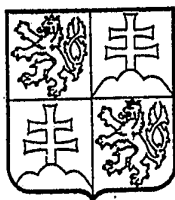


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

272 772

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.
A 61 D 7/00

(21) PV 1518-87.8

(22) Přihlášeno 06 03 87

(30) Právo přednosti od 07 03 86 US (837 477)

(40) Zveřejněno 13 06 90

(45) Vydáno 02 12 91

(72) Autor vynálezu

COLLIER ROBERT JOSEPH, DELMAR
McGRATH MICHAEL FRANCIS, CHESTERFIELD,
MISSOURI (US)

(73) Majitel patentu

MONSANTO COMPANY, ST. LOUIS, MISSOURI (US)

(54)

Způsob zvýšení nárůstu parenchymu mléčné
žlázy zdravého, fyziologicky normálního
hospodářského zvířete

(57) Nárůst parenchymu mléčné žlázy, který produkuje mléko, může být u fyziologicky normálního hospodářského zvířete významně zvýšen tím, že se na mléčnou žlázu působí intercisternální infuzí prostředku, který obsahuje alespoň jednu účinnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující epidermální růstový faktor, růstový faktor typu insulinu, somatropin, transformující růstový faktor, insulin, placentální laktogen, prostaglandiny, jejich směs a/nebo jejich syntetické analogy. Dobrého zvýšení nárůstu parenchymu lze dosáhnout aplikací jednotkové dávky obsahující 2 mikrogramy až 100 miligramů účinné látky.

Vynález se týká způsobu zvýšení nárůstu parenchymu mléčné žlázy zdravého, fyziologicky normálního hospodářského zvířete.

Produkce mléka savců je ultimativně omezena množstvím parenchymu v mléčné žláze. Srovnání výtěžku mléka s mokrou hmotností a suchou hmotností celkového parenchymu, se suchou hmotností odtučněného parenchymu a celkovou DNA žlázy poskytuje vysoce korelovatelné výsledky. V Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. 43, 71 (1983) Davis a spol. připisují zvýšenou produkci mléka u geneticky vyšších živočichů výhradně zvýšenému objemu vemene, což je také ve vztahu s množstvím parenchymatických buněk.

Klasická tvrzení ukazují, že růst parenchymu mléčné žlázy je řízen hypofýzovými, vaječnickovými, nedledvinkovými a placentárními faktory. Viz Cowie, Monographs on Endocrinology 15 (1980) a US patent č. 4 521 409, udělený Baumanovi a Sejrserenovi 4. června 1985, kde je popsáno, že růst parenchymu mléčné žlázy u přežvýkavců lze zvýšit podáváním růstového hormonu somatotropinu do krevního oběhu přežvýkavců přibližně v době mezi počátkem puberty a prvním porodem, s výhodou na počátku první březosti.

Při podávání do krevního oběhu zvířete se většina mitogenů buněk parenchymu mléčné žlázy váže také na receptory v mnoha jiných tkáních příslušného zvířete. Díky takovému zředění žádoucího účinku na receptory stimuluující růst mléčné žlázy lze očekávat, že zvětšení parenchymu mléčné žlázy cestou podávání do krevního oběhu vyžaduje relativně velká množství takových mitogenů. Existuje tedy velká potřeba vyvinout praktickou techniku pro zvýšení kapacity a/nebo účinnosti produkce mléka, která by nebyla závislá na podávání do krevního oběhu savce.

Pomocí králíků, myší a krys, které byly fyziologicky abnormální, tj. bez vaječníků a/nebo s předem vyvolaným pseudotěhotenstvím (např. pomocí reprodukčních hormonů), byly provedeny studie účinků vývoje mléčné žlázy podkožními injekcemi somatotropinu a/nebo jiných hormonů, implantátů, které uvolňují cholera toxin, nebo intraduktální injekcí "laktogenního hormonu". Lyons a spol.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 50, 308 až 311 (1942) a Recent Prog. Hormone Res. 14, 219 až 254 (1958), Fiddler a spol.: J. Endocrinol. 49, 459 až 460 (1971), Daniel a spol.: Sci. 224, 1245 až 1247 (1984) a Silberstein a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4950 až 4954 (1984). Jiní pracovníci studovali účinky mitogenů in vitro, jako je například epidermální růstový faktor, s nebo bez insulinu, na růst kultivovaných mléčných buněk různých živočichů: Imagawa a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4074 až 4077 (1982), Taketani a spol.: Endocrin. 113, (3), 871 (1983) a Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2647 až 2650 (1983), Tonelli a spol.: Nature 285, 250 až 252 (1980) a Turkington: Exper. Cell Res. 57, 79 až 85 (1969).

Cílem vynálezu je zvýšení nárůstu parenchymu mléčné žlázy zdravého, fyziologicky normálního hospodářského zvířete aplikací růstových faktorů a/nebo jiných mitózu ovlivňujících látek v průběhu březosti nebo v době mezi nástupem puberty a první březostí způsobem, při kterém se používá minimálního množství látky ovlivňující zvýšení nárůstu parenchymu a při kterém je minimální možnost, že u zvířete dojde k vyvolání vedlejších biologických účinků.

Podle vynálezu se tohoto cíle dosahuje tím, že se působí na mléčnou žlázu intracisterální infuzí prostředku, který obsahuje alespoň jednu účinnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující epidermální růstový faktor, růstový faktor typu insulinu, somatotropin, transformující růstový faktor, insulin, placentální laktogen, prostaglandiny, jejich směs a/nebo jejich syntetické analogy.

Zvířeti se s výhodou aplikuje jednotková dávka obsahující 2 mikrogramy až 100 miligramů účinné látky.

Použití růstových faktorů jinou metodou ke stejnému účelu je známé z EP 146 703, EP 140 998, z dokumentů v nich citovaných (R. Baserge, Carpenter, K. Sejrseren) a z dokumentů citovaných v úvodní části tohoto popisu (Imagawa, Taketani, Tonelli, Turkington).

Způsobem podle vynálezu, který nevyžaduje aplikaci mitózu ovlivňujících látek do krevního oběhu zvířete, podkožní injekcí nebo implantací, ale který místo toho využívá vhodných způsobů aplikace, jakými se v případě většiny krav chovaných pro mléko a některých dalších savců rutinně provádí infuze antibiotik, se neočekávaně dosahuje podstatného nárůstu normálního parenchymu. Podstatného zvýšení nárůstu parenchymu oproti normálně pozorovanému nárůstu se podle vynálezu dosahuje použitím pouze velmi malých množství mitózu ovlivňujících látek, a to během relativně krátké doby.

Aplikací těchto látek způsobem podle vynálezu se docílí u hospodářských zvířat chovaných pro mléko významného zvýšení produkce mléka. U březích jalovic byla zvýšena produkce mléka, jak bude dále prokázáno, v průměru o 11 %.

Způsob podle vynálezu je použitelný pro jakékoliv hospodářské zvíře, u něhož je žádoucí, aby došlo ke zvýšení nárůstu parenchymu mléčné žlázy. Zvláště užitečný je pro přežvýkavce, jako jsou například krávy chované pro mléko, krávy chované pro maso a jalovice obou těchto druhů. Je použitelný u všech známých typů krav chovaných pro mléko, např. Holstein, Friesen, Brown Swiss, Jersey, Guernsey, Ayrshire, Milking Shorthorn a jejich kříženců, a u všech známých typů krav chovaných pro maso, např. Hereford, Angus, Zebu, Charolais, Brangus, Simmental, Chianina, Dutch Belted, Limousin a jejich kříženců.

Je použitelný také u jiných přežvýkavců, jako jsou například ovce a kozy všech typů, stejně jako různých nepřežvýkavců, jako jsou například svině všech typů. Nejpozoruhodnější pro praktickou aplikaci je to, že se vynález používá u savců, kteří jsou fyziologicky normální, což pro tyto účely znamená, že jim nejsou odstraněny vaječníky ani nebyli předem léčeni (např. reprodukčním hormonem, jako je estrogen, gonadotropin a pod.) na indukci pseudobřezosti nebo puberty.

Termín "parenchym mléčné žlázy" tak, jak je zde používán, se týká tkáně v mléčné žláze (včetně toho, co se obvykle nazývá "mléčné epithelium"), která je podstatná pro produkci mléka touto žlázou. U samic dochází k růstu mléčné žlázy po nástupu puberty. Obvykle (např. u jalovic) k většině nárůstu mléčné žlázy dochází během prvního zabřeznutí. K dalšímu růstu a/nebo opětovnému růstu parenchymu dochází v průběhu následujících březostí.

