



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° 06-18273

54. TÍTULO "FRACCIONES DE LECHE Y PREPARACIONES DE LECHE PARA EL TRATAMIENTO Y/O
PREVENCION DE LAS ENFERMEDADES MEDIADAS POR COX-2"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A23L 1/305, A61K38/00, A23J1/20

71. SOLICITANTE NESTEC S.A.

DOMICILIO VEVEY, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 23 FEB 2006

PETITORIO

1


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
 Radicación: 66112/3 00000000
 Fecha (AÑO): 2005-02-23 17:11:03 Folios: 66
 Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC 411 PRESENTE
 Dependencias: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 12-04-2006

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: NESTEC S.A.

Dirección: Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 8089701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 8089701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: BOVETTO, Lionel; HAU, Joerg y MACE, Catherine.

Dirección: 220 B Route des Tattes, St. Thomas, F-74500 Larringes; Sur le Jordil,
CH-1148 Cuamens y Avenue des Mousquines 27, CH-1005 Lausanne.

Nacionalidad o Domicilio: Francia y Suiza.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/010200

Fecha: 13/09/04

Publicación Internacional No. WO 2005/025335 A1

Fecha: 24/03/05

⑥

Título (54)

"FRACCIONES DE LECHE Y PREPARACIONES DE LECHE PARA EL
TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES MEDIADAS
POR COX-2"

⑦

Clasificación Internacional (51) A23L 1/305, A61K38/00, A23J1/20

⑧

Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

12/09/03

(31) Número de Solicitud

03020739.3

⑨

Comprobante de Pago No. 06-14,338

Fecha: Febrero 21 de 2006

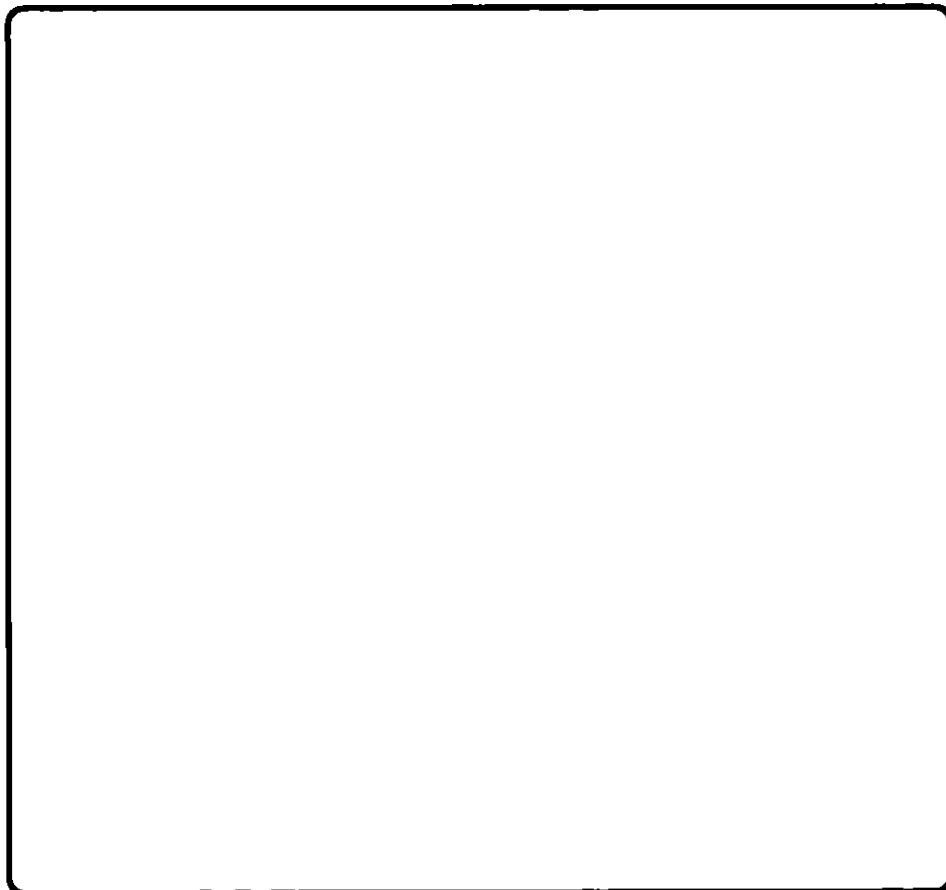
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción y publicación con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén, T.P. 53.215

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06410273 00000000 Folios: 00
Fecha (VTD): 2006-02-23 17:11:03
Trámite : 011 PCY-PATENT 3/9 FASE NUL: 411 PRESENTAL
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 14,338
FECHA : FEBRERO 21 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	39309442	21/02/2006	13,533.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00 /

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCIÓN OFICIAL No.283/04 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 01 DE SEPTIEMBRE DE 2004 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL SEGÚN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de poder conferido en inglés y español por NESTEC S.A., una sociedad organizada y existe de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey, Suiza, y otorgado a los Doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARÍA y/o ENRIQUE ÁLVAREZ, todos domiciliados en Bogotá, Colombia, Calle 72 No. 5 - 83 (Piso 6°).

Dado el 5 de agosto de 2004. Firma ilegible de la Señora Paula Nelson, Vice-Presidente de Nestec S.A.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Legalización por parte del suscrito Notario de la firma de la Señora Paula NELSON quien desempeña el cargo de Vice-Presidente de la compañía NESTEC S.A., una sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Suiza, domiciliada en Vevey (Suiza). Además, dicho Notario certifica que el signatario, según las leyes de Suiza, tiene facultad para otorgar el presente documento. Los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos el 24 de marzo de 1997, y de todo ello da fe.

Firma de Jean-Daniel RUMPF.

Sello: Jean-Daniel RUMPF - Notario. Estampilla de 4 Frs.

Traducción Oficial No.
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCÉS - ESPAÑOL
Res. Ministerio No. 2680/91

283/0.

Legalización No. 7.135. El Notario Jean-Daniel RUMPF, en Vevey, Distrito de Vevey, Cantón de Vaud, Suiza, certifica la firma puesta en la página anterior por la Señora Paula Nelson, Directora adjunta de Nestec S.A., en Vevey, la cual compromete en forma válida con su firma individual.

Dado en Vevey, el once de agosto de dos mil cuatro. Firma ilegible del Notario.

Sello: Jean-Daniel RUMPF – Notario. Estampilla de 4 Frs.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. - País: Suiza

El presente documento público

2. - ha sido firmado por el Señor Jean-Daniel RUMPF
3. - obrando en calidad de Notario en Vevey
4. - con sello de Jean-Daniel RUMPF, Notario

CERTIFICADO

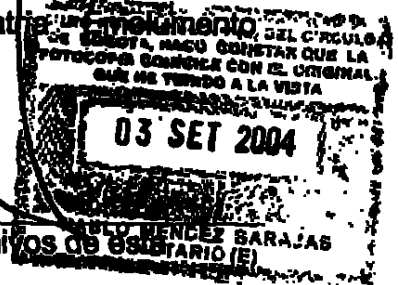
5. - En Lausana
6. - El 12 de agosto de 2004
7. - Por la Cancillería de Estado del Cantón de Vaud
8. - Bajo el número 6705
9. - Sello: Cancillería del Consejo de Estado – Libertad y Patria
- de 25 Fr.
10. - Por el Canciller de Estado, firma de P. Equey.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de ESTADÍSTICO (E) oficina para confrontación y a la cual me remito.

Traducción oficial No. 283/04.

Traductor: Jean-Jacques Turpin.

Bogotá, D.C., 1 de septiembre de 2004.

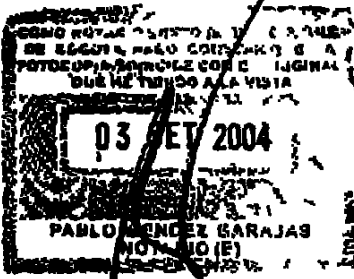


Traducción Oficial No. 283/04
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Interpreté Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
No. Minutaria No. 2480/04

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Fin Reyes
61229

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SEP -2 A 11 09

Lez
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Los abajo firmados, NESTEC S.A., una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza

con domicilio en Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, NESTEC S.A., a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitration, to collect, to appeal and, in short, with all the further powers as may be required and we hereby declare from now on as valid and good, all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 5th August 2004

Paula NELSON - Vice President



NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Sulza
Vevey

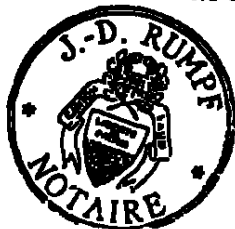
{ss

Hoy 11 de Agosto de 2004, compareció
PAULA NELSON, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es Vicepresidente

de NESTEC S.A., la
compañía nombrada en el documento que antecede,
una sociedad debidamente organizada y existente
conforme a las leyes de Sulza, domiciliada en la
ciudad de Vevey, Sulza legalmente constituida
para un período de duración que aún no ha
terminado, que ejerce su objeto social; conforme a
las leyes de Sulza, que el declarante está autorizado
por dicha Compañía para conferir este poder; que el
sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre
y en representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
fiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Vevey, Sulza, con fecha
24 Marzo, 1997, y certifica que de
conformidad con la legislación de dicho País, la
anterior declaración juramentada es prueba
suficiente de que los hechos sobre que ella versa son
ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).



NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Vevey

{ss

On this 11th day of August, 2004,
personally came

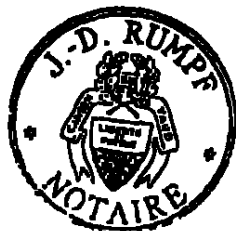
Paula NELSON
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he/she is the

Vice President of NESTEC S.A., the
company named within, a Corporation organized and
existing under the laws of the Switzerland, domiciled
at the City of Vevey, Switzerland legally constituted
for a period of tenure not yet expired, which exercises
its corporate purposes according to the laws of
Switzerland, that the deponent is authorized by said
Company to confer this power of attorney; that the
seal affixed hereunto by the deponent in the name
and on behalf of said Corporation is the corporate
seal thereof; and that the purpose for which this
instrument is granted is included within the corporate
purposes of the Company.

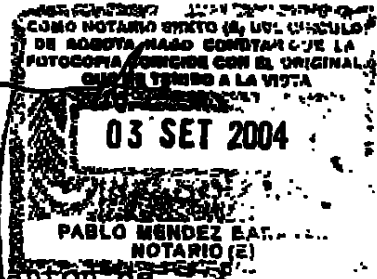
The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Vevey, Switzerland, under date of March 24, 1997
and hereby certifies that under the laws of said
County the foregoing acknowledgment is sufficient
proof that the facts therein contained are true, which
he attests.

Légalisation No 7'135.-

Le notaire JEAN-DANIEL RUMPF, à Vevey, District de Vevey, Canton de
Vaud, Suisse, certifie authentique la signature apposée d'autre
part par M^{me} Paula NELSON, directrice-adjointe de la société
NESTEC S.A., à Vevey, qu'elle engage valablement par sa signature
individuelle.
VEVEY, LE ONZE AOÛT DEUX MILLE QUATRE.



J.D. Rumpf



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

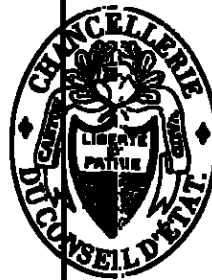
1. Pays: SUISSE

Le présent acte public

2. a été signé par Jean-Daniel Rumpf

3. agissant en qualité de notaire à Vevey

4. est revêtu du sceau/timbre de J.-D. Rumpf notaire



Attesté

5. à Lausanne

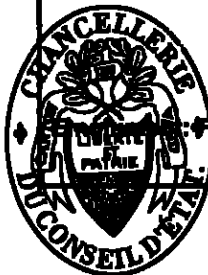
6. le 12 août 2004

7. par la Chancellerie d'Etat du Canton de Vaud

8. sous No 6705

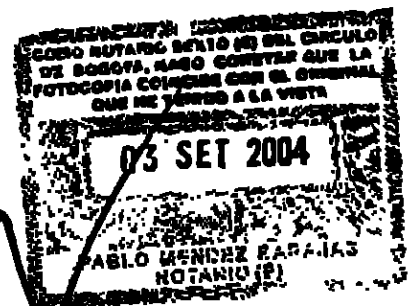
9. Sceau/timbre:

10. Signature
pr le Chancelier d'Etat:



Fr. 25.-


P. Equey



RETIRO FOLIO 8 PARA PUBLICAR.
RETIRO FOLIO 9 Y 10 PARA TARJETERO.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/010200

8

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO
IPC 7 A23L1/305 A61K38/00 A23J1/20

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 A23L

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, WPI Dato, PAJ, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 01/11990 A (HASCHKE FERDINAND; MAIRE JEAN CLAUDE (CH); JOST ROLF (CH); KRATKY) 22 de Febrero de 2001 (2001-02-22) reivindicación 1; ejemplo 4	1-6, 18
A	----- reivindicación 1; ejemplo 4	7-17
X	DE 44 13 839 C (FRITZ KOCH PHARMA GMBH DR MED) 19 de Octubre de 1995 (1995-10-19) resumen; reivindicación 1	1-6, 18
A	----- WO 01/56555 A (NAYLOR ALAN; GLAXO GROUP LTD (GB); MANGEL ALLEN WAYNE (US)) 9 de Agosto de 2001 (2001-08-09) reivindicaciones 1, 7	1-18
A	----- US 6 469 063 B1 (CHEN SONGYUAN Y COL) 22 de Octubre de 2002 (2002-10-22) resumen	1-18
	----- -/-	

