10 ⁽¹⁾
	6% ⁽²⁾	13% ⁽²⁾
Bez zmian	66 ⁽¹⁾	68 ⁽¹⁾
	80% ⁽²⁾	86% ⁽²⁾

Tabela 3. Zmiana procentowego udziału limfocytów względem całkowitej ilości białych krwinek w grupie COLOCO prp oraz Placebo. ⁽¹⁾ liczba osób, u których nastąpiła poprawa/pogorszenie/bez zmian; ⁽²⁾ procentowy udział uczestników, u których nastąpiła poprawa/pogorszenie/bez zmian względem wszystkich badanych (n=125).

Wnioski z badań neuropsychologicznych:

Część neuropsychologiczna (kognitywna) badania wskazuje, że COLOCO prp już w stosunkowo krótkim okresie obserwacji (16 tygodni) jest w stanie:

- zwiększyć sprawność krótkotrwałej pamięci wzrokowej w grupie najstarszej tj. AAMI („OLD”), na co wskazują wyniki uzyskane w teście *DMS* (zmienna *Percent correct*, wizyta 1 vs wizyta 3, $F=3,005$; $p=0,086$, $\eta^2 = 0,24$).
- poprawić zdolność uczenia się oraz pamięci przestrzennej w grupie najmłodszej MT na co wskazują wyniki uzyskane w teście *PAL* (zmienna *Total errors adjusted*, analiza efektu wewnątrz grupowego, $F=5,072$; $p=0,007$, $\eta^2 = 0,43$).
- zwiększyć szybkość reakcji w odpowiedzi na bodziec w grupie średniej tj. ADT, na co wskazują wyniki test RTI w układzie analizy międzygrupowej (zmienna *Simple reaction time*, powtarzalna analiza międzygrupowa placebo vs. treatment, $F=2,793$; $p=0,097$, $\eta^2 = 0,24$).
- pozytywnie wpłynąć na zdolność do koncentracji się (uwagi) na co wskazują wyniki uzyskane w teście *RVP* (zmienna *RVP. A*, wizyta 1 vs wizyta 3, $F=3,039$; $p=0,084$, $\eta^2 = 0,26$).

Podsumowując, COLOCO prp korzystnie wpływa w populacji osób zdrowych na zwiększenie sprawności procesów poznawczych kluczowych dla homeostazy kognitywnej w każdym etapie życia dorosłego człowieka. W grupie najmłodszej była to zdolność uczenia się, w grupie średniej zdolność do koncentracji (uwagi) oraz szybkość reakcji w odpowiedzi na bodziec, natomiast w grupie najstarszej poprawa sprawności procesów pamięciowych.

Wnioski z badań biochemicznych:

Badania biochemiczne wykazały podwyższenie poziomu BDNF u 63,1% badanych osób przyjmujących preparat COLOCO prp ($\chi^2(1) = 19,46$; $p < 0,001$; OR = 0,1868, 95%CI = 0,0866-0,4031). Poziom limfocytów w grupie COLOCO prp powrócił do wartości mieszczących się w normie u 13% badanych ($\chi^2(2) = 9,977$; $p = 0,006814$), co przemawia za zdolnością COLOCO prp w kierunku modulacji i przywracania homeostazy systemu immunologicznego.

Podczas ostatniej wizyty zamykającej badanie, z każdym z uczestników badania przeprowadzono wywiad w kierunku możliwości wystąpienia działań niepożądanych wynikających ze stosowania preparatu COLOCO prp. U żadnej z osób przyjmujących preparat COLOCO prp nie stwierdzono żad-

nych działań ubocznych. Ponadto, w trakcie trwania badania żaden z uczestników nie zgłosił niepokojących objawów, które mogłyby wskazywać na niekorzystne działanie COLOCO prp, co dowodzi, iż przyjmowanie preparatu COLOCO prp jest w pełni bezpieczne i nie powoduje żadnych działań niepożądanych.

Tabletki

Składnik	mg
COLOCO prp	0,12
Laktoza jednowodna DC	100,00
Laktoza 200 mesh	70,86
Sorbitol	270,00
Celuloza mikrokrystaliczna	69,00
Guma ksantanowa	6,00
Aromat waniliowy	3,00
Dwutlenek krzemu	3,00
Stearynian magnez	5,00
Suma	530,00

Z podanych składników wytłaczano tabletki o masie całkowitej 530 mg.