Pro zvýšení takového růstu se tento vynález provádí tak, že se látka, která má žádáný mitogenní účinek, podává savci mezi asi nástupem puberty (včetně peri/pubertálního období) a první březostí nebo mezi první a kteroukoliv následující březostí. Takové podávání se typicky provádí v "suchém" období, během něhož savec nelaktuje. U krav chovaných pro mléko a u podobných savců je obvykle výhodné podávání během posledního trimestru před porodem.

Výhodou a překvapivě účinnou technikou podávání podle tohoto vynálezu je způsob, který se nejobvykleji nazývá "infuse do mléčné žlázy". U savců, jako jsou například krávy, se této techniky rutinně používá pro podávání mastí obsahujících antibiotika nebo jiných prostředků pro prevenci nebo léčení mastitidy. V praktické aplikaci podle tohoto vynálezu se látka, která má mitogenní účinek, obvykle může podávat podobnou technikou nebo tak, a to dokonce výhodněji, že je obsažena (s nebo bez jiných stimulátorů růstu parenchymu) v prostředku, který se podává infusně pro prevenci nebo léčení mastitidy, respektive pro nějaký další účel.

Podle této techniky se otvorem a kanálkem struku injekční stříkačkou s tupou jehlou zavede do zadržovacího prostoru struku látka, která má mitogenní účinek. Odtud se obvykle rozšíří přes nádržku struku (přes zadržovací prostor struku) do zadržovacího prostoru žlázy a do vývodového systému mléčné žlázy. Tento velmi dobře známý způsob je popsán Spinellim a spol.: *Drugs in Veterinary Practice*, strana 80 až 83, C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo., USA (1978) a Reuterem a spol.: USA patent 4 011 312 (ze dne 8. března 1977). Tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkazy. Pro účely podle tohoto vynálezu lze považovat jiné postupy za ekvivalentní infuzi do mléčné žlázy tehdy, jestliže takovou látku ukládají v zadržovacím

prostoru struku, což vede k rozšíření takové látky do tkáně mléčné žlázy, kde způsobuje zvýšení nárůstu parenchymu.

Pod výrazy "přímé" a "parakrinní" mitogenní účinky, používané v tomto popisu, se rozumí účinky, které nevyžadují, aby látka podávaná infuzí vstupovala do oběhu zvířete v množství, které zvýší její koncentraci na takovou hladinu, která prostřednictvím endokrinní regulace má mitogenní účinnost žádoucí velikosti na parenchymtické buňky zvířete. Souhrnný článek o parakrinní regulaci růstu mléčné žlázy viz: Oka a spol.: *Clinics in Endocrin. and Metab.* 15, (1), 79 až 97 (1986).

Látky, které mají "přímé" nebo "parakrinní" mitogenní účinky, působí lokalizovaně, tj. ovlivňují buňky v přímé blízkosti stimulačního prostředku. Takové prostředky buď stimulují epitelální, myoepitelální a/nebo stromální buňky tak, že tyto uvolňují mitogenní nebo sekundární látku nebo látky, které stimulují lokální buňky, nebo tyto prostředky přímo vyvolávají odpověď v buňkách přítomných v lokalizovaném okolí.

Existuje mnoho důležitých provedení způsobu podle vynálezu za použití látky, která působí přímo na parenchymatické buňky mléčné žlázy, do níž je zavedena infuze, čímž se zvýší rychlost normální proliferace buněk. V jiných provedeních působí látka přímo na neparenchymatické buňky ve žláze, což má za následek, že v takových buňkách dochází díky parakrinnímu účinku k místnímu zvýšení množství látky, která má přímou mitogenní účinnost na parenchymatické buňky žlázy (ve žláze do níž vede infuze).

V některých případech, jak lze vidět z dále uvedených specifických příkladů, infuze takové látky do mléčné žlázy vede k podstatnému růstu mléčných žláz, které jsou přilehlé k té, do níž se infuze provádí, aniž by došlo k podstatnému zvýšení hladiny látky podané infuzí v krevním oběhu živočicha. Účinné receptory pro přímé nebo parakrinní efekty některých látek v mléčné žláze však mohou existovat pouze v jistých fázích fyziologického vývoje živočicha. Například v mléčné žláze hovězího dobytka existuje po dobu březosti větší množství receptorů vázících somatotropin než u zvířat, která nejsou březí. Srovnaj následující citace: Jean-Francois Beckers v "L'Hormone Placentaire Somatomammotrope Bovine", kapitola 5, Université de Liege, Faculté de Médecine Veterinaire (1983), Gertler a spol.: "Hormonal Control of Casein Synthesis and Organ Culture of the Bovine Lactating Mammary Gland" v *J. Dairy Res.* 49, 387 (1982) a Akers: "Binding Sites, Mammary Growth, Secretory Cell Differentiation, and Milk Biosynthesis in Ruminants" v *J. Dairy Sci.* 68, 501 (1985).

V mnoha uspořádáních podle vynálezu je látkou s mitogenním účinkem polypeptidový růstový faktor. Jisté třídy takových růstových faktorů výhodných pro použití podle tohoto vynálezu mají molekulovou hmotnost obvykle nižší než asi 45 000, typičtěji dokonce nižší než asi 22 500, a v případě růstových faktorů, které mají přímou mitogenní účinnost jak shora popsáno, typicky nižší než asi 10 000. V některých případech se mohou s výhodou použít některé nepolypeptidové látky, například steroidy vaječníků a placenty a jejich agonisty. V kterémkoliv případě může být touto látkou látka přirozeně se vyskytující, látka syntetizovaná tak, aby simulovala látku přirozeně se vyskytující, nebo látka syntetizovaná, ale nepodobající se žádné v přírodě se vyskytující sloučenině, nicméně však mající příslušný mitogenní účinek.

Výhodnou třídou polypeptidových růstových faktorů, které se mohou používat, jsou epidermální růstové faktory (EGF). Tyto faktory interagují s receptory mléčných epitelálních buněk, což vede k proliferaci těchto buněk. Byly sekvenovány EGF různých živočišných druhů. Byly identifikovány jejich aminokyselinové sekvence a/nebo konfigurace dané vnitřním zkříženým navázáním cysteinových zbytků disulfidovými vazbami. Jedním takovým EGF je dobře charakterizovaný jednořetězový polypeptid o 53 aminokyselinách, který se může izolovat z podčelistních (slinných) žláz dospělých myších samců. Jiný typ EGF, lidský urogastron, je syntetizován v duodenu (dvanáctník) a ve slinných žlázách a lze jej izolovat z lidské moče. Urogastron je ze 70 % homologní (37 z 53 obvyklých aminokyselin) s myším

EGF a má tři disulfidové vazby ve stejných polohách. Dostupná data naznačují, že lidský urogastron a lidský EGF jsou identické látky. Pro více informací o EGF viz: Carpenter a spol.: "Epidermal Growth Factor", Ann. Rev. Biochem. 48, 193 až 216 (1976) a Gregory: Nature 257, 325 až 327 (1975). Obě citace jsou zde zařazeny jako odkazy.

Je známo, že pro mitogenní účinnost není nutná úplná aminokyselinová sekvence lidského nebo myšího EGF. Například: Gamble a spol.: USA patent č. 3 917 824 (ze 4. listopadu 1975) molekulární popisuje variace zkrácené (např. o 2,5 nebo 6 aminokyselin) na karboxylovém konci, Gregory a spol.: USA patent č. 4 035 485 (ze 12. července 1977) popisuje molekulární variace zkrácené o 7 aminokyselin, Cohen: USA patent číslo 3 948 875 (ze 6. dubna 1976) popisuje deriváty EGF, kterým na C-konci chybí zbytky Leu-Arg, Banks a spol.: přihláška PCT 83/04030 popisuje urogastronová analoga, která se liší typem nebo umístěním jedné nebo více aminokyselin, a Komoriya a spol.: přihláška PCT 85/01284 popisuje polypeptidy s aktivitou podobnou EGF, která je založena na přítomnosti sekvence sestávající z 10 aminokyselin, které odpovídají aminokyselinám mezi Cys₂₀ a Cys₃₁ přirozeného EGF. Všechny tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkazy. Tyto nebo podobné molekulární variace EGF, jejich analoga nebo jiné sloučeniny, které interagují s EGF (nebo funkčně podobnými) receptory v mléčné žláze po infuzi do mléčné žlázy, a které dosahují požadavků podle tohoto vynálezu v podstatné míře, jsou v tomto rozsahu ekvivalenty EGF pro účely podle tohoto vynálezu.