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

10 de Enero de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

04/02/2005

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europeas, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Koch, J

7A

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/010200

9

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	WO 02/051437 A (NESTLE SA; GERMAN BRUCE (CH); PECQUET SOPHIE (CH); TURINI MARCO (C) 4 de Julio de 2002 (2002-07-049 resumen; ejemplos 7, 8	1-18

12

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/010200

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 0111990 A	22-02-2001	EP	1048226 A1	02-11-2000
		AU	765986 B2	09-10-2003
		AU	4753500 A	13-03-2001
		BR	0010125 A	15-01-2002
		CA	2371696 A1	22-02-2001
		CN	1358067 T	10-07-2002
		WO	0111990 A1	22-02-2001
		MX	PA01010778 A	20-08-2003
		NO	20015178 A	23-10-2001
		PL	351599 A1	05-05-2003
		US	6777391 B1	17-08-2004
		ZA	200108412 A	13-01-2003
		AU	774751 B2	08-07-2004
		AU	7654300 A	30-04-2001
		BR	0014377 A	19-11-2002
		CA	2385860 A1	05-04-2001
		CN	1377238 T	30-10-2002
		CZ	20021135 A3	14-08-2002
		WO	0122837 A1	05-04-2001
		EP	1220620 A1	10-07-2002
		HU	0202886 A2	28-01-2003
		JP	2003510059 T	18-03-2003
		NO	20021333 A	14-05-2002
		NZ	517994 A	29-08-2003
		SK	5792002 A3	06-08-2002
		TR	200200840 T2	23-09-2002
		ZA	200202081 A	13-06-2003
DE 4413839 C	19-10-1995	DE	4413839 C1	19-10-1995
WO 0156555 A	09-08-2001	AU	2870301 A	14-08-2001
		EP	1251839 A2	30-10-2002
		WO	0156555 A2	09-08-2001
		JP	2003521511 T	15-07-2003
		US	2003013717 A1	16-01-2003
US 6469063 A	22-10-2002	NINGUNO		
WO 02051437 A	04-07-2002	BR	0116415 A	30-12-2003
		CA	2431835 A1	04-07-2002
		WO	02051437 A1	04-07-2002
		EP	1345624 A1	24-09-2003
		JP	2004522725 T	29-07-2004
		NO	20032732 A	25-07-2003
		US	2003232057 A1	18-12-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/010200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A23L1/305 A61K38/00 A23J1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/11990 A (HASCHKE FERDINAND ;MAIRE JEAN CLAUDE (CH); JOST ROLF (CH); KRATKY) 22 February 2001 (2001-02-22)	1-6,18
A	claim 1; example 4	7-17
X	DE 44 13 839 C (FRITZ KOCH PHARMA GMBH DR MED) 19 October 1995 (1995-10-19)	1-6,18
	abstract; claim 1	
A	WO 01/56555 A (NAYLOR ALAN ;GLAXO GROUP LTD (GB); MANGEL ALLEN WAYNE (US)) 9 August 2001 (2001-08-09)	1-18
	claims 1,7	
A	US 6 469 063 B1 (CHEN SONGYUAN ET AL) 22 October 2002 (2002-10-22)	1-18
	abstract	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 2005

Date of mailing of the international search report

04/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-8040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/010200

12

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/051437 A (NESTLE SA ;GERMAN BRUCE (CH); PECQUET SOPHIE (CH); TURINI MARCO (C) 4 July 2002 (2002-07-04) abstract; examples 7,8	1-18

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/010200

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0111990	A	22-02-2001	EP 1048226 A1 02-11-2000
			AU 765986 B2 09-10-2003
			AU 4753500 A 13-03-2001
			BR 0010125 A 15-01-2002
			CA 2371696 A1 22-02-2001
			CN 1358067 T 10-07-2002
			WO 0111990 A1 22-02-2001
			MX PA01010778 A 20-08-2003
			NO 20015178 A 23-10-2001
			PL 351599 A1 05-05-2003
			US 6777391 B1 17-08-2004
			ZA 200108412 A 13-01-2003
			AU 774751 B2 08-07-2004
			AU 7654300 A 30-04-2001
			BR 0014377 A 19-11-2002
			CA 2385860 A1 05-04-2001
			CN 1377238 T 30-10-2002
			CZ 20021135 A3 14-08-2002
			WO 0122837 A1 05-04-2001
			EP 1220620 A1 10-07-2002
			HU 0202886 A2 28-01-2003
			JP 2003510059 T 18-03-2003
			NO 20021333 A 14-05-2002
			NZ 517994 A 29-08-2003
			SK 5792002 A3 06-08-2002
			TR 200200840 T2 23-09-2002
			ZA 200202081 A 13-06-2003
DE 4413839	C	19-10-1995	DE 4413839 C1 19-10-1995
WO 0156555	A	09-08-2001	AU 2870301 A 14-08-2001
			EP 1251839 A2 30-10-2002
			WO 0156555 A2 09-08-2001
			JP 2003521511 T 15-07-2003
			US 2003013717 A1 16-01-2003
US 6469063	B1	22-10-2002	NONE
WO 02051437	A	04-07-2002	BR 0116415 A 30-12-2003
			CA 2431835 A1 04-07-2002
			WO 02051437 A1 04-07-2002
			EP 1345624 A1 24-09-2003
			JP 2004522725 T 29-07-2004
			NO 20032732 A 25-07-2003
			US 2003232057 A1 18-12-2003

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
24 de Marzo de 2005 (24.03.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/025335 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A23L 1/305,
A61K 38/00, A23J 1/20

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2004/010200

(22) Fecha de Registro Internacional:
13 de Septiembre de 2004 (13.09.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
03020739.3 12 de Septiembre de 2003 (12.09.2003) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto
Estados Unidos de América): NESTEC S.A. [CH/CH];
Ave Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América
solamente): BOVETTO, Lionel [FR/FR]; 220 B Route
des Tattes, St. Thomas, F-74500 Larringes (FR).
HAU, Joerg [DE/CH]; Sur le Jordil, CH-1148
Cuarnens (CH). MACE, Catherine [FR/CH]; Avenue
des Mousquines 27, CH-1005 Lausanne (CH).

(74) Agente: CHAUTARD, Cécile; Avenue Nestlé 55,
CH-1800 Vevey (CH).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra
manera, para cada tipo de protección nacional disponible):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra
manera, para cada tipo de protección regional disponible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- como derecho del solicitante para solicitar y que se le otorgue una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- como derecho del solicitante para reivindicar la prioridad de la solicitud más temprana (Regla 4.17(iii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- de la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) para Estados Unidos de América solamente

Publicado:

- con reportes de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: FRACCIONES DE LECHE Y PREPARACIONES DE LECHE PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES MEDIADAS POR COX-2

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con composiciones nutricionales y farmacéuticas para el tratamiento y prevención de enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2 y a un método para incrementar la actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2 de un producto. Además de ello, la presente invención se refiere al uso de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche para inhibir la actividad de ciclooxigenasa 2 (COX-2), en particular para la preparación de un medicamento o un alimento funcional para el tratamiento y la prevención de enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 March 2005 (24.03.2005) ✓

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/025335 A1

(51) International Patent Classification⁷: **A23L 1/305.**
A61K 38/00, A23J 1/20

SK, TR, OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/010200 ✓

Declarations under Rule 4.17:

(22) International Filing Date:
13 September 2004 (13.09.2004) ✓

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
03020739.3 12 September 2003 (12.09.2003) EP ✓

(71) Applicant (for all designated States except US): NESTEC S.A. (CH/CH); Ave Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors: and

(73) Inventors/Applicants (for US only): BOVETTO, Lionel (FR/FR); 220 B Route des Tattes, St. Thomas, F-74500 Larringes (FR), HALL, Joerg (DI/CH); Sur le Jardi, CH-1148 Cuarnens (CH), MACE, Catherine (FR/CH); Avenue des Mousquines 27, CH-1005 Lausanne (CH).

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(74) Agent: CHAUTARD, Cécile; Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MILK FRACTIONS AND MILK PREPARATIONS FOR TREATING AND/OR PREVENTING COX-2 MEDIATED DISEASES

(57) Abstract: The present invention pertains to nutritional and pharmaceutical compositions for treating and preventing cyclooxygenase-2 mediated diseases and to a process for increasing the cyclooxygenase-2 inhibiting activity of a product. In addition thereto, the present invention relates to the use of one or more milk protein fractions and/or one or more milk protein preparations for inhibiting the activity of cyclooxygenase-2 (COX-2), in particular for the preparation of a medicament or a functional food for treating and preventing cyclooxygenase-2 mediated diseases.

WO 2005/025335 A1

15

AB

16

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente NO 7456WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																									
Solicitud internacional No. PCT/EP2004/010200	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 13.09.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 12.09.2003																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A23L1/305, A61K38/00, A23J1/20																										
Solicitante NESTEC S.A. y col.																										
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de 5 hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de 3 hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																										
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;">☒</td> <td style="width: 20%;">Casilla No. I</td> <td>Bases del reporte</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			☒	Casilla No. I	Bases del reporte	☐	Casilla No. II	Prioridad	☐	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases del reporte																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☐	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																								
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 12.04.2005	Fecha de terminación de este reporte 01.08.2005																									
Nombre y dirección de correo de la autoridad examinadora preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea - P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Funcionario autorizado Koch, J Teléfono No. +31 70 340-																									

17

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem.

☐ Este reporte se basó en una traducción del idioma original al siguiente idioma , el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:

- ☐ búsqueda internacional (según las Reglas 12.3 y 23.1 (b))
☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4)
☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Respecto a los elementos* de la solicitud internacional, este reporte se basó en (hojas reemplazadas las cuales han sido suministradas a la Oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, Páginas

1-31 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

1-18 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/4-4/4 como se presentaron originalmente

☐ listado de secuencia y/o alguna tabla(s) - ver Casilla Suplementaria en Relación al Listado de Secuencia

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ el listado de secuencia (*especificar*):
☐ cualquier tabla(s) relacionada al listado de secuencia (*especificar*):

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos modificados a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ el listado de secuencia (*especificar*):
☐ alguna tabla(s) relacionada al listado de secuencia (*especificar*):

* Si el ítem 4 aplica, algunas o todas de estas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas".

20

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

Solicitud Internacional No. 18
PCT/EP2004/010200

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	4, 7-17
	No: Reivindicaciones	1-3, 5, 6, 18
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	7-17
	No: Reivindicaciones	1-6, 18
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	1-18
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver hoja separada

Re Ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 01 11990 A (HASCHKE FERDINAND; MAIRE JEAN CLAUDE (CH); JOST ROLF (CH); KRATKY) Febrero 22 de 2001 (2001-02-22)
D2: DE 44 13 389 C (FRITZ KOCH PHARMA GMBH DR MED) Octubre 19 de 1995 (1995-10-19)

2. D1 revela (c.f. ej. 4; cl. 1) una fórmula de infante que comprende suero dulce del cual el glicomacropéptido de caseína ha sido removido. De acuerdo con la presente descripción (e.g., tabla 4 en la página 29), el suero dulce tiene un efecto inhibidor de COX-2 comparativamente alto.
Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-3, 5, 6 y 18 no es novedosa (Artículo 33(2) PCT).

3. D2 revela (cf. resumen; col. 1 § 2) una composición antioxidante para tratar enfermedades, que comprende suero dulce, vitaminas y minerales. Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-3, 5, 6 y 18 no es novedosa (Artículo 33(2) PCT).

4. La reivindicación dependiente 4 no parece contener ninguna característica adicional que, en combinación con las características de cualquier reivindicación a la que se refiere, cumpla con los requerimientos de la PCT con respecto al nivel inventivo, las razones son las siguientes:

En la reivindicación 4 se sugiere un ligero cambio en el producto de la reivindicación 1 que viene dentro del alcance de la práctica común seguida por los expertos en la técnica, especialmente en la medida en que las ventajas alcanzadas de esta forma pueden contemplarse fácilmente por anticipado. En consecuencia, la materia objeto de la reivindicación 4 también parece carecer de nivel inventivo.

5. El documento WO0156555 (D1), que ha sido identificada como la técnica previa más cercana con respecto a las reivindicaciones 7, 13, 16 y 17, revela un método para el tratamiento de constipación, en donde los compuestos que inhiben COX-2, tales como derivados de piridazina y piridina, son administrados, e.g., a humanos.

20

- 5.1 La materia objeto de las reivindicaciones 7, 13, 16 y 17 de la presente solicitud difieren del documento de la técnica previa más cercano en que el material de proteína de leche que provee actividad inhibidora de ciclooxigenasa-2 (COX-2) es aislado y usado como un ingrediente de producto, respectivamente.
La materia objeto de las reivindicaciones 7, 13 16 y 17 es, por lo tanto, novedosa (Artículo 33(2) PCT).
- 5.2 La solución sugerida en la presente solicitud resuelve el problema de proveer sustancias activas para el tratamiento de enfermedades mediadas por COX-2, que muestran un riesgo reducido de efectos secundarios perjudiciales.
- 5.3 La solución proveída en las reivindicaciones 7, 13, 16 y 17 de la presente solicitud se considera como novedosa e inventiva debido a que el uso de material de proteína de la leche para tratar enfermedades mediadas por COX-2 no está revelado en la técnica previa y porque el experto no está enterado de los efectos inhibidores de COX-2 de las fracciones de proteína de la leche.
- 5.4 Las reivindicaciones 8-12, 14 y 15 son dependientes de las reivindicaciones 7 y 13, respectivamente, y como tales también cumplen los requerimientos de la PCT con respecto a novedad y nivel inventivo.