Mleko dla niemowląt

Mleko początkowe z dodatkiem COLOCO prp (GM1-C)

Formułę mleka początkowego dla niemowląt w wieku 0–5 miesięcy, MAMI LAC 1, suplementowano dodatkiem 20 µg preparatu COLOCO prp na 100 g, zapewniającym dawkę 2,7 mikrogramów COLOCO prp na 100 ml mleka gotowego.

Składniki		100 ml mleka gotowego do picia	100g
Energia	kcal	69	510
	kJ	290	2140
Tłuszcz	g	3,5	25,5
Kwas linolowy	mg	450	3300
Kwas α-linolowy	mg	61	450
Białko:	g	1,28	9,5
Kazeina	g	0,51	3,8
Białka serwatkowe	g	0,77	5,7
Węglowodany:	g	8,2	60,6
Laktoza	g	7,4	54,8
Maltodekstryna	g	0,8	5,8
Wilgotność	g		3,0

Witaminy:			
Wit. A	μg	85	630
Wit. D3	μg	1,4	10,5
Wit. E	mg	1,1	8,1
Wit. K1	μg	4,1	30
Wit. C	mg	8,1	60
Wit. B ₁	μg	58	430
Wit. B ₂	μg	142	1050
Wit. B ₆	μg	47	350
Wit. B ₁₂	μg	0,15	1,1
Niacyna	mg	0,69	5,1
Kwas foliowy	μg	9,7	72
Kwas pantotenowy	μg	311	2300
Biotyna	μg	1,5	11
Minerały	g	0,32	2,4
Wapń	mg	56	415
Fosfor	mg	28	210
Magnez	mg	5,7	42
Żelazo	mg	0,76	5,6
Cynk	mg	0,46	3,4
Mangan	μg	8,3	61
Miedź	μg	49	360
Jod	μg	11	81
Sód	mg	23	170
Potas	mg	64	470
Chlorki	mg	45	335
Selen	μg	2,1	15,40
Cholina	mg	8,8	65
Inozytol	mg	3,0	22
Tauryna	mg	4,9	36
L-karnityna	mg	1,9	14
COLOCO prp	μg	2,7	20

Mleko następne z dodatkiem COLOCO prp (GM-2 C)

Formułę mleka następnego dla niemowląt w wieku 6–12 miesięcy, MAMI LAC 2, suplementowano dodatkiem 40 µg preparatu COLOCO prp na 100 g, zapewniającym dawkę 5,6 mikrogramów COLOCO prp na 100 ml mleka gotowego.

Składniki		na 100 ml mleka gotowego do picia	na 100g
Energia	kcal	69	485
	kJ	290	2040
Tłuszcz	g	3,1	22,0
Kwas linolowy	mg	400	2800
Kwas α-linolowy	mg	55	390
Białko:	g	1,7	12,2
Kazeina	g	1,0	7,3
Białka serwatkowe	g	0,7	4,9
Węglowodany:	g	8,5	59,8
Laktoza	g	5,7	39,8
Maltodekstryna	g	2,8	20,0
Wilgotność	g		3,0
Witaminy:			
Wit. A	µg	73	512
Wit. D3	µg	1,5	10,3
Wit. E	mg	1,0	6,7
Wit. K1	µg	5,4	38
Wit. C	mg	12,8	90

Wit. B ₁	μg	71	500
Wit. B ₂	μg	91	640
Wit. B ₆	μg	50	350
Wit. B ₁₂	μg	0,16	1,1
Niacyna	mg	0,70	4,9
Kwas foliowy	μg	11	78
Kwas pantotenowy	μg	370	2600
Biotyna	μg	1,7	12
Minerały	g	0,57	4,0
Wapń	mg	85	600
Fosfor	mg	61	430
Magnez	mg	8,3	58
Żelazo	mg	1,3	9,2
Cynk	mg	0,71	5,0
Mangan	μg	3,8	27
Miedź	μg	51	360
Jod	μg	12	81
Sód	mg	31	220
Potas	mg	110	771
Chlorki	mg	68	480
Selen	μg	0,75	5,3
Cholina	mg	14	95
Tauryna	mg	7,1	50
Inozytol	mg	6,8	48
COLOCO prp	μg	5,6	40

Zastrzeżenia patentowe

1. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, do zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia zaburzeń i stanów wymagających podwyższenia i/lub modulacji poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) jako oznaczanego

