



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104321336 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201380025974.9	C07K 7/06 (2006.01)
(22) 申请日 2013.03.08	C07K 14/47 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61K 38/07 (2006.01)
申请公布号 CN 104321336 A	A61K 38/08 (2019.01)
(43) 申请公布日 2015.01.28	A61K 38/17 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61P 15/14 (2006.01)
61/612,410 2012.03.19 US	A61P 31/04 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61P 29/00 (2006.01)
2014.11.18	(56) 对比文件
(86) PCT国际申请的申请数据	CN 101247721 A,2008.08.20
PCT/IL2013/050214 2013.03.08	Boisnard M et al.Alpha-s2-casein
(87) PCT国际申请的公布数据	precursor-sheep,GenBank Acc#KASH2.
W02013/140388 EN 2013.09.26	《GenBank》.1999,全文.
(73) 专利权人 米勒尤迪斯公司	Boisnard M et al.Alpha-s2-casein
地址 以色列甘亚夫内	precursor-sheep,GenBank Acc#KASH2.
(72) 发明人 乔斯·马里奥·伊斯柯维奇	《GenBank》.1999,全文.
贾维尔·伊斯柯维奇	Bouniol C et al.Alpha-s2-casein
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理	precursor-goat,GenBank Acc#JN0547.
有限公司 11262	《GenBank》.1999,全文.
代理人 郑霞	Bouniol C et al.Alpha-s2-casein
(51) Int.Cl.	precursor-goat,GenBank Acc#JN0547.
C07K 5/10 (2006.01)	《GenBank》.1999,全文.
	审查员 李影
	权利要求书2页 说明书15页
	序列表7页

(54) 发明名称  
管理哺乳的肽

(57) 摘要  
本发明提供新的高效诱导哺乳期哺乳动物乳腺退化和停止乳腺产生乳汁的短肽。本发明还提供了包含该肽的药物组合物,以及使用它的方法,包括用于治疗乳腺微生物感染的方法。

1. 一种合成或重组的肽, 包含式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列, 其中 $X_1$ 是带正电荷的氨基酸, 而 $X_2$ 不存在, 其中每次出现时 $n=0, 1$ 或 $2$ , 并且其中所述SEQ ID NO:1的式还包括在C-末端的封闭基团, 其中所述合成或重组的肽是通过肽键一个接一个连接的4-30个氨基酸残基的线性系列, 并且其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12组成。

2. 根据权利要求1所述的合成或重组的肽, 其中所述封闭基团选自酰胺和酯。

3. 根据权利要求2所述的合成或重组的肽, 其中所述封闭基团是酰胺。

4. 根据权利要求1所述的合成或重组的肽, 其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:2组成。

5. 根据权利要求2所述的合成或重组的肽, 其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:12组成。

6. 一种药物组合物, 包含治疗有效量的包含式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽, 其中 $X_1$ 是带正电荷的氨基酸, 而 $X_2$ 不存在, 且其中每次出现时 $n=0, 1$ 或 $2$ , 并且其中所述SEQ ID NO:1的式还包括在C-末端的封闭基团, 其中所述合成或重组的肽是通过肽键一个接一个连接的4-40个氨基酸残基的线性系列, 并且其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12组成; 和

药学上可接受的稀释剂或载体。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其中所述封闭基团选自酰胺和酯。

8. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其中所述药物组合物包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的肽。

9. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其中所述药物组合物包含由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的肽。

10. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其中所述药物组合物被配制用于以选自凝胶、软膏、霜、乳液和透皮贴剂组成的组的形式局部施用。

11. 根据权利要求6所述的药物组合物, 其中所述药物组合物被配制用于胃肠外施用。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物, 其中所述药物组合物被配制用于乳腺内施用。

13. 一种用于诱导哺乳期哺乳动物暂时停止产奶、持久停止产奶或乳腺退化的药物组合物, 所述药物组合物包含有效量的包含式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽, 其中 $X_1$ 是带正电荷的氨基酸, 而 $X_2$ 不存在, 且其中在每次出现时 $n=0, 1$ 或 $2$ , 并且其中所述SEQ ID NO:1的式还包括在C-末端的封闭基团, 其中所述合成或重组的肽是通过肽键一个接一个连接的4-40个氨基酸残基的线性系列, 并且其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12组成。

14. 一种用于预防、治疗和扭转微生物感染的药物组合物, 所述药物组合物包含有效量的包含式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽, 其中 $X_1$ 是带正电荷的氨基酸, 而 $X_2$ 不存在, 且其中在每次出现时 $n=0, 1$ 或 $2$ , 并且其中所述SEQ ID NO:1的式还包括在C-末端的封闭基团, 其中所述合成或重组的肽是通过肽键一个接一个连接的4-40个氨基酸残基的线性系列, 并且其中所述合成或重组的肽由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12组成。

15. 根据权利要求13或14所述的药物组合物, 其中所述封闭基团选自酰胺和酯。

16. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述微生物感染在哺乳期哺乳动物中。
17. 根据权利要求13或16所述的药物组合物,其中所述哺乳期哺乳动物选自哺乳期家畜动物和哺乳期人类。
18. 根据权利要求13或16所述的药物组合物,其中所述药物组合物在乳腺泌乳时施用。
19. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述药物组合物在挤奶或哺乳停止的同时施用。
20. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述药物组合物以选自以下组成的组的间隔被施用1至6次:6小时,8小时,12小时,16小时,20小时,24小时,48小时或72小时。
21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述药物组合物施用1次。
22. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述药物组合物施用至所述哺乳期动物的至少一个乳腺。
23. 根据权利要求22所述的药物组合物,其中所述药物组合物被施用至所述乳腺的乳头管。
24. 根据权利要求13或14所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含选自由以下组成的组的抗微生物剂:抗生素、杀菌剂、甾体类和非甾体类抗炎药,或免疫调节剂和疫苗。

## 管理哺乳的肽

### 发明领域

[0001] 本发明涉及乳腺哺乳 (lactation) 领域。特别地, 本发明提供用于有效而快速中断哺乳和用于治疗乳腺炎的新肽。

### [0002] 发明背景

[0003] 停止乳汁移除导致乳腺分泌变化并开始活性乳腺退化 (active mammary involution) 过程。这个过程在哺乳和非哺乳状态转换期间发生, 包括广泛的和高度有序的组织 and 乳汁成分变化。乳腺退化的起始阶段由启动凋亡的局部刺激引起, 但退化可以通过重启乳汁移除被逆转 (Capuco和Akers, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:137-144; Wilde等人, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:129-136)。这种局部控制在单个乳腺的乳汁淤积时可以引起退化, 正如在单侧停止挤奶 (milking) 后的哺乳期山羊中所观察到的 (Quarrie等人, 1994. Biochem. Soc. Trans. 22:178S) 或在奶头封闭后的哺乳期小鼠中观察到的 (Li等人, 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:3425-3430; Marti等人, 1997. Eur. J. Cell. Biol. 73:158-165)。