~~28~~

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NO 7456WO		FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/418
International application No. PCT/EP2004/010200	International filing date (day/month/year) 13.09.2004	Priority date (day/month/year) 12.09.2003	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A23L1/305, A61K38/00, A23J1/20			
Applicant NESTEC S.A. et al			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 12.04.2005		Date of completion of this report 01.08.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5618 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 851 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized Officer Koch, J Telephone No. +31 70 340- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/010200

22

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 as originally filed

Drawings, Sheets

1A-4A as originally filed

☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

22

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/010200

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	4,7-17
	No: Claims	1-3,5,6,18
Inventive step (IS)	Yes: Claims	7-17
	No: Claims	1-6,18
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-18
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:

D1: WO 01 11990 A (HASCHKE FERDINAND ;MAIRE JEAN CLAUDE (CH);
JOST ROLF (CH); KRATKY) 22 February 2001 (2001-02-22)

D2: DE 44 13 839 C (FRITZ KOCH PHARMA GMBH DR MED) 19 October 1995
(1995-10-19)

2. D1 discloses (cf. ex. 4; cl. 1) an infant formula comprising sweet whey from which casein glycomacropeptide has been removed. According to the present description (e.g. table 4 on page 29), sweet whey has a comparatively high COX-2 inhibiting effect.

The subject-matter of claims 1-3, 5, 6 and 18 is therefore not novel (Article 33(2) PCT).

3. D2 discloses (cf. abstract; col. 1 § 2) an antioxidant composition for treating diseases, which comprises sweet whey, vitamins and minerals. The subject-matter of claims 1-3, 5, 6 and 18 is therefore not novel (Article 33(2) PCT).

4. Dependent claim 4 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which it refers, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step, the reasons being as follows:

In claim 4, a slight change in the product of claim 1 is suggested which comes within the scope of the customary practice followed by persons skilled in the art, especially as the advantages thus achieved can be readily contemplated in advance. Consequently, the subject-matter of claim 4 also appears to lack an inventive step.

5. The document WO0156555 (D1), which has been identified as the closest prior art with respect to claims 7, 13, 16 and 17, discloses a method for treating constipation, wherein COX-2 inhibiting compounds such as pyridazine and pyridine derivatives are administered e.g. to humans.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/010200

- 5.1. The subject-matter of claims 7, 13, 16 and 17 of the present application differs from the closest prior art document in that a milk protein material providing a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibiting activity is isolated and used as a product ingredient, respectively.
The subject-matter of claims 7, 13, 16 and 17 is therefore new (Article 33(2) PCT).
- 5.2. The solution suggested in the present application solves the problem of providing active substances for treating COX-2 mediated diseases, which exhibit a reduced risk of deleterious side effects,
- 5.3. The solution provided in claims 7, 13, 16 and 17 of the present application is considered as novel and inventive, because the use of milk protein material for treating COX-2 mediated diseases is not disclosed in the prior art and because the skilled person must be considered as unaware of the COX-2 inhibiting effects of milk protein fractions.
- 5.4. Claims 8-12, 14 and 15 are dependent on claims 7 and 13, respectively, and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

**FRACCIONES DE LECHE Y PREPARACIONES DE LECHE PARA EL
TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES MEDIADAS P R
COX-2**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con composiciones nutricionales y farmacéuticas para el tratamiento y prevención de enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2 y a un método para incrementar la actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2 de un producto. Además de ello, la presente invención se refiere al uso de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche para inhibir la actividad de ciclooxigenasa 2 (COX-2), en particular para la preparación de un medicamento o un alimento funcional para el tratamiento y la prevención de enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2.

27

**FRACCIONES DE LECHE Y PREPARACIONES DE LECHE PARA EL
TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES MEDIADAS POR
COX-2**

La presente invención se refiere a composiciones nutricionales y farmacéuticas útiles para tratar y/o prevenir enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa-2 y a un proceso para incrementar la actividad inhibitoria de un producto sobre la ciclooxigenasa-2. En particular, la presente invención también se refiere al uso de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche, para inhibir la actividad de la ciclooxigenasa-2, específicamente para la preparación de un producto alimenticio o un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por ciclooxigenasa-2.

Las enzimas ciclooxigenasa (COX) son enzimas claves requeridas para la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas (PG). Hasta el momento se han identificado dos isoformas de COX, COX-1 y COX-2, las cuales difieren en muchos aspectos: la isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos y se cree que es responsable de la producción de prostaglandinas que controlan las funciones fisiológicas normales, tales como la mantención de la mucosa gástrica y la regulación del flujo sanguíneo renal. La segunda isoforma, COX-2, parece no ser expresada constitutivamente en muchos de los

30

tejidos normales, sin embargo es altamente inducible y puede ser encontrada solamente en ubicaciones particulares, por ejemplo, en sitios de inflamación y en células de cáncer.

A pesar que las enzimas COX se encuentran unidas a la membrana, ellas no poseen una región trans-membrana convencional. En lugar de esto, ellas contienen cuatro hélices anfipáticas que están yuxtapuestas, para formar una región de hidrofobicidad. Esta región hidrofóbica es la que ancla la porción "inferior" de la enzima en la membrana. El sitio activo de la ciclooxigenasa esta ubicado en el área de la hidrofobicidad, cercana a las hélices anfipáticas. Se considera que los substratos e inhibidores de la enzima logran llegar al sitio activo por medio de un canal que se forma en la bicapa lipidica (W. Krause, R. N. Dubois, *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 61 (2000), 145-161).

Los inhibidores COX, y en particular los inhibidores de la COX-2, se utilizan para tratar una diversidad de diferentes enfermedades, tales como enfermedades inflamatorias, y también son utilizados como analgésicos. Además, por lo general se ha encontrado que la COX-2 esta sobre expresada en tejidos premalignos y malignos y un tratamiento con inhibidores COX-2 ha demostrado reducir la formación de tumores intestinales, esofágicos, de lengua, mamarios, de piel, de pulmón y de vejiga en animales (K. Subbaramaiah, A. J. Dannenberg, *TRENDS in Pharmacological Sciences* 24 (2003), 96-102).

Varias drogas bien conocidas del tipo no esteroideal anti-inflamatorio (también conocidas como AINES), tal como por ejemplo la aspirina y el ibuprofeno, inhiben a las COX-1 y COX-2. Recientemente, una nueva clase de inhibidores (COXIB) se ha descrito el cual inhibe específicamente a la enzima COX-2 solamente (M. E. Turini, R. N. Dubois, *Physiology And Diseases. Annu. Rev. Med.* 53 (2002), 35-57). Sin embargo, se sabe que los AINES provocan diversos efectos colaterales, por ejemplo problemas renales y ulceración duodenal y estomacal.

Consecuentemente, el problema de la presente invención es proveer medios adicionales para inhibir a las ciclooxigenasas, en particular a la COX-2, los cuales deben estar asociados en un bajo riesgo de efectos colaterales nocivos.

Este problema se ha resuelto proveyendo fracciones específicas y/o preparaciones de leche las cuales exhiben una actividad inhibitoria sobre COX-2, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por COX-2.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 corresponde a un diagrama que muestra la preparación de fracciones de leche de bovino tal como se explica en el Ejemplo 1.1;

La Figura 2 es un diagrama que muestra la preparación de fracciones de leche humana tal como se presenta en el Ejemplo 1.2.;

La Figura 3 es un diagrama que muestra la preparación de fracciones de leche de búfalo tal como se presenta en el Ejemplo 1.3.; y

La Figura 4 presenta una comparación de las actividades inhibitorias de COX-2 de diversas fracciones de proteína de leche y las preparaciones de proteína de leche derivadas de leche humana (HM), leche de vaca (CM) y leche de búfalo (BM).

De acuerdo a un aspecto, la presente invención provee una composición nutricional y/o farmacéutica, útil para tratar y/o prevenir las enfermedades mediadas por ciclooxigenasa-2, en donde dicha composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche, las cuales proveen una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2.

El término "tratar y/o prevenir las enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa-2" tal como se utiliza en la presente solicitud comprende a ambos, tratar una enfermedad asociada con la expresión, en particular con una expresión aumentada de ciclooxigenasa-2, así como prevenir una enfermedad la cual puede verse influenciada a través de la reducción del nivel de ciclooxigenasa-2 en un sitio específico en el organismo de un individuo, o por medio de la prevención de un nivel elevado de la ciclooxigenasa-2 en un sitio específico del organismo del individuo. Un nivel incrementado de la ciclooxigenasa-2 representa una cantidad, que en promedio es

superior al nivel de la ciclooxigenasa-2 estadísticamente presente en un individuo saludable en un sitio específico.

Un primer grupo de enfermedades mediadas por ciclooxigenasa-2, las cuales pueden ser tratadas y/o el inicio de las mismas puede ser prevenido de acuerdo a la presente invención es el cáncer, comprendiendo cualquiera de sus estados pre-cancerosos. De acuerdo a los datos científicos disponibles que existen, actualmente se presume que en los tejidos pre-malignos y malignos se encuentra sobre expresada la COX-2, y que dicha expresión incrementada de COX-2 esta asociada al menos en parte a la inducción de la formación del tumor. De hecho, una sobre expresión de COX-2 ha sido observada en diversas condiciones pre-malignas y malignas, por ejemplo, en órganos tales como colon, estomago, esófago, hígado, vejiga biliar, páncreas, cabeza y cuello, pulmón, tejido mamario, vejiga, órganos genitales femeninos y piel. En el estado de l arte, también, se ha logrado un tratamiento exitoso a base de los inhibidores de COX-2. Por lo cual, la administración de una composición de acuerdo a la presente invención será útil para tratar y/o prevenir los estados de cáncer y/o pre-cancerígenos.

Incluso, los inhibidores de COX-2 han demostrado bloquear la formación de prostaglandinas, la presencia de las cuales esta asociada con el desarrollo y el progreso del dolor, fiebre e inflamación. De acuerdo a la presente invención, grupos de enfermedades objetivo adicionales, mediadas por ciclooxigenasa-2, para las cuales se espera un tratamiento y/o

prevención, son la artritis, fiebre reumática, síntomas asociados con la influenza u otras infecciones virales, la dismenorrea, el dolor de cabeza, dolor dental, las enfermedades degenerativas de las articulaciones, etc. Incluso, de acuerdo a la presente invención, la enfermedad de Alzheimer se considera que es una enfermedad objetivo, debido a que los inhibidores de COX-2 han demostrado poseer un efecto protector en el desarrollo de esta enfermedad.

De acuerdo a la presente invención, las composiciones nutricionales y/o farmacéuticas se diseñan para ser administrados a cualquier individuo que las necesite, preferentemente mamíferos, en particular humanos y animales, por ejemplo los domésticos.

Una "actividad inhibitoria de ciclooxygenasa-2" como se menciona aquí puede ser determinada de acuerdo a un método de monitoreo de COX-2 sobre la base de células HUV-EC-C como se indica más adelante en los Ejemplos, pero también en base a otros ensayos conocidos en el arte.

La cantidad terapéuticamente efectiva de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche específicamente requeridas para un individuo determinado pueden ser fácilmente determinadas por el experto en el arte de acuerdo a su conocimiento general de la técnica considerando una diversidad de factores, tal como peso corporal, edad, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, ruta de administración, velocidad de expresión,

combinación de droga, etc. Básicamente, el régimen de dosis especial para un individuo particular dependerá de que se pretenda lograr una prevención general o un tratamiento agudo de una enfermedad. Por ejemplo, la dosis diaria de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche pueden ser seleccionadas de un rango comprendido entre 7 mg hasta 70 g en caso de una persona de 70 kilogramos, correspondiente a una dosis diaria de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 1 g por kilo de peso corporal, preferentemente desde alrededor de 0,5 mg hasta alrededor de 100 mg, más preferentemente desde alrededor de 5 mg hasta alrededor de 70 mg e incluso más preferentemente desde alrededor de 10 mg hasta alrededor de 50 mg.

Una composición nutricional de acuerdo a la presente invención es cualquier composición adecuada para el consumo humano o animal, que comprende al menos un material seleccionado del grupo que consiste de agua, proteínas y/o péptidos, carbohidratos, grasas.

Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención es cualquier composición que comprende al menos un compuesto terapéuticamente activo tal como se detalló en la presente descripción.

Más aun, la presente invención provee una composición nutricional y/o farmacéutica que comprende una cantidad incrementada de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que proveen

una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2, y la cual provee una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2, que es superior a la actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa-2 de una composición nutricional y/o farmacéutica en donde la cantidad de dichas una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche no han sido incrementadas.

Como tal, una cantidad incrementada de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche, la cual provee una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2 puede ser obtenida ya sea agregando la cantidad adicional de dichas una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche y/o sustituyendo una fracción de leche con una fracción de leche en donde el compuesto(s) bio-activo ha sido enriquecido. Un enriquecimiento puede ser logrado de acuerdo a técnicas físicas, químicas y biológicas bien conocidas en el arte y que pueden ser realizadas por ejemplo, basado en los ensayos descritos en los Ejemplos.