- w osoczu krwi biomarkera, które to zaburzenia i stany obejmują zaburzenia związane ze wzmożoną aktywnością umysłową, stany obniżonego nastroju, zaburzenia koncentracji, łagodnie zaburzenie poznawcze oraz wspomaganie procesu rozwoju układu nerwowego i stymulacji funkcji poznawczych u niemowląt i małych dzieci.
2. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do stosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wymienione zaburzenia i stany obejmują pogorszenie sprawności krótkotrwałej pamięci wzrokowej, pogorszenie zdolności uczenia się oraz pamięci przestrzennej, spowolnienie reakcji w odpowiedzi na bodziec i/lub pogorszenie koncentracji uwagi.
 3. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do podawania doustnego.
 4. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według zastrz. 1 do 3, **znamienny tym**, że jest formułowany jako składnik środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety.
 5. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według dowolnego z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego do mleka modyfikowanego i odżywek dla niemowląt i małych dzieci, niekarmionych od urodzenia lub po zakończeniu karmienia mlekiem matki, mającego na celu podwyższenie poziomu BDNF do poziomu porównywalnego z poziomem u niemowlęcia karmionego naturalnym mlekiem matki.
 6. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według dowolnego z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego dla dzieci starszych po okresie karmienia piersią i/lub mlekiem modyfikowanym i dla dorosłych, w celu stymulacji i/lub aktywności układu nerwowego oraz uzyskania efektu prokognitywnego.
 7. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według dowolnego z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że jest formułowany jako składnik dodatku żywieniowego dla kobiet w ciąży w celu podwyższenia poziomu BDNF w osoczu krwi matki i dziecka w okresie prenatalnym.
 8. Wysokoprolinowy kompleks peptydowy do zastosowania według dowolnego z zastrz. od 1 do 7, **znamienny tym**, że jest pozbawiony frakcji β -laktoglobuliny.
 9. Preparat zawierający wysokoprolinowy kompleks peptydowy wyodrębniany z siary ssaków, o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 10 000 i zawierający od 16% do 22% reszt proliny, do zastosowania jak określono w dowolnym z zastrz. od 1 do 8, **znamienny tym**, że ma postać środka farmaceutycznego, nutraceutyku, dodatku żywieniowego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego lub suplementu diety.
 10. Preparat według zastrzeżenia 9, **znamienny tym**, że zawiera skuteczną terapeutycznie dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego dla osoby dorosłej od 50 do 1000 μ g.
 11. Preparat według zastrz. 10, **znamienny tym**, że zawiera dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego od 80 do 160 μ g.
 12. Preparat według zastrz. 11, **znamienny tym**, że zawiera dawkę dobową wysokoprolinowego kompleksu peptydowego 120 μ g.
 13. Preparat według zastrz. 9, **znamienny tym**, że jest przeznaczony dla kobiet w ciąży i zawiera terapeutycznie skuteczną dawkę wysokoprolinowego kompleksu peptydowego od 50 do 140 μ g.
 14. Preparat według zastrz. 9, **znamienny tym**, że jest nim formuła modyfikowanego mleka maternizowanego dla niemowląt wzbogaconego przez dodatek wysokoprolinowego kompleksu peptydowego w ilości zaspokajającej zapotrzebowanie, dzienne od 1 do 5 mikrogramów na 1 kg masy ciała.

Rysunki

grupa: AAMI (OLD)

