

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **016039**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2012.01.30**

(21) Номер заявки  
**200702401**

(22) Дата подачи заявки  
**2006.05.02**

(51) Int. Cl. *A01N 37/18* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)

---

### (54) СПОСОБЫ УХОДА ЗА ЛАКТИРУЮЩИМИ ЖИВОТНЫМИ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИХ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

---

(31) **60/676,292; 60/688,697**

(32) **2005.05.02; 2005.06.09**

(33) **US**

(43) **2008.08.29**

(86) **PCT/IL2006/000524**

(87) **WO 2006/117784 2006.11.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**МИЛЕУТИС ЛТД.; СТЕЙТ ОФ  
ИЗРАИЛЬ, МИНИСТРИ ОФ  
ЭГРИКАЛЧЕР ЭНД РУРАЛ  
ДЕВЕЛОПМЕНТ, ЭГРИКАЛЧЕРАЛ  
РЕСЕРЧ ОРГАНИЗЕЙШН (IL)**

(56) **US-6391849  
US-20050220801  
US-6780844**

(72) Изобретатель:  
**Искович Хосе Марио, Силаникове  
Ниссим, Искович Хавьер (IL)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к способу уменьшения продолжительности сухостойного периода между циклами лактации у лактирующего животного из поголовья домашнего скота, к способу улучшения гигиенических показателей молока лактирующего животного и к способу предотвращения болей, связанных с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения лактирующего животного, и к способу лечения молочной железы посредством введения по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим пептиды, выделенные из казеина в форме стерильного раствора, которые являются прозрачными и, по существу, лишенными мицелл.

**B1****016039****016039****B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к пептидам, выделенным из казеина, и их применению в уходе за лактирующими животными, в особенности относится к способам уменьшения продолжительности сухостойного периода лактирующего животного из поголовья домашнего скота, для увеличения выхода молока и качества молока после родов и для улучшения состояния поголовья домашнего скота. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, включающим пептиды, выделенные из казеина в форме стерильного раствора, который является чистым и, по существу, лишенным мицелл.

### Уровень техники

Казеин (CN) является преобладающим белком в молоке человека и млекопитающего, отличного от человека. Казеин был охарактеризован ранее, как состоящий из трех фракций,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , согласно электрофоретической подвижности каждой фракции (Hipp et al., 1952. Dairy Sci., 35:272). Сегодня казеин определяют согласно аминокислотным последовательностям каждой из подгрупп  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  и  $\kappa$  (Engel et al., 1984. J. Dairy Sci. 67:1607-1608).

Ферментативный гидролиз казеина высвобождает пептиды, которые могут вносить вклад в здоровье и правильное развитие молодняка (FitzGerald et al., 1998. Int. Dairy J. 8:451-457) и служить в качестве локальных регуляторов функции молочной железы (Silanikove et al., 2000. Life Sci. 67:2201-2212; Shamay et al., 2002. Life Sci. 70:2707-2719). Сериновая протеаза, плазмин является превалирующей протеазой в молоке, и известно, что она производит из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина устойчивые к кипению пептиды (протеозы-пептоны).

Протеозы-пептоны (PPs), также известные как казеиновые фосфопептиды (CPP), составляют примерно треть белков сыворотки молока (Andrews, 1983. J. Dairy Res. 50:45-55). Плазмин обнаружен в молоке, в основном в его не активной форме плазминогена, и превращение плазминогена в плазмин модулируется с помощью плазминогеновых активаторов (Politis I., 1996. J. Dairy Sci. 79:1097-1107).

Было показано, что выделенные из казеина пептиды имеют несколько биологических активностей и применений. Исследования состава молока продемонстрировали наличие бактерицидной активности, относящейся к казеину. US патент № 3764670 описывает новые полипептиды, выделенные из казеина, обладающие свойствами антибиотиков против микроорганизмов.

Также наблюдалась иммуно-модулирующая активность казеиновых пептидов. Например, международная PCT патентная заявка WO 01/13739 описывает способ усиления иммунитета млекопитающих и ускорения их роста путем непосредственного введения или введения из пищи белков, содержащих фосфорилированные аминокислоты, такие как казеиновые фосфопептиды. Поскольку усиливался иммунитет млекопитающих, их сопротивление против инфекционных заболеваний укреплялось, и устранялись факторы, ингибирующие их рост, таким образом, осуществлялось ускорение роста млекопитающих.

В публикациях патентах заявок US №№ 20020147144 и 20040167073 описаны биологически активные пептиды, которые выделены из последовательностей или являются подобными последовательностям, идентичным N-концу  $\alpha$ S1 фракции молочного казеина, которая способна стимулировать и усиливать иммунный ответ, защищать против вирусной инфекции, нормализовать уровень холестерина в сыворотке и стимулировать кроветворение.

Публикация международной патентной заявки WO 2005/081628 описывает биологически активные пептиды, которые выделены из или являются подобными последовательностям  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ - или  $\kappa$ -казеиновых фракций молочного казеина, способных к иммуномодуляции и другим терапевтическим активностям, включающим, но не ограниченным ими, стимулирование и усиление иммунного ответа, защиту против вирусной инфекции, нормализацию уровня холестерина в сыворотке и стимулирование кроветворения. Выделенные из казеина пептиды являются не токсичными и могут применяться для лечения и предотвращения иммунных патологий, диабета, гиперхолестеринемии, гематологических заболеваний и заболеваний, связанных с вирусными инфекциями.

Европейская патентная заявка № EP 1375513 описывает, что среди пептидов, выделенных из казеина, пептиды, имеющие аминокислотные последовательности, включающие многочисленные фосфосериновые остатки, показывают сильную иммуно-усиливающую активность. Специфически изобретение относится к иммуно-усиливающему агенту, включающему пептид, состоящий из аминокислотной последовательности Q1-SerP-X-SerP-Q2, где SerP представляет фосфосериновый остаток, X представляет от одного до трех любых аминокислотных остатков и Q1 и Q2 независимо отсутствуют или представляют по меньшей мере один аминокислотный остаток.

Патент US № 6391849, принадлежащий одному из авторов настоящего изобретения и коллегам, описывает выделенные из казеина протеозы-пептоны, которые действуют как хелаторы кальция, и их применяют для контроля физиологических изменений в молочной железе, включающих временное или стабильное прекращение молочной продуктивности, для индукции инволюции и предотвращения, лечения и обратимости инфекций.

Было показано, что казеиновые фосфопептиды обладают уникальным свойством - способностью связывать макроэлементы, такие как Ca, Mg и Fe, вместе со следовыми элементами, такими как Zn, Ba,

Cr, Ni, Co и Se, которые могут солюбилизоваться в тонком кишечнике и, таким образом, становиться доступными для всасывания. Как таковые CPP применяют в качестве добавок в напитках и детском питании и в стоматологических лекарственных средствах. Например, патент US № 5834427 описывает очищенный казеиновый фосфопептид (CPP), имеющий новую аминокислотную последовательность, и очищенный казеин, включающий указанную последовательность. CPP или казеин, содержащий указанную последовательность, имеет улучшенную способность к солюбилизации минералов и их всасыванию у животных. CPP или  $\beta$ -казеин-N, содержащий указанную последовательность, может быть добавлен в эффективном количестве для усиления минерального всасывания у животных в пищевые продукты, напитки, лекарственное средство, косметические средства, в корма. Композиция для перорального применения, включающая  $\beta$ -казеин-N или CPP по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, может уменьшать или ослаблять дентинную гиперчувствительность.

Патент US № 5227154 описывает способ для контроля за зубным камнем путем лечения зубов с применением пероральной композиции, которая включает специфические казеиновые фосфопептиды и/или их соли. US патент № 6652875 описывает состав для доставки биоактивных составляющих к биологическим поверхностям, включающим зубные поверхности, такие как зубы и десны, где указанный состав включает суспензии или водный раствор по меньшей мере одного выделенного или очищенного казеинового белка или его соли вместе по меньшей мере с одной биоактивной составляющей.

Были предложены разнообразные способы для получения казеиновых гидролизатов, специфически CPP. Например, патент US № 4740462 описывает получение CPP путем гидролиза казеина с помощью кристаллического трипсина с последующим фракционированием и разделением с помощью ультрафильтрации или методов хроматографии, таких как гель-проникающая хроматография или ионообменная хроматография. Этот способ может иметь некоторое применение для исследования, но он не является удобным или экономичным в промышленном масштабе. Другие способы включают применение токсичных веществ, таких как хлорид бария, которые неприемлемы в пищевых продуктах и/или фармацевтических композициях.

Невзирая на применяемый способ получения, раствор, содержащий казеиновый гидролизат, имеет тенденцию быть мутным. Мутность рассматривается как значительное неблагоприятное условие в фармацевтических композициях, также как в некоторых пищевых продуктах, специфических напитках, поскольку бывает трудно или невозможно визуально проследить изменения в мутной композиции, в особенности детектировать контаминации. US патент № 5405756 описывает способ для получения казеинового фосфопептида, удобного для применения в качестве добавки к напиткам без влияния на прозрачность напитка; однако, полученный белок содержит кальций и, кроме того, чистый раствор получают только при кислом pH.

#### **Уход за лактирующими животными из поголовья домашнего скота**

В современной молочной отрасли лактирующие животные стадами проходят через контролируемые циклы лактации и беременности, как таковые режимы вносят вклад в значительное увеличение молочной продуктивности. При уходе за молочными стадами по настоящему изобретению, например стадами коров и коз, существует значительное перекрытие между периодами лактации и беременности, где "сухостойный период" устанавливают между 50 и 70 днями перед родами путем прекращения доения. Этот режим применяют, чтобы прийти к компромиссу между необходимостью стимулировать инволюцию, необходимого процесса для последующего здорового периода лактации, и требованием высокой молочной продуктивности на протяжении всего года.

Прекращение удаления молока приводит к быстрым изменениям в секреции молочной железы и к иницированию процесса активной инволюции молочной железы. Этот процесс включает всестороннюю и высокоорганизованную последовательность изменений в ткани и композиции молока, которая осуществляется во время переходного периода между лактирующим и не лактирующим состояниями. Во время первой стадии инволюции молочной железы процесс инициируется локальными стимулами, которые инициируют апоптоз, но инволюция может стать обратимой при повторном иницировании удаления молока (Capuco and Akers, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:137-144; Wilde et al., 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:129-136). Этот локальный контроль может вызывать инволюцию, когда стимулируется застой молока в индивидуальных железах, как наблюдалось у лактирующих коз после одностороннего прекращения доения (Quarrie et al., 1994. Biochem. Soc. Trans. 22: 178S), или у лактирующих мышей после уплотнения сосков (Li et al., 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 3425-3430; Marti et al., 1997. Eur. J. Cell. Biol. 73:158-165).

Вторая стадия инволюции является стабильной, и удаление молока не может вызвать возобновления секреции молока (Capuco and Akers, 1999, *ibid*; Wilde et al., 1999, *ibid*). Обратимость второй стадии инволюции может осуществляться только в последующей лактирующей стадии после освобождения от бремени. Эта стадия характеризуется активацией протеаз, которые разрушают лобулярно-альвеолярную структуру железы путем деградации внеклеточного матрикса и основания мембраны, а также массовой потерей альвеолярных клеток.

Прекращение доения для стимулирования инволюции связано с увеличенным риском развития мас-

тита, заболевания, вызванного интрамаммарной инфекцией (IMI) патогенами, главным образом бактериями, но также дрожжами, грибами или даже водорослями. Мастит может быть клиническим с локальными (и в некоторых случаях общими) признаками и аномалиями молока или субклиническим с потерями продуктивности и пониженным качеством молока.

Современные молочные коровы, переходя обычно в сухостойный период, все еще производят 20-40 л молока в день. Таким образом, застой молока может вызвать протекание благодаря секреции молочной железы, которое, по существу, увеличивает риск приобретения интрамаммарной инфекции. Обычный запуск, приводящий к продолжительной инволюции, обычно связан с повышенной степенью IMI. Клинический и субклинический мастит связан со значительными экономическими потерями из-за непригодного молока (меньше сельскохозяйственная продуктивность), пониженному качеству молока (меньше доход), ранней выбраковке коров (меньше генетический потенциал), затратам на лекарственные средства, ветеринарным расходам и увеличенным затратам на рабочую силу для фермера. Мастит является заболеванием, истощающим молочные стада, на которое только в молочной отрасли в USA ежегодно затрачивается примерно 2 млрд долларов.

Ранее было показано одним из авторов настоящего изобретения и коллегами, что фракция чистого  $\beta$ -казеина ( $\beta$ -CN) 1-28 уменьшает секрецию молока у коров и коз. Активность этого пептида коррелировалась с его способностью блокировать калиевые каналы в апикальных мембранах эпителия молочной железы (Silanikove et al., 2000, *supra*).

Было также показано, что инъекция неочищенного вещества казеинового гидролизата (CNH) в вымя козы или коровы имитирует природное явление инволюции, стимулируя локальный противовоспалительный ответ и потерю целостности межклеточных непроницаемых перегородок (TJ), с последующим быстрым запуском секреции молочной железы (US патент № 6391849; Shamay et al., 2002, *ibid*; Shamay et al., 2003. *J. Dairy Sci.* 86:1250-1258). Процесс, стимулируемый с помощью CNH, был более быстрым, чем процесс, стимулируемый с помощью природного запуска. Эти результаты выявляют, что возможно значительно уменьшить время, требуемое для инволюции. Однако все еще остается неочевидным, возможно ли сократить или пропустить сухостойный период без влияния на выход молока в последующий период лактации. Annen et al. (2004. *J Dairy Science* 87:3746-3761), показали, что лечение многократно рожающих коров бычьим соматотропином (bST) давало возможность сокращения и даже пропуска сухостойного периода без уменьшения молочной продуктивности; однако это лечение не было настолько эффективным для коров, рожающих в первый раз. Кроме того, ранее было показано, что лечение с помощью bST вызывает мастит, заболевания репродуктивной системы и другие заболевания, связанные с продуктивностью, и что такое лечение увеличивает заболевания опорно-двигательного аппарата.

В последние десятилетия на Западе состояние сельскохозяйственных животных находится в зоне увеличенного общественного внимания (Broom D.M. 1992 In: Phillips et al., Eds. *Farm Animals and the Environment*. CAB Wallingford UK pp 245-253). Недавняя разработка по практике стойлового содержания и ухода за сельскохозяйственными животными при системах интенсивной продуктивности отражает увеличение моральной стороны заботы о состоянии сельскохозяйственных животных (Fregonesi et al., 2001. *Livestock Production Sci.* 68:205-216; Fregonesi et al., 2002. *Livestock Production Sci.* 78:245- 257). Улучшение состояния животных, определенное как предотвращение боли и увеличение присутствия положительных ощущений, или комфорт являются важными факторами в уходе за поголовьем домашнего скота (Broom, 1992, *ibid*). Оценки ухудшенного биологического функционирования, в особенности связанные с ухудшением здоровья и увеличением физиологических ответов на стресс, применяют, чтобы оценить статус состояния сельскохозяйственных животных.

Существует неудовлетворенная необходимость в эффективном безопасном лечении для уменьшения сухостойного периода молочного стада без негативного влияния на выход молока, для увеличения выхода молока и качества и для поддержания и/или улучшения состояния животных из поголовья домашнего скота. Кроме того, было бы очень полезно иметь фармацевтические композиции в форме чистого, легкого в применении раствора, включающего выделенные из казеина пептиды.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится в основном к уходу за лактирующими животными из поголовья домашнего скота и к фармацевтическим композициям, включающим выделенные из казеина пептиды. Настоящее изобретение в особенности относится к способам уменьшения продолжительности сухостойного периода, установленного для лактирующих животных, для увеличения их выхода молока и качества молока, и для предотвращения боли, связанной с инфекцией молочной железы и внезапным прекращением доения. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где композиции представлены в форме чистого стерильного раствора, по существу, лишенного казеиновых мицелл, и включает пептиды, имеющие, по существу, неизменный низкий молекулярный вес примерно от 1000 примерно до 5000 Да.

Обычной практикой в стадах, поддерживаемых для молочной продуктивности, является принуждение к прекращению молочной продуктивности перед ожидаемыми родами. Период без лактации, определенный как "сухостойный период", является очень важным для здоровья животного и для поддержания

его способности производить молоко. До настоящего времени сухостойный период от 50 до 70 дней являлся отраслевым стандартом. Оказалось что можно сократить продолжительность сухостойного периода без негативного влияния на выход молока после родов. В настоящем изобретении описан способ увеличения выхода молока после родов по сравнению с выходом молока в период лактации перед родами. Таким образом, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения продолжительности сухостойного периода между циклами лактации у лактирующего животного, включающий введение лактирующему животному по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), и где выход молока в период доения, следующий за сухостойным периодом, является, по меньшей мере, таким же, как выход молока в период доения, предшествующий сухостойному периоду.