La actividad inhibitoria de un producto sobre la ciclooxigenasa-2, que resulta de un enriquecimiento o adición como se indica anteriormente podría ser por ejemplo al menos 1%, más preferentemente de al menos un 5%, más preferentemente al menos un 10% superior, y en particular al menos 25% superior que la actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2 de la composición nutricional/farmacéutica de la referencia, es

decir, de la composición nutricional/farmacéutica que posee además de la una o más fracciones de proteína de leche adicional y/o enriquecida y/o una o más preparaciones de proteína de leche, la misma composición como la composición nutricional/farmacéutica que posee una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2 incrementada.

Durante extensos estudios, los autores de la presente invención demostraron que las fracciones de proteína de leche específicas, proveen una actividad inhibitoria de ciclooxigenasa-2, la cual esencialmente puede encontrarse que no excede a aquella de la leche como tal. Sin desear estar unido a ningún tipo de teoría, puede suponerse que la baja actividad inicial observada en la leche humana parece estar asociada con las proteínas del suero. Las caseínas en si mismas pueden tener un efecto sorprendente, o contener una "bioactividad latente" la cual es activada (y luego encontrada en la fracción del suero) por medio de acidificación o el tratamiento con cuajo.

Pueden ser mencionadas las fracciones de suero de leche humana, de leche de bovino, de leche de búfalo, o de otra leche de mamífero, fracciones de leche descremada de leche humana, de leche de bovino, leche de búfalo, leche de bovino, o de otra leche de mamífero, la fracción ácida de caseína de leche de bovino, la fracción de caseína dulce de la leche de bovino, etc. o combinaciones de la misma que son conocidas, tal como se encontró que dichas fracciones de leche exhiben una

actividad inhibitoria de COX-2. Pueden ser utilizadas como fracciones de suero, por ejemplo las fracciones de suero ácido, las fracciones de suero dulce, las fracciones de suero soluble y las combinaciones de las mismas.

El sub-fraccionamiento adicional de la proteína de suero soluble y su monitoreo revela que son preferidas algunas sub-fracciones de proteína soluble en suero proveniente de la leche de bovino.

En principio, la separación y el aislamiento de las sub-fracciones de proteína soluble de suero, puede ser lograda por medio de la cromatografía interacción hidrofóbica (HIC), o por cromatografía líquida de alta resolución de interacción hidrofóbica (HI-HPLC), por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), y similares, todas de las cuales se basan en los mismos principios de separación. Los principios de HIC son conocidos para el experto en el arte. Generalmente, las muestras se cargan en una columna equilibrada (fase estacionaria) que comprende un material hidrófobo, el cual retiene las muestras. El material hidrófobo puede ser, por ejemplo, un poliestireno entrecruzado macroporoso, el que es comercializado como Amberlite Xad 16 XAD 16 proveniente de Rohm and Hass, por ejemplo, también pueden ser utilizado 15 RPC TN 17-0727-02 (poliestireno-divinilbenceno) de Amersham o equivalentes a estos.

Antes de que la proteína sea cargada en la columna, esta última debe ser equilibrada con una solución tamponada.

Después que la fracción es cargada, una solución tampón o una mezcla de soluciones tampón (fase móvil) puede(n) ser corrida(s) a lo largo de la columna, mediante lo cual la mezcla de las soluciones tampón varía y puede, por ende, tener propiedades variables para eluir desde la columna las sub-fracciones de proteína de acuerdo a su hidrofobicidad. La separación de las proteínas de suero de acuerdo a este método esta descrita en: "Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene", D. F. Elgar et al., Journal of Chromatography A 878 (2000) 183-196.

Las sub-fracciones de proteína eluidas desde la columna pueden ser descritas precisamente por medio de la composición de la mezcla del tampón o del contenido de acetonitrilo que efectúa su elución desde la fase estacionaria. Por ejemplo, la proteína de suero soluble puede ser cargada en una columna rellena con cuentas o esferas de poliestireno-divinilbenceno (15 RPC TN 17-0727-02 de Amersham) un tampón A puede ser definido como ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% vol. en agua y una solución tampón B puede ser definida como acetonitrilo 80% vol. y 0,85% volumen TFA (vol-%). Luego, la mezcla y el transporte de los tampones A y B pueden ser controlados por medio de un sistema específico, por ejemplo un FPLC (cromatografía líquida de proteína rápida) en una estación

UNICORN (Pharmacia/Amersham), y hacerlos correr a lo largo de la columna.

La sub-fracción de la proteína eluída puede ser definida por un rango de elución de proporciones mixtas de los tampones antes mencionado A y B. Utilizando la composición tampón específica (debido a que el orden de elución es dependiente del pH), el momento o intervalo de elución de una sub-fracción de proteína puede ser descrito simplemente por medio de la cantidad relativa de acetonitrilo presente en el momento de la elución de una fracción de proteína de acuerdo a la invención.

Si se desea, las sub-fracciones así obtenidas pueden ser concentradas por medio de técnicas bien conocidas en el arte, tal como la evaporación, ultrafiltración o diálisis, para eliminar el solvente orgánico antes de ser secadas, por ejemplo por medio de vacío, congelamiento, aspersión, lecho fluidizado, horno, o cualquier otro proceso de secado adecuado.

Se ha demostrado que las sub-fracciones enumeradas en los Ejemplos de la Tabla 7 son particularmente efectivas para promover la inhibición de COX II. Incluso, de acuerdo a una modalidad más preferida de la presente invención, se hace referencia a las sub-fracciones 1, 9, 10 y 14, tal como se muestran en la Tabla 5, las cuales son altamente efectivas.

Generalmente, la leche de cualquier origen mamífero (humanos, vacas, búfalos, ovejas, cabras, camellos, caballos, etc.) puede ser utilizada para preparar las fracciones de

proteína de leche o las preparaciones de proteína de acuerdo a la presente invención.

La leche descremada, el suero ácido y el suero dulce pueden ser preparados de acuerdo a un proceso tal como se describió en los Ejemplos. Los términos "proteína de suero soluble" o "proteína soluble" como se utiliza en el contexto de la presente invención representan la proteína que es recuperada en solución acuosa después de una ultra-centrifugación (por ejemplo, durante 1 hora, a 100.000 g) o de acuerdo a otro proceso conocido para un experto en el arte. Los términos "proteína no soluble" o "caseína micelar" representan al material lavado recuperado del sedimento después dicha ultracentrifugación (por ejemplo de acuerdo a las etapas que se indican en el Ejemplo 1 o de acuerdo a cualquier otro procedimiento o método conocido por el experto en el arte).

Particularmente, la elevada actividad inhibitoria de ciclooxygenasa-2 es provista por el suero dulce que proviene de leche humana y por diversas fracciones de leche de vaca, es decir natural, descremada, suero dulce, suero soluble, caseína de suero. Para el total de las tres especies de leche investigadas en los Ejemplos (humano, bovino, búfalo), las mayores tasas de inhibición de COX-2 se obtienen con el suero dulce, el cual consecuentemente representa una modalidad preferida de la presente invención.

Las preparaciones de proteína de suero proveen buenos resultados, sin embargo no fueron tan efectivas como diversas

fracciones de proteína de leche. Entonces se puede suponer que las fracciones de proteína de leche de acuerdo a la presente invención proveen efectos sinérgicos positivos, los cuales mejoran la actividad inhibidora de COX-2. Si se desea, también pueden ser combinadas las fracciones de proteína de leche y las preparaciones de proteína de suero.

Estudios dirigidos a la identificación de los compuestos inhibidores de ciclooxigenasa-2, que están presentes en las fracciones de proteína de leche de acuerdo a la presente invención, demostraron que los compuestos deben ser proteinaceos. Se ha demostrado que la lactoferrina, un compuesto conocido no posee actividad inhibidora alguna sobre la ciclooxigenasa-2.

La biodisponibilidad y la estabilidad con respecto a la biodegradación de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche puede ser además incrementada protegiendo a uno o más grupos funcionales, tales como por ejemplo -OH, -NH₂, -SH, -COOH, de los compuestos que están presente en dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche. Tal protección puede ser realizada por ejemplo a través de una reacción con una o más azúcares o carbohidratos, tales como por ejemplo lactosa. Por ejemplo, el calentamiento de las proteínas de leche en presencia de lactosa entrega proteínas lactosiladas. Después de proteger, los compuestos serán capaces de proveer resistencia incrementada frente a la degradación, en

particular frente a la degradación proteolítica que ocurre en el organismo, lo cual, por lo general a su vez resulta en un aumento de la biodisponibilidad. También puede ser utilizada una derivatización para obtener una solubilidad deseada y por medio de la cual lograr una biodisponibilidad deseada y controlada.

De acuerdo a otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche para la preparación de una composición nutricional o farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades mediadas por COX-2, inhibiendo la actividad de la ciclooxygenasa-2.

Por ejemplo, la una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que proveen la actividad inhibidora de COX-2 pueden ser administradas en una forma de dosis oral, tópica, parenteral o rectal que contiene vehículos, excipientes, adyuvantes y portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables. El término parenteral como se utiliza aquí incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intraesternal o técnicas de infusión.

La composición nutricional o farmacéutica de acuerdo a la presente invención puede ser utilizada para tratar o prevenir las enfermedades mediadas por ciclooxygenasa-2, tales como cáncer o estados pre-cancerosos, en particular que afectan al colon, estomago, esófago, hígado, vejiga biliar, páncreas,

cabeza y cuello, pulmón, mamas, vejiga, órganos genitales femeninos y piel y/o enfermedades inflamatorias, tales como artritis, fiebre reumática, síntomas asociados con la influenza u otras infecciones virales, dismenorrea, dolor de cabeza, dolor dental, enfermedades degenerativa de las articulaciones, etc. y/o enfermedad de Alzheimer.

Además, la composición nutricional o farmacéutica de acuerdo a la presente invención puede ser aplicada como un co-tratamiento durante un tratamiento de cáncer convencional y/o un tratamiento de un estado pre-canceroso, una quimioterapia, una terapia de radiación, una bioterapia y/o durante el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o durante el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Las una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que proveen una actividad inhibidora de ciclooxigenasa-2 también pueden ser útiles como un sustituto parcial o completo para los medicamentos convencionales, tales como por ejemplo los AINES. Por lo cual, la invención comprende composiciones farmacéuticas útiles para tratar enfermedades mediadas por ciclooxigenasa-2, como se ha definido anteriormente, las cuales comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche y uno o más ingredientes terapéuticamente efectivos, tales como aliviadores del dolor; un potenciador; un antagonista H2, un descongestionante; un antitusígeno; un

diurético; un antihistamínico sedante o no sedante; un agente para tratar o prevenir el cáncer o los estados pre-cancerosos, etc.

Las composiciones farmacéuticas que contienen a los ingredientes activos pueden encontrarse en cualquier forma adecuada para el uso oral, tales como por ejemplo tabletas, obleas, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas blandas o duras, o jarabes o elixires.

Las composiciones que se pretende destinar para el uso oral pueden ser preparadas de acuerdo a cualquier método conocido en el arte para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de agentes edulcorantes, agentes del sabor, agentes colorantes y agentes preservantes para poder proveer preparaciones farmacéuticamente elegantes y sabrosas.

Las tabletas contienen al ingrediente(s) activo(s) en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, tales como diluyentes inertes, agentes de granulación, agentes desintegrantes y lubricantes, los cuales son adecuados para la fabricación de dichas tabletas. Las tabletas pueden no estar cubiertas o estas pueden ser recubiertas por técnicas conocidas para así retardar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y mediante lo cual se provee una acción sostenida sobre un período más largo.

Las formulaciones para el uso oral también pueden ser presentadas como cápsulas de gelatina dura, en donde el ingrediente activo es mezclado con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda en donde los ingredientes activos se mezclan con agua o con un medio oleoso.

Las suspensiones acuosas contienen al material activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas, tales como por ejemplo agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, preservantes, agentes del color, agentes saborizantes, y agentes edulcorantes.

Los polvos dispersables y los gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por medio de la adición de agua proveen a los ingredientes activos en mezcla junto a un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más agentes preservantes. También pueden encontrarse presentes excipientes adicionales, como por ejemplo edulcorantes, saborizantes y agentes del color.

Las fracciones de proteína de leche y/o las preparaciones de proteína de leche, tal como se ilustran anteriormente, pueden ser utilizadas en cualquier composición nutricional, farmacéutica o alimento funcional, en donde estas composiciones pueden comprender, por ejemplo, al menos un componente seleccionado del grupo que consiste de agua, proteínas y/o péptidos, grasas y carbohidratos. Dicha composición además puede comprender minerales y vitaminas, por

ejemplo, en una cantidad que va desde 30% a 150% de la dosis diaria de acuerdo a la recomendación U.S. RDA. Además de esto, dichas composiciones pueden comprender material de fibra, agentes del sabor, emulsionantes, atrapadores de radicales, preservantes, ácidos, lípidos, frutas y jugos de fruta, infusiones, etc.

En particular, las composiciones de acuerdo a la presente invención pueden comprender por ejemplo una composición de alimento seleccionada de leche, yogur, requesón, queso, leches fermentadas, productos basados en leche fermentada, helados, productos a base de cereales, polvos en base de leche, formulas infantiles o alimentos para mascotas.

Las formulaciones, de las cuales se espera sean altamente aceptadas por los consumidores, son por ejemplo bebidas, tales como aquellas en base a productos lácteos, bebidas convencionales, tales como agua, jugos de fruta o infusiones, que comprenden las fracciones de proteína de leche y/o las preparaciones de acuerdo a la presente invención.