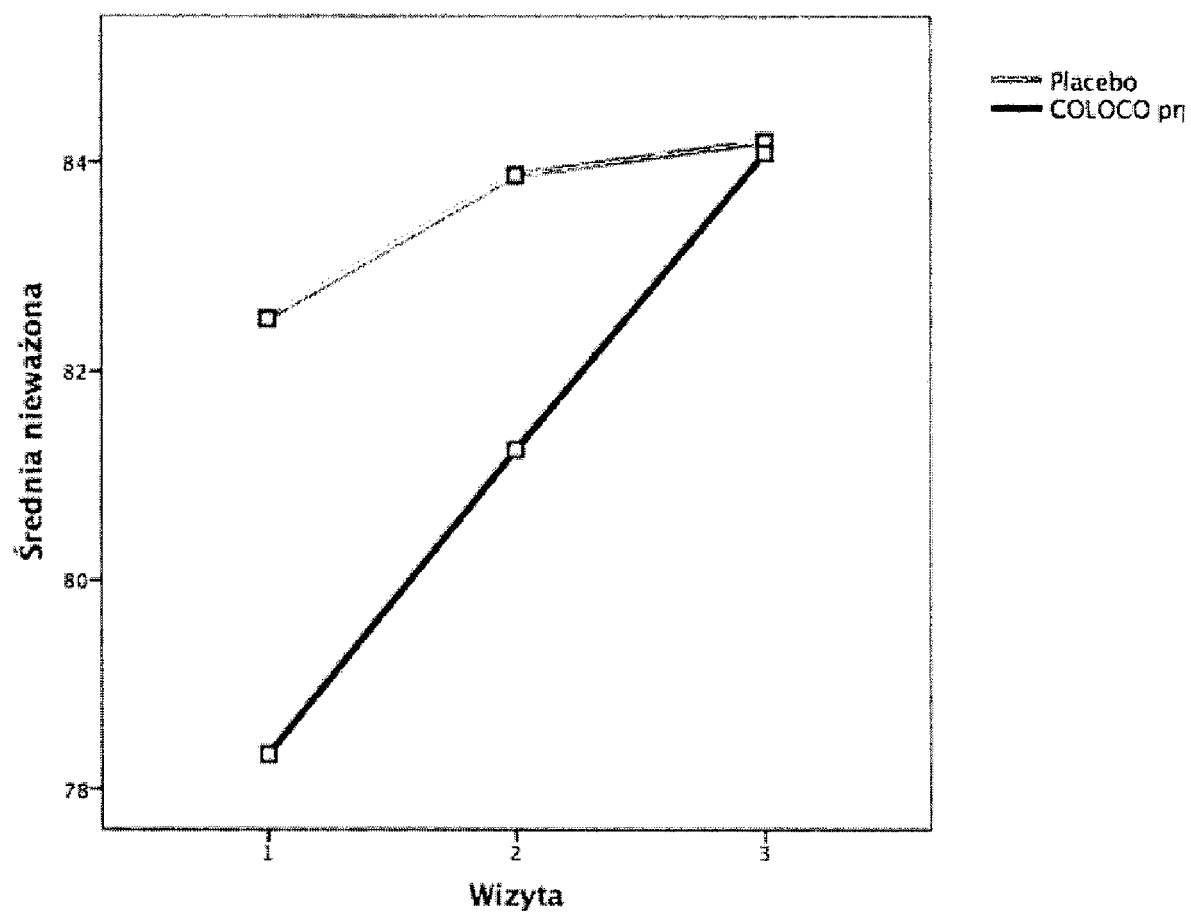


Fig. 1

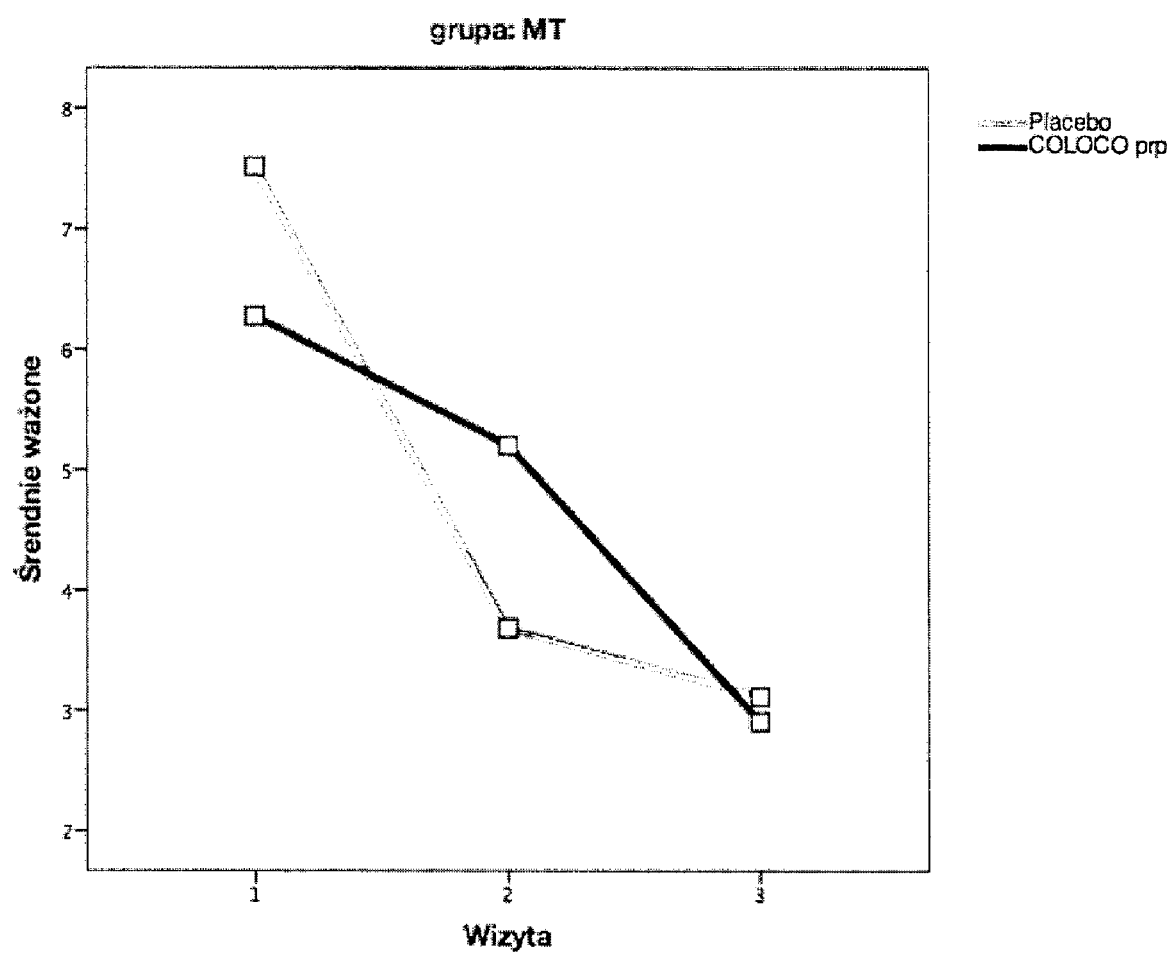