[0004] 进一步的退化阶段是持久的, 并且乳汁移除不能恢复乳汁分泌 (Capuco和Akers, 1999. 如上; Wilde等人, 1999. 如上)。逆转持久退化状态仅可能在生育后的后续哺乳阶段发生。这个分娩后阶段的特征是激活通过降解细胞外基质和基底膜破坏乳腺小叶-泡结构的蛋白酶, 并大量损失泡细胞。

[0005] 在现代乳品加工业, 存栏的哺乳期动物经历受控制的挤奶和怀孕周期, 因为这种制度有助于显著提高乳汁产量。在现代乳畜群例如牛和羊管理中, 哺乳期和怀孕之间存在明显重叠, 其中通过停止挤奶将“干乳期 (dry period)”加在分娩前35至75天之间。建立这一制度是诱导后续健康哺乳期所必需的退化 (involution) 过程的需要与全年高乳汁产量要求的妥协。

[0006] 母乳喂养, 或哺乳, 已被确定为喂养和培育婴儿的理想方法, 被认为是实现最佳婴儿和儿童的健康、生长和发育的主要因素。流行病学研究表明, 人类乳汁和母乳喂养婴儿显著降低了大量慢性疾病的风险或严重性, 并也有多项研究表明对哺乳母亲的潜在健康益处。

[0007] 鉴于这些健康益处以及社会和经济优势, 美国儿科学会和世界卫生组织 (World Health Organization. (2003) Global strategy for infant and young child feeding. Geneva, Switzerland: World Health Organization and UNICEF. ISBN0.9241562218) 已签发政策声明, 推荐前六个月专门母乳喂养, 然后逐渐引入固体食物并继续母乳喂养至少另外6个月, 之后只要双方需要, 越长越好。在正常的母乳喂养过程中, 婴儿断奶是从母乳喂养转移到另一个食物来源, 如固体食物, 配方奶或果汁的一个渐进过程。由于婴儿的饮食包含其它食物来源, 母亲可以继续哺乳但缩短每次喂养的时间, 减少每天哺乳次数和/或缓慢增加哺乳间隔时间。在这种情况下, 由于婴儿需求量减少, 母亲的乳汁会以缓慢的速度自然减少。

[0008] 但是在有些情况下, 需要阻止母亲哺乳或需要突然中止哺乳。有些妈妈喜欢奶瓶

喂养而不是母乳喂养。婴儿死亡也会导致母亲突然停止母乳喂养。怀孕的哺乳期母亲也可能被告知要停止哺乳,尤其是当流产的风险很高时。以下情况也建议立即断奶:半乳糖血症婴儿;婴儿的母亲使用违禁药物(美国儿科学会,禁毒委员会,1994年);婴儿的母亲有未经治疗的活动性肺结核,婴儿的母亲已感染了人类免疫缺陷病毒(美国儿科学会,儿童艾滋病委员会,1995年)。无论是母亲选择不进行母乳喂养或停止哺乳,哺乳期都会持续一段时间。对于产生乳汁但不哺乳的妇女,乳汁淤积一定程度上与乳房肿胀有关,并可能在生理和心理上导致显著的痛苦。

[0009] 停止挤奶或哺乳也与乳腺炎风险增加有关,这种疾病由乳房内感染(IMI)病原体引起,大多是细菌,但也有酵母、真菌或甚至藻类。乳腺炎可以是临床上局部(在某些情况下整体)的临床体征和乳汁异常,或亚临床的产量损失和降低乳汁质量。

[0010] 已经表明,注射含有胰蛋白酶(protease-peptones)(PP,也被称为酪蛋白磷酸肽, CPP)的酪蛋白水解物(CNH)的粗制品到山羊或牛的乳房(udder)可以模拟自然退化现象,引起局部炎症反应和紧密连接(TJ)完整性的丧失,然后乳腺分泌快速枯竭(美国专利号6,391,849;Shamay等人,2002Life Sci.70:2707-2719;Shamay等人,2003.J.Dairy Sci.86:1250-1258)。CNH引发的过程比自然枯竭引发的过程更迅速。进一步表明,纯 $\beta$ -酪蛋白( $\beta$ -CN)级分1-28下调牛和山羊的乳汁分泌。这种肽的活性与其阻断乳腺上皮细胞顶膜的钾离子通道的能力有关(Silanikove等人,2000.Life Sci.67:2201-2212)。

[0011] 欧洲专利申请号EP1375513中公开在酪蛋白衍生肽中,氨基酸序列中具有多个磷酸丝氨酸残基的肽显示出强大的免疫增强活性。具体地,该发明涉及一种含有氨基酸序列Q1-SerP-X-SerP-Q2的肽的免疫增强剂,其中SerP表示磷酸丝氨酸残基,X代表一至三个任意氨基酸残基,Q1和Q2独立地缺失或代表至少一个任意氨基酸残基。

[0012] 本发明的发明人及其合作者以前公开了包含酪蛋白衍生肽的药物组合物,该组合物为即用的、无菌透明溶液,基本上不含胶束且pH高于6.0的形式(国际专利申请公开号W02006/117784)。其表明最小活性肽包含序列Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu。然而,这些药物组合物包含多种由酪蛋白水解得到的肽。

[0013] 因此,获得包含根据氨基酸序列和浓度所定义的肽的药物组合物是公认的需要,并且也将是非常有利的。此类组合物可以通过可重复的方式工业规模生产。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及诱导哺乳期动物停止和减少乳汁产生以及乳腺退化的组合物和方法。特别地,本发明提供了明确定义的有效诱导退化和治疗乳腺炎的肽,以及含有这种肽的药物组合物及其用途。

[0016] 本发明部分基于出人意料地发现含有与至少一个正电荷的氨基酸残基连接的基序Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)的肽足以诱导哺乳期动物停止产奶和乳腺退化。本发明相对于现有技术的贡献是提供新的合成或重组的短肽,其与迄今已知的诱导退化的含酪蛋白水解物的组合物相比,至少一样有效诱导退化。这些肽可以容易地和重复地生产,基本上无残留物和具有高无菌度,并且可以根据需要来配制。

[0017] 因此,根据一个方面,本发明提供合成或重组的肽,其包括式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-X}_{2(n)}$ (SEQ ID NO:1)的4-7个氨基酸的序列,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸且其中每次出现时 $n=0,1$ 或 $2$ 。

[0018] 根据某些实施方案,带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。根据某些目前典型的实施方案,带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0019] 根据某些典型的实施方案,SEQ ID NO:1的式还包含C-末端的封闭基团(blocking group)。根据某些实施方案,该封闭基团选自酰胺和酯组成的组。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0020] 根据某些实施方案,所述肽包含选自以下组成的组的氨基酸序列:Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)(SEQ ID NO:2);Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:3);Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:4);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:5);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:6);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)(SEQ ID NO:7);Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:8)和Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:9)。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0021] 根据某些典型实施方案,所述肽包含如SEQ ID NO:2所列出的氨基酸序列。根据其他典型实施方案,所述肽包含在C末端具有酰胺的SEQ ID NO:2所列出的氨基酸序列,所述序列如SEQ ID NO:12所列。