Los ejemplos adicionales para las formulaciones ventajosas son por ejemplo las composiciones en forma de preparaciones de postre, geles o espumas (tales como por ejemplo "moussés" ("espumas"), manjar blanco, gelatinas, flanes, preparaciones en base a yogur) o en forma de bocadillos comprendiendo un producto de confitería que tiene un relleno o centro que comprende a las fracciones de proteína de leche y/o las preparaciones de acuerdo a la presente invención. Por

ejemplo, las fracciones de proteína de leche y/o las preparaciones de acuerdo a la presente invención también pueden ser aplicadas en forma de una capa de cubierta o de un recubrimiento sobre cualquier producto alimenticio convencional o pueden ser incluidas como un material de relleno en cualquier producto alimenticio convencional.

De acuerdo a otro aspecto, la presente invención provee un proceso para incrementar la actividad inhibidora de un producto sobre la ciclooxigenasa-2, en donde dicho método comprende la etapa de incrementar la cantidad de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que proveen en dicho producto una actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2.

El producto en donde se ve aumentada la actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2, por ejemplo, puede ser una composición nutricional y/o farmacéutica y/o un alimento funcional, en particular un producto alimenticio lácteo.

Los autores de la presente invención también han encontrado métodos o procedimientos para aislar las fracciones de proteína de leche, los cuales proveen a ambos buenos rendimientos y esencialmente conservan en los componentes activos contenidos en dichas fracciones de proteína de leche, la actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2.

El proceso para aislar a la proteína de suero dulce o a la proteína de suero ácido que proveen una actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2 comprenden las siguientes

etapas: centrifugar la leche a 13.600 g durante 30 minutos para obtener una capa de crema y una capa de leche descremada; separar dicha capa de crema; aislar dicha leche descremada; agregar una solución acuosa de CaCl_2 en una cantidad tal a la leche descremada, que se obtenga una mezcla que tiene una concentración de 2 mmol/l de Ca^{+2} ; calentar dicha mezcla a 35°C y agregar un cuajo que tiene una actividad de 50 mg de quimosina activa por litro (por ejemplo en una cantidad de 0,4 a 0,6, preferentemente 0,5 μl de cuajo por cada ml de leche descremada) a dicha mezcla o calentar dicha mezcla a 25°C y acidificar la mezcla con una solución acuosa de HCl (32%), hasta un valor de pH de 4,6; centrifugar la mezcla a 13.600 g durante 30 minutos para poder obtener una separación de fase; y aislar respectivamente la proteína dulce del suero o la proteína ácida del suero.

El método para aislar la proteína soluble del suero que provee una actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2 comprende las siguientes etapas: centrifugar la leche a 13.600 g durante 30 minutos para obtener una capa de crema y una capa de leche descremada; separar dicha capa de crema; aislar dicha leche descremada; agregar una solución acuosa de CaCl_2 en una cantidad tal a la leche descremada, que se obtenga una mezcla que posee una concentración de 2 mmol/l de Ca^{+2} ; centrifugar durante 1 hora a 100.000 g para separar la fase de proteína soluble del suero de la fase de caseína micelar no soluble; y aislar la fase de proteína soluble del suero.

De acuerdo a otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una fracción de leche que provee una actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2, en donde dicha fracción de leche es posible de obtener de acuerdo a uno de los procedimientos que se han indicado anteriormente.

Debido a su actividad inhibidora sobre la ciclooxigenasa-2, la fracción de proteína de leche de acuerdo a la presente invención proveerá alternativas para los AINES convencionales, en particular en los casos en donde se encuentran contra-indicados dichos AINES, tales como aquellos casos de individuos que sufren de úlceras, desordenes de la coagulación, enfermedad renal, etc. Además, puede esperarse que un producto como tal, se encuentre esencialmente libre de efectos colaterales nocivos y consecuentemente pueda ser consumido durante un período de tiempo prolongado. En particular, esto será de gran interés cuando se desee la prevención de una enfermedad mediada por ciclooxigenasa-2, por ejemplo, en el caso de las personas que se supone tienen un riesgo incrementado de desarrollar cáncer debido a su predisposición genética o debido a una exposición a factores de riesgo bien conocidos (nutrición de alto riesgo, tales como por ejemplo, una típica "dieta del Oeste" elevada en grasas y baja en fibras, o la exposición a químicos, etc.).

Como los productos lácteos han sido consumidos desde hace generaciones por el humano, puede esperarse que un

medicamento o alimento funcional de acuerdo a la presente invención sea altamente aceptado por los consumidores.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención sin limitar esta a las modalidades específicas mencionadas.

EJEMPLOS

Todos los solventes fueron de grado analítico o de grado HPLC y fueron adquiridos de Merck (Dietikon, Suiza). El agua fue purificada, ya sea en las instalaciones utilizando un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q (Millipore, Volketswil, Suiza) o fue adquirida, de grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). También se adquirieron desde Merck el $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, HCl (32%), hidróxido de sodio, perhidrol al 30% H_2O_2 p. A.

El cuajo ("presión simple") fue producido por TEXEL (38470 Vinay, Francia) y fue obtenido de Rhône Poulenc Rohrer (Cooperation Pharmaceutique Francaise, 77000 Melun, Francia; Batch No. 101089007) con una actividad de 50 mg de quimosina activa por litro.

Ejemplo 1

Preparación de la Muestra de Leche

A menos que explícitamente se indique de otra forma, las etapas estándar para la preparación de fracciones de leche se realizaron como se describe en: C. Alais, *Science du Lait*,

Principe des Techniques Laitieres. SEPAIC, Paris, 4thed., 1984, p. 29-35 and 159-178.

Las etapas de fraccionamiento a escala de laboratorio fueron realizadas comenzando a partir de procesos lácteos industriales, convencionales. De manera sorprendente, la eficiencia de selectividad y de separación pudieron verse significativamente incrementadas, realizando las etapas de los procesos indicados más adelante, en particular realizando una centrifugación a altas tasas de aceleración y etapas de lavado adaptadas específicamente.

1.1 Leche de bovino

La leche de bovino se obtuvo del mercado local ("Toni lait", Suiza).

En una primera etapa, la crema fue extraída de la leche completa por medio de una centrifugación que tenía una tasa de aceleración de hasta 13.600 g utilizando un rotor de ángulo fijo Sorval GS3 (9.000 rpm, durante 30 minutos). Comenzando de un volumen de 2.200 ml de leche entera, se recuperaron 90 g de crema en la capa superior. Después de la separación de la capa superior, se obtuvo 2.090 ml de leche descremada.

La separación del suero dulce de la caseína se logra por medio del tratamiento enzimático de la leche descremada, induciendo la coagulación de la caseína. Se agregó 520 µl de una solución acuosa de CaCl₂ 200 mM (200 mmol/l) sobre 520 ml

de leche descremada para poder alcanzar una mezcla que tuviese una concentración final de 2 mM (mmol/l) de Ca^{+2} . La mezcla de leche descremada fue calentada a 35°C y luego se agregó inmediatamente 250 μl de cuajo bajo agitación magnética moderada. Después de 1 minuto la mezcla se incubó durante un período de 50 minutos a 35°C en un baño de agua, se vertió sobre botellas para centrifugación y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 13.600 g (rotor de ángulo fijo Sorval GS3; 9.000 rpm, 30 minutos) para poder separar el suero dulce de la caseína cuajada no soluble.

Los 476 ml de sobrenadante (es decir el "suero dulce") fue fraccionado en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Suero dulce), congelados por inmersión en nitrógeno líquido y almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína cuajada (45 g) fue suspendida en 286 ml de una solución acuosa de CaCl_2 , 2 mM (mmol/l), en donde dicha solución CaCl_2 fue complementada con NaCl al 0,9% en peso y luego fue centrifugada; el sobrenadante (246 ml) fue separado en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (lavado de caseína cuajada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 31 g recuperados, de caseína cuajada lavada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 , 2 mM (mmol/l), en donde dicha solución CaCl_2 esta complementada con NaCl al 0,9% en peso, de tal modo que se obtuvo un volumen de

250 ml. La mezcla luego fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína cuajada) y congelados.

La separación del suero ácido desde la caseína se obtiene por medio de la acidificación química de la leche descremada, induciendo así la coagulación de la caseína. Se agregó 520 µl de una solución acuosa de CaCl_2 200 mM (mmol/l) sobre 520 ml de leche descremada para poder obtener una mezcla que tenga una concentración final de Ca^{+2} de 2 mM (mmol/l). Esta mezcla fue acidificada a 25°C, agregando una solución acuosa de HCl (32%) bajando desde un pH 6,6 hasta un pH 4,6 en condiciones de agitación magnética moderada. Después de 1 minuto de agitación, la mezcla se incubó durante un período de 60 minutos a 25°C, se vertió en botellas para centrifugación y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 13.600 g (rotor de ángulo fijo Sorval GS3; 9.000 rpm, durante 30 min) para separar el suero ácido de la caseína ácida no soluble.

Los 503 ml de sobrenadante (es decir el suero ácido) fueron fraccionado en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Suero ácido), congelados por inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína ácida (41 g) fue suspendida en 233 ml de una solución acuosa de acetato de sodio 20 mM (mmol/l) que tiene un valor de pH de 4,6. La mezcla así obtenida fue centrifugada, y el sobrenadante (250 ml) fue separado, y posteriormente separado en alícuotas en envases, los cuales

fueron rotulados (Caseína ácida lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 28,6 g recuperados, de caseína ácida lavada fueron suspendidos en agua. El pH de esta mezcla fue ajustado desde 4,67 a 6,6 por medio de adición de NaOH. Posteriormente, el volumen fue ajustado a 250 ml, y la así mezcla obtenida fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína ácida) y congelados.

Para poder separar las proteínas solubles (suero) y las proteínas no solubles lavadas (caseína micelar), se realizaron las siguientes etapas:

Se agregó 250 μ l de una solución acuosa de CaCl_2 de 200 mM (mmol/l) sobre 250 ml de leche descremada para obtener una mezcla que tuviese una concentración final de Ca^{+2} de 2 mM (mmol/l). Esta leche fue ultracentrifugada (6 tubos que contenían 42,1 g de leche descremada en un rotor de ángulo fijo 45 TI que fueron centrifugados durante 1 hora en una ultracentrifuga Beckman L8-60M a una velocidad de 32.000 rpm que corresponden a 100.000 g en la mitad del tubo) para poder separar la proteína soluble del suero de la caseína micelar no soluble.

Los 228 ml del sobrenadante (es decir la proteína de suero soluble) fueron fraccionados en alícuotas de 10 X 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Proteína soluble del suero) y congelados por

inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína micelar (24 g) fue suspendida en 220 ml de una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando complementada dicha solución de CaCl_2 con NaCl al 0,9% en peso. La mezcla fue ultracentrifugada (en una ultracentrifuga Beckman L8-60M durante 1 hora a una velocidad de 32.000 rpm correspondiendo a 100.000 g en la mitad del tubo). El sobrenadante (229 ml) fue separado, y luego separado en alícuotas y envasadas, los cuales fueron rotulados (caseína micelar lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 22 gramos recuperados de caseína micelar lavada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando dicha solución CaCl_2 complementada con NaCl al 0,9% en peso, de modo que se obtuvo un volumen final de 250 ml. Esta mezcla fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína micelar) y congelados.

1.2 Leche mamaria de Humano

Leche de procedencia humana se obtuvo de madres saludables, las cuales estuvieron de acuerdo en donar sus muestras de leche mamaria en cantidades que no ponían en peligro el suministro nutricional del bebe (10-60 ml). Las muestras se obtuvieron por hasta 70 días después del parto por medio de sacado con bomba mamaria u ocasionalmente por sacado manual, y fueron procesadas dentro de 2 horas luego de la

recolección. Cuando no se indico explícitamente de otra forma, todas las etapas de los procedimientos fueron realizadas como se describieron en el 1.1, anteriores fueron aplicadas.

Se agregó 7,2 ml de una solución acuosa de CaCl_2 200 mM (mmol/l) sobre 715 ml de leche entera para poder obtener una mezcla de una concentración final de Ca^{+2} de 2 mM (mmol/l). Después de someter a una centrifugación, para la separación de la crema (como se describe en 1.1, antes), se recuperó 26,6 g de crema como la capa superior y fueron separados 713 g de leche descremada.

Se obtiene la separación de suero dulce/caseína por medio del tratamiento enzimático de la leche descremada induciendo la coagulación de la caseína. Se calentó la leche descremada (200 g) a 35°C, y luego se agregó inmediatamente 100 μl de cuajo bajo agitación magnética moderada. Luego de 1 minuto la mezcla fue incubada durante 50 minutos a 35°C en un baño de agua, luego fue vertida en botellas para centrifugación y posteriormente se centrifugo a 13.600 g durante 30 minutos (como se describe en 1.1) para poder separar el suero dulce de la caseína cuajada no soluble.

Los 199 ml de sobrenadante (es decir el suero dulce) fueron fraccionados en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron etiquetados (Suero dulce) y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido y luego estos almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína cuajada (2 g) fue dispersa en 98 ml de una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando dicha solución de CaCl_2 complementada con NaCl al 0,9% en peso. La mezcla resultante se centrifugó; el sobrenadante (99 ml) se separó y luego se separó en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína cuajada lavada) y congelado en nitrógeno líquido.