Jsou známy různé postupy přípravy EGF. Např.: V japonské patentové přihlášce 59/027858 (Nippon Shinyaku) je popsána kondenzace chráněných 1 až 5 aminokyselinových peptidů za vzniku chráněného tripentakoneptidu, který se po odstranění chránících skupin oxiduje na EGF. Nebo Lee a spol. v evropské patentové přihlášce 128 733 (publikované 19. prosince 1984) a Bell v patentové přihlášce PCT 85/00369 (publikované 31. ledna 1985) popisují přípravu EGF expresí rekombinované DNA. Sugimoto v tritském patentu 2 092 155 popisuje přípravu EGF multiplikací hybridních buněk. Nishimura a spol. v USA patentu 4 528 186 (z 9. června 1985) popisuje izolaci EGF z lidské moče. Tyto objevy jsou zde zahrnuty jako odkazy.

V jiných výhodných uspořádáních se růstový faktor může vybrat z fetálních EGF, jako jsou například transformující růstové faktory α -typu. Viz Sporn a spol.: evropská patentová přihláška 105 014 a Todaro a spol.: evropská patentová přihláška 190 018 (tyto objevy jsou zde zahrnuty jako odkazy). Tyto faktory integrují s receptory mléčné žlázy, čímž dochází k žádané mitogenní účinnosti. Jiná třída různých polypeptidů, které jsou užitečné v tomto vynálezu, je ilustrována virovými proteinovými analogy popsány Brownem a spol. v evropské patentové přihlášce 199 769 založené na PCT přihlášce 86/02650.

V jiných uspořádáních může být růstovým faktorem polypeptid ze skupiny insulinů, analog takového polypeptidu nebo jiná látka, která integruje s růstovým faktorem podobným insulinu (IGF) nebo s funkčně podobnými receptory v mléčné žláze, čímž dochází k mitogenní účinnosti na parenchym. Jako IGF se s výhodou používá IGF-I ("somatomedin") nebo IGF-II. Podobné výsledky se mohou obecně získat použitím insulinu nebo jeho prekursoru (např. pro-insulinu) i když požadovaná množství jsou mnohem vyšší než u IGF.

O těchto růstových faktorech z řady insulinů a způsobu jejich přípravy existuje rozsáhlá literatura. Například aminokyselinové sekvence lidského IGF-I a IGF-II a jejich příprava expresí rekombinantní DNA v mikrobiálních hostitelích jsou popsány v evropské patentové přihlášce 128 733 (výše) a 123 228 (Chiron Corp.) (publ. 31. října 1984). Analoga IGF-I s valinem v poloze 59 jsou popsány Niwou a spol. v evropské patentové přihlášce 158 892 (publikované 23. října 1985). Více informací o IGF lze nalézt v práci Rinderknechta a spol. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2365 (1976), Zapfa a spol.: Curr. Top. Cell Reg. 19, 257 (1981) a Wilsona a spol.: J. Endocrin. 95, 59 až 64 (1982). Přípravu insulinu a pro-insulinu popsal Johnson v Sci. 219, 632 až 637 (1983), dále je příprava insulinu a pro-insulinu popsána v evropské patentové přihlášce 55 945 firmy Genentech, která byla zveřejněna 14. července 1982.

Při jiných výhodných provedeních se aplikují infuzí některé z látek, vznikajících metabolickou cestou z kyseliny arachidonové, nebo směs těchto látek nebo jejich analogy, které mají mitogenní účinek na epitelové buňky mléčných žláz. K těmto látkám patří prostaglandiny, např. ze serie A až F, a jejich analogy, např. [11 Δ , 13E, 15S]-11,15-dihydroxy-9-oxoprost-13-en-1-ová kyselina (E_1), [5Z, 11 Δ , 13E, 15S]-11,15-dihydroxy-9-oxoprost-5,13-dien-1-ová kyselina (E_2), [13E, 15S]-15-hydroxy-9-oxoprost-10,13-dien-1-ová kyselina (A_1), [5Z, 13E, 15S]-15-hydroxy-9-oxoprost-5,10,13-trien-1-ová kyselina (A_2), [13E, 15S]-15-hydroxy-9-oxoprost-8[12], 13-dien-1-ová kyselina (B_1), [5Z, 13E, 15S]-15-hydroxy-9-oxoprost-5,8[12], 13-trien-1-ová kyselina (B_2), [5Z, 9 Δ , 13E, 15S]-9,15-dihydroxy-11-oxoprost-5,13-dien-1-ová kyselina (D_2), [9 Δ , 11 Δ , 13E, 15S]-9,11,15-trihydroxyprost-13-en-1-ová kyselina ($F_1\Delta$), [5Z, 9 Δ , 11 Δ , 13E, 15S]-6,9-epoxy-11,15-dihydroxyprost-5,13-dien-1-ová kyselina (I_2), které všechny dodává firma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Lutalyse (R) prostaglandin ($F_2\Delta$) od firmy The Upjohn Co., Kalamazoo, MI a cloprost-enol. Lze také použít prekursorů a metabolitů těchto látek (např. arachidonové kyseliny a jejich metabolitů), které mají podobnou účinnost pokud se týká ovlivňování mitózy mléčných buněk, přičemž se látek s větší účinností nebo/a s delším poločasem může použít v příslušně nižších dávkách. Řada těchto látek je popsána v *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, sv. 14 (zejména str. 1 až 43, 73 až 129 a 263 až 307), vyd. J. E. Pike a D. R. Mortonem, Jr., Raven Press, New York, NY (1985) a v článku *Prostaglandins and the Arachidonic Acid Cascade*, Norman A. Nelson a další, 60 *Chem. Eng. News*, str. 30 a následující (16. srpen 1982).

Látky, které při podání infuzí dávají parakrinní mitogenní účinek, zahrnují placetální laktogen, jisté předcházející hormony hypofýzy a další polypeptidy a v podstatě podobnou chemickou strukturou tak, aby se dosáhlo v podstatě stejných mitogenních účinků pro účely tohoto vynálezu. Obecně jsou z důvodů účinnosti výhodné předcházející hormony hypofýzy jiné než prolaktin (např. somatotropiny).

Množství potřebná pro mitogenní účinnost použitých látek, požadovanou tímto vynálezem, jsou velmi malá. To ukazuje na neočekávaně vysokou účinnost těchto látek při jejich používání. V některých případech jsou jednotkové dávky pro infuzi do žlázy ne větší než asi 2 mikrogramy. V některých případech mohou být účinné i nižší dávky. Obvykle se mohou podávat jednotkové dávky až asi 100 miligramů nebo i více, aniž by došlo k nežádoucím účinkům. Z ekonomických důvodů jsou však obvykle výhodné menší dávky (např. méně než asi 100 mikrogramů).

Nejvýhodnějšími koncentracemi látky s mitogenní účinností v infuzním prostředí jsou obvykle koncentrace mezi asi 5 a asi 500 nanogramy/ml, ačkoliv v některých případech mohou být užitečné i vyšší nebo nižší koncentrace. Nejžádanější dávky, koncentrace, frekvence a počty infuzí lze určit na základě rutinní zkušenosti. V mnoha případech se dobrých výsledků dosáhne jednou až asi pěti infuzemi. Tyto infuze se s výhodou podávají odděleně, např. během 1 až asi 10 (s výhodou 2 až 5) dnů. Tato skutečnost, tj. to, že podstatného zvýšení růstu parenchymu lze dosáhnout v tak krátkých dobách, byla zcela neočekávaná a má značný komerční význam. Postačující celkové dávky, tj. počet postupných infuzí jednotlivěmu savci během březosti nebo puberty před březostí, jsou obvykle asi 10 mikrogramů, typicky méně než 500 miligramů, často s výhodou menší než asi 1 miligram látky s mitogenní účinností.

I když lze v praxi podle tohoto vynálezu používat jedinou látku s mitogenní účinností, v některých případech mohou být výhodnější kombinace takových látek. V mnoha případech je žádoucí podávat infuzí takovou látku s mitogenní účinností, která blízce odpovídá látce přirozeně se u příslušného druhu (kterému se podává) vyskytující, např. hovězí EGF, IGF a/nebo somatotropin pro použití u dobytka. Obvykle jsou vhodné také látky, které odpovídají těm, které se přirozeně vyskytují u jiných druhů živočichů. Způsob podle tohoto vynálezu se provádí tak, že se používá prostředek připravený pro podávání savcům infuzí do mléčné žlázy. Tento prostředek obsahuje takové množství látky s mitogenní účinností na

mléčné epitheliální buňky u tohoto savce, které je účinné pro zvýšení růstu parenchymu mléčné žlázy shora uvedeného savce. Takové prostředky by měly být z fyziologického hlediska snášitelné, s výhodou nedráždivé a v podstatě neobsahující endo/toxiny. Jestliže je to žádoucí, lze látku s mitogenní účinností podávat jako pevnou látku, která může být jemně rozemleta nebo slisována do výhodného tvaru a velikosti, např. pro prodloužené uvolňování v nádržce struku (v zásobní oblasti struku). V jiných uspořádáních je žádoucí použít vehikulum, které je v podstatě kapalné při tělesné teplotě savce a s výhodou také za teploty místnosti, při níž dochází k infuzi. Ať už infuzovaný prostředek je pevný nebo kapalný, obvykle je výhodné použít také vehikulum, které podporuje difuzi látky s mitogenní účinností mléčnou žlázou. V některých případech, ale ne ve všech, je výhodné, aby vehikulum bylo v podstatě rozpustné ve vodě.