Согласно определенным воплощениям сухостойный период уменьшается до менее чем 50 дней, предпочтительно до менее чем примерно 40 дней, более предпочтительно до периода между примерно 20 и примерно 30 днями.

В способе пептид вводят одновременно с прекращением доения. Фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина. Фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, ее фрагмент, аналог или производное, раскрытые в описании, или фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и аналогов, производных и фрагментов указанных последовательностей, раскрытых в описании.

Пептид вводят по меньшей мере в один сосковый канал молочной железы. Выход молока в период доения, следующий за сухостойным периодом, увеличивается по сравнению с выходом молока в период доения, предшествующий сухостойному периоду.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предлагается способ улучшения гигиенических показателей молока лактирующего животного, включающий введение в молочную железу лактирующего животного по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с мол. массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), чтобы уменьшить число соматических клеток (SCC) в молоке по сравнению с числом (SCC), обнаруженных в молоке до введения пептида, причем число соматических клеток в молоке после введения пептида составляет менее чем 400000 клеток/мл.

Согласно настоящим определенным предпочтительным воплощениям SCC уменьшается во время цикла лактации, следующего за сухостойным периодом, который устанавливают после применения лечения.

Фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина.

Фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и аналогов, производных или фрагментов указанных последовательностей, раскрытых в описании.

Указанный пептид вводят по меньшей мере в один сосковый канал молочной железы лактирующего животного и одновременно с прекращением доения.

Инфекция молочной железы и/или внезапное прекращение доения вызывают боль и стресс у животного. Не только из-за того, что такой стресс уменьшает продуктивность болеющего животного, но и благодаря увеличенной осведомленности об основных условиях животных в системах с высокоинтенсивной продуктивностью, звучат требования о разработке способов для улучшения состояния таких животных из поголовья домашнего скота. В настоящем изобретении описано, что возможно уменьшить или даже предотвратить боль, связанную с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предлагается способ предотвращения болей, связанных с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения лактирующего животного из поголовья домашнего скота, включающий введение в молочную железу лактирующего животного по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), таким образом улучшая состояние лактирующего животного.

Согласно определенным воплощениям улучшение состояния лактирующего животного измеряют по уменьшению количества шагов в день и по продолжительности периода лежки в день указанного животного. Согласно еще одному воплощению по меньшей мере один пептид, выделенный из казеина, вводят в инфицированную молочную железу. Согласно другому воплощению пептид или пептиды вводят в не инфицированную молочную железу.

Согласно определенным воплощениям, в способах по настоящему изобретению применяют пептиды, выделенные из казеина, которые являются фосфопептидами. Согласно следующему воплощению фосфопептид выбран из группы, состоящей из фосфопептида, выделенного из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина,  $\alpha$ S2-казеина. Согласно настоящим определенным предпочтительным воплощениям, фосфопептид, применяемый согласно способам по настоящему изобретению, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 5 и их аналогов, производных или фрагментов. Согласно дополнительным настоящим предпочтительным воплощениям в способах по настоящему изобретению применяют фосфопептид, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из аналогов, производных и фрагментов последовательностей SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 5. Может применяться как один тип пептида, так и множество типов пептида.

Согласно определенным воплощениям, способы по настоящему изобретению включают внутриканальное введение по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина. Согласно настоящим определенным предпочтительным воплощениям способы включают введение в сосковый канал молочной железы лактирующего животного. Введение в сосковый канал может осуществляться путем инъекции или вливания. По меньшей мере один пептид может быть введен в одну или более молочных желез, включая одновременное введение во все молочные железы лактирующего животного. Согласно другому воплощению способ для увеличения выхода молока после родов и во время последующего периода лактации включает введение в момент прекращения доения, обычно примерно за 60 дней перед ожидаемыми родами, предпочтительно примерно за 40 дней, более предпочтительно примерно за 30 дней перед родами по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина. Дозирование и повторяемость стадий введения по меньшей мере одного пептида выбраны из группы так, чтобы получить увеличение в выходе молока после родов. Согласно определенным воплощениям, пептид вводят по меньшей мере в одну молочную железу 1 или более раз, обычно 1-3 раза с интервалом, выбранным из группы, состоящей из примерно 6, примерно 8, примерно 12, примерно 16, примерно 20 или примерно 24 ч. Согласно одному настоящему наиболее предпочтительному воплощению по меньшей мере один пептид вводят только один раз. Согласно дополнительному настоящему предпочтительному воплощению пептид вводят во все молочные железы вымени. Согласно определенным воплощениям среднее увеличение выхода молока составляет по меньшей мере примерно 3%, предпочтительно по меньшей мере примерно 6%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 9%, наиболее предпочтительно примерно от 10 до примерно 25%.

Согласно еще следующим воплощениям увеличение качества молока получают путем введения в начале сухостойного периода, обычно примерно за 60 дней перед ожидаемыми родами, по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина. Дозирование и повторяемость стадий введения в молочную железу выбраны так, чтобы уменьшить SCC и получить увеличение качества молока в период лактации, следующий за указанным сухостойным периодом. Согласно одному настоящему наиболее предпочтительному воплощению по меньшей мере один пептид вводят только один раз.

Согласно дополнительным воплощениям, способ для предотвращения боли, связанной с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения, включает одно введение выделенного из казеина пептида или пептидов.

В ходе исследования новых способов, описанных в настоящем изобретении, авторы осознали необходимость для улучшения композиций, включающих выделенные из казеина пептиды.

Пептиды, выделенные из казеина, которые обычно представляют собой гидролизат ферментативного гидролиза казеина, известны благодаря их пищевой ценности, и как таковые применяются в клиническом питании, в составах детского питания и для обогащения белком пищи и напитков. Также предполагается, что гидролизаты казеина имеют фармацевтические применения. Такие вещества обычно продаются в виде сухого порошка для восстановления непосредственно перед применением с подходящим носителем, например со стерильной водой. Полученный раствор подвержен контаминации благодаря его высокой пищевой ценности, тогда как его мутность мешает непосредственной идентификации контаминации. Кроме того, мутные вещества имеют тенденцию выпадать в осадок.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что дополнительная фильтрация мутного вещества казеина через фильтр от примерно 0,1 до примерно 0,5 мкм предпочтительно через фильтр ниже 0,25 мкм, по существу, удаляет казеиновые мицеллы, присутствие которых является главной причиной мутности. Кроме того, после фильтрации композиция включает пептиды в пределе от примерно 1000 до примерно 5000 Да. Этот размерный предел включает предпочтительную популяцию выделенных из казеина пептидов, специфических фосфопептидов, таких, что процесс фильтрации дополнительно предлагается для композиции, включающей, по существу, одинаковые выделенные из казеина пептиды,

имеющие молекулярный вес в пределе от 1000 до 5000 Да.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция для введения лактирующему животному, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO: 1), которая представлена в форме готового к применению стерильного прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл, имеющего pH выше 6,0.

Следует понимать, что хотя фармацевтические композиции по настоящему изобретению были получены путем вышеописанной фильтрации, они могут быть получены любым известным из уровня техники способом для удаления веществ размером выше, примерно, 0,25 мкм и/или пептидов с молекулярным весом выше 5000 Да, таким способом, как ультрафильтрация, диализ и подобным.

Согласно следующим воплощениям, фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество фосфопептида, выбранного из группы, состоящей из фосфопептида, выделенного из  $\beta$ -казеина, фосфопептида, выделенного из  $\alpha$ S1-казеина, фосфопептида, выделенного из  $\alpha$ S2-казеина и их комбинации. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 2, ее аналогов, производных или фрагментов. Согласно дополнительным настоящим предпочтительным воплощениям фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 3, ее аналогов, производных или фрагментов. Согласно еще другим настоящим предпочтительным воплощениям фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 4, из пептида, включающего аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 5 и их аналогов, производных и фрагментов. Согласно дополнительным воплощениям фармацевтическая композиция включает множество пептидов, выделенных из казеина, как описано выше. Согласно еще одному воплощению фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество пептида, состоящего, по существу, из аминокислотной последовательности, представленной в виде любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или их аналогов, производных и фрагментов или любой их комбинации, имеющей молекулярный вес в пределе от примерно 1000 до примерно 5000 Да.

Пептид, выделенный из казеина, может быть получен путем гидролиза казеина, или это может быть синтетический пептид. Синтетические пептиды могут быть получены, как описано здесь выше и как известно специалисту в данной области.

Согласно еще одному воплощению содержание белка в фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет примерно от 10 нг/мл до примерно 15 мг/мл. Это количество является эффективным при терапевтическом применении, пока раствор является чистым. Согласно еще одному воплощению мутность композиции составляет менее чем 6 нефелометрических единиц мутности (NTU). Согласно другому воплощению pH композиции составляет от примерно 6,0 до примерно 8,0.

Фосфопептиды в композициях по настоящему изобретению являются высокостабильными в широком температурном пределе. Согласно еще одному воплощению фосфопептиды являются устойчивыми к нагреванию, так что потеря активности наблюдается, когда композицию, включающую пептиды, нагревают до 50-70°C в течение 15 мин. Согласно другому воплощению фосфопептиды являются устойчивыми к замораживанию, так что композицию можно хранить при -20°C в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 12 месяцев.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO: 1), которая представлена в форме лиофилизованного порошка и перед применением порошок восстанавливают до жидкой формы с образованием прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл и имеющего pH выше 6,0.

Следует понимать, что новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению, включающие по меньшей мере один выделенный из казеина пептид, в особенности выделенный из казеина фосфопептид, которые представлены в форме чистого стерильного раствора, удобны для применения в новых способах для ухода за поголовьем домашнего скота, описанных выше. В качестве альтернативы эти фармацевтические композиции также могут применяться для любого другого применения таких пептидов, известного из уровня техники, как описано выше в главе "Уровень техники".

Согласно определенным воплощениям композиция включает терапевтически эффективное количество фосфопептида, выделенного из казеина. Согласно дополнительным воплощениям фосфопептиды в фармацевтической композиции имеют средний молекулярный вес от примерно 1000 до примерно 5000 Да. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям средний молекулярный вес составляет примерно 2500 Да.

Новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению оказались удивительно эффективными в лечении молочной железы у любого лактирующего животного, включая человека; у животных из поголовья домашнего скота, выращиваемых для мясной или молочной продуктивности, включающих коров, коз, овец и буйволов; у других животных из поголовья домашнего скота, включающих верблюдов, лам, лошадей и свиней; и у домашних животных, включающих кошек и собак.

Согласно определенным воплощениям лечение выбрано из группы, состоящей из стимулирования временного прекращения молочной продуктивности, стимулирования стабильного прекращения молочной продуктивности и стимулирования инволюции.

Преимущественно фармацевтические композиции по настоящему изобретению стимулируют инволюцию через период времени около 3 дней без негативного влияния на восстановление тканей молочной железы к следующему периоду лактации. Кроме того, инволюцию можно стимулировать на любой стадии цикла лактации, включая пик лактации.

Согласно еще другому аспекту новая фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применяется для предотвращения и лечения микробных инфекций и обратимости инфекций.

Композиции являются эффективными в лечении инфекций, вызванных широким кругом патогенов, включающих, но не ограниченных ими, грамположительные, так же как грамотрицательные бактерии, грибки, микоплазму и вирусы. Согласно еще одному воплощению композиции по настоящему изобретению являются эффективными в лечении микробных инфекций, которые вызывают мастит. Таким образом, фармацевтические композиции, предлагаемые по настоящему изобретению, уменьшают зависимость от антибиотиков при лечении инфекций, включающих инфекции молочной железы, облегчают решение обеих проблем - и проблемы инфекций, устойчивых к антибиотикам, и проблемы остатков антибиотика, присутствующих в молоке в случае мастита. В качестве альтернативы фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводить в комбинации с дополнительной антимикробной терапией. Согласно еще одному воплощению фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с антимикробным агентом, выбранным из группы, состоящей из антибиотика, бактерицида, стероидного противовоспалительного агента и нестероидного противовоспалительного агента. Комбинированная терапия может уменьшить требуемую дозу вышеуказанного агента и/или усилить его терапевтический эффект. Согласно другому воплощению фармацевтическую композицию вводят в комбинации с вакциной. Согласно следующему воплощению фармацевтическую композицию вводят в комбинации с иммуномодулятором.

В дополнение к эффективному лечению мастита во время лактации новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению успешно преодолевают проблему стабильности маститных инфекций от одного цикла лактации к следующему при введении в момент стимулирования сухостойного периода.

Новую фармацевтическую композицию по настоящему изобретению обычно включают в состав для парентерального введения. Согласно еще одному воплощению фармацевтическая композиция включена в состав для внутриканального введения, например, путем вливания или инъекции. Согласно одному настоящему предпочтительному воплощению фармацевтическая композиция включена в состав для инъекции в полость железы через сосковый канал лактирующего животного. Фармацевтическая композиция может быть также включена в состав для местного применения на груди или вымени в виде геля, мази, крема, эмульсии или в состав для продолжительного высвобождения, включающий трансдермальный пластырь. В качестве альтернативы фармацевтические композиции по настоящему изобретению включены в состав для систематического перорального введения.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где композиция представлена в форме чистого, легкого в применении стерильного раствора, по существу, лишенного мицелл, имеющего pH выше 6,0, для применения, выбранного из группы, состоящей из стоматологического применения и терапевтического применения, но не ограниченной этими применениями. Эти известные применения описаны, например, среди других применений в патентах US №№ 5227154; 5834427 и 6652875; европейской патентной заявке № EP 1375513; в публикациях международных патентных заявок WO 01/13739 и WO 2005/081628 и в публикациях патентных заявок US №№ 20020147144 и 20040167073.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предлагается способ лечения молочной железы, включающий введение лактирующему животному фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), которая представлена в форме готового к применению стерильного прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл и имеющего pH выше 6,0, где лечение молочной железы выбрано из группы, состоящей из стимулирования временного прекращения продукции молока, индуцирования стабильного прекращения продукции молока, стимулирования инволюции и предотвращения, лечения или реверсирования микробиологической инфекции.



Инфекцией, подлежащей лечению, является мастит, и композицию вводят в инфицированную молочную железу лактирующего животного. Фармацевтическую композицию вводят в период лактации при прекращении доения или во время сухостойного периода.

Фармацевтическую композицию вводят в комбинации с дополнительным антимикробным средством, выбранным из группы, состоящей из антибиотиков, бактерицидных средств, стероидных и нестероидных противовоспалительных средств, иммуномодуляторов и вакцин.

Лактирующее животное выбрано из группы, состоящей из коровы, козы, овцы, буйволицы, верблюдицы, ослицы, ламы, лошади, свиньи, кошки и собаки.

Лактирующим животным может являться человек.

Согласно еще одному воплощению лечение выбрано из группы, состоящей из стимулирования временного прекращения молочной продуктивности, стимулирования стабильного прекращения молочной продуктивности и стимулирования инволюции.

Согласно определенным воплощениям инфекцией является мастит, включающий как субклинический, так и клинический мастит, и композицию вводят в инфицированную молочную железу лактирующего животного. Согласно еще одному воплощению, фармацевтическую композицию вводят во время периода лактации, чтобы лечить мастит во время доения. Согласно другому воплощению фармацевтическую композицию вводят в конце цикла лактации или во время сухостойного периода. Введение в начале и во время сухостойного периода предполагает введение в инфицированную молочную железу, чтобы лечить существующий мастит, так же как и в не инфицированную молочную железу в качестве профилактики.

Одновременное прекращение доения из всех молочных желез лактирующего животного обычно приводит в результате к нежелательной воспалительной реакции. В настоящем изобретении показано, что введение фармацевтических композиций по изобретению одновременно во все молочные железы лактирующего животного не сопровождается какими-либо неблагоприятными эффектами. Таким образом, возможно стимулировать прекращение продуктивности молока и инволюцию и лечить мастит в любом желаемом количестве молочных желез индивидуального животного. Введение согласно настоящему изобретению включает введение как только в одну железу, так и во все железы, например во все четыре железы вымени коровы.

Режимы применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению зависят от желаемого результата и от животного, подвергаемого лечению. Предполагается как разовое введение, так и множественные введения. Согласно определенным воплощениям для лечения мастита пептид вводят 1 и более раз, предпочтительно 1-3 раза с интервалом, выбранным из группы, состоящей из примерно 6, примерно 8, примерно 12, примерно 16, примерно 20 или примерно 24 ч. Согласно другим воплощениям для стимулирования прекращения молочной продуктивности и инволюции пептид вводят как разовое лечение. Режим разового введения высокожелателен, поскольку это увеличивает податливость лечения.

