

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 511**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2006 E 06728320 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1890720**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos derivados de la caseína y métodos para el uso de las mismas**

30 Prioridad:

02.05.2005 US 676292 P

09.06.2005 US 688697 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2013

73 Titular/es:

MILEUTIS LTD. (50.0%)

P.O. BOX 9139

70800 GAN-YAVNE, IL y

STATE OF ISRAEL, MINISTRY OF AGRICULTURE

& RURAL DEVELOPMENT, AGRICULTURAL

RESEARCH ORGANIZATION (50.0%)

72 Inventor/es:

ISCOVICH, JOSE MARIO;

SILANIKOVE, NISSIM y

ISCOVICH, JAVIER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 400 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos derivados de la caseína y métodos para el uso de las mismas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos derivados de la caseína y su uso en la gestión de animales lactantes, particularmente a su uso para disminuir la duración del periodo seco de un animal de ganadería lactante, para aumentar su producción de leche e higiene de la leche después del parto y para mejorar el bienestar del ganado. La presente invención además se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos derivados de la caseína en la forma de una solución estéril, que es clara y sustancialmente carente de micelas.

10

Antecedentes de la invención

15

La caseína (CN) es la proteína predominante en la leche mamífera humana y no humana. La caseína se ha caracterizado previamente como compuesta de tres fracciones α , β y γ , de acuerdo con la movilidad electroforética de cada fracción (Hipp y otros 1952. Dairy Sci., 35:272). Hoy, la caseína se define de acuerdo con las secuencias de aminoácidos de cada uno de los subgrupos α S1, α S2, β y κ (Engel y otros 1984. J. Dairy Sci. 67:1607-1608).

20

La hidrólisis enzimática de la caseína libera péptidos que pueden contribuir a la salud y el desarrollo adecuado de los jóvenes (FitzGerald y otros, 1998. Int. Dairy J. 8:451-457) y que sirven como reguladores locales de la función de la glándula mamaria (Silanikove y otros, 2000. Life Sci. 67:2201-2212; Shamay y otros, 2002, Life Sci. 70:2707-2719). La serín proteasa, plasmina, es la proteasa predominante en la leche y se conoce que produce péptidos resistentes a la ebullición (proteasa-peptonas) de la β -caseína, α -S1 caseína y α S2-caseína.

25

Las proteasa-peptonas (PPs), también conocidas como fosfopéptidos de caseína (CPP), constituyen alrededor de un tercio de las proteínas del suero (Andrews, 1983. J. Dairy Res. 50:45-55). La plasmina en la leche se encuentra principalmente en su forma inactiva, plasminógeno, y la conversión de plasminógeno a plasmina está modulada por los activadores del plasminógeno (Politis I., 1996. J. Dairy Sci. 79:1097-1107).

30

Los péptidos derivados de la caseína han demostrado tener varias actividades y aplicaciones biológicas. Los estudios con compuestos de leche demostraron la actividad bactericida relacionada con la caseína. La Patente U.S. N° 3.764.670 divulga polipéptidos nuevos derivados de caseína que poseen propiedades antibióticas contra microorganismos.

35

También se ha observado la actividad de modulación inmune de los péptidos de caseína. por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT Internacional Wo01/13739 divulga un método de potenciar la inmunidad de mamíferos y promover el crecimiento de los mismos administrando proteínas que contienen aminoácidos fosforilados como los fosfopéptidos de caseína, directamente o en la comida. Como la inmunidad de los mamíferos se potencia, la resistencia de los mismos contra enfermedades infecciosas es reforzada y los factores que inhiben el crecimiento de las mismas son eliminados, promoviendo de este modo el crecimiento de los mamíferos.

40

Las Solicitudes de Patente U.S. N° de Publicación 20020147144 y 20040167073 divulgan péptidos biológicamente activos que están derivados o son similares a secuencias idénticas al N-terminal de la fracción α S1 de la caseína de la leche, que son capaces de estimular y mejorar la respuesta inmune, protegiendo contra infecciones virales, normalizando los niveles de colesterol en suero, y estimulando la hematopoyesis.

45

La Solicitud de patente Internacional PCT WO 2005/081628 divulga péptidos activos biológicamente que están derivados o son similares a secuencias de fracciones de α S1, α S2, β - o κ -caseína de la caseína de la leche, capaces de modulación inmune y otras actividades terapéuticas, incluyendo estimular y mejorar la respuesta inmune, proteger contra infecciones virales, normalizar los niveles de colesterol en suero, y estimular la hematopoyesis. Los péptidos derivados de la caseína son no tóxicos y se pueden usar para tratar y prevenir patologías inmunes, diabetes, hipercolesterolemia, trastornos hematológicos y enfermedades relacionadas con los virus.

50

55

La Solicitud de Patente Europea N° EP1375513 divulga que entre los péptidos derivados de la caseína, los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden residuos de fosfoserina plurales muestran una actividad inmuno-potenciadora fuerte. Específicamente, la invención se refiere a un agente inmuno-potenciador que comprende un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos Q1-SerP-X-SerP-Q2, en donde, SerP representa el residuo de fosfoserina, X representa de uno a tres de cualquier residuo de aminoácidos, y Q1 y Q2 están independientemente ausentes o representan al menos uno de cualquier residuo de aminoácidos.

60

La Patente U.S N° 6.391.849 de uno de los inventores de la presente invención y compañeros de trabajo divulga proteasa-peptonas que actúan como quelantes del calcio, y su uso en controlar los cambios fisiológicos en

65

una glándula mamaria, incluyendo el cese transitorio y permanente de la producción de leche, la inducción de la involución y prevención, tratamiento y la inversión de infecciones.

5 Los fosfopéptidos de la caseína han demostrado poseer la propiedad única de ser capaces de enlazar macro-elementos como Ca, Mg, y Fe, junto con oligoelementos como Zn, Ba, Cr, Ni, Co y Se, que pueden ser solubilizados en el intestino delgado y por lo tanto disponibles para la absorción. Como tales, los CPPs se usan como aditivos en bebidas y comidas infantiles, y en medicamentos dentales. Por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5.834.427 divulga un fosfopéptido de caseína purificado (CPP) que tiene una secuencia de aminoácidos nueva y
10 de solubilizar minerales y absorber los mismos en animales. El CPP o la caseína que contiene el mismo tiene una capacidad mejorada de solubilizar minerales y absorber los mismos en animales. El CPP o la β -caseína-H que contiene la misma se puede añadir a productos alimenticios, bebidas, medicación, cosméticos, alimentos en una cantidad efectiva para mejorar una absorción mineral en animales. Una composición oral que comprende la beta-caseína H o el CPP inventivo y un portador farmacéuticamente aceptable pueden reducir o aliviar una hipersensibilidad dental.

15 La Patente U.S. Nº 5.227.154 divulga un método para controlar un cálculo dental tratando los dientes con una composición oral que comprende fosfopéptidos de caseína específicos y/o sales de los mismos. La patente U.S. Nº 6.652.875 divulga una formulación para la administración de constituyentes bioactivos a superficies biológicas, incluyendo superficies dentales como los dientes o las encías, en donde dicha formulación comprende una
20 suspensión o solución de al menos una proteína de caseína aislada y purificada o una sal de la misma, en agua, junto con al menos un constituyente bioactivo.

Se han propuesto varios métodos para la preparación de hidrolizados de caseína, específicamente CPPs. Por ejemplo, la Patente U.S. Nº 4.740.462 divulga la producción de CP por hidrólisis de caseína con una tripsina cristalina seguida por el fraccionamiento y separación por ultrafiltración o técnicas cromatográficas como
25 cromatografía de permeación en gel o cromatografía de intercambio de iones. Este método puede tener alguna utilidad de investigación, pero no es adecuado o económico en una escala industrial. Otros métodos implican el uso de sustancias tóxicas, como el cloruro de bario, que no son aceptables en productos alimenticios y/o composiciones farmacéuticas.

30 Independientemente del método usado para la preparación, una solución que contiene un hidrolizado de caseína tiende a ser turbido. La turbidez se considera una desventaja significativa en las composiciones farmacéuticas así como en algunos productos alimenticios, específicamente en las bebidas, ya que es difícil o imposible seguir de manera visual cambios en la composición turbida, particularmente para detectar
35 contaminaciones. La Patente U.S. Nº 4.405.756 divulga un método para la preparación de fosfopéptidos de caseína adecuada para el uso como un aditivo para bebidas sin afectar a la transparencia de la bebida; sin embargo, la proteína obtenida contiene calcio y, además, sólo se obtiene una solución clara a un pH ácido.