Fig. 2

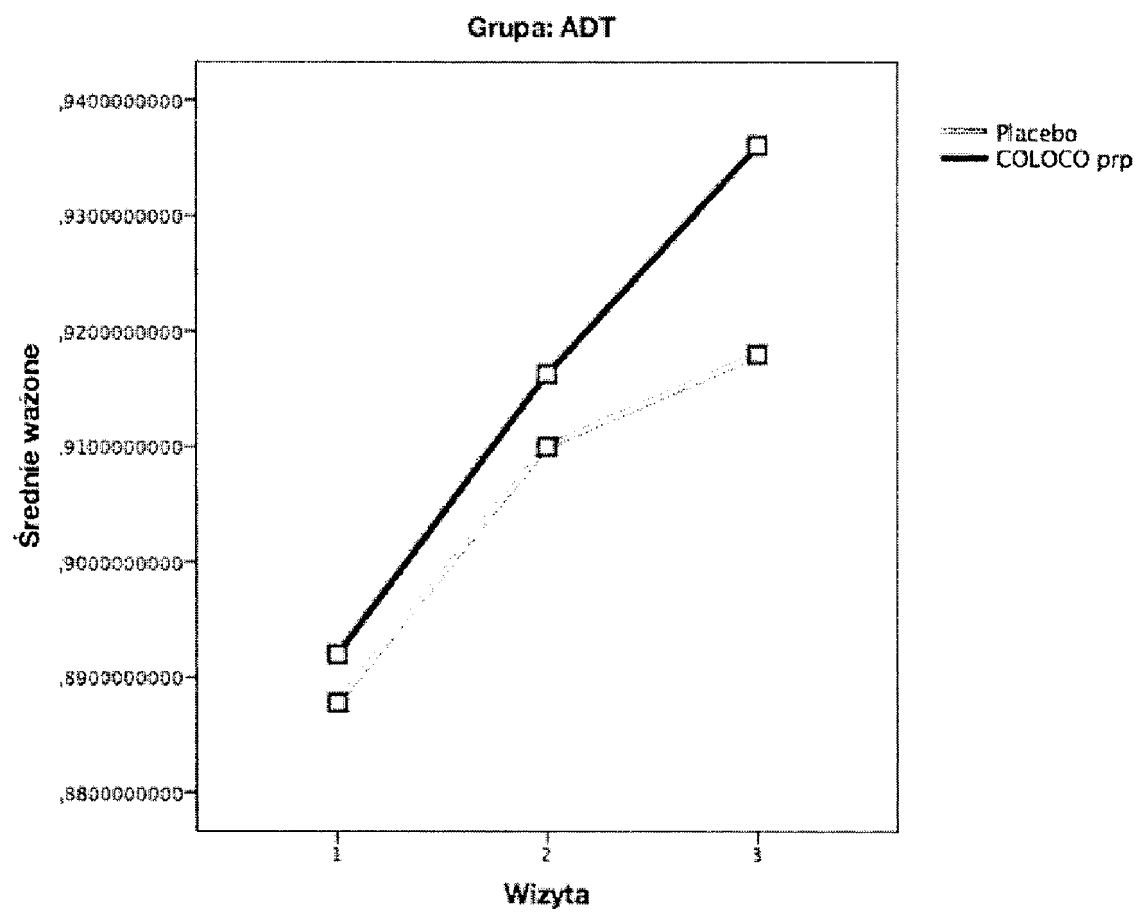


Fig. 3