Nejvíce žádaný typ a množství vehikula pro infuzi látky s mitogenní účinností se určí na základě rutinní zkušenosti. Pro ilustraci je typicky postačující například 1 až 10 ml kapalného vehikula s pH ve fyziologickém rozmezí, např. fyziologický solný roztok, Freundův neúplný adjuvant nebo rostlinný (například sojový nebo sezamový) nebo minerální olej. Obvykle jsou výhodné emulze dvou nebo více takových činidel. Jestliže je to žádoucí, mohou být do prostředku zahrnuty příslušné stabilizátory, např. mono- nebo di-sacharidy, cukr a alkoholy nebo neutrální aminokyseliny.

Tento vynález poskytuje také způsob přípravy prostředků, které jsou užitečné pro zvýšení růstu parenchymu mléčné žlázy u savců. V obecném uspořádání takový způsob zahrnuje spojení (např. dispergování) látky s mitogenním účinkem na epitheliální buňky mléčné žlázy shora uvedeného savce s vehikulem (pojivem), které zvyšuje difuzi látky mléčnou žlázou shora uvedeného savce. Shora uvedený prostředek se upraví shora uvedeným spojením pro podání savci infuzí do mléčné žlázy.

Následující popisy specifických uspořádání podle vynálezu jsou pouze ilustrativní a neznamenalí jakékoliv omezení rozsahu vynálezu. Všechna zvířata v těchto pokusech byla fyziologicky normální (jak shora popsáno). Všechny teploty jsou uvedeny ve stupních Celsia. Díly a procenta jsou hmotnostní díly a procenta, pokud není jinak uvedeno.

Příklad 1 a 2

Epidermální růstové faktory

Dvanáct březích nelaktujících krav různých plemen chovaných pro maso se v období posledních 40 až 80 dnů březosti volně ustájí. Krmí se dávkou vojtěškového sena a peletovaného koncentrátu. Do každé čtvrtiny vemene se infuzí do mléčné žlázy kanálkem struku 1., 3., 5., 7. a 9. den této studie podá 10 ml excipientu (Freundův neúplný adjuvant emulgovaný se stejným množstvím 0,9% sterilního solného roztoku). Infuze se provádějí plastickou strukovou kanylou (pro infuzi) (délky 3,2 cm, přibližně 12 gauge) od firmy Jorgensen Laboratories, Loveland Co. Protože zadní a přední půlka vemene nemají stejnou velikost, byla srovnávání zpracovaných a kontrolních částí dělána mezi vzájemně opačnými čtvrtinami, tj. čelní pravá versus zadní levá a zadní pravá versus čelní levá. Pro kontrolu a zpracování byly náhodně vybrány dvě čtvrtiny v každém vemenu. Při infuzích excipient obsahuje 25 mikrogramů lidského EGF (hEGF) získaného od G. D. Searle and Co., Ltd., Anglie (6 zvířat) nebo myšního EGF (mEGF) získaného od Collaborative Research Corp., Lexington, Ma., USA (jiných 6 zvířat). hEGF byl připraven firmou Searle expresí rekombinantní DNA a následně dalším čištěním filtrací na filtru (mol. hm. 10 000) na vyšší čistotu než na 90 % (jak bylo stanoveno HPLC), mEGF (kultivovaný, č. katalogu 40001) z myšších podčelistních žláz byl připraven způsobem podle Savage a spol.: J. Biol. Chem. 247, 7609 (1972) v 98% čistotě (stanoveno na SDS polyakrylamidovém gelu).

Před podvázáním se struky každého zvířete 3 po sobě následující dny máčí. Každý struk se v den podání předem vyčistí 70% vodným ethanolem. Čtrnáctý den se krávy zabijí. Proveďte se excise mléčných žláz. Z každého vemene (pokud je to nutné, vydojí se) se odstraní kůže a vemeno se rozdělí na čtyři čtvrtiny: přední pravou, přední levou, zadní pravou

a zadní levou. Každá čtvrtina vemen se rozemele. Reprezentativní vzorek (200 g) se zhomogenizuje se čtyřnásobkem svého objemu vody. Změří se celkový objem každého homogenátu.

Při stanovení suché hmotnosti každé čtvrtiny vemene se tři 10 ml podíly homogenátu zředěného 1 : 5 umístí do předem odvážených pánví, vysuší se přes noc při 60 °C a pak se suší do konstantní hmotnosti.

Při stanovení hmotnosti suché odtučněné tkáně každé čtvrtiny vemene se tři 5 ml podíly nezředěného homogenátu extrahují způsobem podle Andersona: J. Anim. Sci. 41, 118 (1975) s tím, že se vzorky umístí do předem odvážených skleněných centrifugačních zkumavek (o velikosti 25 x 150 mm), extrahují se přes noc 10 ml směsí ethanolu s etherem v poměru 3 : 1, potom se centrifugují (5 minut při 500 otáčkách za minutu) a supernatant se odebere. Proveďte se druhá extrakce dalšími 10 ml směsí ethanolu s etherem. Vzorek se vysuší pod dusíkem do konstantní hmotnosti.

DNA v každé čtvrtině vemene se stanoví způsobem podle Burtona: Methods in Enzymol. 12B, 163 až 166 (1968). Jako testovací roztok se používá roztok 15% trichloroctové kyseliny (TCA) ve 2N kyselině chlorovodíkové. Při tomto stanovení se alikvotní část (podíly homogenátu) žlázy zředí vodou v poměru 1 : 5 a vše se zhomogenizuje. Používají se tři 0,25 ml nebo 0,5 ml podíly těchto homogenátů. Každý podíl se smíchá se 2 ml testovaného roztoku. Po 30 minutách se vzorky deset minut odstřeďují při 3 000 otáčkách za minutu. Výsledné pelety se promyjí 2 ml 10% roztoku trichloroctové kyseliny v destilované vodě. Po opětovném odstřeďování se výsledné pelety rozbijí ve 2 ml 0,5% kyseliny chloristé a směs se zahřívá 30 minut na 70 °C, aby se extrahovala DNA. Vzorky se odstřeďují. Jeden ml výsledného/každého supernatantu se umístí do zkumavek 12 x 75 mm. Přidají se 2 ml roztoku 1,5 g difenylaminu a 1,5 ml kyseliny sírové ve 100 ml ledové kyseliny octové (bezprostředně před použitím se ke 20 ml tohoto činidla přidá 0,1 ml 1,6% vodného acetaldehydu). Vzorky se míchají vířením a inkubují se při 27 °C. Jako standard se používá DNA brzlíku teleste.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

T a b u l k a 1

Účinnosti hEGF podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA /µg
A. zpracování průměr	389,9	120,0	63,2	794,5
B. kontrola průměr (pouze excipient)	357,3	111,4	58,3	710,0
C. průměrné zvýšení (A-B)	32,6	8,6	4,9	84,5
D. % zvýšení (A-B)/B	9,1	7,7	8,4	11,9
E. průměrné % zvýšení/zvíře	12,9	13,1	16,1	14,8
F. hladina významnosti % zvýšení p je menší než	0,01	0,09	0,16	0,06

T a b u l k a 2

Účinnosti mEGF podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	419,6	150,2	69,6	905,1
B. kontrola průměr (jen excipient)	402,0	147,9	64,6	794,9
C. průměrné zvýšení (A-B)	17,6	2,3	5,0	110,2
D. % zvýšení (A-B)/B	4,4	1,6	7,9	13,8
E. průměrné % zvýšení na zvíře	1,8	2,1	5,2	12,0
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,22	0,40	0,19	0,05

Jak ukazují výsledky v tabulkách 1 a 2, čtvrtiny vemene, do nichž byl infuzně podán hEGF nebo mEGF, byly důsledně těžší a obsahovaly více DNA než jejich stranově opačné kontrolní čtvrtiny, kterým byl podán pouze excipient a obvykle při vysokých hladinách statistické významnosti.