Gestión de Animales de Ganadería Lactantes

40 En la industria lechera moderna, los animales lactantes en rebaños pasan a través de ciclos controlados de ordeño y embarazo, ya que esos regímenes contribuyen a un aumento significativo en la producción de leche. En la gestión actual de rebaños lecheros, por ejemplo vacas y cabras, hay una superposición significativa entre la lactancia y el embarazo, en donde un "periodo seco" se impone entre 50 a 70 días antes del parto por el cese del ordeño. Este régimen está ajustado a un compromiso entre la necesidad de inducir la involución, un proceso
45 necesario para el periodo de lactancia sano posterior, y el requisito de una producción de leche alta durante todo el año.

El cese de la retirada de la leche lleva a cambios rápidos en la secreción mamaria y al inicio del proceso de involución mamaria activo. Este proceso comprende una secuencia extensiva y altamente ordenada de cambios en el tejido y la composición de la leche, que tienen lugar durante la transición entre los estados lactante y no lactante. Durante el primer estado de involución mamaria, el proceso es activado por estímulos locales que inician la apoptosis, pero la involución puede ser revertida reiniciando la retirada de leche (Capuco y Akers, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:137-144; Wilde y otros, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4:129-136). Este control local puede causar la involución cuando el estasis de la leche es inducido en glándulas individuales, como se
50 observó en cabras lactantes después del cese unilateral del ordeño (Quarrie y otros, 1994. Biochem. Soc. Trans. 22:178S), o en ratones lactantes después del sellado del pezón (Li y otros, 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 3425-3430; Marti y otros, 1997. Eur. J. Cell. Biol. 73:158-165).

La segunda etapa de la involución es persistente, y la retirada de la leche no puede causar la reanudación de la secreción de leche (Capuco y Akers, 1999. *ibid.*, Wilde y otros, 1999. *ibid.*). La inversión del segundo estado de involución puede tener lugar sólo en una etapa de lactancia posterior después de dar a luz. Esta etapa está caracterizada por la activación de proteasas que destruyen la estructura lobular-alveolar de la glándula degradando la matriz extracelular y la membrana basal, así como una pérdida masiva de células alveolares.
60

El cese del ordeño para inducir la involución está asociado con un riesgo aumentado de desarrollar mastitis, una enfermedad causada por la infección intramamaria (IMI) con patógenos, mayoritariamente bacterias, pero
65

también levaduras, hongos, o incluso algas. La mastitis puede ser clínica, con signos clínicos locales (y en algunos casos generales) y anomalías en la leche, o subclínica con pérdidas de producción y calidad de la leche disminuida.

5 Las vacas lecheras modernas habitualmente se secan sin dejar de producir de 20 a 40 litros de leche por día. Por lo tanto, el estasis de la leche puede causar fugas de la secreción mamaria, que aumenta sustancialmente el riesgo de adquirir IMI. El secado convencional, que lleva a un proceso largo de involución, está típicamente asociado con una tasa más alta de IMI. La mastitis clínica y subclínica produce pérdidas económicas significativas debido a la leche rechazada (menos producción agrícola), calidad de leche degradada (menos ingresos), sacrificio temprano de vacas (pérdida de potencial genético), costes de fármacos, gastos veterinarios, y costes de trabajo aumentados para el granjero. La mastitis es la enfermedad más debilitadora en el ganado lechero, costando en la industria lechera de los U.S. sólo alrededor de 2 billones de \$ anualmente.

15 Se ha demostrado previamente por uno de los inventores de la presente invención y compañeros de trabajo que una fracción de β -caseína (β -CN) pura 1-28 regula por disminución la secreción de leche en vacas y cabras. La actividad de este péptido fue correlacionada con su capacidad de bloquear los canales de potasio en las membranas apicales de los epitelios mamaros (Silanikove y otros, 2000. *supra*).

20 Se ha demostrado que la inyección de preparación bruta de hidrolizados de caseína (CNH) en la ubre de una cabra o una vaca imita el fenómeno natural de la involución, induciendo una respuesta inflamatoria local y la pérdida de la integridad de la unión estrecha (TJ), seguido por un secado rápido de la secreción mamaria (Patente U.S. nº 6.391.849; Shamay y otros, 2002. *ibid*; Shamay y otros, 2003. J. dairy Sci. 86:1250-1258). El proceso inducido por la CNH fue más rápido y sincronizado que el inducido por el secado natural. Estos resultados indican que es posible reducir significativamente el tiempo requerido para la involución. sin embargo, todavía no está claro si es posible acortar u omitir el periodo seco sin afectar a la producción de leche en el periodo de lactancia posterior. Annen y otros (2004. J. Dairy Science 87:3746-3761), demostraron que el tratamiento de vacas multiparas con somatotropina bovina (bST) permitió acortar, e incluso omitir, el periodo seco sin reducción en la producción de leche; sin embargo, este tratamiento no fue tan efectivo en vacas primíparas. Además, se ha demostrado anteriormente que el tratamiento con bST causa mastitis, trastornos reproductivos y otras enfermedades relacionadas con la producción, y que dichos tratamiento aumenta los trastornos alimenticios.

35 El bienestar de los animales de granja es de creciente preocupación pública en las sociedades occidentales en las últimas décadas (Broom DM In: Phillips y otros, Eds Farm Animals and the Environment. CAB Wallingford UK pp 245-253). El desarrollo reciente en el alojamiento y prácticas de gestión de animales de granja bajo sistemas de producción intensivos refleja el aumento en las preocupaciones morales del bienestar de los animales (Fregonesi y otros, 2001. Livestock Production Sci. 68:205-216; Fregonesi y otros, 2002. Livestock Production Sci. 78:245-257). La mejora en el bienestar de los animales, definida como la prevención del sufrimiento y aumentar la presencia de sensaciones positivas, o confort es un factor importante en la gestión del ganado (Broom, 1992. *ibid*). Las mediciones del funcionamiento biológico deteriorado, particularmente las conectadas con salud disminuida y respuestas de estrés fisiológico aumentadas, se usan para evaluar el estado de bienestar de los animales de granja.

45 Hay una necesidad insatisfecha para un tratamiento eficiente, seguro para reducir el periodo seco en los rebaños lecheros sin afectar negativamente a la producción de leche, para aumentar la producción de leche y la higiene y para mantener y/o aumentar el bienestar de los animales de ganadería. Además, sería altamente ventajoso tener composiciones farmacéuticas en la forma de soluciones claras, listas para usar, que comprenden péptidos derivados de la caseína.

Resumen de la invención

50 La presente invención se refiere en general a la gestión de animales de ganadería lactantes y a composiciones farmacéuticas que comprende péptidos derivados de la caseína. Particularmente, la presente invención se refiere al uso de péptidos derivados de la caseína para disminuir la duración del periodo sedo impuesto en animales lactantes, para aumentar su producción de leche y la higiene de la leche, y para evitar sufrimiento asociado con la infección de la glándula mamaria y el cese abrupto del ordeño. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína, en donde las composiciones están en la forma de una solución estéril clara, sustancialmente carente de micelas de caseína, y comprenden péptidos que tienen un peso molecular bajo, sustancialmente uniforme de desde 1.000 a 5.000 Dalton.

60 Es una práctica común en los rebaños mantenidos para la producción de leche implementar el cese de la producción de leche por un animal lactante antes de un parto esperado. El periodo no lactante, definido como "periodo seco", es muy importante para la salud del animal y para mantener su capacidad de producir leche. Hasta ahora, un periodo seco de 50 a 70 días ha sido el estándar de la industria. Inesperadamente, la presente invención muestra ahora que es posible acortar la duración del periodo seco sin afectar negativamente a la producción de leche después del parto. Sorprendentemente, la presente invención divulga ahora un uso de péptidos derivados de

la caseína para aumentar la producción de leche después del parto en comparación con la producción de leche en el periodo lactante antes del parto.

5 Así, de acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona el uso de la menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para reducir la duración del periodo seco entre ciclos de lactancia en un animal lactante sin afectar negativamente a la producción de leche, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton. De acuerdo con ciertas realizaciones, el periodo seco se reduce a menos de 50 días, preferiblemente a menos de alrededor de 40 días, más preferiblemente a entre
10 alrededor de 20 a alrededor de 30 días.