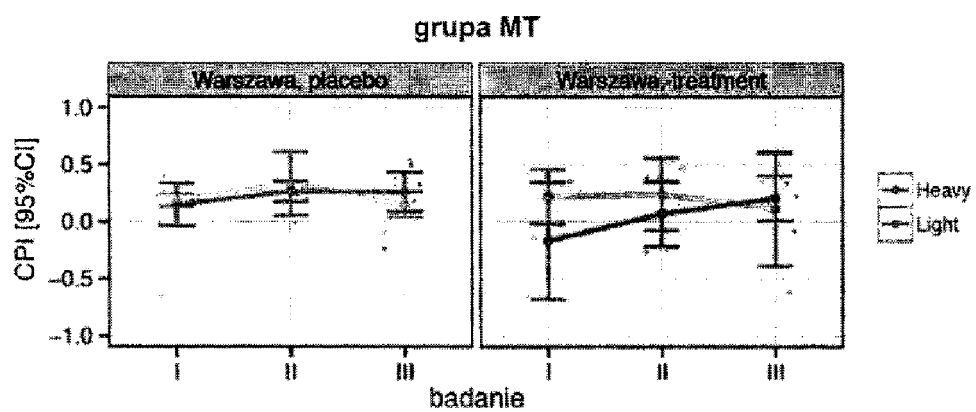


Fig. 4

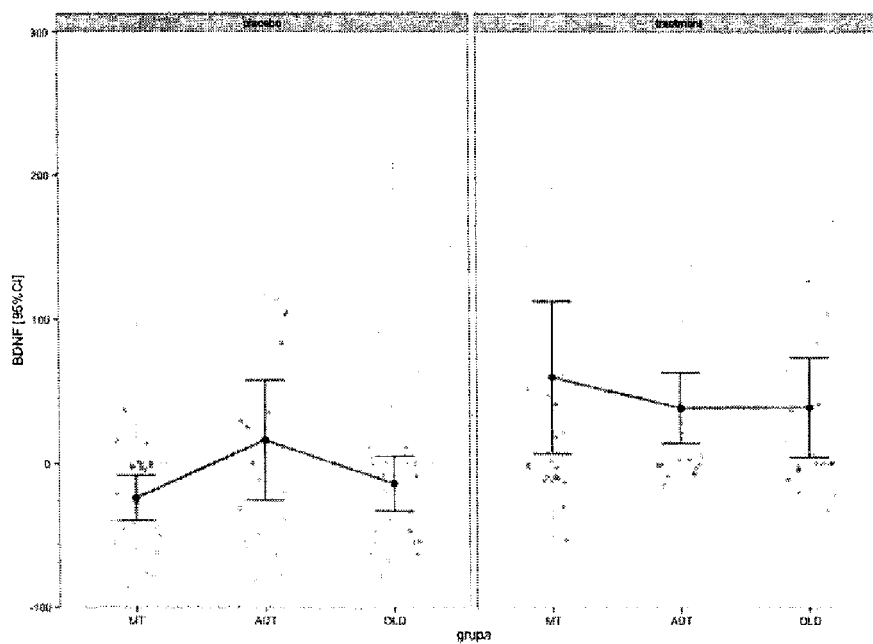


Fig. 5