[0022] 根据某些实施方案,所述肽的长度为4-40个氨基酸,典型地4-30,更典型地4-15或4-10个氨基酸。根据某些典型实施方案,所述肽由SEQ ID NO:2组成。根据某些其他典型实施方案,所述肽由SEQ ID NO:12组成。

[0023] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括治疗有效量的包括式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$ (SEQ ID NO:1)的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸,且每次出现时 $n=0,1$ 或 $2$ ,以及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0024] 根据某些实施方案,带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。根据某些目前典型的实施方案,带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0025] 根据某些典型实施方案,所述肽还包括C-末端的封闭基团。根据某些实施方案,该封闭基团选自酰胺和酯组成的组。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0026] 根据某些实施方案,所述药物组合物包括包含如SEQ ID NO 2-9中任一个所列出的氨基酸序列、或其组合的肽。根据某些典型的实施方案,所述药物组合物包含合成或重组的肽,其包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其组合。根据其它实施方案,所述药物组合物包含由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12或其组合组成的肽。

[0027] 本发明的药物组合物可以根据具体需要,特别是根据治疗群体的类型来配制。根据某些实施方案,为了局部施用至乳房(breast)或乳房(udder),所述药物组合物被配制成凝胶、软膏、霜剂、乳剂或持续释放制剂包括透皮贴剂。

[0028] 根据其它实施方案,所述药物组合物被配制用于肠胃外施用。根据某些实施方案,药物组合物被配制为管内施用(intracanal administration),例如通过输注或注射。当处理群体是家畜动物时,药物组合物配制成通过哺乳期动物乳腺的乳头管注射到乳腺蓄乳池(gland cistern)。可选地,本发明的药物组合物被配制用于全身性口服施用。

[0029] 根据另外的方面,本发明提供了哺乳期哺乳动物诱导暂时停止产奶,长期停止产奶或乳腺退化的方法,该方法包括向需要其的哺乳期哺乳动物施用药物组合物,该药物组合物包含有效量的具有式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$ (SEQ ID NO:1)的4-7个氨基酸

的序列的合成或重组的肽,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸,且每次出现时 $n=0、1$ 或 $2$ 。

[0030] 根据某些实施方案,带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。根据某些目前典型的实施方案,带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0031] 根据某些典型的实施方案,肽还包括C-末端的封闭基团。根据某些实施方案,该封闭基团选自酰胺和酯组成的组。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0032] 根据某些实施方案,所述药物组合物包含有效量包含如SEQ ID NO2-9中所列出的任一氨基酸序列,或其组合的肽。根据某些典型的实施方案,所述肽包含SEQ ID NO:2。根据其它实施方案,所述肽由SEQ ID NO:2组成。

[0033] 根据某些实施方案,哺乳期哺乳动物是家畜动物。根据其他实施方案,哺乳期哺乳动物是人。

[0034] 根据某些实施方案,所述药物组合物在乳腺哺乳的同时施用。根据其它实施方案,所述药物组合物在停止挤奶或哺乳的同时施用。在其中哺乳期哺乳动物是家畜动物的实施方案中,停止挤奶时间包括,但不限于,产犊前诱导干乳期的时间。预期单次施用以及多次施用。

[0035] 典型地,所述药物组合物以选自由以下组成的组的间隔被施用一次或多次,典型的1至6次,更典型的1至3次:约2小时,约6小时,约8小时,约12小时,约16小时,约20小时,约24小时,约48小时或约72小时。根据一个目前典型的实施方案,所述药物组合物被施用仅一次。

[0036] 根据另外的实施方案,其中所述哺乳期哺乳动物是家畜动物,停止挤奶发生在预期分娩前约60至70天,典型的在预期分娩前约40至60天,或约20至约40天。因此,药物组合物在预计分娩前约60至90天施用,典型的在预期分娩前约40至60天,或约20至约40天。

[0037] 根据某些实施方案,肽施用后约2-3天观察到停止产奶,对下一哺乳期重构乳腺组织没有不利影响。本发明的肽可以在哺乳周期的任何阶段施用,包括在哺乳期高峰。

[0038] 如上所述,突然停止挤奶和诱导退化导致乳房内感染及乳腺炎更高的风险和更高的发生率。通过本发明的肽和组合物快速诱导退化显著降低因停止挤奶引起的乳腺炎的发生率。此外,本发明中的肽有效治疗和缓解乳腺炎。因而,根据某些方面,本发明提供了一种用于预防、治疗和扭转微生物感染的方法,该方法包括向哺乳期动物施用本发明的药物组合物。

[0039] 根据某些实施方案,所述方法包括局部或肠胃外施用所述药物组合物。根据一些实施方案,所述方法包括管内施用含肽的药物组合物。根据某些典型的实施方案,所述药物组合物被施用至哺乳期哺乳动物乳腺的乳头管。可通过注射或输注的方式施用到乳头管。根据其他典型的实施方案,所述组合物局部施用到乳腺。该组合物可施用到一个或多个乳腺,包括同时施用至哺乳期哺乳动物的所有乳腺。该组合物可在哺乳期的任何阶段施用。

[0040] 根据另外的实施方案,所述方法还包含共同施用由以下组成的组抗微生物治疗:抗生素和杀菌剂;免疫调节剂;抗炎疗法或其组合。在一个实施方案中,该方法还包括施用非抗生素乳头封闭或结合抗生素、杀菌剂或免疫调节剂的乳头封闭。根据某些实施方案,该疗法选自由抗生素、杀菌剂、甾体和非甾体抗炎治疗,免疫调节剂和免疫接种治疗。在某些实施方案中,为了防止由于向乳腺乳头管施用药物组合物过程导致的潜在的感染,特别是

当在牧群站点进行施用,施用抗微生物治疗是有用的。

[0041] 应明确理解,本发明的范围包括如本领域已知的一个或多个氨基酸替代,以及氨基酸衍生物,非天然氨基酸和合成的酸,并约定,这些变体和修饰必须保留了本发明上下文中原始分子诱导乳腺退化的能力。

[0042] 本发明的其它目的、特征和优点将通过下面的描述和附图变得清楚。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明提供了新的合成或重组的肽,其在包括哺乳期家畜动物和哺乳期人类的哺乳期哺乳动物的乳腺中高效诱导退化过程和停止产奶。

[0045] 在详细解释至少一个本发明的实施方案之前,应当理解的是,本发明并不限于其应用到后续描述所列出的或通过实施例举例说明的细节。本发明能够胜任其他实施方案或能够以各种方式被实践或执行。另外,也应理解,本文使用的措辞和术语是用于描述目的,而不应被视为限制。

[0046] 定义

[0047] 术语“肽”贯穿在整个说明书中使用以指通过肽键一个接一个连接的氨基酸残基的线性系列。根据本发明的原则的肽是合成或重组的,并且不同于任何已知的完整蛋白。