Příklad 3 až 6

Epidermální růstové faktory

24 březích nelaktujících krav chovaných pro maso se rozdělí do 4 skupin po 6 zvířatech; účinky infuze lidského EGF do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene byly u těchto zvířat určovány stejným způsobem jako v příkladu 1 až na to, že A) jako excipient byla u skupiny 1 použita Freundova emulze a u skupin 2, 3 a 4 emulze obsahující 60 dílů sezamového oleje a 40 dílů 0,9% sterilního injeztovatelného solného roztoku, který obsahoval 0,5 % Tweenu 20, a že B) u skupin 1 a 2 se používá 25 mikrogramů hEGF v každé infuzi, u skupiny 3 2,5 mikrogramu a u skupiny 4 250 mikrogramů. Stanovení DNA se provádějí jako v příkladech 1 až 2 až na to, že se původní tři 0,5 ml podíly homogénátu extrahují 1 hodinu 2 ml směsí ethanol - ether (v poměru 3 : 1), odstřeďují se 15 minut při 3 000 otáčkách za minutu, promyjí se během 10 minut 2 ml 70% ethanolu, odstřeďují se 15 minut při 3 000 otáčkách za minutu a před smícháním každého podílu s roztokem kyseliny trichloroctové se ethanol odstraní. Výsledky pro skupiny 1 až 4 jsou uvedeny v tabulkách 3 až 6.

T a b u l k a 3

Účinnosti celkově 125 mikrogramů hEGF ve Freundově emulzi podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 1)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučňená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	364,9	107,2	60,3	723,0
B. kontrola průměr (jen excipient)	349,5	101,0	56,8	629,0
C. Průměrné zvýšení (A-B)	15,4	6,2	3,5	94,0
D. % zvýšení (A-B)/B	4,4	6,1	6,2	14,9
E. průměrné % zvýšení/zvíře	8,1	10,3	8,3	23,0
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,15	0,11	0,13	0,18

T a b u l k a 4

Účinnosti celkově 125 mikrogramů hEGF v emulzi sezamového oleje podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 2)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučňená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	370,2	122,1	71,0	995,0
B. kontrola průměr (jen excipient)	356,2	111,1	68,8	703,0
C. průměrné zvýšení (A-B)	14,0	11,0	2,2	292,0
D. % zvýšení (A-B)/B	3,9	9,9	3,2	41,5

T a b u l k a 4 - pokračování

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA /ug
E. průměrné % zvýšení na zvíře	10,4	20,2	15,9	70,0
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,2	0,02	0,3	0,09

T a b u l k a 5

Účinnosti celkově 12,5 mikrogramů hEGF v emulzi sezamového oleje podaného infuzí
do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 3)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	397,8	132,4	79,4	867,6
B. kontrola průměr (pouze excipient)	400,0	127,0	72,7	896,6
C. průměrné zvýšení (A-B)	(2,2)	5,4	6,7	(29,0)
D. % zvýšení (A-B)/B	(0,5)	4,2	9,2	(3,3)
E. průměrné % zvýšení na zvíře	(0,6)	7,8	16,3	(2,2)
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	-	0,17	0,1	-

T a b u l k a 6

Účinnosti 1,25 miligramů hEGF v emulzi sezamového oleje podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 4)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	391,9	131,5	81,7	733,2
B. kontrola průměr (pouze excipient)	360,2	117,9	75,1	729,2
C. průměrné zvýšení (A-B)	31,7	13,6	6,6	4,0
D. % zvýšení (A-B)/B	8,8	11,6	8,8	0,5
E. průměrné % zvýšení na zvíře	9,9	12,2	11,9	1,6
F. % zvýšení hladina významnosti p menší než	0,001	0,004	0,03	-

Jak ukazují výsledky v tabulkách 3 až 6, čtvrtiny vemene, do nichž byl infuzně podán hEGF, byly podstatně těžší a obsahovaly více DNA než jejich stranově opačné kontrolní čtvrtiny, kterým byl podán pouze excipient.

Příklady 7 až 8

24 březích nelaktujících krav různých plemen chovaných pro maso se náhodně rozdělí do 3 skupin po 8 zvířatech v každé skupině. Účinky infuze lidského EGF do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene byly u těchto zvířat určovány stejným způsobem jako v příkladu 1 až 2 až na to, že množství hEGF v každé infuzi bylo 25 mikrogramů u skupiny 1, 250 mikrogramů u skupiny 2, a 2,5 mikrogramu u skupiny 3. Hmotnosti žláz a DNA byly určovány stejným způsobem jako v příkladech 1 až 2. Výsledky s nízkou dávkou u skupiny 3 byly nejasné vzhledem k napuchnutí některých žláz. Výsledky pro skupiny 1 a 2 jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8.

T a b u l k a 7

Účinnosti 125 mikrogramů hEGF podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 1)

	mokrý hmotnost g	suchý hmotnost g	suchý odtučněná hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	363,0	113,0	52,8	396,9
B. kontrola průměr (bez účinné látky)	358,0	109,7	50,7	358,9
C. průměrné zvýšení (A-B)	5,0	3,3	2,1	38,0
D. % zvýšení (A-B)/B	1,5	3,0	4,1	10,6
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,34	0,21	0,16	0,12

T a b u l k a 8

Účinnosti celkově 1,25 miligramů hEGF podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso (skupina 2)

	mokrý hmotnost g	suchý hmotnost g	suchý odtučněná hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	392,5	122,0	63,8	344,0
B. kontrola průměr (pouze excipient)	388,2	115,7	61,4	384,0
C. průměrné zvýšení (A-B)	4,3	6,3	2,4	(40,0)
D. % zvýšení (A-B)/B	1,1	5,3	3,9	(10,4)
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,4	0,12	0,26	-

Jak ukazují výsledky v tabulkách 7 až 8, čtvrtiny vemene, do nichž byl infuzně podán hEGF, byly těžší a obsahovaly více DNA než jejich stranově opačné kontrolní čtvrtiny, kterým byl podán pouze excipient.

Příklad 9

24 březích jalovic Holstein se v době přibližně 40 posledních dnů březosti volně ustájí, krmí se dávkou vojtěškového sena a peletového koncentrátu. Infuzí do mléčné žlázy se kanálkem struku do každé čtvrtiny vemene každý třetí den až do porodu podá 10 ml excipientu všem jalovicím kromě jedné, které se aplikuje lidský EGF, jak popsáno v tomto příkladu, pouze do 15 dnů před porodem. Infuze se provádějí plastickou kanylou pro infuzi, 3,2 cm dlouhou, přibližně číslo 12, s tupým koncem od firmy Jorgensen Laboratories, Loveland, Co. Zvířata se náhodně vyberou vždy po 12 pro následující 4 zpracování: A) 250 mikrogramů lidského EGF, získaného od firmy G. D. Searle and Co., Ltd., Anglie, rozpuštěného v (62,5 mikrogramů/ml) 0,9% fyziologickém roztoku pro injekce, obsahujícím 0,5% Tweenu 20, a pak emulgovaného těsně před použitím v sterilním sezamovém oleji, obsahujícím 5 % Arlace A manidmonooleátu, (olej: fyziologický roztok v poměru 3 : 2) o konečné koncentraci 25 mikrogramů lidského EGF v ml excipientu, B) 250 mikrogramů hovězího IGF-I, připraveného jako v příkladech 10 až 12, vyčištěného a pak rozpuštěného a emulgovaného, jak bylo právě popsáno pro hEGF, C) 50 miligramů N-methionylaného hovězího somatotropinu (BST), připraveného jako v příkladech 19 až 20 a pak zředěného na 10 mg/ml ve sterilním sezamovém oleji a D) kontrola za použití samotného excipientu (sterilní sezamový olej). U každého zvířete se všechny 4 čtvrtiny vemene zpracují stejným způsobem. Každé vemeno se před zpracováním postříká 70% ethanolom a vysuší do sucha a po zpracování se dezinfikuje roztokem jodu. Při porodu se 4 zvířata z každé skupiny zabijí a jejich mléčné žlázy se oddělí pro analýzu. Zbývajících 8 zvířat z každé skupiny se normálně dojí každé dopoledne a každé odpoledne prvních 105 dnů laktace.

Během těchto 105 dnů dává jalovice, které byl aplikován lidský EGF pouze do 15 dnů před porodem, za den průměrně 9,6 kg mléka, tj. 34,8 %, více než dají průměrně kontrolní krávy. V průměru nepřesahuje produkce mléka krav zpracovávaných až do porodu produkci mléka kontrolních krav.