Другие объекты, свойства и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из следующего описания и чертежей.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 показывает увеличение молочной продуктивности коровы № 2425 после введения казеинового гидролизата по сравнению с предыдущими периодами лактации;

фиг. 2 показывает увеличение молочной продуктивности коровы № 2331 после введения казеинового гидролизата по сравнению с предыдущими периодами лактации;

фиг. 3 показывает индекс давления вымени 10 коров, получавших лечение (внезапное прекращение доения + лечение антибиотиком в сухостойный период + лечение казеиновым гидролизатом), и 10 контрольных коров, запущенных обычным путем (внезапное прекращение доения + лечение антибиотиком в сухостойный период) во время 3 последних дней лактации (лактация) и первых семи дней после запуска. Отличия между лечениями в период после сухостойного периода были значительными при  $P < 0,01$ ;

фиг. 4 показывает вымя двух коров на 4 день после лечения с выходом молока около 30 л;

фиг. 4А - корову лечили с помощью С (внезапное прекращение доения + лечение антибиотиком в сухостойный период);

фиг. 4В - корову лечили с помощью С+N (внезапное прекращение доения + лечение казеиновым гидролизатом + лечение антибиотиком в сухостойный период);

фиг. 5 показывает среднее совокупное соотношение между количеством шагов и продолжительностью периода лежки 10 коров, которые получали лечение (С+N - внезапное прекращение доения + лечение антибиотиком в сухостойный период + лечение казеиновым гидролизатом), и 10 контрольных коров, запущенных обычным путем (С - внезапное прекращение доения + лечение антибиотиком в сухостойный период) во время 3 последних дней лактации (лактация) и первых семи дней после запуска. Отличия между лечениями в период после сухостойного периода были значительными при  $P < 0,005$ .

#### **Подробное описание изобретения**

Перед подробным объяснением по меньшей мере одного воплощения по изобретению следует понять, что изобретение не ограничено в своей заявке подробностями, которые представлены в следующем описании или проиллюстрированы с помощью примеров. В изобретении допускаются другие воплоще-

ния, которые или практикуют или проводят разнообразными путями. Также следует понять, что стилистика и терминология применяются здесь с целью описания и не должны рассматриваться, как ограничение.

### Определения

Как применяется здесь, термин "казеин" обозначает белок, превалирующий в молоке млекопитающих, отличных от человека, и в молоке человека, включающий подгруппы  $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$ ,  $\beta$  и  $\kappa$ .

Как применяется здесь, термин  $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$  и  $\beta$ -казеин обозначает  $\alpha S1$ ,  $\alpha S2$  и  $\beta$ -казеиновый белок млекопитающего, включающего, но не ограниченного ими, млекопитающих из поголовья домашнего скота (например, коров, овец, коз, кобыл, верблюдов, оленей и буйволов), человека и морских млекопитающих.

Термин "пептид" применяется по всему описанию с целью обозначить линейные ряды аминокислотных остатков, связанных один с другим с помощью пептидных связей. Пептид согласно принципам настоящего изобретения отличается от интактного белка.

Термин "фосфопептид" обозначает фосфорилированный пептид в форме конъюгированного пептида, в котором непептидной частью является остаток фосфорной кислоты. В особенности выражение "казеиновый фосфопептид" или "CPR" обозначает фосфопептид, содержащий казеиновый фрагмент.

Термин "прекращение молочной продуктивности" обозначает как временное прекращение, так и стабильное прекращение молочной продуктивности. Временное прекращение молочной продуктивности обозначает обратимое прекращение. Стабильное прекращение обозначает задержку лактации, которая является обратимой после родов, следующих за беременностью и после лечения половыми гормонами. Согласно догме настоящего изобретения механические стимулы (т.е. доение) также могут делать обратимым стабильное прекращение молочной продуктивности, стимулированное композициями и способами по изобретению.

Термин "сухостойный период" обозначает фазу перед родами, в которой доение прекращают. Согласно настоящим правилам применение сухостойного периода необходимо для завершения процесса инволюции, после которого способность к секреции молока восстанавливается к родам. В настоящий момент продолжительность сухостойного периода составляет 50-70 дней. Как ни странно, в настоящем изобретении показано, что продолжительность сухостойного периода может быть уменьшена до менее чем примерно 50 дней, предпочтительно до менее чем примерно 40 дней, более предпочтительно до менее чем примерно 20-30 дней без негативного влияния на выход молока. Как ни странно, в настоящем изобретении показано, что применение выделенного из казеина пептида для установления сухостойного периода приводит в результате к значительному увеличению выхода молока в период лактации, следующий за сухостойным периодом.

Термин "мастит" обозначает воспаление молочной железы или вымени, вызванное физическим вмешательством, введением химических веществ, вирусов, грибов, паразитов или наиболее часто инфекцией бактерий и их токсинами. "Мастит" применяется для описания всех форм такого воспаления, включающих субклинический и клинический мастит, клинический мастит включает средний, тяжелый и хронический мастит.

При субклиническом мастите не детектируется никакой опухоли груди или вымени и не наблюдаются аномалии в молоке. Однако специальные скринирующие тесты, такие как Калифорнийский тест на мастит (CMT), Висконсинский тест на мастит (WMT) на основе оценки количества микроорганизмов и тест с применением каталазы, будут показывать изменения в композиции молока. Этот тип мастита обычно обозначается как "скрытый".

Клинический мастит может быть средним или острым и характеризуется присутствием лейкоцитов в молоке. Средний клинический мастит включает изменения во внешнем виде молока, включающие присутствие хлопьев и комков, водянистое молоко или другие необычные формы молока.

Средний клинический мастит может сопровождаться другими симптомами, включающими, горячую, легко раздражимую или опухшую грудь или вымя.

Тяжелый клинический мастит включает симптомы горячей, легко раздражимой, твердой груди или вымени, что является довольно болезненным для лактирующего животного. Начало тяжелого клинического мастита очень болезненно, и лактирующее животное может находиться в болезненном состоянии, показывая признаки жара, частого пульса, депрессии, слабости и потери аппетита. Состояние, когда на всю систему лактации оказано влияние, обозначается как острый систематический мастит. Тяжелые симптомы могут также сопровождаться прекращением молочной продуктивности.

Хронический мастит является стабильной инфекцией вымени, обычно в форме субклинического мастита, который иногда может развиваться в клиническую форму и обратно в субклиническую форму. Хронический мастит характеризуется твердой опухолью внутри молочной железы вследствие бактериального образования и создания соединительной ткани.

Термин "терапия сухостойной коровы" или "терапия при сухостойном периоде" обозначает терапию интрамаммарным введением сразу после последнего доения в период лактации для того, чтобы устранить, вылечить и исцелить диагностированное маститное воспаление в конце периода лактации.

Термин "предупреждающая/профилактическая терапия сухостойной коровы" обозначает терапию интрамаммарным введением сразу после последнего доения в период лактации для того, чтобы предотвратить маститное воспаление во время сухостойного периода и во время следующего периода лактации.

Термин "состояние поголовья домашнего скота" или "состояние на животноводческой ферме" обозначает предотвращение боли и увеличение присутствия положительных ощущений, обычно называемых комфортом или удовольствием, которые, помимо прочего, происходят из увеличения периодов лежки, увеличения времени пережевывания жвачки, уменьшения метаболических потребностей, уменьшения давления вымени и/или соскового протекания, уменьшения случаев мастита и других заболеваний и уменьшения эффекта хромоты благодаря высокому выходу молока.

Термин "чистая фармацевтическая композиция" и/или "чистый раствор" обозначает жидкий раствор, имеющий величину мутности менее чем 6 NTU. Как применяется здесь, мутность является единицей измерения, измеряющей степень, с которой свет, проходящий через столбик воды, рассеивается взвешенными органическими или неорганическими частицами. Рассеивание света увеличивается при большем количестве взвешенных частиц. Мутность обычно измеряется в нефелометрических единицах мутности, которые заменяют единицы мутности Джексона (JTU). Нефелометрический способ сравнивает свет, рассеянный образцом, и свет, рассеянный исследуемым раствором.

Термин "мицелла" или мицеллы" обозначает совокупность молекул, которая составляет коллоидную частицу, в особенности казеиновые мицеллы, которые содержат, главным образом, белок, кальций и фосфат. Мицеллы также содержат цитрат, минорные ионы, ферменты липазу и плазмин, и захваченную молочную сыворотку. Казеиновые мицеллы имеют довольно пористые структуры, занимающие примерно 6-12% от общего объема фракции молока. Диаметр казеиновых мицелл находится в пределах от 90 до 150 нм. Данные из электронной микроскопии и из других способов предполагают, что мицеллы состоят из меньших единиц, называемых субмицеллами, которые имеют диаметр от 10 до 20 нм.

Термин "стерильный" обозначает раствор, свободный от патогена, что определяется обычным тестом на стерильность, известным специалисту в данной области, и свободным от эндотоксина, где уровень эндотоксина в конечном продукте составляет менее чем 0,5 EU/мл согласно тесту Limulus Amebocyte Lysate (LAL).

Термин "средний молекулярный вес" обозначает значение плюс или минус стандартное отклонение молекулярного веса пептида или белка, что измеряется способом, известным специалисту в данной области. Такие способы включают, например, СДС-гель электрофорез и размер-исключающую хроматографию с такими инструментами, как HPLC, где образец сравнивают со стандартами с известным молекулярным весом.

Пептиды в фармацевтических композициях по этому изобретению предпочтительно имеют средний молекулярный вес от примерно 1000 до примерно 5000 Да. Таким образом, в изобретении в особенности рассматриваются пептиды, имеющие, в целом, аминокислотные остатки между 10-50. В настоящем изобретении также рассматриваются белки, в которых последовательность мотива остова, например аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, является искусственно вставленной в последовательность полипептида, такого как пептиды, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК или с помощью химического синтеза. Пептиды могут быть получены путем гидролиза казеина с выходом смеси пептидов. Согласно догме настоящего изобретения могут применяться смеси пептидов, или смеси могут быть дополнительно очищены способами белковой очистки, известными из уровня техники, с получением выделенных пептидов.

Пептиды в фармацевтических композициях по настоящему изобретению также могут быть синтезированы с применением способов, хорошо известных из уровня техники, включая химический синтез и технологию рекомбинантной ДНК. Синтез может быть осуществлен в растворе или с помощью твердофазного пептидного синтеза, как описано у Merrifield (см. J. Am. Chem. Soc, 85:2149, 1964). Фосфорилирование сериновых остатков может быть осуществлено любым способом, известным из уровня техники, как описано, например, среди других способов в Meggio et al., 1991. FEBS Lett. 283 (2):303-306 и Perich J.W. 1997. Method Enzymol. 289:245-246.

В основном, способы пептидного синтеза включают последовательное добавление одной или более аминокислоты или подходящим образом защищенных или полученных производных аминокислот для наращивания пептидной цепи. Обычно или амино-, или карбоксильная группа первой аминокислоты защищена подходящей защитной группой. Защищенная аминокислота или полученное производное аминокислоты может быть затем или присоединена к инертной твердой подложке, или применена в растворе путем добавления следующей аминокислоты в последовательность, имеющую комплементарную (амино- или карбоксильную) подходящим образом защищенную группу, при условиях, подходящих для образования амидной связи. Защитную группу затем снимают с этого вновь добавленного остатка аминокислоты и затем добавляют следующую аминокислоту (защищенную подходящим образом), и так далее; традиционно этот процесс также сопровождается стадиями отмывки. После того как все желаемые аминокислоты соединены в подходящей последовательности, последовательно или одновременно снимают любые оставшиеся защитные группы (и любую твердую подложку) с получением конечного пептида. С помощью простой модификации этой основной процедуры возможно добавлять более чем одну амино-

кислоту во время роста цепи, например, путем конденсации (при условиях без рацемизации хиральных центров) защищенного трипептида с подходящим образом защищенным дипептидом с образованием пентапептида после снятия защиты и так далее.

В настоящем изобретении описаны способы с применением выделенных из казеина пептидов для основного ухода за стадом из поголовья домашних лактирующих животных.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предлагается способ для уменьшения продолжительности сухостойного периода между циклами лактации без негативного влияния на выход молока путем введения лактирующему животному из поголовья домашнего скота эффективного количества по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина.

В современной молочной отрасли лактирующее животное дает потомство раз в год, так что доение продолжается пока животное является беременным. Установление сухостойного периода для лактирующего животного перед родами является принятой практикой для стимулирования процесса инволюции молочной железы с возможностью восстановления ткани молочной железы к следующему периоду лактации. Стимулирование сухостойного периода является необходимым, помимо прочего, для поддержания подобного выхода молока до и после родов. У коров природный процесс инволюции завершается между 21-30 днями после его стимулирования путем прекращения доения. Таким образом, сухостойные периоды от 50 до 70 дней являлись отраслевым стандартом, поскольку сухостойные периоды менее чем 40 дней приводили в результате к уменьшению выхода молока в последующую лактацию на 10-30%. Недавно было показано, что сухостойный период в 30 дней также может иметь место без потери молочной продуктивности с применением бычьего соматотропина, который может оказывать нежелательные побочные эффекты, однако, только для неоднократно рожавших коров (Annen et al., *ibid*). Ранее было показано автором настоящего изобретения и коллегами, что продолжительность процесса инволюции может быть уменьшена до примерно 3 дней у лактирующих коз и коров. В настоящем изобретении здесь показано, что как ни странно, возможно стимулировать инволюцию во всех четырех молочных железах вымени лактирующей коровы в течение 3 дней.

В настоящем изобретении здесь описано, что введение выделенных из казеина пептидов является эффективным не только при стимулировании быстрой инволюции, но и также при сокращении сухостойного периода до менее чем 50 дней, предпочтительно до менее чем примерно 40 дней, более предпочтительно до примерно 20-30 дней без негативного влияния на выход молока. Современные молочные коровы, переходя обычно в сухостойный период, все еще производят 20-40 л молока в день. Таким образом, сокращение сухостойного периода имеет значительную экономическую ценность. Кроме того, в настоящем изобретении демонстрируется, что инициация сухостойного периода у лактирующего животного способом по настоящему изобретению, т.е. путем более предпочтительного введения лактирующему животному по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, а не путем прекращения доения, приводит в результате к увеличению выхода молока во время периода доения, следующего за сухостойным периодом. Не желая быть привязанным к специфическому механизму, это увеличение может быть связано с (а) уменьшением SCC и его негативными эффектами на выход молока и/или (б) с более всесторонней заменой популяции эпителиальных клеток молочной железы новыми клетками, как результат более всестороннего апоптоза, стимулированного введением по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предлагается способ для увеличения качества молока лактирующего животного из поголовья домашнего скота, включающий введение в молочную железу лактирующего животного терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина.

Термин "качество молока" обозначает число соматических клеток (SCC) на 1 мл молока. "Увеличение качества молока" обозначает уменьшение SCC до количества, равного или составляющего менее чем 750000 клеток на 1 мл молока, предпочтительно равного или менее чем 600000 клеток на 1 мл молока, более предпочтительно равного или менее чем 400000 клеток на 1 мл молока, даже более предпочтительно равного или менее чем 300000 клеток на 1 мл молока, наиболее предпочтительно равного или менее чем 200000 клеток на 1 мл молока. Обычным явлением в современном молочном хозяйстве является высокий выход молока, полученный от лактирующего животного, в частности, коровы, хотя и имеющей субклиническую инфекцию вымени. Такая корова часто производит высокое количество молока, однако, инфекция в одной или более железах увеличивает SCC в молоке до уровня, который может увеличить общее количество в собирающей цистерне, таким образом понижая сорт молока на уровне фермы. Было показано, что терапия с антибиотиками, применяемая интрамаммарно во время лактации, приводит в результате к излечению от бактерий; однако, она не уменьшает четверти SCC коровы по сравнению с уровнем, предшествующим лечению (Cattell et al., 2001. *J. Dairy Sci.* 84:2036-2043). В настоящем изобретении показано, что введение выделенных из казеина пептидов приводит в результате к значительному уменьшению SCC. Как ни странно, в настоящем изобретении здесь описано, что разовое введение по меньшей мере одного выделенного из казеина пептида является достаточным для достижения такого уменьшения SCC. Согласно догме настоящего изобретения выделенные из казеина пептиды вводят местно в сосковый канал инфицированной молочной железы с тем, чтобы ограничить лечение только инфицированной железой. Местная активность пептида в инфицированной железе дает возмож-

ность продолжения доения из других не инфицированных желез. Качество молока, таким образом, улучшается сразу после лечения, поскольку инфицированная железа обычно является единственной, которая вносит вклад в повышение SCC. В настоящем изобретении здесь показано, что введение по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, является эффективным для уменьшения SCC у коров с субклинической инфекцией и в большей степени у коров с клинической инфекцией. Поскольку эффект лечения может быть ограничен подвергнутой лечению железой, то немедленное улучшение качества молока получают без необходимости удалять молоко из не инфицированной железы. Это важно, поскольку удаленное молоко является одной из главных причин экономических потерь у молочных коров, имеющих клинический мастит (DeGraves and Fetrow, 1993. Vet. Clin. Noth Am. Food Animal Pract. 9:421-434). Введение может быть осуществлено в одну молочную железу, а также во все молочные железы, например во все 4 молочные железы лактирующей коровы. Оказалось неожиданным, что молоко, полученное из подвергнутой лечению железы, в следующий цикл лактации включает меньшее количество микроорганизмов. Согласно определенным воплощениям выделенный из казеина пептид вводят в молочную железу или железы лактирующего животного во время сухостойного периода для того, чтобы увеличить качество молока в следующий период лактации.