[0048] 如本文所用的,术语“磷酸肽”指共轭肽形式的磷酸化的肽,其中非肽部分是磷酸残基。具体而言表述“磷酸肽”或“磷酸丝氨酸”表示共轭丝氨酸,其中非肽部分是磷酸残基。

[0049] 如本文所用,术语“停止产奶”是指暂时停止和持续停止产奶。暂时停止产奶是可逆中止。持续停止是指中断哺乳期,仅通过怀孕分娩和/或性荷尔蒙治疗才可逆转。根据本发明的教导,机械性刺激(即,挤奶或哺乳)可以逆转由本发明的组合物和方法诱导的暂时停止产奶。

[0050] 如本文所用的术语“退化”指的是乳腺内受控的细胞凋亡和组织重塑的复杂过程,其导致乳腺停止产奶。在退化的初始阶段,内皮细胞的凋亡性死亡通常会导致残留的乳汁分泌物中体细胞计数增加。

[0051] 这里所用的术语“乳腺炎”指的是乳腺(mammary gland)、乳房(breast)或乳房(udder)由物理伤害、引入化学物质、病毒、真菌、寄生虫或最常见的细菌入侵及其毒素引起的炎症。“乳腺炎”用来描述各种形式的炎症,包括亚临床和临床乳腺炎,临床乳腺炎包括轻度的、重度的和慢性乳腺炎。

[0052] 在亚临床乳腺炎中,既检测不到乳房(breast)或乳房(udder)肿胀,也观察不到乳汁异常。这种类型的乳腺炎通常被称为“亚临床”的。在家畜动物,尤其是奶牛中,特殊的筛选试验,包括基于对体细胞计数的估计和过氧化氢酶检测的加州乳腺炎试验(CMT)和威斯康星乳腺炎试验(WMT),显示亚临床乳腺炎情况下乳汁成分的改变。临床乳腺炎可以轻微或严重,并以乳汁中存在白细胞为特征。轻度临床乳腺炎涉及乳汁外观的改变,包括存在白点或血块,水状乳汁或其他不正常形式的乳汁。轻度临床乳腺炎可伴有其他症状,包括发热、敏感或肿胀的乳房(breast)或乳房(udder)。

[0053] 严重的临床乳腺炎包括发热、敏感、坚硬的乳房(breast)或乳房(udder)症状,这对于哺乳主体非常疼痛。严重的临床乳腺炎的发病是突然的,哺乳主体可能变得不适,表现出发烧、速脉(rapid pulse)、抑郁、乏力和食欲不振。主体的整个泌乳系统受到影响时,病症被称为急性全身性乳腺炎。这种严重的症状可能还伴随着停止产奶。



[0054] 慢性乳腺炎是持久的乳房 (udder) 或乳房 (breast) 感染,通常是亚临床乳腺炎的形式,偶尔可发展成临床形式并返回到亚临床形式。慢性乳腺炎的特征在于乳腺内由于细菌建立和结缔组织形成产生的硬块。

[0055] 操作本发明的优选方式

[0056] 根据一个方面,本发明提供了一种合成或重组的肽,其包括式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-X}_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸且其中每次出现时 $n=0,1$ 或 $2$ 。

[0057] 根据某些实施方案,带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。根据某些目前典型的实施方案,带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0058] 本发明的肽可以通过本领域公知的方法,包括化学合成和重组DNA技术来合成。合成可以在溶液中进行或通过固相肽合成进行,如Merrifield所描述的(见J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 1964)。典型地,肽是通过使用标准的固相技术合成的。这些方法包括排他性固相合成、部分固相合成方法、片段缩合以及经典的溶液合成。固相肽合成方法在本领域是公知的,并被如John Morrow Stewart和Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (第二版, Pierce Chemical Company, 1984) 进一步描述。

[0059] 丝氨酸残基的磷酸化可以通过任何本领域已知的方法进行,例如在Meggio等人, 1991. FEBS Lett. 283 (2):303-306和Perich JW 1997. Method Enzymol. 289:245-246等中描述。

[0060] 在一般情况下,肽合成方法包括顺序加入一个或多个氨基酸或适当保护的或衍生化的氨基酸到生长的肽链。通常第一个氨基酸的氨基或羧基基团被合适的保护基团保护。然后被保护或衍生化的氨基酸既可以附着到惰性固体支持物上也可以在溶液中,在适合形成酰胺键的条件下加入适当保护的具有互补(氨基或羧基)基团的序列中的下一个氨基酸。然后,保护基团从这个新添加的氨基酸残基上被移除,然后下一个氨基酸(适当保护的)被添加,如此等等;传统上这个过程也伴随着洗涤步骤。当所有的所需氨基酸被按正确顺序连接后,任何剩余的保护基团(和任何固体支持物)被按顺序或同时去除,以得到最终的肽。通过对这种一般方法的简单修改,就可以向生长链上一次添加多于一个氨基酸,例如,通过偶联(在不使手性中心外消旋的条件下)被保护的三肽与适当保护的二肽以在去保护后形成五肽,如此等等。

[0061] 合成的肽可通过制备型高效液相色谱 (Creighton T. 1983. Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.) 纯化,其组成可通过氨基酸测序来证实。

[0062] 本发明的肽也可以使用本领域已知的重组技术,例如Bitter等人, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544和Studier等人 (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89所描述的产生。

[0063] 根据某些典型的实施方案,肽的C末端羧基被保护。该保护基团选自但不限于,酰胺(即C末端羟基被替换为 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}_2$ 和 $\text{NR}_2\text{R}_3$ )或酯(即C末端羟基被替换为 $\text{OR}_2$ )。 $\text{R}_2$ 和 $\text{R}_3$ 任选独立地是脂族,取代脂族,苄基,取代苄基,芳基或取代芳基基团。此外, $\text{R}_2$ 和 $\text{R}_3$ 可以任选地连同氮原子一起与约0-2个额外杂原子如氮,氧或硫形成 $\text{C}_4$ 至 $\text{C}_8$ 杂环。非限制性的合适的适宜杂环实例包括哌啶基,吡咯烷基,吗啉代,硫代吗啉代或哌嗪基。C端保护基的实例包括但不限

于-NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NH(乙基), -N(乙基)<sub>2</sub>, -N(甲基)(乙基), -NH(苄基), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基)(苄基), -NH(苯基), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基)(苯基), -OCH<sub>3</sub>, -O-(乙基), -O-(正丙基), -O-(正丁基), -O-(异丙基), -O-(仲丁基), -O-(叔丁基), -O-苄基和-O-苯基。

[0064] 根据某些目前典型的实施方案,所述肽的C末端被酰胺保护。

[0065] 根据某些实施方案,所述肽包含选自以下组成的组的氨基酸序列:Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)(SEQ ID NO:2);-Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:3);Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:4);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:5);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:6);Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)(SEQ ID NO:7);Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys(SEQ ID NO:8)和Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys(SEQ ID NO:9)。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0066] 根据某些典型的实施方案,所述肽包含SEQ ID NO:2所列出的氨基酸序列。