Příklad 10 až 12

Růstové faktory podobné inzulinu

24 březích nelaktujících krav různých plemen chovaných pro maso se v době posledních 40 až 80 dnů březosti volně ustájí, krmí se dávkou vojtěškového sena a peletovaného koncentrátu. Infuzí do mléčné žlázy se jím kanálkem struku do každé čtvrtiny vemene 1., 3., 5., 7. a 9. den této studie podá 10 ml excipientu (emulze sezamového oleje stejného druhu jako byla emulze použitá v příkladech 4 až 6). Kontrolní a testované čtvrtiny vemene se náhodně vyberou. Srovnání kontrolní a testované čtvrtiny vemene se provádí jako v příkladech 1 a 2. Při infuzích testované sloučeniny obsahoval excipient růstový faktor I podobný hovězímu inzulinu (bIGF-I), který se připraví expresí v E. coli (Prla kmen 079) rekombinantní DNA kódující bIGF-I napojený na proteinovou signální sekvenci stěn "lam" B buněk, sekrecí do periplasmového prostoru E. coli a izolací vyčištěním konvenčními způsoby (včetně gelové filtrace, HPLC na latexu a na obrácených fázích). Tento bIGF-I má aminokyselinovou sekvenci a sekundární strukturu shodnou s AMgenovým lidským IGF-I používaným v příkladu 14. Ve standardních L6 myoblastových testech je jeho aktivita v podstatě stejná (90 až 123 %) jako aktivita bIGF-I z příkladu 14. V infuzi byla použita následující množství bIGF-I: skupina 1 - 2,5 mikrogramu, skupina 2 - 25 mikrogramů, skupina 3 - 250 mikrogramů. Příprava zvířat, infuze a stanovení hmotnosti čtvrtin jejich vemene a DNA se provádí shodně jako v příkladech 3 až 6. Výsledky pro skupinu 1 jsou uvedeny v tabulce 9.

T a b u l k a 9

Účinnosti celkově 12,5 mikrogramů bIGF-I na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso při podávání infuzí do mléčné žlázy (skupina 1)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	408,4	111,7	54,9	1307
B. kontrola průměr (pouze excipient)	369,0	102,7	48,0	1219
C. průměrné zvýšení (A-B)	39,4	9,0	6,9	88
D. % zvýšení (A-B)/B	10,7	8,7	14,2	7,2
E. průměrné procento zvýšení na zvíře	11,0	8,8	16,0	12,5
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,01	0,003	0,03	0,2

V této studii dvě vyšší dávky bIGF (skupiny 2 a 3) neposkytovaly větší nárůst zpracovaných čtvrtin ve srovnání s kontrolními čtvrtinami. Byl však pozorován podstatný růst čtvrtin, jimž nebyla infuze podána. Jestliže se postupy popsané pro skupiny 1 až 3 zopakují, získají se v podstatě shodné výsledky. Ze shrnutí výsledků z původní studie a jeho opakování bylo zjištěno, že zpracované a kontrolní čtvrtiny vemene rostly následujícím způsobem:

T a b u l k a 10

dávky	kontroly	zpracování	spojeno
střední vs. nízká	+ 27 % p menší než 0,08	+ 23,1 % 0,12	+ 25 %
vysoká vs. střední	+ 34,4 % p menší než 0,08	+ 31,5 % 0,09	+ 33 %
vysoká vs. nízká	+ 71,3 % p menší než 0,007	+ 62 % 0,01	+ 67 %

Ke shora uvedenému růstu kontrolních čtvrtin vemene dochází i když se plasmová hladina bIGF-I během studia významně nezvýšila. Výsledky prakticky jsou shodné, jestliže se tyto testy opakuji s jinými březími nelaktujícími kravami chovanými pro maso, které jsou seskupeny na základě v podstatě stejných počátečních objemů vemene, aby se co nejvíce z výsledků odstranily různé proměnné faktory.

Příklad 13

Různé faktory podobné inzulinu

Jetliže se jalovicím, chovaným pro maso nebo pro mléko, nebo březím kravám podá infuzí postupem podle příkladů 10 až 12 celkem 125 mikrogramů až 12,5 miligramu růstového faktoru II podobného inzulinu, vyčištěného v podstatě od všech jiných hovězích peptidů jako v příkladu 1 US patentové přihlášky 888 996 z 31. července 1986, odpovídající evropské patentové přihlášce 86870128.5, jsou výsledky v podstatě stejné jako v příkladech 10 až 12, tj. podstatně se zvýší hmotnosti a DNA zpracovaných čtvrtin vemene.

Příklad 14

Kombinace IGF s EGF

30 ovcí smíšeného plemene se v posledních 35 až 45 dnech březosti krmí dávkou voj-těškového sena a ovčího krmiva. Do každé poloviny vemene se jim infuzí do mléčné žlázy ká-nálkem struku podává 1., 3., 5., 7. a 9. den této studie 2,5 ml excipientu. 15 ovcím se podá Freundova emulze stejného druhu jako v příkladech 1 a 2, dalším 15 ovcím se podá 0,9% fyziologický roztok. Infuze se provádí pomocí A-cath teflonové kanyly, dlouhé 3,2 cm, číslo 16, od firmy C. B. Bard Inc., s tupým koncem pro umístění do katetrů. U každého zví-řete se náhodně označí poloviny vemene pro zpracování excipientem, který dále obsahuje 2,5 mikrogramu myšího EGF toho druhu, který byl použit v příkladech 1 až 2, a 2,5 mikro-gramu lidského IGF-I připraveného expresí rekombinantní DNA a podávaného firmou AMgen Biological Corp., Thousands Oaks, Ca. (Catalog No. 04111, Lot 407; o čistotě vyšší než 90 % podle HPLC). Druhá půlka vemene každého zvířete je určena jako kontrolní, neboť se infuzí do ní podává pouze excipient. Před tím byly struky každého zvířete máčeny 7 po sobě jdou-cích dnů. V den zpracování byl každý struk předem očištěn 70% ethanolem.

Třináctý den se ovce zabijí. Provede se excise jejich mléčných žláz. Z každého veme-ne (vydojené, jestliže je to nutné) se odstraní kůže, načež se rozdělí na pravou a levou polovinu. Každá polovina vemene se homogenizuje se čtyřnásobkem (hmotnostním) vody. Změří se celkový objem homogenátu.

Při stanovení suché hmotnosti každé poloviny vemene se tři 10ml podíly homogenátu zředěného 1 : 5 umístí do předem odvážených pánví, vysuší se přes noc při 60 °C a pak se suší do konstantní hmotnosti.

Při stanovení hmotnosti suché odtučněné tkáně každé poloviny vemene se tři 5ml podí-ly nezředěného homogenátu extrahují způsobem podle Andersona: J. Anim. Sci. 41, 118, (1975) s tím, že se vzorky umístí do předem odvážených skleněných centrifugačních zkumavek (o ve-likosti 25 x 150 mm), extrahují se přes noc 10 ml směsí ethanolu s etherem v poměru 3 : 1, potom se centrifugují (5 minut při 500 otáčkách za minutu) a supernatant se odebere. Pro-vede se druhá extrakce dalšími 10 ml směsí ethanolu s etherem. Vzorek se suší pod dusíkem do konstantní hmotnosti.

DNA v každé polovině vemene se stanoví způsobem podle Burtona: Biochemistry 62315 (1956). Jako testovací roztok se používá roztok 15% trichloroctové kyseliny (TCA) ve 2N kyselině chlorovodíkové. Při tomto stanovení se alikvotní podíly homogenátu žlázy zředí vodou v poměru 1 : 5 a vše se zhomogenizuje. Používají se troje 0,25ml nebo 0,5ml podíly těchto homogenátů. Každý podíl se smíchá se 2 ml testovaného roztoku. Po 30 minutách se vzorky 10 minut odstřeďují při 3 000 otáčkách za minutu. Výsledné pelety se promyjí 2 ml 10% roztoku kyseliny trichloroctové v destilované vodě. Po opětovném odstřeďování se vý-sledné pelety rozbijí ve 2 ml 0,5% kyseliny chloristé a směs se zahřívá 30 minut na 70 °C, aby se extrahovala DNA. Vzorky se odstřeďují. Jeden mililitr každého výsledného supernatan-tu se umístí do zkumavek 12 x 75 mm. Přidají se 2 ml roztoku 1,5 g difenylaminu a 1,5 ml kyseliny sírové ve 100 ml ledové kyseliny octové (bezprostředně před použitím se ke 20 ml tohoto činidla přidá 0,1 ml 1,6% vodného acetaldehydu). Vzorky se smíchají, míchají se ví-řením a inkubují se při teplotě 27 °C. Jako standard se používá DNA brzlíku telete.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

T a b u l k a 11

Účinnosti kombinace mEGF a hIGF-I podané infuzí do mléčné žlázy na ploviny vemen březích ovcí

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	277,3	73,6	75,2	1021,2
B. kontrola průměr (pouze excipient)	264,7	66,2	56,4	849,5
C. průměrné zvýšení (A-B)	12,5	7,4	18,8	171,7
D. % zvýšení (A-B)/B	4,7	11,0	33,0	20,2
E. hladina významnosti zvýšení p je menší než	0,016	0,03	0,001	0,002

Data v tabulce 11 ukazují, že DNA a suchá hmotnost, mokrá hmotnost a suchá hmotnost odtučněných polovin vemen zvířat zpracovaných podle vynálezu byly podstatně zvýšeny ve srovnání s nezpracovanými polovinami, a to s mimořádně vysokými hladinami statistické významnosti.