Los 1,15 g recuperados de la caseína cuajada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), en donde dicha solución de CaCl_2 esta complementada con NaCl al 0,9% en peso volumen, para poder obtener un volumen de 100 ml. La mezcla resultante luego fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína cuajada) y luego congelados.

La separación del suero ácido desde la caseína se obtiene por medio de la acidificación química de la leche descremada, induciendo así la coagulación de la caseína. Se acidifico 200 ml de leche descremada a 25°C agregando una solución acuosa de HCl (32%) ajustando desde un pH 6,6 hasta un pH 4,6 bajo agitación magnética moderada. Después de 1 minuto de agitación, la mezcla se incubó durante un período de 60 minutos a 25°C, se vertió en botellas para centrifugación y posteriormente se sometió a centrifugación a 13.600 g durante 30 minutos (como se describe en el Ejemplo 1.1) para poder separar el suero ácido desde la caseína ácida no soluble.

Los 195 ml de sobrenadante (es decir suero ácido) fueron fraccionados en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron etiquetados (Suero ácido) y congelados por inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína ácida (4,9 g) fue suspendida en 95 ml de solución acuosa de acetato de sodio 20 mM (mmol/l) que tiene un pH de 4,6, y la mezcla fue centrifugada. El sobrenadante (96 ml) fue fraccionado en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína ácida lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 2,9 gramos recuperados, de caseína ácida lavada fueron suspendidos en 95 ml de agua. El pH de esta mezcla se ajustó a 6,2 agregando NaOH. Posteriormente, el volumen se llevó a 100 ml. La mezcla luego fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína ácida) y congelados.

Para poder separar las proteínas solubles (suero) y las proteínas no solubles lavadas (caseína micelar), se realizó las siguientes etapas:

Se sometió a ultracentrifugación la leche descremada como se describió en 1.1.

Los 198 ml de sobrenadante se fraccionaron en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Proteína de suero soluble) y

congelados por inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína micelar (0,5 g) fue suspendida en 32 ml de una solución acuosa de CaCl_2 de 2 mM (mmol/l), en donde dicha solución de CaCl_2 esta complementada con NaCl al 0,9% en peso y ultra-centrifugada (como se describe bajo el Ejemplo 1.1). El sobrenadante así obtenido (32,8 ml) se separó en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína micelar lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 0,4 g recuperados, de caseína micelar lavada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando complementada dicha solución de CaCl_2 con NaCl al 0,9% en peso, para poder obtener un volumen de 33 ml. La mezcla resultante fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína micelar) y congelados.

1.3 Leche de Búfalo

Se obtuvo leche de búfalo fresca pura en la región Lahore de Pakistán y se suministró refrigerada hasta las cercanías del laboratorio en donde fue liofilizada. La temperatura de congelamiento fue de alrededor de menos 20°C hasta alrededor de menos 25°C y la temperatura del secado fue de 40°C. La presión de vacío se mantuvo por debajo de 2 Torr, con una presión final de 0,2 Torr. El polvo seco se selló en bolsas plásticas recubiertas con aluminio, se embarco y luego se almaceno a temperatura ambiente. Cuando no se indico

explícitamente de otra forma, todas las etapas del procedimiento se realizaron como se describió en el Ejemplo 1.1.

La leche de búfalo liofilizada fue reconstituida hasta un 13% de sólidos total (ST) disolviendo 70 g del polvo en 468 ml de H₂O, y agregando 5,4 ml de una solución acuosa de CaCl₂ 200 mM (200 mmol/l). Se obtuvo 543 ml de leche de búfalo reconstituida con una concentración final de Ca⁺² de 2 mM. Luego de la centrifugación para la separación de la crema como se indica bajo el Ejemplo 1.1, se recuperó 46 g de crema como una capa superior y fueron separados 485 ml de leche descremada.

La separación del suero dulce desde la caseína se obtuvo por medio del tratamiento enzimático de la leche descremada induciendo la coagulación de la caseína. Se calentó 145 ml de leche descremada a 35°C, luego se agregó 73 µl de cuajo inmediatamente bajo agitación magnética moderada. Luego de 1 minuto la mezcla se incubó durante un período de 50 minutos a 35°C en un baño de agua, se vertió en botellas para centrifugación y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 13.600 g (como se describe en el Ejemplo 1.1) para poder separar el suero dulce de la caseína cuajada no soluble.

Los 130 ml de sobrenadante (es decir "suero dulce") fueron fraccionados en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Suero dulce) y congelados por inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

72

La caseína cuajada (14 g) se suspendo en 140 ml de una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando complementada dicha solución CaCl_2 con NaCl al 0,9% en peso y centrifugada (tal como se indica en el Ejemplo 1.1). El sobrenadante así obtenido (130 ml) fue separado en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína cuajada lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 13 g recuperados, de caseína cuajada lavada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando complementada dicha solución de CaCl_2 con NaCl al 0,9% en peso, para poder obtener un volumen de 145 ml. La mezcla resultante luego fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (caseína cuajada) y congelados.

La separación suero ácido/caseína se obtuvo por acidificación química de leche descremada induciendo la coagulación de la caseína. Se acidifico 145 ml de leche descremada a 25°C agregando 0,6 ml de una solución acuosa de HCl (32%) ajustando desde un valor de pH de 6,74 hasta pH 4,6 bajo agitación magnética moderada. Luego de 1 minuto de agitación, la mezcla se incubó durante 60 minutos a 25°C, se vertió en botellas para centrifugación y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 13.600 g (como se describe en el Ejemplo 1.1) para poder separar el suero ácido de la caseína ácida no soluble.

Los 129 ml del sobrenadante fueron fraccionados en alícuotas de 10 x 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Suero ácido) y congelados por inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína ácida (13 g) fue suspendida en 130 ml de solución acuosa de acetato de sodio 20 mM (mmol/l) con un pH de 4,6, y la mezcla fue centrifugada (véase el Ejemplo 1.1). El sobrenadante (129 ml) fue fraccionado en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína ácida lavada) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 12 gramos recuperados, de caseína ácida lavada fueron suspendidos en agua y el pH fue ajustado a 6,7 agregando NaOH. Posteriormente, el volumen se ajustó a 145 ml. La mezcla luego fue separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (Caseína ácida) y congelados.

Para poder separar las proteínas solubles y las proteínas no solubles lavadas (caseína micelar), se realizó las siguientes etapas:

Se sometió a ultracentrifugación 145 ml de leche de búfalo descremada (como se describe en el Ejemplo 1.1) para separar el suero de la caseína micelar no soluble. Los 132 ml del sobrenadante se fraccionaron en alícuotas de 10 X 1,3 ml (Eppendorf) y en tubos plásticos de 40 ml, los cuales fueron rotulados (Proteína de suero soluble) y congelados por

A

inmersión en nitrógeno líquido y luego almacenados en bolsas plásticas a menos 20°C.

La caseína micelar gelatinosa (11,4 g) fue suspendida en 133 ml de una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando dicha solución CaCl_2 complementada con NaCl al 0,9% en peso. La mezcla fue ultracentrifugada (véase 1.1, más atrás). El sobrenadante así obtenido (125 ml) se separó en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (*caseína micelar lavada*) y congelados en nitrógeno líquido.

Los 11 gramos recuperados, de caseína micelar lavada fueron suspendidos en una solución acuosa de CaCl_2 2 mM (mmol/l), estando complementada dicha solución de CaCl_2 con NaCl al 0,9% en peso, para poder obtener un volumen de 145 ml. La mezcla resultante fue luego separada en alícuotas en envases, los cuales fueron rotulados (*caseína micelar*) y luego congelados.

Ejemplo 2

Sub-fraccionamiento de la Proteína de Suero Soluble a Partir de Leche de Bovino

15 ml de proteína de suero soluble como se describe en el Ejemplo 1 se descongelo durante 20 minutos en un baño de agua a 37°C, se mezcló por medio de agitación en Vortex y se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm en una centrifuga de Eppendorf 5415. Luego de filtrar sobre un filtro Millipore 0,45 μm (306/GSWP04700.GS), se inyectó 10 ml de esta preparación en

una columna HR16x50 rellena con 100 ml de Source 15 RPC TN 17-0727-02 (poliestireno-divinilbenceno), la cual fue conectada a un sistema FPLC controlada por una estación UNICORN (Amersham Pharmacia Biotech).

Las condiciones cromatográficas fueron:

Tampón A: TFA 0,1% en agua (2.000 ml de agua miliQ filtrada sobre un sistema Millipore de 0,45 μ m, más 2 ml de TFA (Sigma 91699, 100 ml));

Tampón B: acetonitrilo al 80%, TFA al 0,85% (400 ml de agua filtrada miliQ en un sistema de Millipore de 0,45 μ m, más 1.600 ml de acetonitrilo, desgasificado en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, y finalmente complementado con 1,7 ml de TFA).

La columna se equilibró con tampón B al 20%. Luego después de pasar un volumen de columna (CV), se inyectó la muestra, el tampón B se incrementó al 75% en 15 CV y al 100% en 2,5 CV. Hacia el final, la gradiente disminuyó al 20% de tampón B en 0,4 CV. La velocidad de flujo se fijó a 3 ml/minuto.

Se recolectó 96 fracciones de 18 ml en tubos plásticos. Se mantuvo las fracciones a menos 20°C. Después del análisis HIC-HPLC, los 96 tubos recolectados fueron combinados en 14 fracciones por similitud del perfil HPLC y se concentró por evaporación después de la liofilización para el posterior monitoreo.

La Tabla 1 muestra 14 sub-fracciones de proteína de suero por un rango volumen porcentaje de tampón B, o un rango en acetonitrilo, dentro de los cuales las sub-fracciones son eluidas.

TABLA 1

Sub-fracciones de proteína de suero soluble definidas por cromatografía de interacción hidrofóbica

Fracción	% de Tampón B al inicio	% de Tampón B al final	% de acetonitrilo al inicio	% de acetonitrilo al final
1	20	26	16	20,8
2	26	35	20,8	28
3	35	43	28	34,4
4	43	44,5	34,4	35,6
5	44,5	47	35,6	37,6
6	47	48,5	37,6	38,8
7	48,5	50	38,8	40
8	50	51,5	40	41,2
9	51,5	52,5	41,2	42
10	52,5	54	42	43,2
11	54	58	43,2	46,4
12	58	60	46,4	48
13	60	70	48	56
14	70	100	56	80

Tampón A: Agua TFA 0,1% Tampón B: Acetonitrilo/Agua/TFA (80%/19,15%/0,85%; v/v)

Columna: Source 15 RPC Amersham (matriz: Poliestireno/divinilbenceno), volumen de columna (CV= 100 ml)

Gradiente: comenzando del Tampón B al 20%, se inyectó la muestra después de 1 volumen de columna (CV), luego

se incrementó la gradiente hasta un 75% de B en 15 CV
luego 2 CV para alcanzar el 100% de Tampón B

Ejemplo 3

Monitoreo COX-2

2.1 Material y Método

Se sembró células HUV-EC-C (una línea celular endotelial permanente derivada de la vena de cordón umbilical humano normal; ATCC CRL1730; M. Miralpeix, M. Camacho et al., Brit. J. Pharmacol. 121 (1997), 171-180), en placas de 96 pocillos (RPMI 1640 + Suero Bovino Fetal al 10%) y las células fueron tratadas con 100 nM (nmol/l) de 12-miristato 13-acetato de forbol por un período de 6 horas a 37°C para inducir a la isoenzima COX-2. Luego se agregó 50 μ M (μ mol/l) de ácido araquidónico y las células se incubaron en presencia de los compuestos de ensayo o de las mezclas de ellos por un período de 20 minutos a 37°C. Se midió la producción de prostaglandina-E₂ por medio de radioinmuno ensayo (RIA) y se determinó la radioactividad con un contador de centelleo (Topcount, Packard) utilizando un cóctel de líquido de centelleo (Packard).

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de los valores control y como un porcentaje de la inhibición de los valores control obtenido en presencia de los compuestos de ensayo. Los valores control corresponden a la actividad COX-2 de las células HUV-EC-C después de la estimulación con miristato acetato de forbol (PMA) durante un

período de 6 horas a 37°C (incluso puede ser realizado con Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa: TNF) en ausencia del compuesto de ensayo.

La concentración que provoca la inhibición correspondiente a la mitad-máxima de los valores control (valor IC_{50}) y los coeficientes de Hill (nH) fueron determinados para los compuestos de la referencia (cicloheximida) por medio de análisis de regresión no lineal de sus curvas de inhibición. Estos parámetros fueron obtenidos a través del ajuste de ecuación de curva de Hill. Los valores de IC_{50} obtenidos para los compuestos de referencia se encontraron dentro de límites aceptables de los promedios históricos obtenidos $\pm 0,5$ unidades log.

Todos los experimentos de monitoreo de COX-2 fueron realizados una vez. En lo que sigue, los valores de inhibición que están por debajo del 10% no fueron considerados y han sido indicados como "0".

2.2 Monitoreo COX-2 de Fracción de Leche Humana

La leche humana descremada exhibe una importante inhibición de la COX-2 (25%; Tabla 2). Cuando se retira la caseína por acidificación o cuajo (entregando suero ácido y suero dulce, respectivamente), fueron obtenidos los valores del 51% y 58% de la inhibición de COX-2. Por lo cual, retirando la caseína se mejora de manera importante la inhibición de COX-2.

Además, las caseínas solas (ácida, dulce, micelar) no presentan ningún efecto inhibitor sobre COX-2.