[0067] 根据某些实施方案,所述肽具有4-40个氨基酸,典型的4-30,更典型的4-15,或4-10个氨基酸的长度。根据某些典型的实施方案,所述肽由SEQ ID NO:2组成。

[0068] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的肽。

[0069] 迄今已知的用于诱导哺乳期哺乳动物退化和停止产奶的化合物和组合物,通常通过水解酪蛋白和/或从水解产物中纯化相关的肽而获得。拥有可有效诱导停止产奶和退化的小的确定的肽是高度期望的,因为这种肽可以持续合成。此外,相对于涉及从天然来源材料纯化肽的方法,肽合成的方法不容易出现污染。与已知的酪蛋白衍生肽相比,本发明的肽至少是同样有效,通常效率更高。

[0070] 术语“药物组合物”意在其广泛含义,指的是一种或多种本发明的肽与其他化学成分如药学上适用的稀释剂和载体的制剂。药物组合物的目的是促进化合物施用至有机体。本发明的药物组合物应含有治疗量的本发明的肽,即诱导停止产奶和退化所需要的量。

[0071] 根据某些实施方案,所述药物组合物中的肽的浓度从约1μg/ml至约5000μg/ml,一般为40μg/ml至约800μg/ml之间。

[0072] 这里使用的术语“药学上可接受的载体”是指不会对生物体引起严重刺激且不会消除所施用的化合物的生物学活性和性质的载体或稀释剂。非限制性的载体的例子有:水,丙二醇,盐水,乳液和有机溶剂与水的混合物。药物的配制和施用的技术可以参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,PA,最新版本,其内容通过引用被并入本文。根据某些实施方案,本发明的药物组合物被配制用于肠胃外施用,例如,用于管内施用,特别是用于注射或输注到乳腺的乳头管。对于注射,本发明的肽可在水溶液中配制,优选在生理相容的缓冲液如Hank氏溶液,林格氏溶液,或在含或不含有机溶剂,如丙二醇和聚乙二醇的生理盐水缓冲液中配制。向乳腺的乳头管进行管内施用并不是就局部或全身施用而定义的。如本文所公开,本发明的药物组合物的管内施用可能具有局部效果,例如用于诱导仅所治疗的乳腺的退化,因此可以被称作局部。所述药物组合物还可以以凝胶、软膏、霜剂、乳剂或持续释放制剂包括透皮贴剂的方式局部施用。本发明还包括全身施用,通过胃肠外或口服施用。

[0073] 根据另外方面,本发明提供了诱导哺乳期哺乳动物暂时停止产奶,持久停止产奶或乳腺退化的方法,该方法包括向需要其的哺乳期哺乳动物施用药物组合物,该药物组合

物包含有效量的包括式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸且其中每次出现时 $n=0,1$ 或 $2$ 。

[0074] 根据另一方面,本发明提供了用于诱导哺乳期哺乳动物暂时停止产奶,持久停止产奶或乳腺退化的包含有效量的包括式 $X_{1(n)}\text{-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-}X_{2(n)}$  (SEQ ID NO:1) 的4-7个氨基酸的序列的合成或重组的肽的药物组合物,其中 $X_1$ 和 $X_2$ 中的至少一个是带正电荷的氨基酸且其中每次出现时 $n=0,1$ 或 $2$ 。

[0075] 据某些实施方案,带正电荷的氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。根据某些目前典型的实施方案,带正电荷的氨基酸是赖氨酸。

[0076] 根据某些典型的实施方案,肽还包括C-末端的封闭基团。根据某些实施方案,该封闭基团选自酰胺和酯组成的组。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0077] 根据某些实施方案,哺乳期哺乳动物选自人、牛、山羊、绵羊、水牛、骆驼、驴、羊驼、马、猪、猫、狗组成的组。

[0078] 根据某些目前典型的实施方案,哺乳期哺乳动物是人类。在人类中,产奶而不哺乳可能是女性自己决定不进行母乳喂养或如上文所述的某种病症阻止母乳喂养的结果。这种乳汁淤积与乳房肿胀一定程度上关联并引起疼痛,并经常与乳腺分泌泄漏相关联,其随后增加了患乳房内感染的风险。本发明的药物组合物和方法因而满足了对于快速和有效诱导退化和停止产奶以防止上述不良状况的需求。

[0079] 根据另外的当前典型的实施方案,所述动物是选自由牛、水牛、山羊、绵羊和猪组成的组的家畜动物。根据某些目前典型的实施方案,家畜动物是奶牛。

[0080] 在现代乳品工业中,哺乳期动物每年生产一次,因此动物怀孕时仍然挤奶。把干乳期加于分娩前的哺乳期动物是用于诱导乳腺的退化过程从而使乳腺组织恢复到下一个哺乳期所采取的实践。诱导干乳期是必要的,尤其,为了维持分娩之前和之后类似的产奶量。在牛中,自然的退化过程在其通过停止挤奶诱导后约21至30天完成。现在本发明公开,出人意料地,本发明的合成或重组的肽诱导停止产奶和退化过程。

[0081] 对产奶暂时和持久的效果可以通过哺乳期动物的乳腺对应用本发明的药物组合物的响应获得,应用本发明的药物组合物通常通过直接注射或通过乳头管输注到乳腺蓄乳池。停止产奶可以发生在仅治疗的腺体中或在治疗的所有的乳腺中。施用可以在哺乳期的任何阶段进行。在其中哺乳期哺乳动物是家畜动物的实施方案中,施用也可以在所谓的干乳期进行。

[0082] 相比于停止挤奶诱导的退化,本发明的合成或重组的多肽和药物组合物诱导的退化过程可更加快速和同步,并且产奶可以通过机械刺激如挤奶恢复。和自然退化过程一样,产奶恢复也可能在怀孕和分娩后出现。本发明的组合物诱导的退化不干扰乳腺组织重建和恢复分娩后的乳汁分泌能力。

[0083] 本发明中的肽和组合物诱导的退化阻止与突然停止挤奶相关联的乳房内感染和乳腺炎。因此,本发明的组合物对于预防乳腺感染是有用的。此外,本发明的肽和组合物可用于治疗和固化乳房内感染,包括与永久或暂时停止挤奶相关的感染。

[0084] 根据另外的实施方案,本发明的肽和组合物可用于促进哺乳动物奶头周围皮肤再生能力。

[0085] 下面的实施例是为了更充分地说明本发明的一些实施方案而被呈现。然而，它们不应以任何方式被解释成为限制本发明的宽广范围。本领域熟练的技术人员可以容易地根据本文公开的原则设计出许多变化和修改而不脱离本发明的范围。

## 实施例

[0086] 所有实验都根据Regulation of Animal Experiments in the State of Israel的指南进行,并根据Ethics Committee of the Research Institution的指导进行。

### [0087] 实施例1:肽合成

[0088] 设计本发明中的合成肽以评估包含Ser (P) 基序的短肽对退化的活性。还合成了具有相同序列但具有非磷酸化丝氨酸残基的肽,来检查磷酸化对肽活性的影响。酪蛋白衍生肽以及酪蛋白水解物用作阳性对照。