15 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de al menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para aumentar la producción de leche de un animal lactante de ganadería después del parto en comparación con la producción del elche del animal lactante antes del parto, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton. En los rebaños lecheros, la higiene de la leche producida, medida por recuentos de células somáticas (SCC) por ml de leche, tiene una gran influencia en la rentabilidad del rebaño, ya que la leche que comprende altos niveles de células por ml de leche debe ser descartada.
20

De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para aumentar la higiene de la leche de un animal lactante, en donde el medicamento se va a administrar a una glándula mamaria del animal lactante, para reducir los recuentos de células somáticas en la leche en comparación con los recuentos de células somáticas (SCC) antes de la administración del péptido, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton.
25

La SCC después de la administración del péptido debe ser de alrededor de 750.000 células por ml de leche y menos, preferiblemente 600.000 células/ml y menos, más preferiblemente 400.000 células/ml y menos, incluso más preferiblemente 300.000 células/ml de leche, más preferiblemente 200.000 células/ml de leche y menos. El SCC puede ser reducido durante el ciclo de lactancia en el que se aplica el tratamiento. El SCC puede ser reducido durante un ciclo de lactancia posterior a un periodo seco impuesto después de que se aplica el tratamiento.
30

35 La infección de la glándula mamaria y/o el cese abrupto del ordeño causa dolor y estrés al animal. Dicho estrés no sólo reduce la productividad de un animal que está sufriendo, la mayor conciencia con las condiciones generales de los animales en sistemas de producción altamente intensivos requiere usos para mejorar el bienestar de dichos animales de ganadería. Sorprendentemente, la presente invención divulga ahora que es posible reducir o incluso evitar el sufrimiento asociado con la infección de la glándula mamaria o el cese abrupto del ordeñado.

40 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso de al menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para evitar el sufrimiento asociado con la infección de las glándulas mamarias en animales lactantes de ganadería, en donde el medicamento se va a administrar a una glándula mamaria del animal lactante, mejorando de este modo el bienestar del animal lactante, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y que tiene un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton, mejorando de este modo el bienestar del animal lactante.
45

El mejorar el bienestar de un animal lactante puede ser medido por la reducción en el número de pasos por día y por la prolongación del periodo acostado por día de dicho animal. El al menos un péptido puede ser derivado de la caseína se administra a una glándula mamaria infectada. El péptido o péptidos pueden ser administrados a una glándula mamaria no infectada.
50

El fosfopéptido puede ser seleccionado del grupo consistente de un fosfopéptido derivado de la β -caseína, α S1-caseína, o α S2-caseína. El fosfopéptido empleado puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID NO:2 a la SEQ ID NO:5. Los usos de la presente invención pueden emplear un fosfopéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:2 a la SEQ ID NO:5. Se pueden emplear un único tipo de péptido así como una pluralidad de tipos de péptidos.
55

Los usos de la presente invención pueden comprender la administración intracanal del al menos un péptido derivado de la caseína. Los usos comprenden la administración en un canal del pezón de una glándula mamaria del animal lactante. La administración al canal del pezón puede ser por medio de inyección o infusión. El al menos un péptido puede ser administrado a una o más glándulas mamarias, incluyendo la administración concomitante a todas las glándulas mamarias del animal lactante. Los usos de la presente invención pueden además comprender la co-administración de una terapia anti-microbiana, seleccionada del grupo consistente de tratamiento antibiótico, bactericida, antiinflamatorio esteroideo y no esteroideo, tratamiento con un inmunomodulador y vacunación.
60
65

Los usos para reducir la duración del periodo seco entre ciclos de lactancia pueden comprender administrar el al menos un péptido derivado de la caseína al mismo tiempo que el cese del ordeño. Se contemplan una única administración así como múltiples administraciones. típicamente, el péptido se administra entre 1 o más veces, preferiblemente de 1 a 3 veces, a un intervalo seleccionado del grupo que consiste de alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 20 horas o alrededor de 24 horas. El al menos un péptido puede ser administrado sólo una vez. El cese del ordeño puede tener lugar 60 días antes de un parto esperado, preferiblemente alrededor de 40 días, más preferiblemente entre alrededor de 20 a alrededor de 30 días antes de un parto esperado.

Los usos para aumentar la producción de leche después del parto y durante el periodo de lactancia posterior pueden comprender administrar el al menos un péptido derivado de la caseína al mismo tiempo que el cese del ordeño, típicamente alrededor de 60 días antes del parto esperado, preferiblemente alrededor de 40 días, más preferiblemente alrededor de 30 días antes del parto. La dosificación y la repetición del paso de administrar el al menos un péptido son seleccionados para obtener un aumento en la producción de leche después del parto. El péptido puede ser administrado a al menos una glándula mamaria entre 1 o más veces, típicamente de 1 a 3 veces, a un intervalo seleccionado del grupo que consiste de alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 20 horas o alrededor de 24 horas. El al menos un péptido puede ser administrado sólo una vez. El péptido puede ser administrado a las cuatro glándulas mamarias de una ubre. El aumento medio en la producción de leche puede ser al menos de alrededor del 3%, preferiblemente de al menos alrededor de 6%, más preferiblemente de al menos alrededor del 9%, más preferiblemente de entre alrededor del 10% a alrededor del 25%.

Un aumento en la higiene de la leche se puede obtener administrando el al menos un péptido derivado de la caseína al comienzo del periodo seco, típicamente alrededor de 60 días antes de un parto esperado. La dosificación y la repetición del paso de administración en la glándula mamaria son seleccionados para reducir el SCC y obtener un aumento en la higiene de la leche en el periodo lactante posterior al mencionado periodo seco. El al menos un péptido puede ser administrado sólo una vez.

El uso para evitar el sufrimiento asociado con la infección de las glándulas mamarias o el cese abrupto del ordeño puede comprender una única administración del péptido o péptidos derivados de la caseína.

Durante el curso de la investigación de los usos nuevos divulgados en la presente invención, los inventores reconocieron la necesidad de composiciones mejoradas que comprenden péptidos derivados de la caseína.

Los péptidos derivados de la caseína, que son típicamente digeridos enzimáticos hidrolizados de la caseína, son conocidos por su valor nutricional y como tales se usan en la nutrición clínica, en fórmulas de alimentos para niños y como enriquecimiento de proteínas de comidas y bebidas. También se ha sugerido que los hidrolizados de caseína tienen aplicaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones son comercializadas comúnmente como un polvo seco para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, inmediatamente antes del uso. La solución obtenida es sensible a la contaminación, debido a su alto valor nutricional, mientras que su turbidez interfiere con la identificación instantánea de la contaminación. Además, las preparaciones turbidas tienden a tener precipitados.

Inesperadamente, los inventores de la presente invención han descubierto que la filtración adicional de una preparación de caseína turbida a través de un filtro de alrededor de 0,1 micrones a alrededor de 0,5 micrones, preferiblemente a través de un filtro por debajo de 0,25 micrones, elimina sustancialmente las micelas de caseína, la presencia de las cuales es la causa principal de la turbidez. Además, después de la filtración, la composición comprende péptidos en el intervalo de alrededor de 1.000 Dalton a alrededor de 5.000 Dalton. Este intervalo de tamaño comprende una población preferida de péptido derivado de caseína, específicamente fosfopéptidos, de tal forma que el proceso de filtración además proporciona una composición que comprende péptido derivado de la caseína sustancialmente uniforme que tiene un peso molecular en el intervalo de 1.000 a 5.000 Dalton.

De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en donde la composición está en la forma de una solución clara estéril lista para usar, sustancialmente carente de micelas, que tienen un pH por encima de 6,0, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton.

El péptido o péptidos pueden tener un peso molecular de alrededor de 2.500 Dalton.

Se debe entender que aunque las composiciones farmacéuticas de la presente invención fueron obtenidas por la filtración anteriormente descrita, pueden ser obtenidas por cualquier método conocido en la técnica para eliminar sustancias por encima de alrededor de 0,25 μm y/o péptidos de más de 5.000 Dalton, como la ultrafiltración, diálisis y similares.

La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un fosfopéptido seleccionado del grupo consistente de un fosfopéptido derivado de la β -caseína, un fosfopéptido derivado de la α S1-caseína, un fosfopéptido derivado de la α S2-caseína o una combinación de los mismos. El fosfopéptido derivado de la β -caseína puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2 y análogos, derivados o fragmentos de la misma. El fosfopéptido derivado de la α S1-caseína puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:3 y análogos, derivados o fragmentos de la misma. El fosfopéptido derivado de la α S2-caseína puede ser seleccionado de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4 y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:5. La composición farmacéutica puede comprender una pluralidad de péptidos derivados de la caseína como se ha descrito en la presente anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o cualquier combinación de las mismas, teniendo un peso molecular en el intervalo de desde alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 Dalton.

El péptido derivado de la caseína puede ser obtenido por hidrólisis de caseína, o puede ser un péptido sintético. Los péptidos sintéticos pueden ser preparados como se describe en la presente a continuación y como es conocido por alguien experto en la técnica.

El contenido de proteína de la composición farmacéutica puede ser de alrededor de 10 ng/ml a alrededor de 15 mg/ml. Esta cantidad es efectiva en aplicaciones terapéuticas, mientras la solución es clara. La turbidez de la composición puede ser menos de 6 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU). El pH de la composición puede ser de desde alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0.