Příklad 15

Kombinace IGF s EGF

Osm nebřezích jalovic Holstein ve stáří asi 18 měsíců bylo testováno na účinky kombinace IGF-I a lidského EGF podané infuzí do mléčné žlázy podle postupů použitých v příkladech 10 až 12 s tím, že A) objem excipientu v každé infuzi byl 2,5 ml a B) každá infuze obsahovala 6,25 mikrogramu biGF-I a 625 mikrogramů hEGF druhů použitých v příkladech 10 až 12, resp. 1 a 2. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

T a b u l k a 12

Účinnosti kombinace hEGF a biGF-I na čtvrtiny vemen jalovic Holstein při podání infuzí do mléčné žlázy

	mokrý hmotnost g	suchý hmotnost g	suchý odtučněná hmotnost g
A. zpracování průměr	205,1	93,2	10,7
B. kontrola průměr (pouze excipient)	188,2	89,0	9,5
C. průměrné zvýšení (A-B)	16,9	4,2	1,2
D. % zvýšení (A-B)/B	8,9	4,7	12,1
E. průměrné % zvýšení na zvíře	11,3	7,7	18,8
F. hladina významnosti zvýšení p menší než	0,06	0,2	0,09

Data v tabulce 12 ukazují, že mokrá hmotnost, suchá hmotnost a suchá hmotnost odtučněných čtvrtin vemene jalovic Holstein, zpracovaných podle vynálezu, byly podstatně větší než jejich stranově opačných čtvrtin, kterým byl podán pouze excipient, a to ve vysokých hladinách statistické významnosti.

Příklad 16

Kombinace IGF s EGF

Účinky kombinace hovězího IGF-I a lidského EGF při podání infuzí do mléčné žlázy 8 březím nelaktujícím kravám různého plemene, chovaných pro maso, během jejich posledních 40 až 80 dnů březosti se stanoví podle postupů, které jsou popsány v příkladech 10 až 12. Každá podaná infuze obsahovala 25 mikrogramů hEGF toho druhu, který je používán v příkladech 1 až 2, a 250 mikrogramů biGF.I toho druhu, který je používán v příkladech 10 až 12. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

T a b u l k a 13

Účinnosti kombinace biGF-I (celkem 1,25 miligramu) a hEGF (celkem 125 mikrogramů) podané infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso

	mokrý hmotnost g	suchý hmotnost g	suchý odtučněná hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	496,1	156,4	72,0	1392

T a b u l k a 13 - pokračování

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
B. kontrola průměr (pouze excipient)	474,0	144,0	60,7	1 243
C. průměrné zvýšení (A-B)	22,1	12,4	11,3	149
D. % zvýšení (A-B)/B	4,7	8,6	18,7	12,0
E. průměrné % zvýšení na zvíře	8,2	13,0	11,0	12,0
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,1	0,03	0,08	0,15

Jak ukazuje tabulka 13, ty čtvrtiny vemen, které obdržely kombinaci bIGF-I s hEGF, byly důsledně těžší a obsahovaly více DNA než jejich stranově opačné čtvrtiny, které obdržely pouze excipient, a to ve vysokých hladinách statistické významnosti.

Příklad 17 až 18

18 březích jalovic Holstein se ve svých posledních 40 až 60 dnech očekávaného otelení volně ustájí a krmí se dávkou vojtěškového sena a peletovaného koncentrátu. Infuzí do mléčné žlázy se jim kanálkem struku do každé čtvrtiny vemene každý třetí den podá 10 ml excipientu (sterilní sezamový olej) pro řadu níže uvedených zpracování. Jalovice ve skupinách 1 a 3 se zpracovávají pouze do pátého dne před porodem, kdežto jalovice ve skupinách 2 a 4 se zpracovávají ještě i v posledních pěti dnech před porodem. Do obou čtvrtin vemen na jedné straně zvířete byl aplikován excipient obsahující mitogenní látku, zatímco do obou čtvrtin vemen na opačné straně zvířete byl podán samotný excipient. Všechny infuze se provádějí infuzní kanylou od firmy Jorgensen Laboratories, jaká byla použita v příkladech 1 a 2. Každý struk se před infuzí postříká 70% ethanolem a vysuší se a po infuzi se dezinfikuje roztokem jodu.

Skupina	Počet jalovic	Mitogenní látka v excipientu	Počet zpracování rozmezí průměr
1	4	hEGF a IGF-I* (po 0,25 mg)	10 10
2	5	"	7 až 20 14
3	5	BSI** (50 mg)	10 až 20 12
4	4	"	4 až 16 9

* Získané jako v příkladech 1 až 2 a 9 až 11, rozpuštěné (každý 62,5 mikrogramů/ml) v sterilním 0,9% fyziologickém roztoku pro injekce, obsahujícím 0,5 % Tweenu 20, a emulgované ve sterilním sezamovém oleji (olej: fyziologický roztok v poměru 3 : 2) a 5 % Arlacelu A od firmy Sigma Chemical Co., St. Louis).

xx Připravený jako v příkladech 19 až 20 a zředěný na 10 mg/ml v sezamovém oleji jako excipientu. Výsledky viz příklady 21 až 22.

Tato zvířata se během prvních 30 dnů po porodu normálně dojí každé dopoledne a odpoledne, přičemž se produkce mléka odděleně zaznamenává pro každou čtvrtinu vemene. V průměru nepřesahuje produkce mléka polovin vemene zpracovaných ve skupině 2 produkci jejich kontrolních polovin vemene.

T a b u l k a 14

Účinnosti kombinace hEGF a IGF-I podané infusí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích jalovic (skupina 1)

průměrná produkce mléka kg/den		% zvýšení (A-B)/B	hladina významnosti zvýšení
zpracovaná strana (A)	kontrolní strana (B)		p menší než
10,0	9,0	11	0,14

Jak je zřejmé z tabulky 14, daly čtvrtiny vemen, do kterých byla infuzí vpravena kombinace hEGF a IGF-I pouze do pátého dne před porodem, v průměru podstatně více mléka, nežli jejich protilehlé strany, kterým byl aplikován pouze excipient.

Příklady 19 až 20

Somatropiny

24 březích nelaktujících krav různého plemene se v jejich posledních 40 až 80 dnech březosti rozdělí do dvou skupin. Testují se účinky infuze do mléčné žlázy podle postupů z příkladů 3 až 6 s tím, že A) objem excipientu v každé infuzi byl 5 ml a B) každá podávaná infuze obsahovala 1 % soli zinku N-methionylovaného hovězího somatotropinu (BST) (a to skupina 1 - 100 mg, skupina 2 - 40 mg), který se připraví expresí rekombinantní DNA a vyčistí v podstatě tak, jak popisují příklady 1A US patentové přihlášky 787 873 ze 16. října 1985, založené na evropské patentové přihlášce 177 478, zveřejněné 9. dubna 1986. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 15 a 16.

T a b u l k a 15

Účinnosti BST, podaného infuzí do mléčné žlázy v celkovém množství 500 miligramů, na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso (skupina 1)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	790,1	207,6	146,7	2 185
B. kontrola průměr (pouze excipient)	736,6	190,6	141,5	2 054
C. průměrné zvýšení (A-B)	53,5	17,0	5,2	131
D. % zvýšení (A-B)/B	7,3	8,9	3,6	6,4
E. průměrné % zvýšení na zvíře	9,8	10,7	7,9	10,5
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,004	0,03	0,18	0,3

T a b u l k a 1 6

Účinnosti celkem 200 miligramů BST podaného infuzí do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen
březích krav chovaných pro maso (skupina 2)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA /ug
A. zpracování průměr	396,9	96,4	49,5	1 371
B. kontrola průměr (pouze excipient)	345,4	85,1	44,8	1 299
C. průměrné zvýšení (A-B)	51,5	11,3	4,7	72
D. % zvýšení (A-B)/B	14,9	13,3	10,5	5,5
E. průměrné % zvýšení na zvíře	13,4	10,7	7,8	15,8
F. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,007	0,06	0,06	0,1

Data v tabulkách 15 a 16 ukazují na to, že mokrá hmotnost, suchá hmotnost a suchá hmotnost odtučněných čtvrtin vemene březích krav chovaných pro maso, kterým byla podána infuze podle vynálezu, byly podstatně větší než u jejich stranově opačných čtvrtin, kterým byl podán pouze excipient, a že hladina statistické významnosti rozdílů mezi zvětšeními zpracovaných čtvrtin a kontrolních čtvrtin je vysoká.