Способы по настоящему изобретению могут быть осуществлены с одним типом пептида, выделенного из казеина, или с множеством типов пептидов, выделенных из казеина. Согласно определенным воплощениям способы по настоящему изобретению осуществляют с чистыми, легкими в применении, описанными здесь ниже фармацевтическими композициями по настоящему изобретению.

Согласно дополнительным воплощениям пептид, выделенный из казеина, включает фосфопептиды. Согласно дополнительным воплощениям фосфопептид включает аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 1. Согласно следующим воплощениям фосфопептид выбран из группы, состоящей из фосфопептида, выделенного из  $\beta$ -казеина, фосфопептида, выделенного из  $\alpha$ S1-казеина, и фосфопептида, выделенного из  $\alpha$ S2-казеина. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям фосфопептид, применяемый согласно способам по настоящему изобретению, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 5 и их аналогов, производных и фрагментов, поскольку эти термины здесь определены. Способы по настоящему изобретению могут осуществляться с пептидами, выделенными из гидролизата казеина как неочищенного казеинового гидролизата, так и очищенного казеинового гидролизата, и с пептидами, очищенными от казеинового гидролизата. Кроме того, способы по настоящему изобретению могут быть осуществлены с синтетическими пептидами, выделенными из казеина. Выделенные из казеина пептиды могут быть введены в фармацевтическую композицию.

Согласно еще другому аспекту в настоящем изобретении предлагается способ для предотвращения боли, связанной с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения у лактирующего животного из поголовья домашнего скота, включающий введение в молочную железу лактирующего животного терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, таким образом, улучшая состояние лактирующего животного.

Согласно определенным воплощениям улучшение состояния лактирующего животного измеряют по уменьшению количества шагов в день и по продолжительности периода лежки в день указанного животного. Согласно еще одному воплощению по меньшей мере один пептид, выделенный из казеина, вводят в инфицированную молочную железу. Согласно другому воплощению по меньшей мере один пептид, выделенный из казеина, вводят в не инфицированную молочную железу. В настоящем изобретении дополнительно описано, что оказалось неожиданным, что фильтрация мутных композиций, включающих выделенные из казеина пептиды, через фильтры от 0,1 до примерно 0,5 мкм предпочтительно через фильтр ниже 0,25 мкм приводит в результате к чистому раствору, который очень желателен для фармацевтического применения.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где композиция представлена в форме чистого, легкого в применении стерильного раствора, по существу, лишенного мицелл, имеющего pH выше 6,0. Согласно еще одному воплощению фармацевтическая композиция, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. Согласно определенным воплощениям композиция включает терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного фосфопептида, выделенного из казеина. Согласно дополнительным воплощениям фармацевтическая композиция включает фосфопептиды, имеющие средний молекулярный вес от примерно 1000 до примерно 5000 Да. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям средний молекулярный вес пептидов в новых фармацевтических композициях по настоящему изобретению составляет примерно 2500 Да.

Фраза "пептиды, выделенные из казеина" обозначает пептиды, которые являются продуктами расщепления казеина (обозначены здесь как пептиды, выделенные из природного казеина), синтетические пептиды, химически синтезированные до соответствующих аминокислотных последовательностей единиц казеина (обозначены здесь как синтетические пептиды, выделенные из казеина), и пептиды, подоб-

ные (гомологичные) казеину, например пептиды и их функциональные гомологи, характеризующиеся одной или более аминокислотными заменами, вставками или делециями, такими как, но не ограниченными ими, разрешенные замены, при условии, что они содержат по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% гомологии. Термины "гомологи" и "функциональные гомологи", применяемые в описании, обозначают пептиды с любыми вставками, делециями и заменами, которые не влияют на биологическую активность пептида.

Как применяется здесь, фраза "их комбинация" определяется как любые вышеупомянутые пептиды, выделенные из  $\alpha$ - или  $\beta$ -казеина, объединенные в смесь с одним или более дополнительными не идентичными пептидами, выделенными из  $\alpha$ - или  $\beta$ -казеина. Как применяется здесь, термин "смесь" определяется как не ковалентная комбинация пептидов, существующих в различных пропорциях друг к другу.

Согласно определенным воплощениям пептид, выделенный из казеина, является фосфопептидом, включающим активный мотив Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO: 1). Следует понимать, что, как здесь описано, любой пептид, включающий этот мотив, будь то выделенный из казеина, из белка, отличного от казеина, синтетически синтезированный или полученный с помощью рекомбинантной технологии, который сохраняет биологические активности пептидов, также не выходит за рамки настоящего изобретения. Фосфопептиды по настоящему изобретению являются примерами пептидов, имеющих аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID Nos. 2-5, как приведено ниже:

SEQ ID NO.	Последовательность	Выделена из	Количество остатков
SEQ ID NO: 2	RELEELNVPGEIVES (P) LS (P) S (P) S (P) EESITR	$\beta$ -казеин	1-25
SEQ ID NO: 3	QMEAESIS (P) S (P) S (P) EEIVPDSVEQK	$\alpha$ S1-казеин	59-79
SEQ ID NO: 4	KNTMEHVS (P) S (P) S (P) EESIISNETYK	$\alpha$ S2-казеин	1-21
SEQ ID NO: 5	NANEEYSIGS (P) S (P) S (P) EESAEEVATEEVK	$\alpha$ S2-казеин	46-70

Настоящее изобретение также охватывает фармацевтические композиции, включающие аналоги, производные или фрагменты пептидов, приведенных выше, при условии, чтобы аналоги, производные и фрагменты сохраняли их биологическую активность, как здесь описано, и фармацевтические композиции представлены в форме чистого раствора, как здесь описано, и пептидные аналоги, производные и фрагменты имеют молекулярный вес от примерно 1000 до 5000 Да.

Термин "аналог" включает любой пептид, включающий последовательность, отличающуюся аминокислотными заменами, вставками, делециями или химическими модификациями пептидов по изобретению, которые сохраняют биологическую активность пептида. "Аминокислотные замены" обозначает, что функционально эквивалентные аминокислотные остатки заменяют остатки в последовательности, что не приводит в результате к функциональному изменению. Например, один или более аминокислотных остатков в последовательности может быть заменен другой аминокислотой с подобной полярностью, которая действует как функциональный эквивалент, что не приводит в результате к функциональному изменению. Замены аминокислоты в последовательности могут быть выбраны из других членов класса, к которому принадлежит аминокислота. Например, не полярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Такие замены известны как консервативные замены. Кроме того, в аминокислоте могут быть произведены не консервативные замены, которые не вносят вклад в биологическую активность пептида. Было бы хорошо, если бы настоящее изобретение охватывало пептидные аналоги, где по меньшей мере одна аминокислота была заменена на другую аминокислоту с получением активного аналога пептида по изобретению, имеющего увеличенную стабильность или более продолжительное время полужизни по сравнению с приведенным здесь пептидом.

В то время как аминокислотные остатки пептидных последовательностей, представленных в SEQ

ID NO: 1-5, все представлены в L изомерной форме, остатки в D изомерной форме могут заменять любой L-аминокислотный остаток, при условии, что пептидный аналог сохраняет свою активность. Из уровня техники хорошо известны способы получения ретроинверсного D-аминокислотного пептидного аналога, где пептид получают с теми же аминокислотами, как описано, но по меньшей мере одна или более аминокислот, включая все аминокислоты, являются D-аминокислотами. Когда все аминокислоты в пептидном аналоге являются D-аминокислотами, N- и C-концы пептидного аналога являются обращенными, в результате получается аналог, имеющий те же структурные группы в тех же положениях, как в L-форме аминокислоты пептида. Однако пептидный аналог является более стабильным к протеолитической деградации и, таким образом, применяется во многих применениях, перечисленных здесь.

Термин "производное" обозначает пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотную последовательность пептида по изобретению, в котором один или более аминокислотных остатков подвержены химическим превращениям с получением производных с помощью реакции боковых цепей или функциональных групп, где такие превращения с получением производных не нарушают активность пептидного производного. Химическое превращение с получением производных аминокислот включает, но не ограничено ими, гликозилирование, окисление, восстановление, миристилирование, сульфатирование, ацилирование, ацетилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, образование цикла, образование дисульфидной связи, гидроксилирование, иодирование и метилирование.

Пептидные производные согласно принципам настоящего изобретения также включают модификации связи, включающие, но неограниченные ими,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  и  $\text{CF=CH}$  и модификации остова. Пептидные связи ( $\text{-CO-NH-}$ ) в пептиде могут быть заменены, например, N-метилированными связями ( $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ); эфирными связями ( $\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$ ); кетометиленовыми связями ( $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ );  $\alpha$ -аза-связями ( $\text{-NH-N(R)-CO-}$ ), где R является любой алкильной группой, например метильной; карба-связями ( $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ); гидроксиметиленовыми связями ( $\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ ); тиамидами ( $\text{-C=S-NH-}$ ); олефиновыми двойными связями ( $\text{-CH=CH-}$ ) и пептидными производными ( $\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$ ), где R является "обычной" боковой цепью, присутствующей в природе на атоме углерода. Эти модификации могут осуществляться на любой из связей на протяжении пептидной цепи и даже по несколько (2-3) одновременно.

Настоящее изобретение также охватывает те пептиды, в которых свободные аминогруппы были превращены с получением производных - с образованием солей амина, включающих, но не ограниченных гидрохлоридами, p-толуолсульфонильными группами, карбобензоксигруппами, t-бутилокси-карбонильными группами, хлорацетильными группами или формильными группами. Свободные карбоксильные группы могут быть превращены с получением производных - с образованием, например, солей, метиловых и этиловых эфиров или других типов эфиров или гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть превращены с получением производных - с образованием, например, o-ацил или o-алкил производных. Имидазольный азот гистидина может быть превращен с получением производных - с образованием N-im-бензилгистидина.

Также включены в виде химических производных те пептиды, которые содержат одно или более природных аминокислотных производных из двадцати стандартных аминокислотных остатков. Например, 4-гидроксипролин может заменять пролин; 5-гидроксизалин может заменять лизин; 3-метилгистидин может заменять гистидин; гомосерин может заменять серин и орнитин может заменять лизин. Пептиды также могут содержать не природные аминокислоты. Не ограничивающими примерами не природных аминокислот являются норлейцин, орнитин, цитруллин, диаминамасляная кислота, гомосерин, гомоцистеин, изопропил Lys, 3-(2'-нафтил)-Ala, никотинил Lys, аминокислотная кислота и 3-(3'-пиридил-Ala). Пептиды могут также содержать не белковые боковые цепи. В дополнение к вышесказанному пептиды по настоящему изобретению могут также включать один или более не аминокислотных мономеров или олигомеров (например, жирные кислоты, сложные углеводороды и подобные). Также охвачен любой пептид, имеющий одну или более вставок аминокислотных остатков по отношению к последовательностям пептидов, приведенных здесь выше, при условии, что поддерживаются необходимая активность и предпочтительный молекулярный вес. Аминокислотные остатки могут быть добавлены в аминоконец, и/или карбоксиконец, и/или в положение на протяжении пептидной последовательности.

Пептидное производное согласно настоящему изобретению может также являться циклическим пептидом. Образование цикла может быть получено, например, посредством образования амидной связи, например путем введения Glu, Asp, Lys, Orn, диаминамасляной кислоты (Dab), диаминопропионовой кислоты (Dap) в различные положения в цепи ( $\text{-CO-NH}$  или  $\text{-NH-CO}$  связи).

Образование цикла с замыканием остова можно также получить посредством введения модифицированных аминокислот с формулами  $\text{H-N}((\text{CH}_2)_n\text{-COOH})\text{-C(R)H-COOH}$  или  $\text{H-N}((\text{CH}_2)_n\text{-COOH})\text{-C(R)H-NH}_2$ , где  $n=1-4$ , и, кроме того, где R является любой природной или не природной боковой цепью аминокислоты. Также рассматриваются образования цикла замыканием остова с боковой цепью и одной боковой цепи с другой боковой цепью.

Также возможно образование цикла посредством образования S-S связей посредством введения двух остатков Cys. Дополнительное образование цикла путем замыкания одной боковой цепи с другой

боковой цепью может быть получено путем образования связи с формулой  $-(\text{CH}_2)_n\text{-S-CH}_2\text{-C-}$ , где  $n=1$  или 2, которая является возможной, например, путем введения Cys или гомоCys и реакцией ее свободной SH-группы, например, с бромацетилованным Lys, Om, Dab или Dar.

Термин "фрагмент", как применяется в описании, обозначает пептид, имеющий одну или более де-лаций аминокислотных остатков по отношению к последовательностям пептидов, приведенных здесь, при условии, что поддерживается необходимая активность. Аминокислотные остатки могут быть деле-тированы из аминоконца, и/или карбоксиконца, и/или из положения на протяжении пептидной последо-вательности.

Пептидные фрагменты могут быть получены путем химического синтеза, технологии рекомбинант-ной ДНК или путем воздействия на пептиды, приведенные здесь, по меньшей мере одного расщепляю-щего агента. Расщепляющий агент может быть химическим расщепляющим агентом, например циано-генбромидом, или ферментом, например экзопроотеиназой или эндопротеиназой. Эндопротеиназы, кото-рые могут применяться для расщепления пептидов по изобретению, включают трипсин, химоотрипсин, папаин, V8 протеазу или любой другой фермент, известный из уровня техники, для получения протеоли-тических фрагментов.

Как описано здесь выше, пептиды по настоящему изобретению могут быть получены путем гидро-лиза казеина или пептиды могут быть получены синтетически.

Гидролиз казеина обычно осуществляют путем гидролиза с трипсином или панкреатическими экс-трактами. Негидролизированный казеин затем отделяют от пептидсодержащего раствора, который допол-нительно очищают от других примесей с помощью подходящего способа, известного из уровня техники и приведенного здесь ниже. Согласно определенным воплощениям по настоящему изобретению очистка и получение легкой в применении чистой фармацевтической композиции включает фильтрацию раство-ра. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям фильтрацию осуществляют через 0,2-0,5 мкм фильтр с применением инертного газа, включающего, например, азот или аргон при низком давлении. Предпочтительно фильтрацию осуществляют через 0,22 мкм фильтр. Как ни странно, в настоящем изобретении демонстрируется, что фильтрация вещества казеинового гидролизата через мем-брану с размером пор ниже 0,5 мкм, предпочтительно примерно 0,2 мкм, обеспечивает чистый раствор. Чистый внешний вид раствора имеет место, главным образом, благодаря удалению негидролизированных казеиновых мицелл. Образующие казеиновые мицеллы коллоидные частицы обеспечивают непрозрач-ный белый цвет молока. Следует понимать, что фармацевтические композиции, имеющие такие же ха-рактеристики как фармацевтические композиции по настоящему изобретению, т.е. включающие тера-певтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, пред-ставленные в форме чистого раствора, по существу, лишенного мицелл, где по меньшей мере один пеп-тид имеет молекулярный вес, который находится в пределах 1000-5000 Да, полученный другими спосо-бами, известными из уровня техники, также рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению очень стабильны. Как применяется здесь, термин "стабильный" обозначает активность пептида, выделенного из казеина после инкубации при определенной температуре, который сохраняет по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% и более исходной пептидной активности.