Los fosfopéptidos dentro de las composiciones son altamente estables dentro de un amplio rango de temperatura. Los fosfopéptidos pueden ser resistentes al calentamiento, de tal forma que no se observa pérdida de actividad cuando la composición que comprende los péptidos se calienta de 50° C a 70° C durante 10-15 minutos. Los fosfopéptidos pueden ser resistentes a la congelación, de tal forma que la composición puede ser almacenada a -20° C durante al menos 6 meses, preferiblemente durante al menos 12 meses.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en la forma de un polvo liofilizado, en donde el polvo es reconstituido a un líquido antes del uso para formar una solución clara, sustancialmente carente de micelas y que tiene un pH por encima de 6,0, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) teniendo un peso molecular de desde 1.000 a 5.000 Dalton. Se debe entender que las composiciones farmacéuticas nuevas de la presente invención, que están en la forma de una solución estéril clara son adecuadas para el uso en los nuevos usos para la gestión de ganado descritos en la presente con anterioridad. Alternativamente, estas composiciones farmacéuticas también pueden ser usadas para cualquier uso de dichos péptidos como se ha descrito en la sección de antecedentes en la presente con anterioridad y como son conocidos en la técnica.

De acuerdo con una cierta realización actualmente preferida, el peso molecular medio es de alrededor de 2.500 Dalton.

Las composiciones farmacéuticas nuevas de la presente invención son sorprendentemente eficientes para tratar una glándula mamaria en cualquier animal lactante, incluyendo humanos; los animales de ganadería criados para producción de carne o leche incluyendo vacas, cabras, ovejas, y búfalos; otros animales de ganadería incluyendo camellos, llamas, caballos y cerdos; y animales domésticos incluyendo gatos y perros.

El tratamiento puede ser seleccionado del grupo consistente de inducir un cese transitorio de la producción de leche, inducir un cese persistente de la producción de leche o inducir la involución. Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención inducen una involución dentro de alrededor de 3 días, sin afectar negativamente a la re-constitución de los tejidos de las glándulas mamarias hacia el siguiente periodo de lactancia. Además, la involución puede ser inducida en cualquier etapa del ciclo de lactancia, incluyendo en el máximo de la lactancia.

De acuerdo con todavía otro aspecto, la composición farmacéutica nueva de la presente invención es útil para la prevención y tratamiento de infecciones microbianas y la reversión de infecciones microbianas.

Las composiciones son efectivas para tratar infecciones causadas por un amplio rango de patógenos, incluyendo, bacterias gram positivas así como bacterias gram negativas, hongos, micoplasmas y virus. De acuerdo con una realización, las composiciones de la presente invención son efectivas para tratar infecciones microbianas que causan mastitis. Así, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención reducen la dependencia de antibióticos para el tratamiento de infecciones, incluyendo infecciones de las glándulas mamarias, aliviando tanto del problema de las infecciones resistentes a los antibióticos como el problema de residuos de antibióticos presentes en la leche en el caso de la mastitis. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la

5 presente invención pueden ser administradas en combinación con terapia anti-microbiana adicional. De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es administrada en combinación con una agente anti-microbiano seleccionado del grupo consistente de un antibiótico, un bactericida, un agente antiinflamatorio esteroideo y un agente antiinflamatorio no esteroideo. La terapia de combinación puede reducir la dosis requerida del agente anteriormente mencionado y/o potenciar su efecto terapéutico. De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica se administra en combinación con una vacuna. De acuerdo con una realización adicional, la composición farmacéutica se administra en combinación con un inmunomodulador.

10 Además de ser eficiente para tratar la mastitis durante la lactancia, las nuevas composiciones farmacéuticas de la presente invención superan exitosamente el problema de la persistencia de la infección de mastitis de un ciclo de lactancia al siguiente, cuando se administran al mismo tiempo de la inducción de un periodo seco.

15 La nueva composición farmacéutica de la presente invención está típicamente formulada para la administración parenteral. De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica está formulada para la administración intracanal, por ejemplo por infusión o por inyección. De acuerdo con una realización actualmente preferida, la composición farmacéutica está formulada para la inyección en una cisterna glandular a través de un canal del pezón de la glándula mamaria del animal lactante. la composición farmacéutica puede también ser formulada para la aplicación tópica a un pecho o ubre como un gel, pomada, crema, emulsión o formulación de liberación sostenida incluyendo un parche transdérmico. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención están formuladas para la administración oral sistémica.

20 Una composición farmacéutica puede ser proporcionada comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva e al menos un péptido derivado de la caseína en donde la composición está en la misma forma de una solución estéril lista para usar clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0, para un uso seleccionado del grupo consistente de uso dental y un uso terapéutico. Estos usos conocidos están divulgados, por ejemplo, en las Patentes U.S. N° 5.227.154; 5.834.427 y 6.652.875; Solicitud de Patente Europea N° EP1375513; Solicitudes PCT Internacionales WO01/13739 y WO 2005/081628M y Publicación de Solicitudes de Patente U.S. N° 20020147144 y 20040167073, entre otras.

30 Un uso para tratar una glándula mamaria en un animal lactante, que comprende el paso de administrar al animal lactante una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína, en donde la composición está en la forma de una solución estéril lista para usar clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0.

35 El tratamiento puede ser seleccionado del grupo consistente de inducir el cese transitorio de la producción de leche, el cese persistente de la producción de leche e inducir la involución.

40 De acuerdo con todavía un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso para tratar e inhibir una infección microbiológica.

45 La infección puede ser mastitis, incluyendo la subclínica así como la mastitis clínica y la composición se administra a una glándula mamaria infectada de un animal lactante. La composición farmacéutica puede ser administrada durante un periodo lactante para tratar la mastitis durante el ordeño. la composición farmacéutica puede ser administrada al final de un ciclo de lactancia o durante el periodo seco. La administración al comienzo y durante el periodo seco contempla la administración a una glándula mamaria infectada para tratar mastitis existente así como a una glándula mamaria no infectada como un tratamiento profiláctico.

50 El cese simultaneo del ordeño de todas las glándulas mamarias de un animal lactante resulta típicamente en una reacción inflamatoria no deseada. Sorprendentemente, la presente invención muestra ahora que administrar las composiciones farmacéuticas de la invención a todas las glándulas mamarias de un animal lactante al mismo tiempo no está acompañado por ningún efecto adverso. Así, es posible inducir el cese de la producción de leche y la involución y tratar la mastitis en cualquier número deseado de glándulas mamarias de un animal individual. La administración de acuerdo con la presente invención incluye la administración de a partir de sólo una glándula hasta todas las glándulas, por ejemplo en las cuatro glándulas de una ubre de vaca.

60 Los regímenes de aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención dependen del resultado deseado y del animal tratado. Se contemplan una única administración así como múltiples administraciones. Para tratar la mastitis, el péptido puede ser administrado entre 1 o más veces, preferiblemente de 1 a 3 veces, a un intervalo seleccionado del grupo consistente de alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 20 horas o alrededor de 24 horas. Para la inducción del cese de la producción de leche y la involución, el péptido puede ser administrado como un único tratamiento. Un régimen de una única administración es altamente deseable a medida que aumenta el cumplimiento del tratamiento.

65 Se puede proporcionar un método para modular una respuestas inmune en un sujeto, comprendiendo el paso de administrar a un animal lactante una composición farmacéutica que comprende una cantidad

terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína, en donde la composición está en la forma de una solución estéril, lista para usar, clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0.

5 Modular una respuesta inmune puede comprender estimular y potenciar la respuesta inmune innata.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claras de la siguiente descripción y dibujos.

10 Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra el aumento en la producción de leche de la vaca N° 2425 después de la administración del hidrolizado de caseína en comparación con los periodos de lactancia anteriores.

15 La FIGURA 2 muestra el aumento en la producción de leche de la vaca N° 2331 después de la administración del hidrolizado de caseína en comparación con los periodos de lactancia anteriores.

20 La FIGURA 3 muestra el índice de presión de la ubre de 10 vacas que recibieron tratamiento (cese abrupto de ordeño + tratamiento seco de antibióticos + tratamiento de hidrolizado de caseína) y 10 vacas de control secadas del modo convencional (cese abrupto del ordeño + tratamiento seco de antibióticos) durante al menos 3 días de lactancia (Lactancia) y los primeros siete días después de ser secadas. Las diferencias entre los tratamientos y el periodo post-secado fueron significativas en $P < 0,01$.

25 La FIGURA 4 muestra las ubres de 2 vacas en el día 4 después del tratamiento con la producción de leche por encima de 30 L. Figura 4A - vaca tratada con C (cese abrupto del ordeño + tratamiento seco de antibióticos) Figura 4B - vaca tratada con C+N (cese abrupto del ordeño + hidrolizado de caseína + tratamiento seco de antibióticos).