[0089] 采用芴基甲氧基羰基 (fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相化学合成十条肽 (Fields G.B.&Nobel R.1990.Int.J.Peptide Protein Res.35:161-214)。每条肽C-末端的 $\alpha$ -羧基转化为酰胺基。对于每条含磷酸丝氨酸基序的肽,合成一条具有相同序列但具有非磷酸化丝氨酸的对照肽。下面的表1显示所有合成肽的序列。

[0090] 表1:合成肽的序列和编号

试验和式编号	分析编号	序列	SEQ ID NO.
P241210-01-01	A(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-NH <sub>2</sub>	10
P241210-01-02	A	Lys-Lys-Ser-Leu-Ser-Ser-NH <sub>2</sub>	11
P241210-01-03	B(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-NH <sub>2</sub>	12
P241210-01-04	B	Lys-Lys-Ser-Ser-Ser-NH <sub>2</sub>	13
P241210-01-05	C(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-NH <sub>2</sub>	14
P241210-01-06	C	Lys-Lys-Ser-Ser-NH <sub>2</sub>	15
P241210-01-07	D(p)	Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-NH <sub>2</sub>	16
P241210-01-08	D	Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-NH <sub>2</sub>	17
P241210-01-09	E(p)	Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-NH <sub>2</sub>	18
P241210-01-010	E	Lys-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-NH <sub>2</sub>	19

[0092] 所有的肽由飞行时间质谱进行了验证。纯度通过反相高效液相色谱法测定,发现为至少98%。所有干燥的化学合成片段被存储在-20℃。

### [0093] 实施例2:制备酪蛋白水解物

[0094] 酪蛋白水解物已知有效诱导乳腺退化(例如美国专利号6,391,849;Shamay等人,2002同上;Shamay等人,2003同上)。因此,制备酪蛋白水解物作为评估肽的诱导退化活性的阳性对照。

[0095] 总重4000gr的酪蛋白酸钠(DMV Int.,NL)加入到pH=8.0的25mM Tris HCl溶液中产生20% (w/v) 溶液。加入酪蛋白酸钠后,轻轻搅拌溶液至平衡,同时保持pH值在8.0和温度为45℃。酪蛋白酸钠通常在约15-60分钟内溶解,产生最终20% (w/v) 的溶液。

[0096] 然后以1:1000胰蛋白酶:酪蛋白酸钠的比例加入四(4) gr猪胰蛋白酶粉末,并将溶液通过磁力搅拌器或抗絮凝搅拌器(deflocculating stirrer)在45℃轻柔搅动下缓慢搅拌。让水解反应共进行1小时。

[0097] 设定的水解时间结束时,通过将粗水解物温度升高至90-95℃并保持溶液在此温度范围内1小时使粗水解物内的胰蛋白酶灭活。1小时后,通过在外使用冰浴将溶液冷却至室温,并使用10N HCl将pH调节至4.7。保持溶液在该pH 15-30分钟。

[0098] 使用IEC离心机(型号DPR 6000,Damon\IEC division)于2-8℃,4500rpm(~4400g)离心20min去除溶液中的不溶物质。所得上清转移到新的灭菌玻璃瓶,用10N NaOH调节pH至7.0。然后用25mM Tris HCl溶液pH7.0调整溶液体积至20升。

[0099] 得到的最终上清液通过3.0μm/1.2μm/0.65μm预过滤器并通过两个0.45/0.22μm无菌CA膜过滤器胶囊(membrane filter capsule)[Sartopure PP23.0μm过滤器胶囊(Sartorius,目录号5592502P1),Sartoclean DGF 1.2μm过滤器胶囊(Sartorius,目录号5642803A1),Sartoclean GF 0.8/0.65μm过滤器胶囊(Sartorius,目录号5602805G1)]过滤。

[0100] 玻璃血清瓶(20ml,50ml,100ml和200ml)在干净房间(1000级,IS06)的无菌工作台(100级,IS05)分别通过无菌灌装装入20ml、40ml、90ml或170ml过滤溶液。每一瓶使用压折器(crimper)用铝密封来密封。所得到的酪蛋白水解物被冷冻保存在-20℃直到使用。

#### [0101] 实施例3:配制合成肽

[0102] 施用之前每条化学合成的肽溶解在生理盐水中达7天。长达7天的稳定性测试表明这些产物的稳定性为98%以上。肽浓度为0.4mg/ml盐水。10ml样品保存在小瓶中,于4℃-8℃备用。施用剂量是4mg(10ml溶液)。

#### [0103] 实施例4:检验分离的肽对退化的诱导的实地研究

[0104] 早期退化期间乳腺分泌物的组成变化反映出血液衍生因子转移的增加和乳状液(lacteal fluid)的合成与分泌减少。例如,退化期间乳糖浓度显著降低,而在早期非哺乳期乳腺分泌物中纤溶酶型纤溶酶原激活剂浓度和pH升高(Oliver和Sordillo 1989.J Dairy Sci.1989;72:1647-1664)。

[0105] 进行实地研究评估在干乳期(即停止挤奶当天)施用的本发明的合成肽的单一乳房内剂量诱导快速退化的潜力。

#### [0106] 研究设计

[0107] 总共107头奶牛被纳入研究,其中45头接受处理,62头作为对照。所有的牛都是处于第一次或更多次哺乳期、符合包括/排除标准的奶牛。本研究是对照盲法病例对照(controlled blinded case-control)研究。

[0108] 病例主体通过乳房内输注接受单剂量的特定的肽。对照是通过乳房内施用接受以下产品的哺乳期牛:

[0109] i) 去磷酸化肽;

[0110] ii) 酪蛋白水解物。

#### [0111] 处理组

#### [0112] 病例组

[0113] 各9头牛的五组(每组总共36个乳房区(udder quarters))计划作为病例组。每组

接受如上实施例1描述的五(5)种磷酸肽(P241210-01-01;03;05;07和09)中的一种处理。肽通过乳房内输注含有4mg肽的10ml施用一次。

[0114] 对照组

[0115] 集合一:各9头牛的五组(每组总共36个乳房区)计划作为第一对照集合。每组接受如上实施例1描述的五(5)种去磷酸肽(P241210-01-02;04;06;08和10)中的一种处理。肽通过乳房内输注含有4mg肽的10ml施用一次。

[0116] 第二对照集合包括:

[0117] (i)十一头牛(总共44个乳房区)用酪蛋白水解物(20ml)处理,通过乳房内输注单次施用20ml(约1.8mg/ml酪蛋白磷酸肽(CPP),总共=36mg CPP/20ml)。

[0118] (ii)六头牛(24个乳房区)通过乳房内输注接受盐水溶液(10ml)。

[0119] 纳入研究的牛来自三个牛群。接受通过奇数号码结尾的批号区分的每种肽(即MLT-P241210-01-01,MLT-P241210-01-03,MLT-P241210-01-05,MLT-P241210-01-07和MLT-P241210-01-09)的病例牛,选自参加研究的牛群。随后,从同一牛群分配接受具有连续批号的肽(偶数结尾,即MLT-P241210-01-02,MLT-P241210-01-04,MLT-P241210-01-06,MLT-P241210-01-08和MLT-P241210-01-10)的牛。