Фосфопептиды в фармацевтических композициях по изобретению являются стабильными как при высоких, так и при низких температурах. Фосфопептиды в фармацевтической композиции можно дер-жать замороженными без существенной потери активности. Кроме того, фармацевтическую композицию можно нагревать до 70°C в течение 15 мин без потери активности.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая пептиды, вы-деленные из казеина, которая представлена в форме легкой в применении, чистого стерильного. Компо-зиция превосходит доступные в настоящий момент выделенные из казеина продукты, поскольку чистота раствора дает возможность легкой быстрой детекции любой контаминации, специфически микробной контаминации. Легкость в применении раствора не требует никаких стадий восстановления перед введе-нием по сравнению со многими известными до настоящего времени композициями, которые предлага-ются в форме порошка. Согласно определенным воплощениям, фармацевтические композиции по на-стоящему изобретению предназначены для ветеринарного применения так, чтобы фармацевтическая композиция вводилась большому количеству субъектов. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению испытали необходимость таких условий, обеспечивающих легкую детекцию контаминации и легкость в применении состава.

Чистоту раствора можно измерить любыми способами, известными из уровня техники специалисту в данной области. Согласно определенным воплощениям, чистоту раствора определяют согласно вели-чине его мутности. Как применяется здесь, "чистым" раствором является раствор, имеющий величину мутности менее чем 6 NTU.

Подразумевается, что в широком смысле термин "фармацевтическая композиция" включает здесь вещества, содержащие белковую композицию в соответствии с настоящим изобретением, применяемые не только для терапевтических целей, но также в виде реагентов или для диагностических целей, как из-вестно из уровня техники. Фармацевтические композиции, предназначенные для терапевтического при-



менения, должны содержать терапевтическое количество пептида, выделенного из казеина, т.е. количество, которое необходимо для предупреждающих или лечебных мероприятий по охране здоровья. Если фармацевтическую композицию необходимо применить как реагент или в диагностических целях, то она должна содержать реакционноспособное или диагностическое количества пептида, выделенного из казеина.

Согласно определенным воплощениям концентрация белка в фармацевтической композиции по настоящему изобретению составляет примерно от 10 нг/мл до примерно 15 мг/мл.

Термин "фармацевтическая композиция" дополнительно обозначает получение одного или более пептидов, описанных здесь, с другими химическими компонентами, такими как фармацевтически приемлемые разбавители, носители и вспомогательные вещества. Целью фармацевтической композиции является облегчение введения состава в организм.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", как применяется в описании, обозначает носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения организма и не противодействует биологической активности и свойствам введенного состава. Не ограничивающими примерами носителей являются вода, пропиленгликоль, солевой раствор, эмульсии и смеси органических растворителей с водой. Термин "вспомогательное вещество", как применяется здесь, обозначает инертное вещество, добавляемое в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения состава. Не ограничивающие примеры вспомогательных веществ включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Методики для получения состава и введения лекарственных средств можно найти в "Фармацевтические науки Ремингтона" издательство Mack Co., Easton, PA, последнее издание, содержание которого введено сюда с помощью ссылки. Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям фармацевтические композиции по настоящему изобретению включены в состав для парентерального введения, например для внутриканального введения, в особенности для инъекции или вливания в сосковый канал молочной железы. Для инъекции пептиды по изобретению могут быть включены в состав в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка, раствор Рингера или в буфере физиологического солевого раствора с или без органических растворителей, таких как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль. Внутриканальное введение в сосковый канал молочной железы не определяется как местное или систематическое введение. Как здесь описано, внутриканальное введение фармацевтической композиции по изобретению может иметь местный эффект, например, при стимулировании инволюции только в подвергнутой лечению молочной железе, и, таким образом, может относиться к местному введению. Фармацевтические композиции могут также вводить местно в виде геля, мази, крема, эмульсии или состава для продолжительного высвобождения, включающего трансдермальный пластырь. Настоящее изобретение дополнительно охватывает систематическое введение как парентеральное, так и пероральное.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, в форме лиофилизованного порошка, где перед применением порошок восстанавливают до жидкой формы с образованием чистого раствора, по существу, лишенного мицелл и имеющего pH выше 6,0.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где композиция представлена в форме чистого легкого в применении стерильного раствора, по существу, лишенного мицелл, имеющего pH выше 6,0, для лечения молочной железы лактирующего животного, включающего стимулирование временного прекращения молочной продуктивности и стимулирования стабильного прекращения молочной продуктивности. Согласно еще следующему аспекту новая фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применяется для предотвращения и лечения инфекции или для обратимости инфекции. Согласно дополнительным воплощениям фармацевтическая композиция включает фосфопептиды, имеющие средний молекулярный вес от примерно 1000 до примерно 5000 Да.

Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям средний молекулярный вес пептидов составляет примерно 2500 Да.

Согласно определенным воплощениям лактирующее животное выбрано из группы животных, состоящей из людей, коров, коз, овец, буйволиц, верблюдиц, ослиц, лам, лошадей, свиней, кошек и собак.

Согласно определенным настоящим предпочтительным воплощениям лактирующим животным является человек. В последние несколько десятилетий вскармливание грудью уменьшилось во всех технологически развитых сообществах мира, а также в чуть меньшей степени в развивающихся странах. Многие женщины выбирают: не кормить своих детей грудью совсем или прекратить кормление через короткий период времени. Другие отказываются от кормления по различным медицинским показателям, включающие определенные инфекционные или не инфекционные заболевания. Специфическим примером являются женщины-носители HIV. Настоящие рекомендации органов здравоохранения для носителей

HIV заключаются в поддержании грудного вскармливания в течение только примерно 10 недель после родов, после чего должны предлагаться только заменители молока. Женщины, родившие недоношенных детей или родившие в срок детей, которые не выжили, также отказываются от кормления. Во всех таких случаях молоко производится молочной железой, но не сцеживается. Такой застой молока связан с опуханием груди до такой степени, что может вызвать заметные страдания как физические, так и психологические. Кроме того, застой молока часто связан с протеканием благодаря секреции молочной железы, которое, по существу, увеличивает риск приобретения интрамаммарной инфекции. Фармацевтические композиции и способы по настоящему изобретению, таким образом, отвечают необходимости быстрого и эффективного стимулирования инволюции и прекращения молочной продуктивности для того, чтобы предотвратить вышеописанные нежелательные состояния.

Согласно дополнительным настоящим предпочтительным воплощениям животным является животное из поголовья домашнего скота, выбранное из группы, состоящей из коровы, буйвола, козы и овцы.

Новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются эффективными для стимулирования временного или стабильного прекращения молочной продуктивности. Временный эффект на выход молока можно получить от молочной железы лактирующего животного в ответ на разовое применение обычно путем прямой инъекции или вливания фармацевтической композиции по изобретению в полость железы через сосковый канал. Обычно разовая инъекция или вливание вызывает резкое уменьшение в молочной продуктивности примерно через 8 ч. В настоящем изобретении здесь описано, что разовое введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению также может вызывать стабильное прекращение молочной продуктивности и инволюцию. Прекращение молочной продуктивности осуществляется только в подвергнутой лечению железе; это явление имеет значительную важность, поскольку доение из не подвергнутых лечению желез может продолжаться, чтобы ограничить потерю выхода молока. В качестве альтернативы, если это желательно, могут быть подвергнуты лечению все молочные железы лактирующего животного для того, чтобы стимулировать прекращение молочной продуктивности.

Процесс инволюции, стимулированный фармацевтическими композициями по настоящему изобретению, является более быстрым и синхронизированным по сравнению с инволюцией, стимулированной прекращением доения, и молочная продуктивность может быть восстановлена путем механических стимулов типа доения.

Восстановление молочной продуктивности также осуществляется как в природном процессе инволюции после следующей беременности и родов. Быстрая инволюция, стимулированная композициями по настоящему изобретению, не противодействует восстановлению ткани молочной железы и восстановлению способности молочной секреции к родам.

Новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно применяют для лечения инфекции молочной железы. Как применяется здесь, термин "лечение" обозначает предотвращение инфекции, так же как лечение инфицированной железы, для того, чтобы сделать обратимой инфекцию и вылечить молочную железу как у человека, так и у млекопитающих, отличных от человека.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению применяют в лечении широкого круга микробных инфекций, включающих инфекции, вызванные грамположительными бактериями, грамотрицательными бактериями, грибами и вирусами.

Согласно определенным воплощениям фармацевтические композиции применяют при лечении мастита специфически у животных из поголовья домашнего скота, включающих коров, овец, буйволов и коз.

Клинический и субклинический мастит являются воспалительными состояниями вымени, главным образом, происходящими в результате бактериальной инфекции. Мастит имеет разнообразие бактериальных этиологий и вызывает большие потери молочной продуктивности ежегодно. Патогенные микроорганизмы, которые наиболее часто вызывают мастит, можно разделить на две группы на основе их источника: патогены окружающей среды и инфекционные патогены. Главными инфекционными патогенами являются *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, отрицательный по коагулазе стафилококк (CNS) и *E. Coli*. За исключением некоторых инфекций микоплазмы, которые могут зарождаться в других местах тела и распространяются систематически, эти пять главных типов микроорганизмов попадают в молочную железу через сосковый канал. Инфекционные организмы хорошо адаптированы для выживания и роста в молочной железе и часто вызывают инфекции, длящиеся неделями, месяцами или годами. Инфицированная железа является главным источником этих организмов в молочном стаде и перенос инфекционных патогенов не инфицированным четвертям и коровам осуществляется, главным образом, во время доения.

Клинический мастит легко диагностируется благодаря заметным изменениям в композиции молока и его внешнем виде, уменьшению молочной продуктивности, повышенной температуре тела и опуханию, покраснению или жару в инфицированных железах. Субклинический мастит, наиболее преобладающая форма заболевания, часто остается не выявленным, потому что его признаки не так легко видны. Многие субклинические ИМ имеют тенденцию быть стабильными, приводя в результате к уменьшению качества молока, благодаря повышенному количеству SCC в молоке, а также благодаря уменьшению

молочной продуктивности. ИМІ, локализованные в одной молочной железе, могут приводить к развитию клинического мастита и к распространению определенных маститных патогенов из инфицированной части молочной железы к неинфицированным. В отличие от клинического мастита обычно не советуют лечить животных из поголовья домашнего скота, имеющих субклинический мастит, путем введения антибиотиков во время лактации (Gruet et al., 2001. *Adv. Drug Delivery Rev.* 50:245-259), потому что показатель эффективности излечения является низким и потому что затрата на лечение и период ухода в течение 4-5 дней доения делают это экономически нецелесообразным (Yamagata et al., 1987. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1556-1561). Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить во время периода лактации. Как описано выше, композиции по изобретению могут иметь местный эффект, такой что лечение может быть введено только в инфицированную молочную железу(ы), в то время как доение из не инфицированных молочных желез может продолжаться, уменьшая потерю молока до минимума.

Для лечения мастита может требоваться введение в молочную железу повторных доз фармацевтических композиций по изобретению. Обычно введение повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно между 1-10 раз, более предпочтительно 1-3 раза с интервалом, выбранным из группы, состоящей из примерно 6, примерно 8, примерно 12, примерно 16, примерно 20 и примерно 24 ч в течение 1-10 дней, предпочтительно 1-3 дней.

Согласно определенным воплощениям новые фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят для лечения инфекций вымени во время сухостойного периода. Лечение может быть как направленным на подвергнутые лечению инфицированные железы (терапия сухостойной коровы), так и может быть как профилактическая терапия (предупреждающая терапия сухостойной коровы). Лечение инфекций в начале и во время сухостойного периода является полезным по сравнению с лечением во время лактации, поскольку оно дает возможность введения фармацевтической композиции не только в инфицированную железу, имеющую видимые признаки инфекции, но и во все железы вымени. Такое введение приводит в результате к подавлению существующей инфекции и предотвращает приобретение новых инфекций во время сухостойного периода. Кроме того, в настоящем изобретении демонстрируется, что введение фармацевтических композиций по изобретению во время сухостойного периода поразительно уменьшает процент инфекции в следующий период лактации. Фармацевтические композиции могут быть введены в молочную железу, для которой идентифицировано, что она имеет клинический или субклинический мастит, в не инфицированную железу в качестве профилактического лечения или в обе железы.

Согласно дополнительным воплощениям новую фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с дополнительным антимикробным лечением, выбранным из группы, состоящей из, но не ограниченной ими, лечения антибиотиками, бактерицидного лечения, стероидного и нестероидного противовоспалительного лечения, лечения с помощью иммуномодулятора и вакцинации. Согласно еще одному воплощению фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и дополнительное антимикробное лечение вводят одновременно как в виде объединенной одной фармацевтической композиции, так и в виде отдельных композиций. В качестве альтернативы фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят как предварительное лечение с последующим применением антимикробного лечения и наоборот.

Следующие примеры представлены в таком порядке для более полной иллюстрации предпочтительных воплощений по изобретению. Однако они ни коим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие широкие рамки изобретения.

#### Примеры

##### Пример 1. Получение фармацевтической композиции.

Коммерческий бычий казеин (например, Sigma) растворяли (100 г/л) в 25 mM Tris-буфере, pH 8 и гидролизовали трипсином (500 U/л) в течение 4 ч при 37°C. Раствор затем подкисляли с помощью HCl до pH 4,7 и негидролизированный казеин осаждали с помощью центрифугирования. Супернатант кипятили в течение 15 мин, охлаждали до комнатной температуры и доводили до pH 7 с помощью раствора NaOH. Вещество, которое не растворилось при этих условиях, удаляли с помощью центрифугирования и выбрасывали. В качестве альтернативы как стартовое вещество применяли коммерческий пищевой сорт гидролизата казеина, 1-40 г/л растворяли в солевом растворе или воде с получением pH приблизительно 7,2. Вода или солевой раствор, применяемые в течение всего процесса, соответствовали требованиям USP монографии "Вода для инъекции". Раствор затем нагревали до 40-60°C и после охлаждения фильтровали через фильтры 5 мкм с использованием инертного газа, такого как азот или аргон, при низком давлении (1-6 фунт/дюйм<sup>2</sup>). Для нескольких образцов потребовалась дополнительная фильтрация через фильтры 3 мкм. Фильтрат затем нагревали до 50-70°C для того, чтобы увеличить растворимость пептидов.

Полученный мутный раствор затем фильтровали через фильтр 0,2 мкм с использованием инертного газа, такого как азот или аргон, при низком давлении (1-6 фунт/дюйм<sup>2</sup>). На этой стадии фильтрации удаляли все оставшиеся казеиновые мицеллы, так что полученный после фильтрации раствор был чистым. Взяли образец фильтрата и протестировали его на общее содержание пептида с помощью метода Бредфорда и концентрацию белка довели до 5-15 мг/мл. pH раствора довели примерно до 7,3-7,6 или концен-

трированной HCl (реагент качества ACS) или 1,0н. NaOH и раствор фильтровали снова через фильтры 0,2 мкм с инертным газом при низком давлении. Конечный фильтрат (примерно 10 мл) поместили и запаяли в 20 мл стерилизованные стеклянные ампулы под давлением инертного газа.

Для определенных коммерческих источников казеинового гидролизата может требоваться стадия предварительной фильтрации через фильтр 5 мкм с использованием инертного газа, такого как азот или аргон, при низком давлении (1-6 фунт/дюйм<sup>2</sup>) для того, чтобы предотвратить закупорку фильтра 0,2 мкм в конце процесса.

Чистоту раствора определяли с помощью турбидометра (Micro 100 General Purpose Turbidometer, Metex Cooperation, Toronto, Canada). Полученный раствор был чистым, имеющим NTU 4,0. Полученную композицию обозначили здесь как MLTS-2.

Пример 2. Лечение мастита.

Пример 2.1. Терапия при сухостойном периоде, применяемая к коровам, имеющим мастит.

Популяция коров.

Тридцать две коровы принимали участие в этом исследовании (8 случаев с заболеванием, т.е. коровы, получавшие лечение, против 24 контролей, выбранных согласно плану исследования, см. ниже). Восемь случаев с заболеванием коров с диагнозом клинический мастит и/или субклинический мастит согласно бактериологическому диагнозу выбрали для получения лечения с применением композиции по изобретению, полученной, как описано в примере 1 выше (MLTS-2). 24 коровы служили в качестве контроля, для 6 из которых был поставлен диагноз мастит, как и у коров, описанных выше, и 18 были не инфицированы. Клинический мастит характеризуется видимыми признаками, включающими присутствие хлопьев или комков в молоке, резкое увеличение SCC, жар, частый пульс, потерю аппетита, обезвоживание и депрессию.

Инфицированная четверть или вымя также может быть опухшим. Субклинический мастит характеризуется уменьшением молочной продуктивности, уменьшением качества молока и повышением SCC, которое детектировалось количеством соматических клеток в молочном танке. Контрольных и тестируемых коров выбрали из одного стада и одной породы.