30 La FIGURA 5 muestra la proporción acumulativa media entre el número de pasos y la duración del acostado de 10 vacas que recibieron tratamiento (C+N- cese abrupto del ordeño + tratamiento seco de antibióticos tratamiento de hidrolizado de caseína) y 10 vacas de control secadas de la forma convencional (C- cese abrupto del ordeño + tratamiento seco de antibióticos) durante los 3 últimos días de lactancia (Lactancia) y los primeros siete días después de haber sido secadas. Las diferencias entre los tratamientos después del periodo post-secado fueron significativas en $P < 0,005$.

35 Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 Como se usa en la presente, el término "caseína" se refiere a la proteína predominante en mamíferos no humanos y la leche humana, que comprende los subgrupos $\alpha S1$, $\alpha S2$, β y κ .

45 Como se usa en la presente, el término $\alpha S1$, $\alpha S2$ y β -caseína se refiere a la proteína $\alpha S1$, $\alpha S2$ y β -caseína de un mamífero, incluyendo animales de ganadería (por ejemplo, vaca, oveja, cabra, yegua, camello, ciervo y búfalo) seres humanos y mamíferos marinos.

50 El término "péptido" se usa a través de la especificación para designar una serie lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces de péptidos. El péptido de acuerdo con los principios de la presente invención es distinto que la proteína intacta.

55 Como se usa en la presente, el término "fosfopéptido" designa un péptido fosforilado en la forma de un péptido conjugado en el que la parte no péptida es un residuo de ácido fosfórico. En particular la expresión "fosfopéptido de caseína" o "CPP" designa un fosfopéptido que contiene un fragmento de caseína.

60 Como se usa en la presente, el término "cese de la producción de leche" se refiere a un cese transitorio así como a un cese persistente de la producción de leche. El cese transitorio de la producción de leche se refiere al cese reversible. El cese persistente se refiere a la interrupción en la lactancia que es reversible sólo por el parto después del embarazo y por tratamiento hormonal sexual. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los estímulos mecánicos (es decir, ordeño) también pueden revertir un cese persistente de la producción de leche inducido por las composiciones y usos de la invención.

65 Como se usa en la presente el término "periodo seco" se refiere a la fase antes del parto en la que se cesa el ordeño. De acuerdo con las prácticas actuales, aplicar un periodo seco es necesario para completar el proceso de involución, después del cual la capacidad de secreción de leche se restaura hacia el parto. Actualmente, la duración del periodo seco es de entre 50 a 70 días. Sorprendentemente, la presente invención muestra ahora que la duración del periodo seco puede ser reducida a menos de alrededor de 50 días, preferiblemente a menos de alrededor de 40

días, más preferiblemente a entre alrededor de 20 días a alrededor de 30 días sin afectar negativamente a la producción de leche. Sorprendentemente, la presente invención muestra que la aplicación del péptido derivado de la caseína para imponer un periodo seco resulta en un aumento significativo en la producción de leche en un periodo de lactancia posterior al periodo seco.

Como se usa en la presente el término "mastitis" se refiere a una inflamación de una glándula mamaria o una ubre, causada por una herida física, la introducción de productos químicos, virus, hongos, parásitos o, más comúnmente, invasión bacteriana y sus toxinas. La "mastitis" se usa para describir toda forma de dicha inflamación, incluyendo mastitis clínica y subclínica, la mastitis clínica incluyendo la mastitis leve, severa y crónica.

En la mastitis subclínica, no se detecta hinchazón del pecho o la ubre y tampoco son observables anomalías en la leche. Sin embargo, pruebas de cribado especiales, como la Prueba de Mastitis de California (CMT), la Prueba de Mastitis de Wisconsin (WMT) basadas en la estimación de recuentos de células somáticas y la prueba de catalasa mostrarán cambios en la composición de la leche. A este tipo de mastitis se hace referencia comúnmente como "oculta".

La mastitis clínica puede ser leve o aguda, y se caracteriza por la presencia de leucocitos en la leche. La mastitis clínica leve implica cambios en la apariencia de la leche incluyendo la presencia de copos o coágulos, leche aguada u otras formas inusuales de leche. La mastitis clínica leve puede estar acompañada por otros síntomas incluyendo, pechos o ubres calientes, sensibles o hinchados.

La mastitis clínica severa implica los síntomas de pechos o ubres calientes, sensibles, firmes que es bastante dolorosa para el animal lactante. El comienzo de la mastitis clínica severa es repentino y el animal lactante se puede poner enfermo mostrando signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida de apetito. Cuando el sistema de lactancia completo del animal está afectado, se hace referencia a la condición como mastitis sistémica aguda. Los síntomas severos pueden también estar acompañados con el cese de la producción de leche.

La mastitis crónica es la infección de la ubre persistente, típicamente en la forma de una mastitis subclínica, que ocasionalmente puede desarrollarse en la forma clínica y volver a la forma subclínica. La mastitis crónica está caracterizada por bultos duros dentro de la glándula mamaria debido al establecimiento de bacterias y la formación de tejido conectivo.

Como se usa en la presente, los términos "terapia de vaca seca" o "terapia seca" se refieren a una terapia administrada intra-mamariamente inmediatamente después del último ordeño en un periodo de lactancia para eliminar, tratar y curar la inflamación por mastitis diagnosticada al final del periodo de lactancia.

Como se usa en la presente, el término "terapia preventiva/profilaxis de vaca seca" se refiere a una terapia administrada intra-mamariamente inmediatamente después del último ordeño en un periodo de lactancia para prevenir la inflamación por mastitis durante el periodo seco, y después del parto durante el siguiente periodo de lactancia.

Como se usa en la presente, el término "bienestar del ganado" o "bienestar en animales de granja" se refiere a la prevención del sufrimiento y a aumentar la presencia de sensaciones positivas, habitualmente llamadas confort o placer, resultando de, entre otros, un aumento de los periodos de acostado, un aumento en el tiempo rumiando, una disminución en la necesidad metabólica, una disminución en la presión de las ubres y/o en las fugas de los pezones, disminución en la incidencia de mastitis y otras enfermedades, y disminución en el efecto de cojera debido a la alta producción de leche.

Como se usan en la presente, los términos "composición farmacéutica clara", y/o "solución clara" se refieren a una solución líquida que tiene un valor de turbidez de menos de 6 NTU. Como se usa en la presente, la turbidez es una unidad de medida que cuantifica el grado al que la luz que viaja a través de la columna de agua se dispersa por las partículas orgánicas e inorgánicas suspendidas. La dispersión de la luz aumenta con una carga suspendida mayor. La turbidez es medida comúnmente en Unidades Nefelométricas de Turbidez, que reemplaza a la Unidad de Turbidez de Jackson (JTU). El método nefelométrico compara la luz dispersada por la muestra y la luz dispersada por una solución de referencia.

Como se usa en la presente, los términos "micela" o "micelas" se refieren a un agregado molecular que constituye una partícula coloidal, particularmente a micelas de caseína que contiene principalmente proteínas, calcio y fosfato. Las micelas también contienen citrato, iones menores, lipasa y enzimas de plasmina, y suero de leche atrapado. Las micelas de la caseína son estructuras bastante porosas, que ocupan alrededor del 6-12% de la fracción del volumen total de la leche. El diámetro de las micelas de la caseína varía de 90 a 150 nm. Evidencias de microscopía electrónica y otros medios sugieren que las micelas están compuestas de unidades más pequeñas llamadas submicelas que tienen diámetros de 10 a 20 nm.

Como se usa en la presente, el término "estéril" se refiere a una solución que está libre de patógenos, como se determina por un test de esterilidad convencional conocido por una persona experta en la técnica, y libre de

endotoxinas, en donde el nivel de endotoxinas en el producto final es menos de 0,5 EU/ml de acuerdo con la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL).

5 Como se usa en la presente, el término "peso molecular medio" se refiere a la medio más o menos al desviación estándar del peso molecular del péptido o proteína medido por un método conocido por alguien experto en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel SDS y cromatografía de exclusión por tamaño en un aparato como un HPLC, en donde la muestra se compara con estándares con peso molecular conocido.

10 Los péptidos en las composiciones farmacéuticas de esta invención tienen preferiblemente un peso molecular medio de alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 Dalton. Así, la invención contempla particularmente péptidos que tienen entre 10-50 residuos de aminoácidos en total. La presente invención también contempla proteínas en las que la secuencia motivo del núcleo, por ejemplo las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO:1, está implantada artificialmente dentro de una secuencia de un polipéptido, como los péptidos
15 fabricados por tecnología de ADN recombinante o por síntesis química. Los péptidos pueden ser obtenidos por hidrólisis de caseína para producir una mezcla de péptidos. de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, se puede usar una mezcla de péptidos, o la mezcla puede ser purificada adicionalmente por cualquier método de purificación de proteínas conocido en la técnica para obtener los péptidos aislados.