[0120] 接受酪蛋白水解物或生理盐水溶液处理的对照主体被分布和匹配到病例组。最后一个对照组的分布以一定比例分布在本研究所包括的每个牛群。

[0121] 排除标准

[0122] 落入以下一个或多个定义的牛不纳入本研究:

[0123] • 在干乳期前4周内因乳腺炎或其他任何病症接受抗生素治疗的牛;

[0124] • 具有小于四(4)个功能齐全的乳房区的牛;

[0125] • 非哺乳期的牛;

[0126] • 具有临床性乳腺炎的证据(如乳腺疼痛、发红、肿胀、或温暖,异常乳汁分泌,抑郁,食欲不振,全身不适,或其他适应症)的牛;

[0127] • 显示其他被研究人员鉴定为排除纳入的健康状况的牛;

[0128] • 计划淘汰的牛。

[0129] 处理

[0130] 所有处理(肽,酪蛋白水解物和生理盐水)在停止产奶(干乳期)的预定时间点施用。施用当天设为0天。

[0131] 取样和测量

[0132] 在0天和处理后1、2和3天,每天一次在早晨挤奶后通过挤奶设备将各集合的无菌奶样收集在两个独立小瓶中。采样时间点设置成达到施用处理后3天以保证足够的乳汁分泌用于测定所有退化参数。样品体积为30至50ml之间。牛奶样品的pH值使用cyberscan pH11仪(Eutech Instruments,新加坡)原位测量。每天该装置的探头被浸泡在pH 7.0和pH 4.01的标准缓冲液中进行校准。从乳腺得到的每个样品测量两次,测量时间间隔为30秒。pH值测量使用相同的样品瓶现场重复。双pH值测定前,牛奶样品瓶轻轻摇动三(3)次。pH值测量后,牛奶样品瓶放在有防腐产品的冷藏容器中(Broad Spectrum Microtabs II-Bronopol and Metamycin-D&F Control System Inc.,Two Technology Way,Norwood MA 02062USA)。

[0133] 牛奶样品中的乳糖值在Central Laboratory of Milk Quality,Caesaria Industrial Park,Israel测定,根据ISO 22662|IDF 198:2007。

[0134] 还使用Fossomatic 360 (Foss Electric,Hillerod,Denmark) 并参照USA National Mastitis Council.Laboratory Handbook on Bovine Mastitis.1999.Ed.National Mastitis Council,Verona,WI 53593USA测定牛奶样品中的体细胞数。

[0135] 处理应用后的每个站点实行标准干燥牛管理操作,在随后的三天对纳入研究的牛进行临床观察。临床观察包括用药(药物类型,剂量,施用途径),体格检查(根据研究人员决定)和监测不良事件。三天后牛按常规牛群进行管理。

[0136] 乳糖变化分析中,6个乳房区的数据被排除。这些乳房区中的1个的数据由于缺少初始值被忽略。对于其他5个乳房区,由于快速乳腺退化过程导致没有足够的用于乳糖分析的牛奶样品,在随访三天里获得的乳糖浓度无法分析。

[0137] 样本量

[0138] 主要的关键变量被设定为退化成功的分类。根据计算,被测试的每个丝氨酸肽的最小样本量为36个乳房区(9头牛)。用于计算的假设是:磷酸丝氨酸肽的成功率为55%和去磷酸丝氨酸肽的成功率为35%,80%的功效(power)达到5%的显著性。

[0139] 结果

[0140] 终点测量结果:采集在0天和处理后连续三(3)天分泌乳汁的pH,乳糖和体细胞数(SCC)的值。结果被描述为处理后3天内每天的测量值与0天测得的水平之间的差异。结果在下文表1-3中提出。

[0141] pH

[0142] 诱导退化过程后,乳腺所产牛奶的pH值升高,主要表明乳腺的紧密连接破裂。下面的表2总结了测试的肽和酪蛋白水解物(CNH)对牛奶样品pH值的影响,样品取自单剂量的每种肽或CNH处理1、2和3天后。结果表示为处理后每天与0天(处理前)之间的pH值差异。

[0143] 表2:本研究中牛奶样品的pH值变化

[0144]

	天数					
	第1天		第2天		第3天	
处理	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
A(p) (SEQ ID NO:10)	0.016	0.017	0.020	0.037	0.118	0.036
A (SEQ ID NO:11)	0.048	0.018	-0.002	0.021	0.072	0.021
B(p) (SEQ ID NO:12)	0.171	0.026	0.165	0.035	0.163	0.033
B (SEQ ID NO:13)	-0.015	0.013	-0.019	0.017	0.065	0.020
C(p)	0.066	0.020	0.046	0.025	0.119	0.035

[0145]

SEQ ID NO:14)						
C (SEQ ID NO:15)	0.034	0.013	-0.006	0.019	-0.001	0.028
D(p) (SEQ ID NO:16)	0.027	0.015	-0.018	0.019	0.077	0.025
D (SEQ ID NO:17)	0.000	0.012	-0.027	0.012	0.013	0.021
E(p) (SEQ ID NO:18)	0.045	0.012	0.061	0.028	0.128	0.034
E (SEQ ID NO:19)	0.047	0.018	-0.028	0.052	0.115	0.032
酪蛋白水解物	0.083	0.018	0.106	0.023	0.167	0.033

[0146] 如表1所显示的,肽B(p),具有SEQ ID NO:12,Lys-Lys-(SerP)-(SerP)-(SerP)-NH<sub>2</sub>(即SEQ ID NO:2在C-末端具有酰胺作为封闭基团)显示对牛奶pH值的影响最显著,特别是在处理后前2天。施用酪蛋白水解物仅在第三天达到肽B(p)的效果量级。值得注意的是,本发明的新型肽的效果优于酪蛋白衍生肽D(p)(SEQ ID NO:16)和E(p)(SEQ ID NO:18)。

[0147] 乳糖

[0148] 退化在牛奶成分方面最重要的影响之一是乳糖含量降低。因此,如以上pH值测定部分所描述的,施用肽或CNH之前和之后取样的牛奶样品的乳糖浓度也被测定。表3总结了每个时间点取样的牛奶样品与0天(处理前)取样样品之间的乳糖浓度变化。