Příklady 21 až 22

V tabulce 17 jsou uvedeny výsledky, dosažené u jalovic ve skupině 3 z příkladů 17 až 18. V průměru byla produkce mléka, docílená u polovin vemene, které byly zpracovány ve skupině 4 z příkladů 17 až 18, mírně vyšší (o 2 %, p menší než 0,4) nežli produkce mléka jejich kontrolních polovin vemene.

T a b u l k a 17

Účinnosti infuze BST podané do mléčné žlázy na čtvrtiny vemen březích jalovic Holstein (skupina 4)

průměrná produkce mléka kg/den		% zvýšení (A-B)/B	hladina významnosti zvýšení p menší než
zpracovaná strana (A)	kontrolní strana (B)		
10,9	9,8	11	0,15

Jak je zřejmé z tabulky 17, daly čtvrtiny vemen, do kterých byl aplikován BST nejdříve do pátého dne před porodem, v průměru podstatně více mléka, nežli jejich protilehlé strany, kterým byl podáván samotný excipient.

Příklady 23 až 26

Transformující růstové faktory

Jestliže se jalovicím, které se chovají pro mléko nebo pro maso, nebo březím kravám podá infuzí podle postupů a dávkování z příkladů 3 až 6 lidský transformující růstový faktor alfa-typu (od Bachen Inc. Fine Chemicals, Torrance, Ca., USA, katalog č. PGR0-30), získají se v podstatě stejné výsledky, tj. dojde k podstatnému a statisticky významnému zvýšení hmotností a DNA zpracovaných čtvrtin vemene.

Příklady 27 až 29

Inzulín

Jestliže se jalovicím, které se chovají pro mléko nebo pro maso, nebo březím kravám, které se chovají pro mléko nebo pro maso podle postupů z příkladů 3 až 6 podá 25, 100 nebo 250 mg hovězího pankreatického inzulínu (od Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA, katalog č. I-5500, 24 mezinárodních jednotek na miligram) v jedné infuzi, získají se podobné výsledky, tj. dojde k podstatnému a statisticky významnému zvýšení hmotností a DNA zpracovaných čtvrtin vemene.

Příklady 30 až 32

Placentální laktogeny

Jestliže se jalovicím, které se chovají pro mléko nebo pro maso, nebo březím kravám, které se chovají pro mléko nebo pro maso, infuzí podle postupů z příkladů 3 až 6 podá celkem 0,25, 10 nebo 250 miligramů přirozeného hovězího placentálního laktogenu (který se vyčistí způsobem podle Bayatta: Endocrin. 119, 1343 až 1350 (1986), dosáhne se velmi podobných výsledků, tj. dojde k podstatnému a statisticky významnému zvýšení hmotností a DNA zpracovaných čtvrtin vemene.

Příklady 33 až 36

Prostaglandiny

24 březích nelaktujících krav různých plemen, chovaných pro maso, se volně ustájí a krmí se dávkou vojtěškového sena a peletovaného koncentrátu. Do každé čtvrtiny vemene se jim infuzí do mléčné žlázy kanálkem struku aplikuje 1., 3., 5., 7. a 9. den této studie 5 ml excipientu (olej MCT od firmy Mead Johnson Corp., což je triglycid se středně dlouhým řetězcem, a sice lipidová frakce kokosového oleje, tvořená zejména triglycidy mastných kyselin s 8 a 10 uhlíky a obsahující C_8 - 67 %, C_{10} - 23 %, $<C_8$ - 6 %, $>C_{10}$ - 4 %). 48 předních a zadních polovin vemene se náhodně rozdělí do 4 skupin, přičemž vždy do jedné čtvrtiny každé poloviny vemene se aplikuje excipient a její podélně protilehlá čtvrtina vemene se použije jako kontrola. Při těchto infuzích obsahoval excipient Prostaglandin (PG) E_1 nebo E_2 od firmy Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO. (katalog č. 86F-0406 a -0404). Množství PG v každé infuzi činila: skupina 1 - 87,5 mikrogramů E_2 , skupina 2 - 875 mikrogramů E_2 , skupina 3 - 87,5 mikrogramů E_1 , skupina 4 - 875 mikrogramů E_1 . Zvířata byla připravena a infuze byly aplikovány jako v příkladech 17 až 18. Účinnosti byly stanoveny jako v příkladech 1 až 2. Výsledky pro skupiny 1 až 4 jsou uvedeny v tabulkách 18 až 21.

T a b u l k a 18

Účinnosti Prostaglandinu E_2 podaného infuzí do mléčné žlázy v celkovém množství 0,4375 miligramů na čtvrtiny vemene březích krav chovaných pro maso (skupina 1)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučná hmotnost g	DNA mg
A. zpracování průměr	1 966,9	525,5	351,8	5 203
B. kontrola průměr (pouze excipient)	1 735,5	484,9	297,8	4 724
C. průměrné zvýšení (A-B)	231,4	40,6	54,0	479
D. % zvýšení (A-B)/B	13,3	8,3	18,1	10,1
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,01	0,04	0,18	0,02

T a b u l k a 19

Účinnosti Prostaglandinu E₂ podaného infuzí do mléčné žlázy v celkovém množství 4,375-miligramů na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso (skupina 2)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA mg
A. zpracování průměr	1 030,8	312,7	194,5	3 397
B. kontrola průměr (pouze excipient)	742,0	219,0	144,3	2 348
C. průměrné zvýšení (A-B)	288,8	93,7	50,2	1 049
D. % zvýšení (A-B)/B	38,9	42,8	34,8	44,6
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,0003	0,0001	0,004	0,001

T a b u l k a 20

Účinnosti Prostaglandinu E₁ podaného infuzí do mléčné žlázy v celkovém množství 0,4375 miligramů na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso (skupina 3)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučněná hmotnost g	DNA mg
A. zpracování průměr	972,5	259,3	180,9	2 881
B. kontrola průměr (pouze excipient)	778,0	210,6	200,3	2 284
C. průměrné zvýšení (A-B)	194,5	48,7	(19,4)	597
D. % zvýšení (A-B)/B	25,0	23,0	(9,7)	26
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,002	0,002	0,58	0,07

T a b u l k a 2 1

Účinnosti Prostaglandinu E_1 podaného infuzí do mléčné žlázy v celkovém množství 4,375 miligramů na čtvrtiny vemen březích krav chovaných pro maso (skupina 4)

	mokrý hmotnost g	suchá hmotnost g	suchá odtučená hmotnost g	DNA mg
A. zpracování průměr	1 435,5	379,6	247,7	4 218
B. kontrola průměr (pouze excipient)	949,3	268,2	189,0	2 792
C. průměrné zvýšení (A-B)	486,2	111,4	58,7	1 426
D. % zvýšení (A-B)/B	51,2	41,5	31,0	51,1
E. hladina významnosti % zvýšení p menší než	0,03	0,02	0,07	0,06

Jak je zřejmé z tabulek 18 až 21, byly čtvrtiny vemen, kterým byly aplikovány prostaglandiny, vždy těžší a obsahovaly více DNA nežli jejich podélně protilehlé kontrolní čtvrtiny, kterým byl podán pouze excipient, a to obvykle při velmi vysokých hladinách statistické významnosti.

I když biologické mechanismy tohoto vynálezu nejsou zcela jasné, je zřejmé, že je lze využít v souladu s konvenčně uznávanými kritérii ke zvýšení parenchymu mléčné žlázy a k odpovídajícímu zvýšení produkce mléka živočicha, jemuž byla aplikována infuze, a že tato schopnost bude přetrvávat v následujícím laktčním období živočicha a v mnoha případech při mnoha dalších laktacích.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob zvýšení nárůstu parenchymu mléčné žlázy zdravého, fyziologicky normálního hospodářského zvířete aplikací růstových faktorů a/nebo jiných mitózu ovlivňujících látek v průběhu březosti nebo v době mezi nástupem puberty a první březostí, vyznačující se tím, že se působí na mléčnou žlázu intracisternální infuzí prostředku, který obsahuje alespoň jednu účinnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující epidermální růstový faktor, růstový faktor typu inzulinu, somatotropin, transformující růstový faktor, insulin, placentální laktogen, prostaglandiny, jejich směs a/nebo jejich syntetické analogy.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se aplikuje jednotková dávka obsahující 2 mikrogramy až 100 miligramů účinné látky.