20 Los péptidos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser también sintetizados usando métodos bien conocidos en la técnica incluyendo síntesis química y tecnología de ADN recombinante. La síntesis se puede realizar en solución o por síntesis de péptidos en fase sólida como se describe por Merrifield (ver J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 1964). La fosforilación de los residuos Serian se puede realizar por cualquier método como se conoce en la técnica, como se describe por ejemplo en Meggio y otros, 1991. FEBS Lett. 283(2):303-306 y Perich JW 1997. Method Enzymol. 289:245-246 entre otros.

En general, los métodos de síntesis de péptidos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos derivatizados o protegidos adecuadamente a una cadena de péptidos creciente. Normalmente, o el grupo amino o el carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector
30 adecuado. El aminoácido derivatizado o protegido puede o ser unido a u soporte sólido inerte o utilizado en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) protegido adecuadamente, bajo condiciones adecuadas para formar el ligamiento de las amidas. El grupo protector es entonces retirado de su residuo de aminoácido recién añadido y se añade el siguiente aminoácido (protegido adecuadamente), y así sucesivamente; tradicionalmente este proceso se acompaña por pasos de lavado también.
35 Después de que todos los aminoácidos deseados han sido enlazados en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) s retirado secuencialmente o concurrentemente, para proporcionar el péptido final. Por la simple modificación de este procedimiento general es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena creciente, por ejemplo, acoplado (bajo condiciones que no racemizen los centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido protegido apropiadamente para formar, después de la desprotección, un
40 pentapéptido, y así sucesivamente.

Se divulgan usos para la gestión general de un rebaño de animales lactantes de ganadería, estos usos utilizan péptidos derivados de la caseína.

45 Se puede proporcionar un uso para reducir la duración del periodo seco entre ciclos de lactancia sin afectar negativamente a la producción de leche, administrando a un animal de ganadería lactante una cantidad efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína.

En la industria lechera moderna, el animal lactante da a luz una vez al año, de tal forma que el ordeño continúa mientras el animal está embarazado. Imponer el periodo seco en un animal lactante antes del parto es una práctica tomada para inducir el proceso de involución en la glándula mamaria, para permitir la restauración del tejido mamario para el siguiente periodo de lactancia. Inducir el periodo seco es necesario, entre otros, para mantener una producción de leche similar antes y después del parto. en vacas, el proceso natural de involución se completa en de 21 a 30 días después del cese del ordeño. En consecuencia, los periodos secos de 50 a 70 días han sido un
50 estándar de la industria, ya que los periodos secos de menos de 40 días han resultado en producción de leche reducida en la lactancia posterior en un 10% a un 30%. Reciente, se ha demostrado en vacas que un periodo seco de 30 días también puede tener lugar sin pérdida en la producción de leche, sin embargo sólo para vacas multiparas, usando somatotropina bovina que puede tener efectos secundarios no deseados (Annen y otros, *ibid*). Se ha demostrado previamente por un inventor de la presente invención y compañeros de trabajo que la duración del proceso de involución puede ser reducida a alrededor de 3 días en cabras y vacas lactantes. La presente invención demuestra ahora que, sorprendentemente, es posible inducir la involución de las cuatro glándulas
60 mamarias de una ubre de una vaca lactante en 3 días.

La presente invención divulga ahora que la administración de péptidos derivados de la caseína es eficiente
65 no solo para inducir una involución rápida sino también para acortar el periodo seco a menos de 50 días, preferiblemente menos de alrededor de 40 días, más preferiblemente a entre alrededor de 20 a alrededor de 30 días

sin afectar negativamente a la producción de leche. Las vacas lecheras modernas son habitualmente secadas mientras todavía producen de 20 a 40 litros de leche por día. En consecuencia, acortar el periodo seco tiene un valor económico significativo. Además, la presente invención demuestra ahora que iniciar el periodo seco en un animal lactante por la administración de al menos un péptido derivado de la caseína al animal lactante en lugar de por el cese del ordeño, resulta en un aumento de la producción de leche durante el periodo de ordeño posterior al periodo seco. Sin desear estar atado a un mecanismo específico, este aumento puede estar relacionado con (a) una disminución en los SCC y sus efectos negativos en la producción de leche, y/o (b) un reemplazo más extensivo de la población de células epiteliales mamarias con nuevas células como resultado de la apoptosis más extensiva inducida por la administración del al menos un péptido derivado de la caseína.

Se puede proporcionar un uso para aumentar la higiene de la leche de un animal de ganadería lactante, que comprende administrar a una glándula mamaria del animal lactante una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína.

Como se usa en la presente, el término "higiene de la leche" se refiere al recuento de células somáticas (SCC) por ml de leche. "Aumentar la higiene de la leche" se refiere a reducir el SCC a igual o menos de 750.000 células por ml de leche, preferiblemente igual o menos de 600.000 células por ml de leche, más preferiblemente igual o menos de 400.000 células por ml de leche, incluso más preferiblemente igual o menos de 300.000 células por ml de leche, más preferiblemente igual o menos de 200.000 células por ml de leche. Un fenómeno típico de la producción lechera moderna es la producción de leche alta obtenida de un animal lactante, especialmente una vaca, aunque haya infección subclínica de la ubre. Dicha vaca frecuentemente produce una alta cantidad de leche, sin embargo, la infección en una o más glándulas aumenta el SCC en la leche a un nivel que puede aumentar los recuentos generales en un tanque colector, reduciendo de este modo el grado de la leche a nivel de la granja. La terapia antibiótica aplicada de forma intramamaria durante la lactancia ha demostrado resultar en una cura bacteriana; sin embargo, no redujo la cuarta o el SCC de la vaca en comparación con los niveles de antes pre-tratamiento (Cattell y otros, 2001. J. Dairy Sci. 84:2036-2043). La presente invención demuestra ahora que administrar péptidos derivados de la caseína resulta en una disminución significativa de los SCC. Sorprendentemente, la presente invención divulga ahora que una única administración de al menos un péptido derivado de la caseína es suficiente para conseguir dicha reducción en los SCC. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los péptidos derivados de la caseína son administrados localmente a un canal del pezón de la glándula mamaria infectada, para confinar el tratamiento sólo a la glándula infectada. La actividad local del péptido en una glándula infectada permite continuar el ordeño de las otras glándulas no infectadas. La higiene de la leche es por lo tanto mejorada significativamente inmediatamente después del tratamiento, ya que la glándula infectada es típicamente la única que contribuye a los SCC elevados. La presente invención demuestra ahora que la administración de al menos un péptido derivado de la caseína es efectiva para reducir los SCC en vacas infectadas subclínicas, y en un grado mejor en vacas infectadas clínicamente. Como el efecto del tratamiento puede ser restringido a la glándula tratada, se obtiene una mejora inmediata en la calidad de la leche sin la necesidad de descartar leche de las glándulas no infectadas. Esto es importante, porque la leche descartada es una de las causas principales de pérdidas económicas en las vacas lecheras que tienen mastitis clínica (DeGraves y Fetrow, 1993. Vet. Clin. North Am. Food Animal Pract. 9:421-434). La administración puede ser en una glándula mamaria así como en todas las glándulas mamarias, por ejemplo en las 4 glándulas mamarias de una vaca lactante. Inesperadamente, la leche obtenida de la glándula tratada en el siguiente ciclo de lactancia comprende recuentos de células somáticas menores. De acuerdo con ciertas realizaciones, el péptido derivado de la caseína se administra a una glándula mamaria o glándulas de un animal lactante durante el periodo seco, para aumentar la higiene de la leche en el siguiente periodo de lactancia.

Los usos pueden ser puestos en práctica con un tipo de péptido derivado de la caseína, o con una pluralidad de tipos de péptidos derivados de la caseína. Los usos pueden ponerse en práctica con las composiciones farmacéuticas listas para usar, claras, descritas en la presente a continuación.

El fosfopéptido puede ser seleccionado del grupo consistente de un fosfopéptido derivado de la β -caseína, un fosfopéptido derivado de la α S1-caseína, y un fosfopéptido derivado de la α S2-caseína. De acuerdo con ciertas realizaciones actualmente preferidas, el fosfopéptido empleado de acuerdo con los usos comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID NO:2 a la SEQ ID NO:5. Los usos pueden ser puestos en práctica con péptidos derivados de la hidrólisis de la caseína, como hidrolizado de caseína no purificado, hidrolizado de caseína purificado y péptidos purificados del hidrolizado de caseína. Adicionalmente, los usos pueden ponerse en práctica con péptidos sintéticos derivados de la caseína. Los péptidos derivados de la caseína pueden ser incorporados en una composición farmacéutica.