Критерии выбора для всех коров были следующие: поздняя стадия лактации, 1-2 недели перед ожидаемым первым днем сухостойного периода; четыре функционирующие четверти; беременность; никаких значительных внешних повреждений сосков; коровы не получали систематической противомаститной терапии за 4 недели до выбора; коровы не употребляли пищу с антибиотиками за 4 недели до выбора; никаких признаков болезненности, которые могли оказать влияние на исход лечения согласно решению исследователя. Коровы с диагностированным маститом являлись коровами с подтвержденными IMI и SCC по меньшей мере 400000 клеток/мл. Коров исключали из исследования согласно следующим критериям исключения: коровы получали иммунотерапию за 4 недели до выбора; коровы получали терапию с антибиотиком, гормоном, противовоспалительную и/или анаболическую терапию, или систематически, или с пищей за 4 недели до выбора; коровы, получающие вакцинную терапию за 12 месяцев до выбора; одновременное применение иммуно- и вакцинной терапий, или систематически, или с пищей; одновременное применение других альтернативных терапий; коровы с активной формой туберкулеза или другими инфекциями согласно решению исследователя; одновременное применение анаболических стероидов или систематически, или с пищей; одновременное применение гормонов или систематически, или с пищей.

План исследования.

Подвергнутые лечению (случаи с заболеванием) и контрольные коровы были выбраны, чтобы минимизировать внешние изменения с помощью определения оценки подбора согласно следующим отличительным признакам: стадо, порода, количество телят, возраст телят, количество сухостойных периодов и дата рождения коровы. Совершенный подбор приравнялся к 5; отсутствие подбора приравнялось к 0. Совершенный подбор требовался для стада и породы. Дополнительные факторы включают (от наиболее важного к менее важному фактору): количество родов (в частности, отелов) (разрешенный подбор  $\pm 1$ ), различие в дате отелов (разрешенный подбор  $\pm 2$  месяца), количество сухостойных периодов (разрешенный подбор  $\pm 1$ ), различие в дате начала сухостойного периода (разрешенный подбор  $\pm 2$  месяца), дата рождения (разрешенный подбор  $\pm 3$  месяца).

Коровы были выбраны для исследования за одну или две недели до предписанного начала сухостойного периода, который бывает примерно за 75 дней до отела. В течение этого периода измеряли следующие параметры по отношению к базовым данным: общий вид вымени; SCC; существование IMI согласно бактериологическому тесту и видимым признакам. Примерно за 60 дней до отела прекращали доение и вводили лечение. Тестируемые коровы получали 10 мл MLTS-2 с 8 мг/мл пептида дважды в день в течение 3 дней. Контрольные коровы с диагнозом мастита получали лечение для сухостойной коровы из широкого круга антибиотиков (цефкином, 75 мг на применение). Введение осуществляли с помощью инъекции в полость железы через сосковый канал молочной железы в виде разовой дозы на каждую четверть. Все четыре четверти вымени подвергали лечению. Для каждой дозы инъекции использовали новую ампулу. Использованные ампулы сохраняли для контроля соответствия и отчетности перед

наблюдателем за исследованием. После последнего лечения коров больше не доили до следующего периода лактации после отела. После завершения 3-дневного лечения у коров прослеживали видимые признаки мастита в течение примерно 9 недель во время сухостойного периода. В течение следующего периода лактации через один, два и три месяца после отела оценивали присутствие микроорганизмов в каждой четверти вымени с помощью бактериологического теста, общий вид вымени и SCC.

Результаты.

В табл. 1 ниже показано, что после лечения не присутствует никаких микроорганизмов, выявленных перед лечением (т.е. показатель эффективности излечения существующей инфекции был 100%).

Таблица 1

Эффект лечений в сухостойный период на излечение бактериальных инфекций и новых инфекций у коров, подвергнутых лечению казеиновым гидролизатом (8 коров, 32 четверти), по сравнению с подобранными контрольными коровами (24 коровы, 96 четвертей)

	Микроорганизм, выявленный перед лечением (No. четвертей)		Тот же микроорганизм, выявленный в следующую лактацию (0-89 дней после отела) (No. четвертей)	
	Случаи с заболеванием	Контроли	Случаи с заболеванием	Контроли
<i>S.aureus</i>	3	5	0	2
<i>S.dysgalactia</i>	4	7	0	4
<i>S.chromoge</i>	0	5	0	2
<i>S.uberis</i>	1	4	0	2
<i>E.coli</i>	1	6	0	3
CNS	2	4	0	0
Другие	0	3	0	5
Инфицированные четверти	11	34	0	18
Показатель эффективности излечения (%)	-	-	100%	47,1%

Замечание: S обозначает Staphylococcus; CNS обозначает отрицательный по коагулазе стрептококк.

У контрольных коров, для которых в начале исследования был поставлен диагноз мастит, не получавших лечение, за время этого периода развился (n=12 четвертей из 18 четвертей); в других 6 четвертях развилась одновременная инфекция, в одной - тот же микроорганизм, в остальных 5 четвертях микроорганизм отличного типа.

Пример 2.2. Однодозовая терапия в сухостойном периоде, применяемая на уровне стада к коровам, включающим коров с маститом и без него.

План исследования.

Целью этого эксперимента было исследовать эффективность MLTS-2 в качестве терапии сухостойной коровы на уровне стада. Пятьдесят пять коров породы Холстейн из одного молочного стада, будучи, по меньшей мере, во втором периоде лактации, принимали участие в эксперименте с 25 июля 2005 г. по 11 ноября 2005 г.

Исследование осуществляли согласно Руководству международной координации по гармоничному функционированию в ветеринарии. Критерии включения и исключения были, как описано в примере 2.1.

Коров выбирали для исследования за одну или две недели до предписанного начала сухостойного периода, который бывает примерно за 75 дней до отела. Образцы молока асептически собирали из каждой четверти по меньшей мере два раза перед предписанным временем лечения при запуске и культивировались в соответствии с установленными руководствами. Интрамаммарная инфекция (IMI) перед запуском была определена путем идентификации по меньшей мере двух положительных культур. В период времени перед лечением измеряли следующие параметры по отношению к базовым данным: общий вид

вымени; SCC; существование IMI согласно бактериологическому тесту и видимым признакам. Примерно за 60 дней до отела прекращали доение и вводили лечение. Лечение вводили асептически интрамаммарным вливанием в четыре четверти 55 тестируемых коров. В каждую четверть осуществляли вливание один раз 10 мл MLTS-2, содержащего 8 мг/мл пептида на 1 мл. Для каждой дозы инъекции использовали новую ампулу. Использованные ампулы сохраняли для контроля соответствия и отчетности перед наблюдателем за исследованием. После последнего лечения коров больше не доили до следующего периода лактации после отела. После завершения лечения у коров отслеживали видимые признаки мастита в течение примерно 9 недель во время сухостойного периода. Чтобы оценить показатель эффективности излечения и процент новой инфекции на уровне четверти, брали образцы молозива из всех четвертей в первые два месяца следующей лактации и культивировали в подходящей среде. Считали, что четверти с двумя последовательными отрицательными молочными культурами были излечены от микробиологической инфекции или имели не инфицированную четверть. Через один и два месяца после отела оценивали общий вид вымени и SCC. Все параметры собирали для каждой четверти и анализировали с помощью SAS/STAT совокупности эффектов до против после с использованием теста хи-квадрата.

Результаты.

В исходной выборке было обнаружено, что 14 коров (25,5%) имеют инфекцию, у которых инфицировано 19 четвертей (8,6%). Превалирующими выявленными организмами являлись варианты стафилококков (14/19) (табл. 2).

Таблица 2

IMI, выявленные до и после лечения (коровы n=55, четверти n=220)

До лечения		IMI подвергнутых лечению коров после отела (Образцы оценивали по тем же бактериям, что и до лечения)			
		IMI		без IMI	
Коровы	Четверти	Коровы	Четверти	Коровы	Четверти
14	19	1	1	13	18
%: 14/55	19/220	Преобл. 1/14	1/19	Излечено: 13/14	18/19
Выявленные бактерии:		Выявленные бактерии			
<i>S. epidermidis</i>	n=2	<i>S. chromogens</i>			
<i>S. chromogens</i>	n=7				
CNS	n=2				
<i>S. aureus</i>	n=2				
<i>S. xyosos</i>	n=1				
<i>Strep. NOS</i>	n=1				
<i>Strep. dysgalactiae</i>	n=3				
<i>Strep. Uberis</i>	n=1				

Замечание: S обозначает Staphylococcus;

CNS обозначает отрицательные по коагулазе стафилококки;

NOS, никак не определен.

Strep, стрептококк.

Преобл. обозначает преобладание.

Различия в существовании IMI до и после лечения были статистически значимы,  $p < 0,005$ .

Данные показывают, что после отела только одна четверть остается инфицированной тем же типом организма до 89 дней.

Пример 2.3. Лечение мастита во время лактации.

Тридцать семь коров выбрали для этого исследования. Для всех коров был поставлен диагноз клинический мастит одной железы. Казеиновый гидролизат вводили путем инъекции в полость инфицированной железы через сосковый канал молочной железы дважды в день: один раз утром и один раз днем.

Коровы, которые принимали участие в исследовании, находились в различных стадиях относительно количества отелов и, соответственно, количества лактации. Организмы идентифицировали и оценивали с помощью стандартных лабораторных методик (Leitner et al., 2004 Dairy Sci. 87:46-52). Положительные результаты были основаны на двух последовательных идентификациях известных маститных пато-

генов. Как видно из табл. 3 ниже, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является высокоэффективной при лечении мастита во время периода лактации.

Таблица 3

Эффект MLTS-2 на излечение от бактериальной инфекции имеющих ИМІ коров во время лактации

Патогены	Количество инфицированных микроорганизмом желез до лечения	Количество инфицированных микроорганизмом желез после лечения
<i>S. aureus</i>	5	1
Все стрептококки	6	2
<i>E. coli</i>	4	1
<i>A. pyogenes</i>	10	0
Другие	8	0
Общий показатель эффективности излечения (%)	33	4

### Пример 3. Сокращение сухостойного периода.

#### Популяция коров.

Коровы были выбраны для исследования согласно критериям включения/исключения, описанным в примере 2.1 выше. Оценка подбора между подвергнутой лечению (n=5) и контрольной группой (n=15) была осуществлена так же, как в вышеуказанном примере. В контрольной группе по меньшей мере одной пятой коров был поставлен диагноз мастит, и они были подвергнуты лечению с помощью терапии антибиотиков для сухостойной коровы.

#### План исследования.

Коровы были выбраны для исследования за две недели до предписанного начала исследования. Начало исследования осуществляли примерно за 60, 40, 30, 20 и 10 дней до ожидаемого отела. До начала исследования измеряли следующие параметры по отношению к базовым данным: SCC; существование ИМІ согласно бактериологическому тесту и видимым признакам и выход молока. Казеиновый гидролизат, полученный, как описано в примере 4 здесь ниже, вводили только один раз в день. Уменьшение количества введений до разового применения является очень желательным, поскольку разовое лечение значительно упрощает процедуры и объем работы на данной ферме, следовательно, существует вероятность, что фермеры примут процедуру. Введение представляло собой инъекцию в полость железы через сосковый канал молочной железы. Для каждой дозы инъекции использовали новую ампулу. Используемые ампулы сохраняли для контроля соответствия и отчетности перед наблюдателем за исследованием. После лечения коров больше не доили до следующей лактации. После завершения лечения за коровами прослеживали (включая оценку вымени) во время установленного сухостойного периода.

Кроме того, после отела оценивали следующие параметры: SCC; ИМІ с помощью бактериологического теста и видимые признаки, оценку соскового канала, включающую оценку открытого или закрытого канала и прочность закупоривания. Также оценивали выход молока. Лечение определяли как успешное, когда оно вызывало полное прекращение молочной продуктивности и после отела не имело никакого побочного эффекта на измеряемые параметры. Сокращение сухостойного периода до 45 дней или менее определяли как высокоуспешное. Статистические анализы были, как описано здесь выше в примере 2.2. Как известно, выходы молока увеличиваются от первого периода лактации (после первого отела) до, по меньшей мере, четвертого периода лактации. Таким образом, для того чтобы стандартизовать выход молока подвергнутых лечению коров против не подвергнутых лечению, данные по выходу молока были скорректированы согласно количеству лактации следующим образом: для первой лактации литр молока в день делили на 0,795, для второй лактации литр молока в день делили на 0,965; для третьей лактации литр молока в день делили на 1,001 и для четвертой и более стандартизация не осуществлялась. Эти корректирующие факторы в настоящий момент применяются Израильской ассоциацией по разведению коров (ICBA) для генетической селекции коров в Израиле.

#### Результаты.

Все коровы со случаями заболевания и контрольные коровы отелялись согласно плану исследования, никаких случаев выкидышей или любых других послеродовых заболеваний не было зарегистрировано. Продолжительность сухостойного периода (в днях) в предыдущую лактацию была одинаковой для случаев с заболеваниями и контролей. С другой стороны, в настоящей лактации продолжительность сухостойного периода была значительно короче ( $p < 0,01$ ) в случаях с заболеванием по сравнению с контролями после лечения казеиновым гидролизатом (табл. 4).

Таблица 4

Эффект лечения казеиновым гидролизатом на продолжительность сухостойного периода

	Сухостойный период после предыдущей лактации		Сухостойный период после настоящей лактации	
	Случаи с заболеванием	Контроли	Случаи с заболеванием	Контроли
Продолжитель- ность (дни)	60,8	63,9	39,2	62,1
Предел	55,69	60,70	31,45	55,71

После отела выход молока у коров не отличался, у которых сухостойный период был сокращен, по меньшей мере, на периоды времени, описанные ниже в табл. 5.

Таблица 5

Выход молока после лечения казеиновым гидролизатом, примененным для сокращения сухостойного периода

Дни лактации	Предыдущий период лактации			Настоящий период лактации		
	Средний выход молока в день (литры)	Различие между случаями с заболеванием и контролями		Средний выход молока в день (литры)	Различие между случаями с заболеванием и контролями	
4-33	40,7	41,6	0,98	43,9	45,6	1,69
34-63	43,4	46,4	3,01	49,8	50,7	0,89
64-104	43,7	47,2	3,50	49,8	51,5	1,82

Пример 4. Уменьшение количества микроорганизмов в молоке.

Пример 4.1. Количество микроорганизмов у лактирующих коров, подвергнутых лечению казеиновым гидролизатом около 3 дней.

Популяция коров.

Тридцать семь коров завершили исследование из исходно набранных для исследования 42 коров. Коровы, подходящие для набора в это исследование, если они имели четыре функциональные четверти, из которых по меньшей мере одна была инфицирована, не имели значительных сосковых повреждений, были здоровы и не получали антибиотик и/или противовоспалительную терапию в течение 30 дней до начала лечения. Кроме того, никакие маститные вакцины не применялись, по меньшей мере, в течение предыдущего года в любом из стад, из которых были выбраны коровы. Коров на этих фермах кормили обычным для Израиля общим смешанным рационом, который включал 65% концентратов и 35% корма, содержащего 17% белка.

Получение казеиновых фосфопептидов.

Казеиновый гидролизат, включающий казеиновые фосфопептиды, был получен, как описано ранее (Shamay et al., 2003, supra). Процедуру осуществляли в Ну Лабораториях (Rehovot, Israel), обеспечивающих стерильность конечного продукта и чтобы продукт был упакован в стерильные ампулы. Уровень эндотоксина в конечном продукте был 0,48 EU/мл согласно тесту Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Количество инъецированного эндотоксина с 10 мл раствора 0,0001 EU/кг веса тела (предполагая средний вес тела коровы 500 кг) составляет в 2000 раз меньшее количество, чем допустимый предел эндотоксина при интратекальном введении человеческих лекарственных средств ( $K = \text{допустимый предел при EU/кг} = 5 \text{ EU/кг}$  для парентеральных лекарственных средств и 0,2 EU/кг для интратекальных лекарственных средств). Конечные продукты для разовой инъекции в одну четверть, содержащую 10 мл CNH с концентрацией пептида 10 мг/мл.

План исследования и результаты.

Казеиновый гидролизат вводили дважды в день в течение 3 дней в единственную инфицированную молочную железу вымени через сосковый канал. Доеение и стимулирование сухостойного периода про-



должалось согласно стандартному графику стада.

Образцы молока оценивали в центральной лаборатории Израильской ассоциации по разведению коров (ICBA), Казария, Израиль или в Национальном справочном центре по маститу, Ветеринарный институт Кимрона. Организмы идентифицировали и оценивали с помощью стандартных лабораторных методик (Leitner et al., 2004. Dairy Sci. 87:46-52). Положительные результаты были основаны на двух последовательных идентификациях известных маститных патогенов.