[0149] 表3:本研究中牛奶样品的乳糖含量变化

处理	天数					
	第 1 天		第 2 天		第 3 天	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
A(p) (SEQ ID NO:10)	-0.462	0.071	-1.364	0.122	-1.771	0.130
A (SEQ ID NO:11)	-0.463	0.060	-1.268	0.109	-1.773	0.160
B(p) (SEQ ID NO:12)	-1.250	0.164	-2.013	0.132	-2.521	0.140
B (SEQ ID NO:13)	-0.320	0.105	-0.969	0.103	-1.412	0.158
C(p) SEQ ID NO:14)	-0.509	0.195	-1.427	0.173	-0.345	0.220
C (SEQ ID NO:15)	-0.846	0.126	-1.554	0.110	-0.387	0.242
D(p) (SEQ ID NO:16)	-0.431	0.083	-1.460	0.088	-2.180	0.103
D (SEQ ID NO:17)	-0.749	0.201	-1.387	0.188	-0.090	0.174
E(p) (SEQ ID NO:18)	-0.354	0.075	-1.530	0.089	-2.042	0.120
E (SEQ ID NO:19)	-0.368	0.077	-1.531	0.141	-1.675	0.202
酪蛋白水解物	-0.293	0.121	-1.048	0.124	-1.383	0.205

[0151] 在所有检查的时间点,与已知高效诱导退化的CNH的效果相比,肽B(p)在降低乳糖含量方面具有更好的效果。肽B(p)也显示比酪蛋白衍生肽D(p)和E(p)更加高效。然而,三天后肽B(p)的效果与酪蛋白衍生肽D(p)的效果类似。

#### [0152] 体细胞计数

[0153] 可以用来建立退化过程进展的额外参数是牛奶中存在的体细胞。牛奶中的细胞计数增加是退化相关的上皮细胞高度凋亡的结果。下面的表4显示与0天相比,体细胞计数(SCC)的变化(见上文)。表中所展示结果是将高度可变的原始数据进行对数变换计算出的结果。

[0154] 表4:本研究牛奶样品中的体细胞计数变化

[0155]		天数					
		第 1 天		第 2 天		第 3 天	
	处理	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
	A(p) (SEQ ID NO:10)	0.592	0.176	1.212	0.195	1.829	0.236
	A (SEQ ID NO:11)	0.911	0.202	1.571	0.161	2.090	0.183
	B(p) (SEQ ID NO:12)	3.129	0.141	3.099	0.231	3.451	0.181
	B (SEQ ID NO:13)	0.109	0.191	0.664	0.182	1.191	0.216
	C(p) SEQ ID NO:14)	-0.129	0.342	0.961	0.273	0.195	0.308
	C (SEQ ID NO:15)	0.511	0.204	1.194	0.211	0.650	0.326
	D(p) (SEQ ID NO:16)	0.383	0.214	1.181	0.209	1.998	0.202
	D (SEQ ID NO:17)	0.387	0.290	1.023	0.240	-0.249	0.270
	E(p) (SEQ ID NO:18)	0.060	0.158	1.175	0.176	1.847	0.226
E (SEQ ID NO:19)	-0.186	0.172	0.843	0.258	1.492	0.207	
	酪蛋白水解物	0.181	0.182	0.818	0.179	1.048	0.256

[0156] 伴随所测试的肽对牛奶pH值和乳糖含量影响所获得的结果,发现肽B(p) 优于酪蛋白水解物或酪蛋白衍生肽。因此认为这种肽诱导退化非常有效。

[0157] 具体实施方案的前面描述,如此充分展示了本发明的一般性质,以至于别人可以运用现有的知识,容易根据各种应用修改和/或调整此类具体实施方案,而无需过度实验和无需背离一般概念,因此,这样的调整和修改应当被理解为在公开的实施方案的等同物的含义和范围内。应理解,这里使用的措辞或术语是用于描述目的而不是限制。工具(means)、材料,以及实施各种公开功能的步骤,可以采取多种不同形式而不背离本发明。

## 序列表

	<110>	米勒尤迪斯公司
	<120>	管理哺乳的肽
	<130>	MLTS/006 PCT
	<160>	19
	<170>	PatentIn version 3.5
	<210>	1
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(1).. (1)
	<223>	X 表示 0-2 个氨基酸; 位于位置 1 或 5 的 X 中的至少 1 个是带正电荷的氨基酸。
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (4)
	<223>	被磷酸修饰
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(5).. (5)
[0001]	<223>	X 表示 0-2 个氨基酸; 位于位置 1 或 5 的 X 中的至少 1 个是带正电荷的氨基酸。
	<400>	1
		Xaa Ser Ser Ser Xaa
		1 5
	<210>	2
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (5)
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (5)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	2
		Lys Lys Ser Ser Ser
		1 5
	<210>	3
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列

	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (5)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	3
	Lys Lys Ser Ser Ser Lys	
	1	5
	<210>	4
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (5)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	4
	Lys Lys Ser Ser Ser Lys Lys	
	1	5
[0002]	<210>	5
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (4)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	5
	Lys Ser Ser Ser Lys Lys	
	1	5
	<210>	6
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (4)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	6
	Lys Ser Ser Ser Lys	
	1	5

	<210>	7
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(4)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	7
	Lys Ser Ser Ser	
	1	
	<210>	8
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(3)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	8
[0003]	Ser Ser Ser Lys Lys	
	1	5
	<210>	9
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(3)
	<223>	被磷酸修饰
	<400>	9
	Ser Ser Ser Lys	
	1	
	<210>	10
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE

	<222>	(3).. (3)
	<223>	被磷酸修饰
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5).. (7)
	<223>	被磷酸修饰
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(8).. (8)
	<223>	酰胺
	<400>	10
	Lys	Lys Ser Leu Ser Ser Ser Xaa
	1	5
	<210>	11
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(7).. (7)
	<223>	酰胺
	<400>	11
[0004]	Lys	Lys Ser Leu Ser Ser Xaa
	1	5
	<210>	12
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (5)
	<223>	被磷酸修饰
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(6).. (6)
	<223>	酰胺
	<400>	12
	Lys	Lys Ser Ser Ser Xaa
	1	5
	<210>	13
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	

	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(6).. (6)
	<223>	酰胺
	<400>	13
	Lys Lys Ser Ser Ser Xaa	
	1	5
	<210>	14
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3).. (4)
	<223>	被磷酸修饰
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(5).. (5)
	<223>	酰胺
	<400>	14
	Lys Lys Ser Ser Xaa	
[0005]	1	5
	<210>	15
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	Xaa
	<222>	(5).. (5)
	<223>	酰胺
	<400>	15
	Lys Lys Ser Ser Xaa	
	1	5
	<210>	16
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成的肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (2)
	<223>	被磷酸修饰

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4).. (6)  
<223> 被磷酸修饰  
<220>  
<221> Xaa  
<222> (9).. (9)  
<223> 酰胺  
<400> 16  
Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Xaa  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的肽  
<220>  
<221> Xaa  
<222> (9).. (9)  
<223> 酰胺  
<400> 17  
Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Xaa  
1 5

[0006]

<210> 18  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (4)  
<223> 被磷酸修饰  
<220>  
<221> Xaa  
<222> (7).. (7)  
<223> 酰胺  
<400> 18  
Lys Ser Ser Ser Glu Glu Xaa  
1 5

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的肽  
<220>



[0007]

<221>	Xaa
<222>	(7).. (7)
<223>	酰胺
<400>	19
	Lys Ser Ser Ser Glu Glu Xaa
	1 5