Se puede proporcionar el uso para evitar el sufrimiento asociado con la infección de las glándulas mamarias o el cese abrupto del ordeño en animales lactantes de ganadería, que comprende administrar a una glándula mamaria del animal lactante una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína, mejorando de este modo el bienestar del animal lactante.

El mejorar el bienestar del animal lactante se puede medir por la reducción en el número de pasos por día y por la prolongación del tiempo acostado por día de dicho animal. El al menos un péptido derivado de la caseína

puede ser administrado a una glándula mamaria infectada. El al menos un péptido puede ser administrado a una glándula mamaria no infectada.

5 La presente invención además divulga que inesperadamente, la filtración de composiciones turbidas que comprenden péptidos derivados de la caseína a través de filtros de 0,1 µm a alrededor de 0,5 µm, preferiblemente a través de filtros por debajo de 0,25 µm, resulta en una solución clara, que es altamente deseable en el uso farmacéutico.

10 Se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en donde la composición está en la forma de una solución estéril lista para usar, clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0. la composición farmacéutica puede además comprender un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un fosfopéptido derivado de la caseína. La composición farmacéutica puede comprender fosfopéptidos que tienen un peso molecular medio de 15 1.000 a 5.000 Dalton. El peso molecular medio de los péptidos en las composiciones farmacéuticas puede ser de alrededor de 2.500 Dalton.

20 Como se usa en la presente la frase "péptidos derivados de la caseína" se refiere a péptidos que son productos de la escisión de la caseína (referidos en la presente como péptidos derivados de la caseína natural), péptidos sintéticos, químicamente sintetizados para corresponder con secuencias de aminoácidos de las unidades de caseína (referidos en la presente como péptidos sintéticos derivados de la caseína), y péptidos similares (homólogos) a la caseína, por ejemplo, péptidos caracterizados por una o más sustituciones inserciones o 25 deleciones de aminoácidos, como sustituciones permisibles, siempre que al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% de la similitud sea mantenida, y homólogos funcionales de los mismos. Los términos "homólogos" y "homólogos funcionales" como se usan en la presente significan péptidos con cualquier inserción, deleción y sustitución que no afecte a la actividad biológica del péptido como se describe en la presente.

30 Como se usa en la presente, la frase "combinación de los mismos" se define como cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados, derivados de la α- o β-caseína, combinados en una mezcla con uno o más péptidos no idénticos, adicionales derivados de la α- o β-caseína. Como se usa en la presente, el término "mezcla" se define como una combinación no covalente de péptidos que existen en proporciones variables de unos a otros.

35 El péptido derivado de la caseína es un fosfopéptido que comprende el motivo activo Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1). Se debe entender que cualquier péptido que comprende este motivo - ya sea derivado de la caseína, de una proteína que no sea caseína, sintetizado sintéticamente o producido por tecnología recombinante - que mantiene las actividades biológicas de los péptidos como se describen en la presente, está también comprendido dentro del ámbito de la presente invención. Los fosfopéptidos pueden ser ejemplificados por péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID N° 2-5, como se enumeran a continuación:

SEQ ID NO.	Secuencia	Derivada de	Número de residuos
45 SEQ ID NO:2	RELEELNVPGEIVES(P)LS(P)S(P)S(P)EESITR	β-caseína	1-25
SEQ ID NO:3	QMEAESIS(P)S(P)S(P)EEIVPDSVEQK	αS1-caseína	59-79
SEQ ID NO:4	KNTMEHVS(P)S(P)S(P)EESIISNETYK	αS2-caseína	1-21
50 SEQ ID NO:5	NANEEEYSIGS(P)S(P)S(P)EESAEEVATEEVK	αS2-caseína	46-70

55 Las composiciones farmacéuticas pueden ser comprendidas comprendiendo análogos, derivados o fragmentos de los péptidos enumerados arriba con tal de que los análogos, derivados o fragmentos mantengan su actividad biológica como se describe en la presente y la composición farmacéutica esté en la forma de una solución clara como se define en la presente, y los análogos, derivados y fragmentos del péptido tengan un peso molecular de alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 Dalton.

60 El término "análogo" incluye cualquier péptido que comprende secuencia alterada por sustituciones, adiciones, deleciones o modificaciones químicas de aminoácidos de los péptidos de la invención y que mantienen la actividad biológica del péptido. Por "sustituciones de aminoácidos", se entiende que residuos de aminoácidos equivalentes son sustituidos por residuos dentro de la secuencia resultando en un cambio silencioso. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, resultando en una alteración silenciosa. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden ser seleccionados de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, 65

serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen la arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Dichas sustituciones se conocen como sustituciones conservadoras. Adicionalmente, se puede hacer una sustitución no conservadora en un aminoácido que no contribuye a la actividad biológica del péptido. Se apreciará que la presente invención comprende análogos de péptidos, en donde al menos un aminoácido es sustituido por otro aminoácido para producir un análogo activo de un péptido de la invención que tiene una estabilidad aumentada o una vida media más larga en comparación con el péptido enumerado en la presente.

Mientras los residuos de aminoácidos de las secuencias del péptido expuestas en las SEQ ID NO:1 a 5 están todas en la forma isomérica "L", los residuos de la forma isomérica "D" pueden sustituir cualquier residuo de L-aminoácido con tal de que el análogo del péptido mantenga su actividad. Los métodos para producir un análogo de péptido de D-aminoácido retroinverso donde el péptido está hecho con los mismos aminoácidos que se divulgan, pero al menos uno o más aminoácidos, incluyendo los aminoácidos son D-aminoácidos, son bien conocidos en la técnica. Cuando todos los aminoácidos en el péptido análogo son D-aminoácidos, y el N- C-terminal del análogo del péptido están invertidos, el resultado en un análogo que tienen los mismos grupos estructurales que están en las mismas posiciones que en la forma de L-aminoácido del péptido. Sin embargo, el análogo del péptido es más estable a la degradación proteolítica y es por lo tanto útil en muchas de las aplicaciones enumeradas en la presente.

El término "derivado" se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos del péptido de la invención, en la que uno o más de los residuos de aminoácidos está sometido a derivatizaciones químicas por una reacción de cadenas laterales o grupos funcionales, donde dichas derivatizaciones no destruyen la actividad del derivado del péptido. La derivatización química de los residuos de aminoácidos incluyen la glicosilación, oxidación, reducción, miristilación, sulfatación, acilación, acetilación, ADP-ribosilación, amidación, ciclación formación de enlace de disulfuro, hidroxilación, yodación, y metilación.

Los derivados del péptido también incluyen modificaciones del enlace, incluyendo $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH , y CF=CH y modificaciones del esqueleto. Los enlaces péptidos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden ser sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$), enlaces de ésteres ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N}$); enlaces de cetometileno ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$), enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier grupo alquilo, por ejemplo metilo enlaces carba ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$); enlaces de hidroxietileno ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$); enlaces de tioamida (-C=S-NH-), enlaces dobles olefínicos (-CH=CH-); y derivados péptidos ($\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$), en donde R es la cadena lateral "normal", presentada de forma natural en el átomo de carbono. Estas modificaciones pueden tener lugar en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena del péptido e incluso en varias (2-3) al mismo tiempo.

Esos péptidos pueden estar comprendidos en los de grupos amino libres que han sido derivatizados para formar sales aminas, incluyendo los hidroclouros, grupos sulfonil p-tolueno, grupos carbobenzoí, grupos t-butiloxycarbonilos, grupos cloroacetilos o grupos formilo. los grupos carboxilo libres pueden ser derivatizados para formar, por ejemplo, sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden ser derivatizados para formar, por ejemplo, derivados o-acilo o o-alquilo. el nitrógeno de imidazol de histidina puede ser derivatizado para formar N-imbenzilhistidina.

También están incluidos como derivados químicos aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte residuos de aminoácidos estándar. Por ejemplo, la 4-hidroxiprolina puede ser sustituida por prolina; la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; la 3-metilhistidina puede ser sustituida por histidina; la homoserina puede ser sustituida por serina; y la ornitina puede ser sustituida por lisina. Los péptidos pueden también contener aminoácidos no naturales. Ejemplos no limitativos de aminoácidos no naturales son la norleucina, ornitina, ácido diaminobutírico, homoserina, hohocisteína, Lys isopropilo, 3-(2'-naftilo)-Ala, Lys nicotínico, ácido amino isobutírico, y 3-(3'-piridilo-Ala). Los péptidos pueden también contener cadenas laterales no de proteína. Además de lo anterior, los péptidos de la presente invención pueden también incluir uno o más monómeros o oligómeros no aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, y similares). También está comprendido cualquier péptido que tiene una o más adiciones de residuos de aminoácidos relativos a la secuencia de los péptidos listados anteriormente en la presente, siempre que la actividad requisito y preferiblemente el peso molecular se mantengan. Los residuos de aminoácidos pueden ser añadidos en el término amino y/o el término carboxi y/o a lo largo de la secuencia del péptido.