Количество микроорганизмов в молоке до применения лечения (SCC-PRE) сравнивали с SCC, наблюдаемым после отела (SCC-POST). SCC-PRE, представленное здесь ниже в табл. 6, представляет собой среднее из двух измерений за 15 дней до применения лечения казеиновым гидролизатом. Представленное SCC-POST представляет собой среднее по меньшей мере из двух измерений, проведенных между 15-60 днями после отела. Для 27 коров SCC прослеживали один раз в месяц в течение 10 месяцев после отела.

Статистический анализ.

SCC-PRE сравнивали с SCC-POST с помощью SAS/STAT совокупности с использованием теста хи-квадрата для SCC и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для длительных изменений. Все образцы молока анализировали на SCC с помощью Fossomatic 360 в лаборатории ICBA и конвертера логарифмической шкалы для статистического анализа.

Результаты.

Данные собирали от 37 коров из 9 стад (2-7 коровы/стадо) с подтвержденным диагнозом мастита в одной четверти. Наиболее преобладающими патогенами являлись *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* и *Streptococcus uberis*. Инфекция с *Streptococcus species*, *P. auroginosa*, *Corynebacterium bovis* и *Micrococcus* была исключительно субклинической, тогда как ~60% инфекций с *S. aureus*, *E. Coli* и *A. pyogenes* были клиническими и ~40% субклиническими.

Были значительные различия между SCC-PRE (среднее 2210200) и SCC-POST (среднее 205000) и при тесте на индивидуальный патоген и в общей группе исследования ( $p < 0,001$ ) (табл. 6).

Таблица 6

Эффект казеинового гидролизата на SCC после отела у лактирующих коров, подвергнутых лечению одной инфицированной железы

		Количество микроорганизмов	
		SCC-PRE	SCC-POST
Патогены	Количество	Среднее	Среднее
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1235,2	147,4
Все Стрептококки	7	3357,4	262,3
<i>Escherichia Coli</i>	5	1781,2	275,4
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	10	1465,1	145,6
Другие	6	3283,5	226,7
Все			
Среднее SCC		2210,2	205,0
Стандартное отклонение		2374,3	170,2

В клинически инфицированных железах SCC-POST у 75% коров ( $n=9/12$ ) было после лечения 201000 клеток/мл или менее, и у всех коров, подвергнутых лечению, SCC-POST было 401000 клеток/мл или менее (табл. 7). В субклинически инфицированных железах SCC-POST у 57% ( $n=12/21$ ) коров было после лечения 201000 клеток/мл или менее, и у 81% случаев было 401000 клеток/мл или менее. При рассмотрении набора всех данных SCC-POST в 63,6% ( $n=21/33$ ) случаев было ниже 201000 клеток/мл, что было значительно выше ( $p < 0,01$ ), чем количество случаев ( $n=12/33$ ), в которых SCC-POST было выше 201000 клеток/мл.

Таблица 7

Эффект казеинового гидролизата на SCC после отела у лактирующих коров, подвергнутых лечению одной инфицированной железы

Стадия мастита до лечения	SCC после лечения		
	0-200	201-400	>401
Клинический	9 коров	3 коровы	0 коров
Субклинический	12 коров	5 коров	4 коровы
Среднее SCC	95,6	329,4	530,9
Стандартное отклонение	45,8	67,1	133,4

В среднем для 27 коров прошел 6,1 месяц между лечениями и стимулированием сухостойного периода, т.е. отел произошел после сухостойного периода. Таким образом, у этих коров SCC-POST представляет SCC, наблюдаемое в период лактации после сухостойного периода. У 59,3% коров (16/27), SCC-POST было ниже 201000 клеток/мл, которое значительно не отличалось от 21/23, количества случаев, в которых SCC-POST было ниже 201000 клеток/мл в период между лечением и запуском. Это не имеет значения, что почти у 26% коров SCC-POST было ниже 101000 клеток/мл в течение всего последующего наблюдения и у 85% (23/27) SCC-POST было менее чем 401000 клеток/мл.

Пример 4.2. Эффект одной дозы казеинового гидролизата, введенного в четыре железы, на количество микроорганизмов после отела.

Уменьшение количества лечений до одноразового очень важно с практической точки зрения, потому что разовое лечение должно существенно упростить процедуры и объем работы на данной ферме, следовательно, существует вероятность, что фермеры примут эту процедуру.

Целью этого эксперимента было исследовать эффект лечения казеиновым гидролизатом, примененным в одной дозе к четырем железам, на количество микроорганизмов после отела. Коровы породы Холстейн (55) из одного молочного стада, будучи, по меньшей мере, во втором периоде лактации, принимали участие в эксперименте с 25 июля по 11 ноября 2005 г.

Исследуемые коровы, критерии включения и исключения, взятие образцов молока и протоколы исследования, по существу, как описано здесь выше в примере 2.1. Количество микроорганизмов в молоке до применения лечения (SCC-PRE) сравнивали с SCC, наблюдаемым после отела (SCC-POST). SCC-PRE представляло собой среднее из двух измерений в течение 15 дней до лечения в каждой индивидуальной железе. SCC-POST представляло собой среднее по меньшей мере из двух измерений в течение 15-60 дней (интервал 15-30, 31-60) после даты отела. Данные и SCC анализировали как в примере 4.1.

Результаты.

До лечения среднее SCC-PRE, измеренное в инфицированных четвертях (19 четвертей 13 коров), было 557278 клеток/мл по сравнению с 183381 клеток/мл ( $p < 0,001$ ) в четвертях без IMI. Как показано в табл. 8 ниже, лечение было эффективным в уменьшении SCC-POST ( $p < 0,01$ ). Различие между SCC до и после лечения было более значительным в интрамаммарно инфицированных железах ( $p < 0,001$ ) по сравнению с различием в железах без IMI ( $p < 0,05$ ); однако, эти результаты очевидно демонстрируют, что применение выделенных из казеина пептидов уменьшает SCC в молоке и, таким образом, улучшается качество молока при применении как к инфицированным, так и к не инфицированным железам.

Таблица 8

Эффект казеинового гидролизата на SCC в инфицированных и не инфицированных железах после отела

	SCC-PRE (клеток/мл)	SCC-POST (клеток/мл)		
		15-30 дней	31-60 дней	Среднее
Инфицированные-IMI	557,278*	146,851*	154,301*	149,201*
Не инфицированные/IMI	183,381***	160,945***	175,813	167,232***
Все	214,777**	156,480**	169,230**	164,914**

\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$

Пример 5. Эффект казеинового гидролизата на выход молока после отела.

Пример 5.1. Эффект многократных применений казеинового гидролизата.

Популяция коров.

Одиннадцать коров (случаи с заболеванием) с поставленным диагнозом клинического и/или субклинического мастита с помощью бактериологического диагноза были выбраны для получения лечения

казеиновым гидролизатом. 33 коровы служили в качестве контроля, из которых 6 был поставлен диагноз мастит, как описано выше, и 27 были не инфицированы. Контрольные и тестируемые коровы были выбраны из одного стада и были одной породы.

Примерно за 60 дней до отела доение прекращали и вводили лечение. Тестируемые коровы получали 10 мл MLTS-2 с 8 мг/мл пептида дважды в день в течение 3 дней. Контрольные коровы получали лечение антибиотиками для сухостойной коровы в виде разового лечения. Все четыре четверти вымени были подвергнуты лечению. Между лечениями коров не доили; остаточное накопление молока удаляли из подвергнутой лечению железы до лечения казеиновым гидролизатом.

Данные этого испытания были подвергнуты трехфакторному дисперсионному анализу ANOVA с планом повторных измерений ("расщепленные делянки"), использующим группы (подвергнутые лечению коровы против контрольных коров); лактация (тестируемая лактация: 1, 2, 3 или 4-5) и через месяц после отела (1-й, 2-й, 3-й или 4-й месяц лактации). Для сравнения средней молочной продуктивности до и после лечения выход молока в день стандартизовали, как описано в примере 3 здесь выше.

Результаты.

Фиг. 1 и 2 изображают обычный ответ на казеиновый гидролизат (коровы №№ 2425 и 2331 соответственно). Обе коровы были инфицированы *Staphylococcus aureus* во время лечения. Можно увидеть, что инфекция вызвала уменьшение в выходе молочной продуктивности во время второго периода лактации. Однако после лечения выход молока значительно увеличился после отела до последнего измерения (60 дней после отела). В табл. 9 показано, что увеличение выхода молока не оказывает негативного влияния на качество молока, измеренное по концентрации белка и жира.

Таблица 9

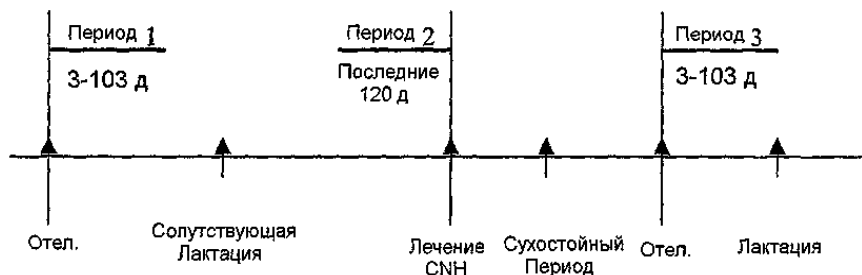
Эффект лечения казеиновым гидролизатом на концентрацию белка и жира в молоке, полученном после отела через 100 дней лактации

	Контроль		Подвергнутые лечению	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Белок (%)	3,0	2,9	3,1	3,2
Жир (%)	3,5	3,6	3,5	3,3

Пример 5.2. Эффект разовых применений казеинового гидролизата.

Целью этого эксперимента было исследовать эффект на выход молока после отела от разового лечения казеиновым гидролизатом, примененного к четырем железам при запуске до отела. Важность режима разового применения заключается в уменьшении объема работы на ферме и в одобрении штатом введения лечения. Коровы породы Холштейн (55) будучи, по меньшей мере, во втором периоде лактации, из одного молочного стада принимали участие в эксперименте с 25 июля по 11 ноября 2005 г.

Исследуемые коровы, критерии включения и исключения, взятие образцов молока, бактериологические тесты и протоколы исследования подобны примерам 2.2 и 4.2. Выход молока от индивидуальной коровы автоматически записывали трижды в день. Эффект казеинового гидролизата на выход молока после отела (от 4 до 103 дней) оценивали путем сравнения выхода молока в следующие определенные периоды:



Выход молока периода 3 сравнивали с выходом молока периодов 1 и 2 (см. схему, приведенную ниже для определения периодов).

Коровы, принимавшие участие в исследовании, находились в различных стадиях по отношению к количеству отелов и, соответственно, количеству лактации. Стандартизацию выхода молока у коров на различных лактациях корректировали согласно выходу молока и количеству лактации, как описано здесь выше в примере 3. 28 коров были подвергнуты лечению в конце первой лактации, 17 - в конце второй и 10 - в конце третьей и более лактации. Выход молока представлен в виде не обработанных результатов и после стандартизации. Данные анализировали с помощью SAS/STAT совокупности, как описано в примере 5.1.

Результаты.

Данные были собраны от 55 коров. Выход молока в период 3 увеличился на 11,60% ( $p < 0,01$ ) по

сравнению с выходом молока в период 1 (табл. 10).

Таблица 10

Эффект на выход молока после отела от казеинового гидролизата, который использовали для лечения в виде разовой дозы при запуске

Дни от даты отела	Период 1		Период 3	
	Не обработанные данные	Данные после коррекции	Не обработанные данные	Данные после коррекции
4-23	33,09	37,22	42,88	43,63
24-43	38,39	43,20	48,86	49,72
44-63	39,82	44,85	48,90	49,77
64-83	39,08	44,08	47,75	48,61
84-103	38,93	43,97	46,60	47,45
4-103	37,86	42,66	46,79	47,61

У коров, имеющих интрамаммарную инфекцию (IMI) (n=13, железы = 19), эффект лечения казеиновым гидролизатом был более заметным ( $p<0,01$ ), потому что ежедневное количество молока в период 2 (табл. 11) был на 2,2 л ниже по сравнению с количеством молока, полученным от коров без IMI, тогда как в период 3 выход молока коров, имеющих IMI, и коров без IMI был подобным (табл. 12).

Таблица 11

Выход молока в период 2 коров, имеющих IMI, и коров без IMI

Дни, предшествующие дате запуска	Коровы с IMI		Коровы без IMI	
	Не обработанные данные	После факторизации	Не обработанные данные	После факторизации
120-101	32,05	36,49	33,44	37,90
100-81	31,31	35,69	32,18	36,54
80-61	28,50	32,62	30,64	34,84
60-41	26,39	30,22	28,79	32,80
40-21	24,51	28,14	26,39	30,14
20-1	21,74	24,98	23,10	26,45
120-1	27,42	31,36	29,09	33,11

Таблица 12

Эффект на выход молока после отела от казеинового гидролизата, который использовали для лечения в виде разовой дозы при запуске (период 3)

Дни после даты отела	Период 3 от коров с IMI в период 2		Период 3 от коров без IMI в период 2	
	Не обработанные данные	После стандартизации	Не обработанные данные	После стандартизации
4-23	41,69	42,39	42,67	43,43
24-43	47,54	48,29	49,28	50,17
44-63	49,61	50,41	48,68	49,57
64-83	48,90	49,71	47,38	48,26
84-103	47,14	47,92	46,43	47,30
4-103	46,97	47,74	46,73	47,57

Пример 6. Эффект казеинового гидролизата на состояние коров, стимулированных к запуску.

Согласно общепринятым практикам современные молочные коровы входят в сухостойный период за 60 дней до ожидаемого отела как компромисс между желанием фермера увеличить до максимума молочную продуктивность и необходимостью минимального "периода запуска", что должно предотвратить уменьшение молочной продуктивности в следующую лактацию (Annen et al., 2004, ibid). Эта практика связана с внезапным прекращением доения коров, все еще производящих значительное количество молока, 20-40 л в день и иногда даже 50 л в день. Такая практика приводит в результате к накоплению больших количеств молока в вымени и связана с застоем и протеканием молока, которые вызывают часто замечаемые страдания, связанные с громким мычанием в течение нескольких дней. Таким образом, настоящая практика запуска коров в современном молочном хозяйстве значительно затрудняет состояние коров.

Целью этого эксперимента было протестировать влияние лечения казеиновым гидролизатом на поведение и состояние производящих молоко молочных коров, стимулированных к запуску путем внезапного прекращения доения. 20 коров породы Хольштейн с назначенным предстоящим концом лактации (~60 дней) и производящих 17-35 л молока в день, были введены в исследование. Коров разбили на пары согласно количеству лактации, дням доения, дням до отела, целостности сосковых окончаний, выходу молока, SCC на 1 мл молока коровы или четверти и согласно количеству четвертей, инфицированных на день запуска (табл. 13).

Таблица 13

Сравнение начальной точки для случаев с заболеванием коров (CNH+цефкином) и контрольных коров (цефкином) (n=10 для каждой группы, данные представлены в виде значения  $\pm$ ст.откл.)

	Случаи с заболеванием коров CNH+Цефкином		Контрольные коровы Цефкином	
	Значение $\pm$ ст.откл.	Предел	Значение $\pm$ ст.откл.	Предел
Количество лактаций	1,7 $\pm$ 0,7	1-3	1,9 $\pm$ 0,9	1-3

Дни доения	355,8±58,4	285-451	327,0±39,8	281-388
Дни до отела	59,3±9,8	42-70	61,2±10,6	38-75
Целостность сосковых окончаний	1,3±0,7	0-2	1,2±0,7	0-2
Выход молока (кг/день)	25,1±5,3	17-32	26,4±5,2	21-35
SCC (x1000)	171,6±219,9	41-704	205,8±250,6	54-900
Статус бактериальной инфекции (корова; четверти) *	4;4		4;6	

SCC молока четверти и бактериальный изолят тестировали по отдельности в течение недели 3 раза перед запуском. Одна корова из каждой пары была затем определена в подгруппу случайным образом (путем подбрасывания монеты). Коровы в подгруппе 1 были подвергнуты после доения лечению казеиновым гидролизатом и антибиотиком широкого диапазона цефкином (75 мг на дозу) (N+C), в то время как коровы в подгруппе 2 были подвергнуты лечению одним цефкином (75 мг на дозу) (C). За одну неделю до лечения коровы из 2 подгрупп были помещены вместе для адаптации в замкнутый загон, обеспечивающий 10 м<sup>2</sup> затененного досчатого настила и 10 м<sup>2</sup> покрытого бетоном загон для каждой коровы, и затем оставались в том месте в течение 2 недель после. Через три недели, считая от недели до лечения до конца второй недели после лечения, коровы были оснащены электронным сенсором, установленным на ноге (Afifarm Система Управления, S.A.E. Afikim, Israel), которая дает возможность наблюдения, регистрации и передачи активности животного (шагов) и лежачего поведения (LB), с минимальным нарушением другого свободного поведения животного.