Suero soluble de leche humana realizado justo como producto de partida (es decir, leche humana descremada).

TABLA 2

Resultados de Monitoreo COX-2 con Fracciones de Leche Humana. TS, Sólidos Totales

Leche Humana Descremada	Código	TS (mg/ml)	dilución para 50 µg/ml	proteína estimada (mg/ml)	inhibición de COX-2 en (%)
Leche humana descremada	H2	100	5,00E-04	10	25
suero ácido de leche humana	H3	80	6,25E-04	6	51
suero dulce de leche humana	H4	80	6,25E-04	6	58
suero soluble de leche humana	H5	80	6,25E-04	6	26
caseína ácida de leche humana	H6	10	5,00E-03	10	0
caseína dulce de leche humana	H7	10	5,00E-03	10	0
caseína micelar de leche humana	H8	5	1,00E-02	5	0

2.3 Monitoreo COX-2 de Leche de Búfalo

La leche de búfalo descremada presenta un efecto inhibitor mediano (36%; Tabla 3). En contraste con la leche humana, la remoción del ácido de las caseínas conduce a una

pérdida de dos tercio de su actividad (cayendo hasta un 12%), probablemente debido a una pérdida de la actividad inducida por ácido, después de la acidificación. Si el pH se mantiene constante (es decir en caso del tratamiento con cuajo y de la ultra-centrifugación), que incrementa la actividad hasta un 44% en ambos casos.

Como con la leche humana, las caseínas de leche de búfalo micelar no mostraron ninguna actividad. Las caseínas ácidas y dulces no se probaron debido a su falta de solubilidad.

TABLA 3

Resultados del monitoreo de COX-2 con Leche de Búfalo. TS, Sólidos Totales.

Leche de Búfalo (BM)	Código	TS (mg/ml)	dilución para 50 µg/ml	proteína estimada en la muestra (mg/ml)	inhibición de COX-2 (%)
Leche de búfalo descremada (BM)	B2	100	5,00E-04	30	36
suero ácido BM	B3	70	7,14E-04	6	12
suero dulce BM	B4	70	7,14E-04	6	44
suero soluble BM	B5	70	7,14E-04	6	44
caseína ácida BM	no soluble				
caseína dulce BM	no soluble				
caseína micelar BM	B8	25	2,00E-03	25	0

2.4 Monitoreo de COX-2 por efecto de Leche de Vaca

Las altas actividades de la leche de vaca natural y descremada (52-53%; Tabla 4) demuestran que la eliminación de la crema no tiene ningún efecto sobre la inhibición de COX-2. La actividad se mantiene constante en el suero soluble (53%), disminuye levemente en el suero ácido (45%) y aumenta en el suero dulce (68%). Sin desear esta unido a ninguna teoría, la disminución de la actividad en el suero ácido puede, tal como en la leche de búfalo, estar relacionada con la influencia del ácido, mientras que el incremento de la actividad frente al tratamiento con cuajo puede ser explicado por la teoría que habla de la desestabilización de la caseína lo cual libera alguna bioactividad "latente", tal como se describe algunas veces durante "el fallo de fraccionamiento", conduciendo a un rendimiento superior que el 100%.

TABLA 4

Resultados del monitoreo de COX-2 con Leche de Bovino. TS, Sólidos Totales.

Leche de Vaca (CM)	Código	TS (mg/ml)	dilución para 50 µg/ml	proteína (mg/ml) estimada en la muestra	inhibición de COX-2 (%)
leche de vaca CM	C1	100	5,00E-04	31	53
Descremada CM	C2	100	5,00E-04	35	52
suero ácido CM	C3	70	7,14E-04	6	45
suero dulce CM	C4	70	7,14E-04	6	68
suero soluble	C5	70	7,14E-04	6	53

CM					
caseína ácida CM	C6	50	1,00E-03	50	42
caseína dulce CM	C7	50	1,00E-03	50	65
caseína micelar CM	C8	25	2,00E-03	25	0

2.5 Monitoreo COX-2 de las Preparaciones de la Proteína de Suero

Dos preparaciones de proteína de suero disponibles también fueron sometidas al monitoreo COX-2:

- Lacprodan 80 (MD foods Ingredients, Viby, Denmark) la cual contiene altas cantidades de las formas lactosil β -lactoglobulina;
- WPI 95, un aislado de proteína de suero natural la cual esta virtualmente depletada en lactosil β -lactoglobulina (verificada por espectrometría de masa). WPI se encuentra disponible de: Davisco Foods International. Inc. 620 North Main, Le Sueur, MN 56058 USA, BIPRO batch JE 251-0-420.

TABLA 5

Resultados del Monitoreo COX-2 con Preparaciones de Proteína de Suero. TS, Sólidos Totales.

Preparación del suero	Código de Proteína	TS (mg/ml)	dilución para 50 μ g/ml	proteína (mg/ml) estimada en la muestra	inhibición de COX-2 (%)
Lacprodan 80	LN	100	5,00E-04	80	23

Suero Natural WPI	NW	100	5,00E-04	95	33
cisteína	CY	10	5,00E-03	10	0
hidrolizado tríptico de Suero DM 10	DH	100	5,00E-04	80	0

Como se puede deducir de la Tabla 4, también estos compuestos presentan una considerable actividad de inhibición de COX-2 de 23% y 33%, respectivamente. En contraste de esto, una proteólisis por efecto de tripsina destruye la actividad inhibidora de COX-2 de una proteína de suero. También el "aminoácido antioxidante" natural cisteína no tuvo efecto sobre la inhibición COX-2.

2.5 Monitoreo de COX-2 de Leche de Bovino Oxidada.

Las muestras de leche de bovino fresca (50 ml) han sido complementadas con perhidrol (30% de H₂O₂) para poder obtener una concentración final de 0,1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM (mmol/l) de H₂O₂ en la mezcla resultante. Todas las muestras se incubaron durante 4 horas a 30°C.

TABLA 6

Resultados del Monitoreo COX-2 con Leche de Bovino Oxidada. TS, Sólidos Totales.

Oxidación de Proteína	Código	TS (mg/ml)	dilución para 50 µg/ml	proteína (mg/ml) estimada en la muestra	inhibición de COX-2 (%)
Leche Bovina fresca	L1	100	5,00E-04	3,1	41
Leche Bovina fresca	L2	100	5,00E-04	3,1	41

H ₂ O ₂ 0,1					
Leche Bovina fresca H ₂ O ₂ 1	L3	100	5,00E-04	3,1	35
Leche Bovina fresca H ₂ O ₂ 10	L4	100	5,00E-04	3,1	27
Leche Bovina fresca H ₂ O ₂ 100 mM	L5	100	5,00E-04	3,1	0

La leche de bovino no tratada y la leche tratada con 0,1 mM de H₂O₂ presentan el mismo efecto "mediano" sobre la inhibición de COX-2 (41%). A la concentración de H₂O₂ de 1mM, la inhibición disminuye levemente (al 35%), además el incremento hasta una concentración de 10mM reduce la inhibición de COX-2 al 27%, y finalmente a una concentración de 100 mM de H₂O₂ la cual, no obstante, está lejos de las condiciones fisiológicas, no permite observar ninguna actividad inhibitoria.

Los resultados indican que el componente activo, es decir el componente supresor de COX-2 en la leche de bovino resiste al H₂O₂ a un nivel de 0,1-10 mM. La disminución del efecto inhibidor corresponde a la disminución de la oxidación de proteína, la cual indica que la actividad inhibidora de COX-2 está basada en proteínas y que esta fuertemente relacionada con el estado natural de la proteína.

2.6 Monitoreo COX-2 de las Sub-fracciones de las Proteínas de Suero Soluble.

Los resultados de la inhibición de COX-2 por efecto de las sub-fracciones de proteína de suero soluble están indicados en la Tabla 7. Los valores positivos indican un mejor comportamiento cuando es comparado contra el control.

TABLA 7

Resultados de la Inhibición de COX II

Fracción HIC	Porcentaje de Inhibición de los Valores Control
1	21
2	-3
3	-7
4	7
5	-17
6	-21
7	-55
8	10
9	36
10	41
11	12
12	12
13	10
14	52

REIVINDICACIONES

1. Una composición nutricional y/o farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2, CARACTERIZADA porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche, en donde dichas una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche proveen una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2.

2. La composición nutricional y/o farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche son seleccionadas del grupo que consiste de fracciones de suero, fracción de leche descremada, preparación de proteína de suero lactosilada, preparación de proteína nativa aislada de suero de leche humana, leche de

bovino, leche de búfalo, fracción de caseína ácida y/o fracción de caseína dulce de leche de bovino, y/o combinaciones de lo mismo, o las subfracciones 1 y 8-17 de la tabla 7.

3. La composición nutricional y/o farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque las fracciones de suero son seleccionadas del grupo que consiste de suero ácido, suero dulce y suero soluble.

4. La composición nutricional y/o farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, CARACTERIZADA porque la biodisponibilidad y/o la estabilidad a la biodegradación de dicha una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche está aumentada por medio de la protección de uno o más grupos funcionales en uno o más componentes contenidos en ella.

5. La composición nutricional de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, CARACTERIZADA porque comprende un material alimenticio seleccionado de leche, yogurt, requesón, queso, leches fermentadas, productos fermentados en base a leche, helados de crema, productos en base a cereal, polvos en base a leche, formulas infantiles o alimento para mascota.

6. La composición nutricional y/o farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, CARACTERIZADA porque está en una forma de dosis oral, tópica, parenteral, o rectal.

7. Uso de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que exhiben una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2, CARACTERIZADO porque sirve para la preparación de una composición nutricional y/o farmacéutica útil para tratar y/o prevenir enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2.

8. El uso de acuerdo a la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque las fracciones de proteína de leche y/o las preparaciones de proteína de leche que exhiben una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2 son seleccionadas del grupo que consiste de fracciones de suero, fracción de leche descremada, preparación de proteína de suero lactosilada, preparación de proteína nativa aislada de suero de leche humana, leche de bovino, leche de búfalo, fracción de caseína ácida y/o fracción de caseína dulce de leche de bovino, y/o combinaciones de lo mismo.

9. El uso de acuerdo a la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque la composición nutricional y/o farmacéutica es provista en una forma de dosis oral, tópica, parenteral, o rectal.

10. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 7 a 9, CARACTERIZADO porque las enfermedades mediadas por la ciclooxigenasa 2 son seleccionadas del grupo que consiste de cáncer y/o estados pre-cancerosos, en particular cáncer y/o estados pre-cancerosos de colon, estómago, esófago, hígado, vesícula biliar, páncreas, cabeza y cuello, pulmón, mamas, vejiga, órganos genitales femeninos y piel, y/o enfermedades inflamatorias, en particular artritis, fiebre reumática, síntomas asociados con influenza u otras infecciones virales, dismenorrea, dolor de cabeza, dolor dental, enfermedades degenerativas de las articulaciones, y/o enfermedad de Alzheimer.

11. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, CARACTERIZADO porque la composición farmacéutica y/o nutricional provee un co-tratamiento durante un tratamiento de cáncer y/o un tratamiento de un estado pre-

canceroso, en particular durante una quimioterapia, una terapia de radiación, una bioterapia, y/o durante un tratamiento de dolor, y/o durante un tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o durante el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

12. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, CARACTERIZADO porque la composición nutricional comprende un material alimenticio seleccionado de leche, yogurt, requesón, queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, helados de crema, productos en base a cereal, polvos en base a leche, formulas infantiles.

13. Un proceso para incrementar la actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2 de un producto, CARACTERIZADO porque dicho método comprende incrementar la cantidad de una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche que proveen una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2 en dicho producto.

14. El proceso de acuerdo a la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque la una o más fracciones de proteína de leche y/o una o más preparaciones de proteína de leche son

seleccionadas del grupo que consiste de fracciones de suero, fracción de leche descremada, preparación de proteína de suero lactosilada, preparación de proteína nativa aislada de suero de leche humana, leche de bovino, leche de búfalo, fracción de caseína ácida y/o fracción de caseína dulce de leche de bovino, y/o combinaciones de lo mismo.

15. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, CARACTERIZADO porque dicho producto es una composición de alimento nutricional y/o farmacéutico y/o funcional.

16. Un procedimiento para aislar fracciones de proteína de leche que proveen una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2, CARACTERIZADO porque dicho procedimiento comprende las etapas de:

- centrifugar la leche a 13.600 g durante 30 minutos para obtener una capa de crema y una capa de leche descremada;
- separar dicha capa de crema y aislar dicha leche descremada;
- agregar una solución acuosa de CaCl_2 a la leche descremada en una cantidad tal que se obtenga una concentración final de Ca^{2+} igual a 2 mmol/l;

- calentar dicha mezcla a 35°C y agregar, a dicha mezcla, cuajo que tenga una actividad de 50 mg de quimosina activa por litro;
 - centrifugar la mezcla a 13.600 g durante 30 minutos para lograr una separación de fase; y
 - aislar la fase de proteína de suero dulce;
- o
- calentar dicha mezcla a 25°C y acidificar dicha mezcla hasta un pH de 4,6 con una solución acuosa de HCl (32%); para obtener la fase de proteína de suero ácido.