Индекс давления вымени (UPI) выбирали следующим образом: 0, 1, 2 и 3, где 0 - нет давления, 1 - среднее давление, 2 - высокое давление и 3 - очень высокое давление. Произвольные величины UPI определяли путем оценки давления вымени при нажатии пальца на ткань и оценивали ее сопротивление давлению в двух областях, молочной полости и в corpus ubeis, на 10 см выше сосков. Все измерения UPI корректировали одним обученным специалистом один раз в день в одно и то же время в течение всего эксперимента.

Данные статистически анализировали с использованием процедуры подобранной модели для повторных измерений JMP (Версия 5, SAS Институт, Gary, NC); лечение было субъективным фактором и время было в числе субъективных факторов. Различия были значительными при P<0,05. Модель представляла собой

$$Y_{ijkim} = \mu + P_i + \alpha_j + C(ij)k + \gamma_l + \alpha\gamma_{il} + \varepsilon_{ijkim}$$

где  $Y_{ijkim}$  = зависимая переменная,  $\mu$  = абсолютная величина,  $P_i$  = фиксированный эффект периода (перед и после запуска;  $i = 1-2$ ),

$\alpha_j$  = фиксированный эффект лечения  $i$  ( $i=1-2$ ),

$C(ij)k$  = случайный эффект коровы  $k$  ( $k = 1-10$ ) в период  $i$  и лечение  $j$ ;

$\gamma_l$  = эффект дня  $l$  ( $l = 1-9$ );

$\alpha\gamma_{il}$  = эффект взаимодействия лечения  $j$  и дня  $l$ ;

$\varepsilon_{ijkim}$  = случайная ошибка, связанная с коровой  $k$  в период  $i$  и при лечении  $j$  в день  $l$ .

Сравнение лечений в течение периода или в течение специфического дня после лечения проводили с помощью t-теста с использованием Tukey-Kramer HSD.

Кроме того, анализ линейной регрессии проводили для каждого лечения отдельно в двух случаях: (i) дни в эксперименте как независимая переменная против накопленного количества шагов и (ii)  $\Delta$  (где  $\Delta$  обозначает разницу данных, измеренных в данный день после отела минус средняя величина тех же данных перед) UPI в виде независимой переменной против  $\Delta$  соотношения между количеством шагов и продолжительностью лежки. Значимость регрессии оценивали исходя из коэффициента регрессии и  $p$ , где различия между наклонами линии регрессии оценивали исходя из наклона линии регрессии ( $b$ ), стандартной ошибки наклона ( $Sb$ ) и  $n$  при помощи t-теста.

Произвольные величины UPI (фиг. 3) заметно увеличивались от ~1,2 до лечения до величин в пределе от 1,8 до 2,5 у коров, подвергнутых лечению только антибиотиком (C), по сравнению с резким падением у коров, подвергнутых лечению N+C в первые 4 дня после стимулирования у коров инволюции, таким образом, в эти 4 дня величины UPI значительно различались между группами ( $p<0,01$ ). Только по про-

шествии 5-го дня после стимулирования запуска UPI контрольных коров уменьшилось. На фиг. 4 представлены фотографии вымени 2 коров на 4 день после лечения. Выход молока этих конкретных двух коров был около 30 л в день на день запуска. Изображение на фиг. 3 демонстрирует различия между подвергнутой лечению коровой с UPI = 0 (панель В) и не подвергавшейся лечению коровой с UPI = ~2 (панель А).

Соотношение между количеством шагов и продолжительностью лежки (RSL) использовали в качестве величины для оценки "комфорта животного" (фиг. 5). Соотношение становится меньше для коров, подвергнутых лечению N+C, начиная со второго дня после лечения, в то время как у коров, подвергнутых лечению С, соотношение не изменялось. В результате, различие между группами расширилось и стало значительным ( $p < 0,005$ ) с третьего дня после лечения и дальше.

В общем, давление вымени, активность и спокойное поведение коров, подвергнутых лечению казеиновым гидролизатом, были очевидно связаны с признаками, что коровы не страдают и что им спокойнее и более комфортабельно, чем коровам, стимулированным к запуску обычным способом.

В то время как определенные воплощения по изобретению были проиллюстрированы и описаны, стало очевидно, что изобретение не ограничено описанными здесь воплощениями. Многочисленные модификации, изменения, вариации, замены и эквиваленты будут очевидны специалистам в данной области, не выходя из рамок и сущности настоящего изобретения, как описано в формуле изобретения, которая следует далее.

#### Список последовательностей

```

<110> MILEUTIS LTD.

<120> Фармацевтические композиции, включающие выделенные из казеина
      пептиды, и способы их применения

<130> MLTS/001 PCT

<150> 60/676,292
<151> 2005-05-02

<150> 60/688,697
<151> 2005-06-09

<160> 5

<170> Патент в Версии 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<220>
<221> Прочие Признаки
<222> {1}..{3}
<223> Модифицированный с помощью фосфорной кислоты

<400> 1

Ser Ser Ser Glu Glu
1          5

<210> 2
<211> 25
<212> Белок
<213> Синтетический пептид

<220>

```

<221> Прочие Признаки  
 <222> (17)..(19)  
 <223> Модифицированный с помощью фосфорной кислоты

<400> 2

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg  
 20 25

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Синтетический пептид

<220>  
 <221> Прочие Признаки  
 <222> (8)..(10)  
 <223> Модифицированный с помощью фосфорной кислоты

<400> 3

Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asp  
 1 5 10 15

Ser Val Glu Gln Lys  
 20

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Синтетический пептид

<220>  
 <221> Прочие Признаки



<222> (8)..(10)

<223> Модифицированный с помощью фосфорной кислоты

<400> 4

Lys Asn Thr Met Glu His Val Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Asn Glu Thr Tyr Lys  
20

<210> 5

<211> 25

<212> Белок

<213> Синтетический пептид

<220>

<221> Прочие Признаки

<222> (11)..(13)

<223> Модифицированный с помощью фосфорной кислоты

<400> 5

Asn Ala Asn Glu Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser  
1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Thr Glu Glu Val Lys  
20 25

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения продолжительности сухостойного периода между циклами лактации у лактирующего животного, включающий введение лактирующему животному по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), и где выход молока в период доения, следующий за сухостойным периодом, является, по меньшей мере, таким же, как выход молока в период доения, предшествующий сухостойному периоду.

2. Способ по п.1, где продолжительность сухостойного периода уменьшается до менее чем 50 дней, предпочтительно продолжительность сухостойного периода уменьшается примерно до 20-30 дней.

3. Способ по п.1, где пептид вводят одновременно с прекращением доения.

4. Способ по п.1, где фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина.

5. Способ по п.4, где фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, ее фрагмент, аналог или производное, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и аналогов, производных и фрагментов указанных последовательностей, раскрытых в описании.

6. Способ по п.1, где пептид вводят по меньшей мере в один сосковый канал молочной железы.

7. Способ по п.1, где выход молока в период доения, следующий за сухостойным периодом, увеличивается по сравнению с выходом молока в период доения, предшествующий сухостойному периоду.

8. Способ улучшения гигиенических показателей молока лактирующего животного, включающий

введение в молочную железу лактирующего животного по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO: 1), чтобы уменьшить число соматических клеток (SCC) в молоке по сравнению с числом клеток (SCC), обнаруженных в молоке до введения пептида, причем число соматических клеток в молоке после введения пептида составляет менее чем 400000 клеток/мл.

9. Способ по п.8, где фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина.

10. Способ по п.9, где фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и аналогов, производных или фрагментов указанных последовательностей, раскрытых в описании.

11. Способ по п.8, где пептид вводят по меньшей мере в один сосковый канал молочной железы лактирующего животного.

12. Способ по п.8, где пептид вводят одновременно с прекращением доения.

13. Способ предотвращения болей, связанных с инфекцией молочной железы или с внезапным прекращением доения лактирующего животного из поголовья домашнего скота, включающий введение в молочную железу лактирующего животного по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где указанный пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), таким образом улучшая состояние лактирующего животного.

14. Способ по п.13, где предотвращение болей у лактирующего животного определяют по уменьшению количества шагов в день и по продолжительности периода лежки в день указанного животного.

15. Способ п.13, где фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина.

16. Способ по п.15, где фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, ее аналог, производное или фрагмент, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и аналогов, производных или фрагментов указанных последовательностей, раскрытых в описании.

17. Способ по п.13, где пептид вводят одновременно с прекращением доения.

18. Способ по п.13, где пептид вводят в инфицированную молочную железу или неинфицированную молочную железу.

19. Фармацевтическая композиция для введения лактирующему животному, нуждающемуся в этом, согласно способу по пп.1-18, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), которая представлена в форме готового к применению стерильного прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл, имеющего pH выше 6,0.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, где фосфопептид выделен из подгруппы казеина, выбранной из группы, состоящей из  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ S1-казеина и  $\alpha$ S2-казеина.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, где фосфопептид, выделенный из  $\beta$ -казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ее фрагмент, аналог или производное, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S1-казеина, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, ее фрагмент, аналог или производное, раскрытые в описании, или где фосфопептид, выделенный из  $\alpha$ S2-казеина, выбран из группы, состоящей из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; из пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и фрагментов, аналогов или производных указанных последовательностей, раскрытых в описании.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, включающая терапевтически эффективное количество пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или представляющего собой аналог или производное указанных последовательностей, раскрытое в описании, или любую комбинацию указанных соединений.

23. Фармацевтическая композиция по п.19, имеющая величину мутности менее чем 6 нефелометрических единиц мутности (NTU).

24. Фармацевтическая композиция по п.19, включающая примерно от 10 нг/мл до примерно 15

мг/мл пептида.

25. Фармацевтическая композиция по п.19, где рН указанной композиции находится в интервале примерно от 6,0 до примерно 8,0.

26. Фармацевтическая композиция для введения лактирующему животному, нуждающемуся в этом, согласно способу по пп.1-18, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), которая представлена в форме лиофилизованного порошка, и перед применением порошок восстанавливают до жидкой формы с образованием прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл и имеющего рН выше 6,0.

27. Способ лечения молочной железы, включающий введение лактирующему животному фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного пептида, выделенного из казеина, где по меньшей мере один пептид является фосфопептидом с молекулярной массой от 1000 до 5000 Да, включающим аминокислотную последовательность Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ ID NO: 1), которая представлена в форме готового к применению стерильного прозрачного раствора, по существу, лишенного мицелл и имеющего рН выше 6,0, где лечение молочной железы выбрано из группы, состоящей из стимулирования временного прекращения продукции молока, индуцирования стабильного прекращения продукции молока, стимулирования инволюции и предотвращения, лечения или реверсирования микробиологической инфекции.

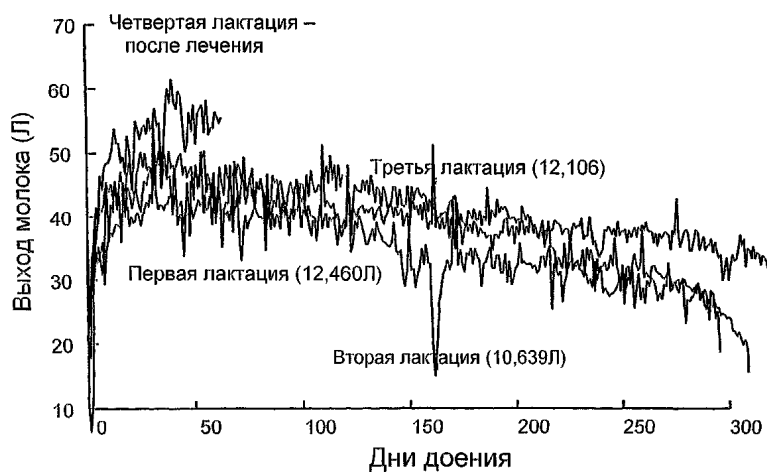
28. Способ по п.27, где инфекцией является мастит, а композицию вводят в инфицированную молочную железу лактирующего животного.

29. Способ по п.28, где фармацевтическую композицию вводят в период лактации, при прекращении доения или во время сухостойного периода.

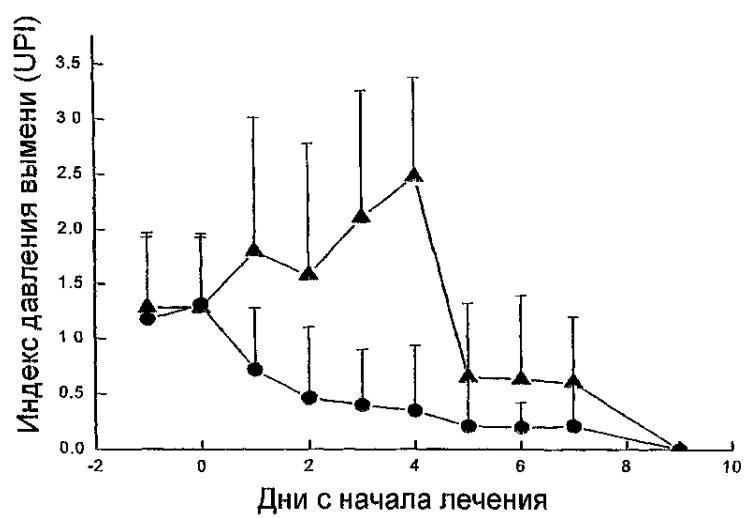
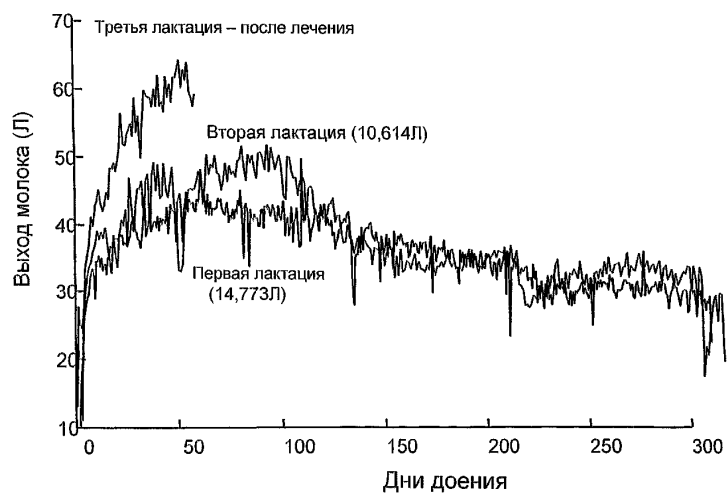
30. Способ по п.27, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации с дополнительным антимикробным средством, выбранным из группы, состоящей из антибиотиков, бактерицидных средств, стероидных и нестероидных противовоспалительных средств, иммуномодуляторов и вакцин.

31. Способ по п.27, где лактирующее животное выбрано из группы, состоящей из коровы, козы, овцы, буйволицы, верблюдицы, ослицы, ламы, лошади, свиньи, кошки и собаки.

32. Способ по п.27, где лактирующим животным является человек.



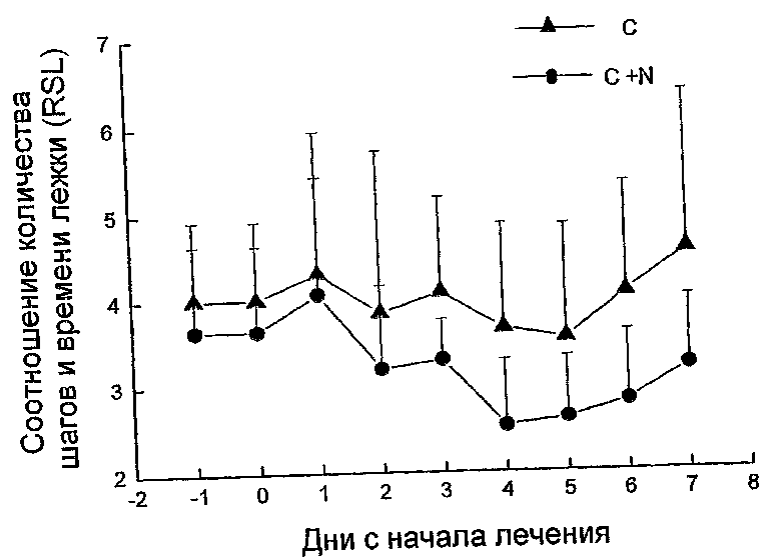
Фиг. 1



Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2