17. Un procedimiento para aislar fracciones de proteína de leche que proveen una actividad inhibidora de ciclooxygenasa 2, CARACTERIZADO porque dicho procedimiento comprende las etapas de:

- centrifugar la leche a 13.600 g durante 30 minutos para obtener una capa de crema y una capa de leche descremada;
- separar dicha capa de crema;
- aislar dicha leche descremada;
- agregar una solución acuosa de CaCl_2 a la leche descremada en una cantidad tal que se obtenga una concentración final de Ca^{2+} igual a 2 mmol/l;
- centrifugar durante 1 hora a 100.000 g para separar la fase de proteína de suero soluble de la fase de caseína micelar no soluble; y

- aislar la fase de proteína de suero soluble.

18. Fracción de leche que provee una actividad inhibidora de ciclooxigenasa 2, CARACTERIZADA porque dicha fracción de leche es obtenible según un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 16 o 17.

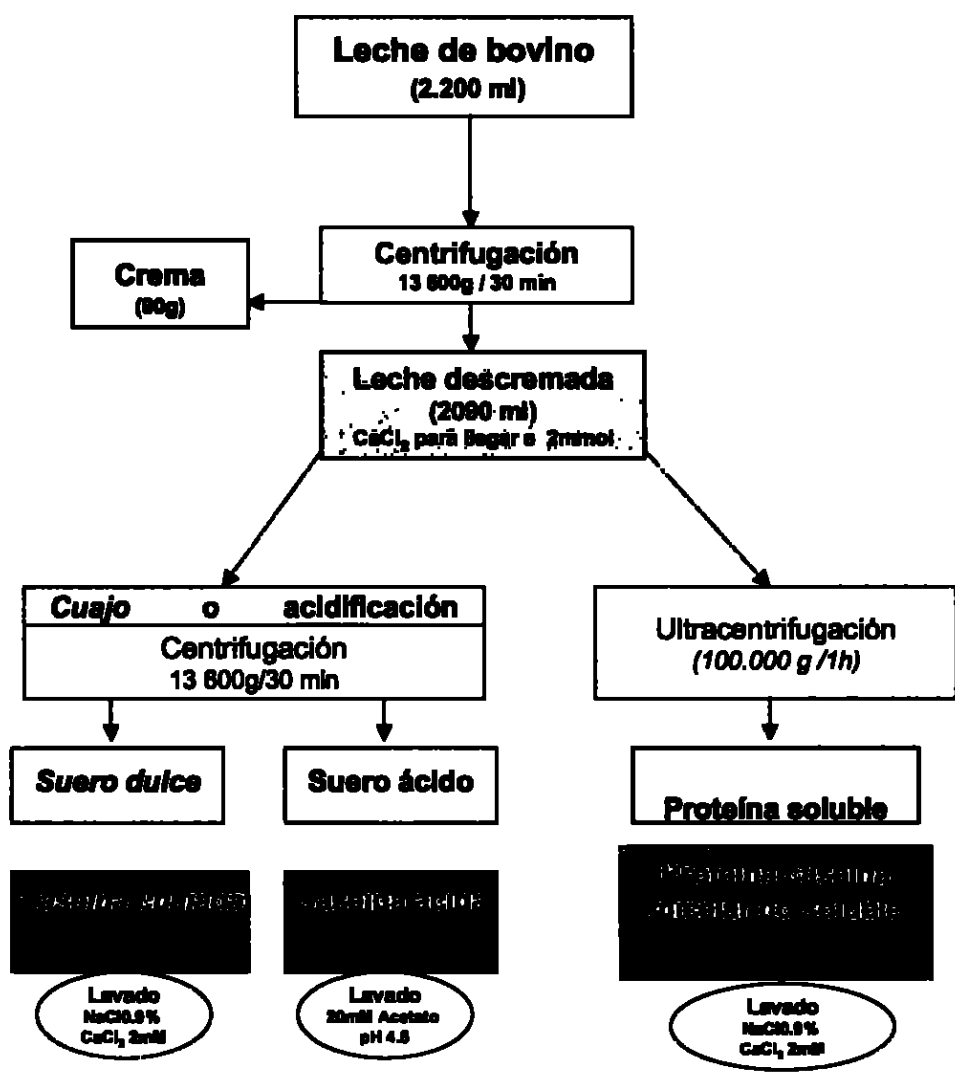


Figura 1

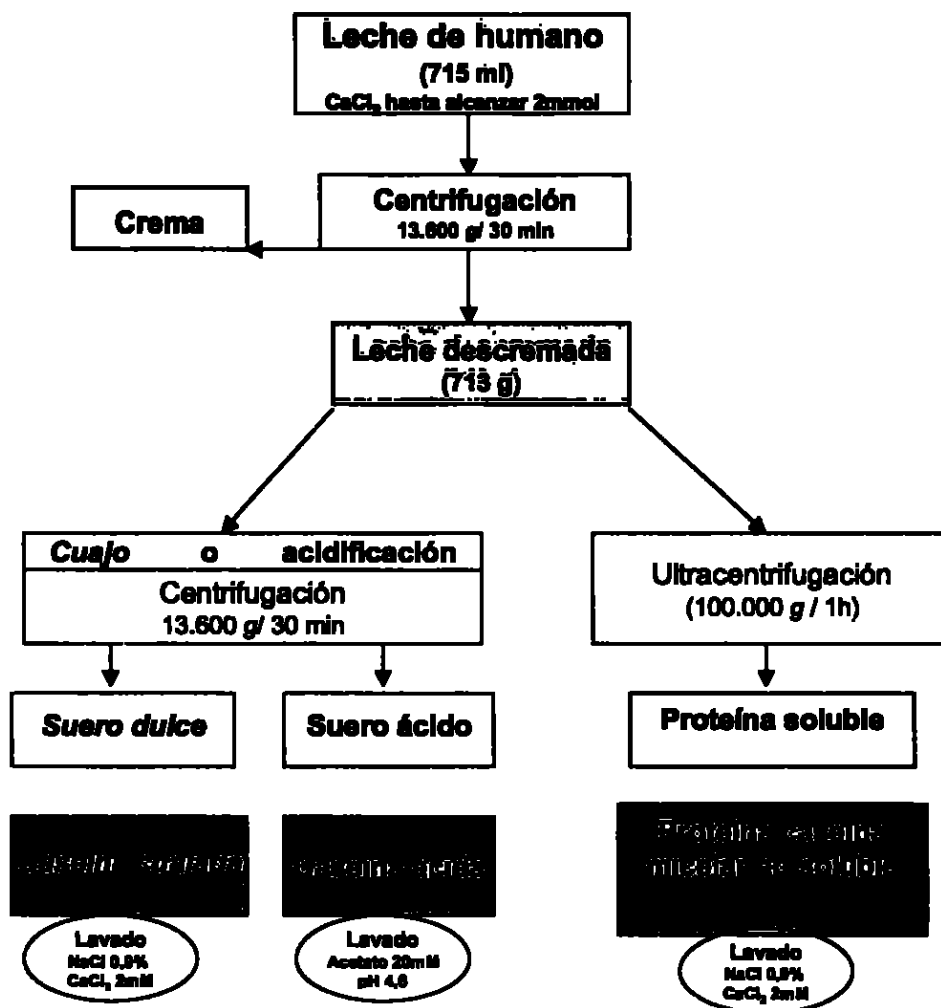


Figura 2

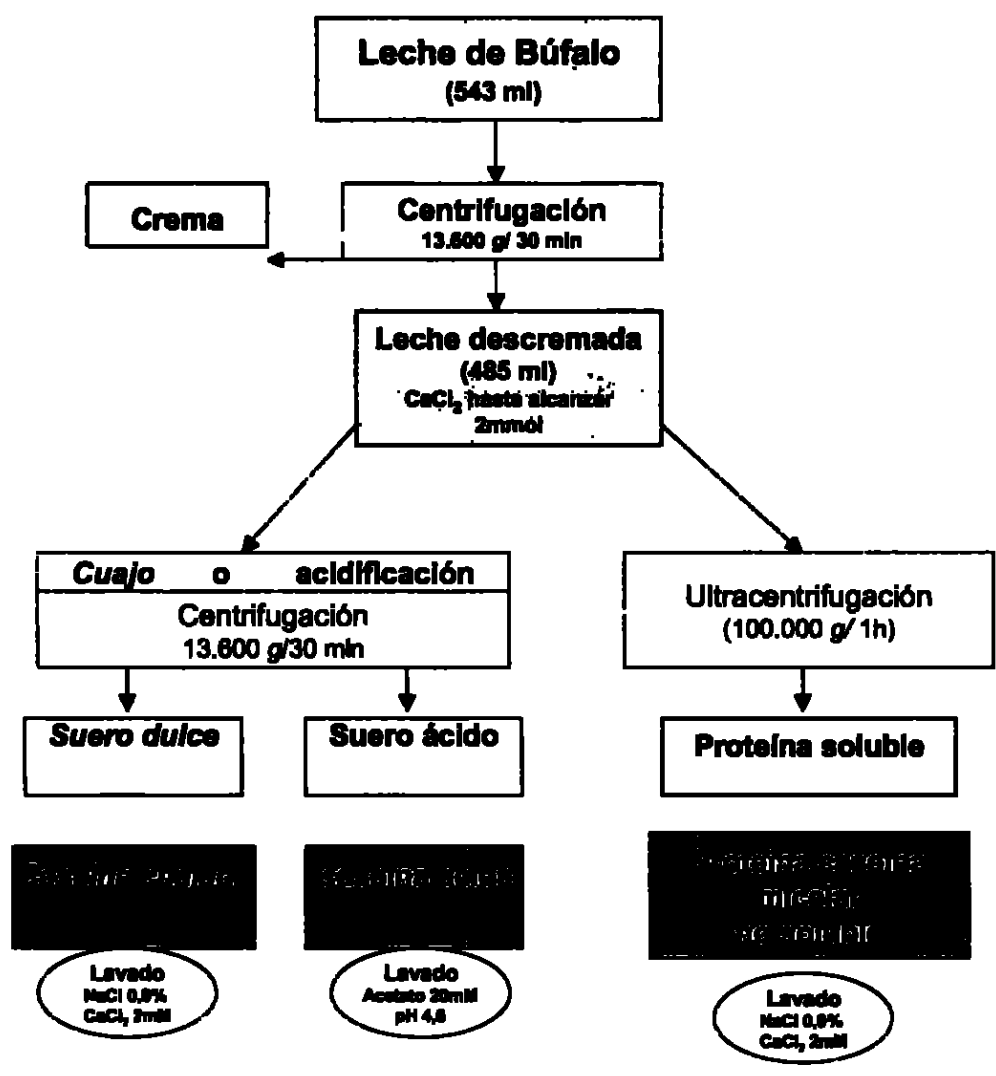


Figura 3

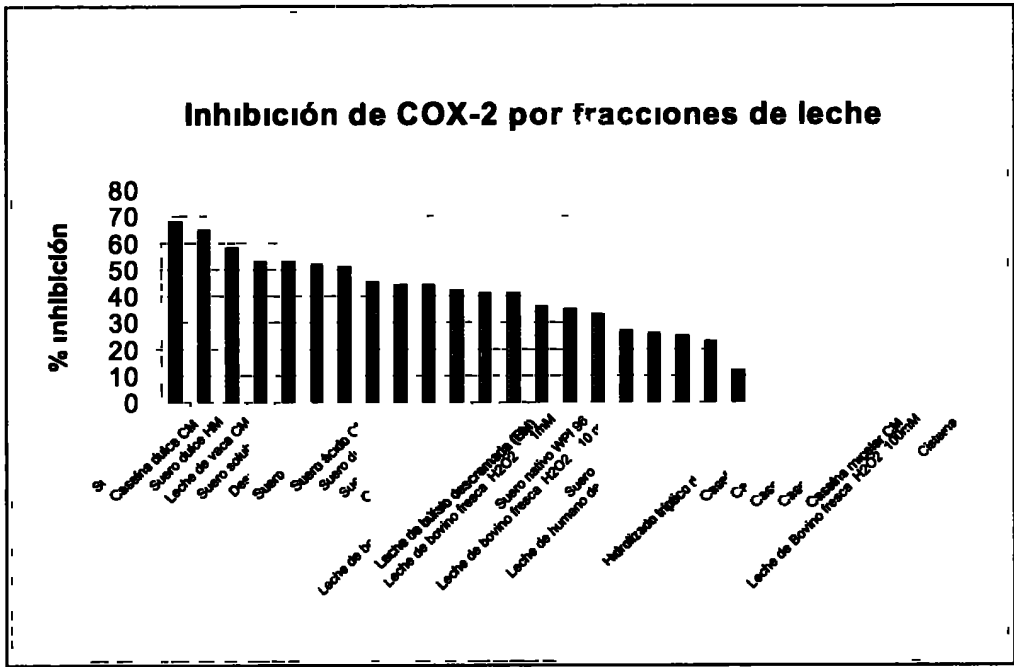


Figura 4

88



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 29
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 85
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

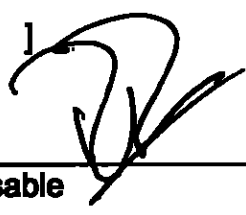
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha _____

Camara 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

90
87

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
NESTEC S.A.

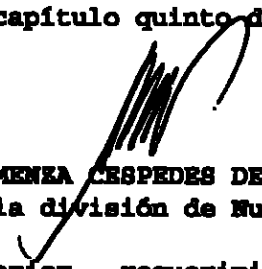
REFERENCIA	Radicación No.	6 18273
	Solicitud internacional	EP2004/010200
	Fecha inicio fase nacional	12/04/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	4316

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 21 ABR. 2006
jramos