Un derivado peptídico puede ser también un péptido cíclico. La ciclación puede ser obtenida, por ejemplo, a través de la formación del enlace de amida, por ejemplo, incorporando Glu, Asp, Lys, Orn, ácido di-amino butírico (Dab), ácido do-aminopropiónico (Dap) en varias posiciones en la cadena (enlaces -CO-NH o -NH-CO). La ciclación esqueleto a esqueleto puede también ser obtenida a través de la incorporación de aminoácidos modificados de las fórmulas $\text{H-N}((\text{CH}_2)_n\text{-COOH})\text{-C(R)H-COOH}$ o $\text{H-HN}((\text{CH}_2)_n\text{-COOH})\text{-C(R)H-NH}_2$, donde $n=14$, y además en donde R es una cadena lateral natural o no natural de un aminoácido. También se contemplan las ciclaciones esqueleto a cadena lateral y cadena lateral a cadena lateral.

La ciclación por la formación de enlaces S-S a través de la incorporación de dos residuos Cys también es posible. La ciclación cadena lateral a cadena lateral adicional puede ser obtenida por la formación de un enlace de

interacción de la fórmula $-(\text{CH}_2)_n\text{-SCH}_2\text{-C-}$, donde $n = 1$ ó 2 , que es posible, por ejemplo, a través de la incorporación de Cys o homo Cys y la reacción de su grupo Sh libre con, por ejemplo, Lys, Orn, Dab o Dap bromoacetilados.

5 El término "fragmento" como se usa en la presente se refiere a un péptido que tiene una o más deleciones de residuos de aminoácidos relativas a las secuencias de los péptidos enumerados en la presente, siempre que la actividad requisito se mantenga. Los residuos de aminoácidos pueden ser suprimidos del término amino y/o del término carboxi y/o a lo largo de la secuencia del péptido.

10 Los fragmentos del péptido pueden ser producidos por síntesis química, tecnología de ADN recombinante, o sometiendo a los péptidos enumerados en la presente a al menos un agente de escisión. un agente de escisión puede ser un agente de escisión química, por ejemplo, bromuro de cianógeno, o un enzima, por ejemplo, una exoproteinasa o endoproteinasa. Las endoproteinasas que pueden ser usadas para escindir los péptidos de la invención incluyen la tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8 y cualquier otro enzima conocido en la técnica que produzca fragmentos proteolíticos.

15 Como se ha descrito en la presente anteriormente, los péptidos pueden ser obtenidos por hidrólisis de caseína, o los péptidos pueden ser obtenidos de forma sintética.

20 La hidrólisis de caseína es realizada típicamente por digestión con tripsina o extractos pancreáticos. La caseína no digerida es después separada de la solución que contiene el péptido, que es purificada adicionalmente de otras impurezas por cualquier método adecuado que se conoce en la técnica y que se ejemplifica en la presente más adelante. La purificación y la preparación de de la composición farmacéutica clara, lista para usar puede comprender la filtración de la solución. La filtración puede ser realizada a través de un filtro de $0,2\text{-}0,5\ \mu\text{m}$ usando un gas inerte, por ejemplo, Nitrógeno o Argón a baja presión. Preferiblemente, la filtración se realiza a través de un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$. Sorprendentemente, la presente invención demuestra que la filtración de un preparado de hidrolizado de caseína a través de una membrana con un tamaño de poro por debajo de $0,5\ \mu\text{m}$, preferiblemente alrededor de $0,2\ \mu\text{m}$, proporciona una solución clara. La apariencia clara de la solución es principalmente debida a la retirada de las micelas de caseína no digeridas restantes. La micelas de caseína que forman partículas coloidales proporcionan el color blanco, no transparente de la leche.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son muy estables. Como se usa en la presente, el término "estable" se refiere a la actividad de un péptido derivado de la caseína después de la incubación a una cierta temperatura, que mantiene al menos el 85%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% o más de la actividad del péptido inicial.

30 Los fosfopéptidos dentro de las composiciones farmacéuticas son estables en altas así como en bajas temperaturas. Los fosfopéptidos dentro de la composición farmacéutica pueden ser congelados sin pérdida sustancial de la actividad. Además, la composición farmacéutica puede ser calentada hasta a $70^\circ\ \text{C}$ durante alrededor de 15 minutos sin pérdida de la actividad.

35 La composición farmacéutica puede ser proporcionada comprendiendo péptidos derivados de la caseína, que esté en la forma de una solución estéril, clara, lista para usar. Esta composición es ventajosa sobre los productos derivados de la caseína actualmente disponibles, ya que la claridad de la solución permite una detección fácil y rápida de cualquier contaminación, especialmente contaminación microbiana. La solución lista para usar no requiere pasos de reconstitución antes de la administración, en comparación con muchas composiciones conocidas hasta ahora proporcionadas en la forma de un polvo. Las composiciones farmacéuticas pueden estar destinadas para uso veterinario, de tal forma que la composición farmacéutica debe ser administrada a un gran número de sujetos. Las composiciones farmacéuticas cumplen con las necesidades de dichas condiciones, proporcionando una detección fácil de la contaminación y una formulación lista para usar.

40 La claridad de la solución puede ser medida por cualquier método conocido por alguien experto en la técnica. De acuerdo con ciertas realizaciones, la claridad de la solución se determina de acuerdo con su valor de turbidez. como se usa en la presente, una solución "clara" es una solución que tiene un valor de turbidez de menos de 6 NTU.

45 El término "composición farmacéutica" se entiende en un sentido más amplio en la presente para incluir preparaciones que contienen una composición de proteínas de acuerdo con la presente invención usadas no sólo con propósitos terapéuticos, sino también como reactivos o propósitos de diagnosis como es conocido en la técnica. La composición farmacéutica pretendida para uso terapéutico debe contener una cantidad terapéutica de un péptido derivado de la caseína, es decir, la cantidad necesario para medidas preventivas o curativas de la salud. Si la composición farmacéutica se va a emplear como un reactivo o diagnóstico, entonces debe contener cantidades reactivas o diagnósticas del péptido derivado de la caseína.

50 La concentración de proteínas de la composición farmacéutica puede ser de alrededor de $10\ \text{ng/ml}$ a alrededor de $15\ \text{mg/ml}$.

El término "composición farmacéutica" además se refiere a una preparación de uno o más de los péptidos descritos en la presente, con otros componentes químicos como diluyentes, portadores y excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es el facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

5 El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente, se refiere a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Ejemplos no limitativos de portadores son: agua, propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de solventes orgánicos con agua. El término "excipiente" como se usa en la presente se refiere a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos no limitativos de excipientes incluyen el carbonato cálcico, el fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

15 Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa, última edición. las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para la administración parenteral, por ejemplo, para la administración intracanal, particularmente para la inyección o infusión en el canal del pezón de una glándula mamaria. Para la inyección, los péptidos pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer, o en regulador salino fisiológico con o sin solventes orgánicos como el propilenglicol y el polietilenglicol. La administración intracanal a un canal del pezón de una glándula mamaria no se define en términos de administración tópica o sistémica. Como se divulga en la presente, la administración intracanal de la administración farmacéutica de la invención puede tener un efecto local, por ejemplo induciendo la involución sólo en la glándula mamaria tratada, u puede por lo tanto ser referida como administración tópica. Las composiciones farmacéuticas pueden ser también administradas tópicamente como un gel, pomada, crema, emulsión o formulación de liberación sostenida incluyendo un parche transdérmico. La administración sistémica, ya sea de forma parenteral u oral está también comprendida.

25 Se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en la forma de un polvo liofilizado, en donde el polvo es reconstituido a un líquido antes del uso para formar una solución clara, sustancialmente carente de micelas y que tienen un pH por encima de 6,0.

30 Se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en donde la composición está en la forma de una solución estéril lista para usar, clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0, para tratar una glándula mamaria de un animal lactante, incluyendo inducir el cese transitorio de la producción de leche e inducir el cese persistente de la producción de leche.

35 De acuerdo con todavía otro aspecto adicional, la composición farmacéutica nueva de la presente invención es útil para la prevención y tratamiento de infecciones o reversión de infecciones. De acuerdo a ciertas realizaciones actualmente preferidas, el peso molecular medio de los péptidos es de alrededor de 2.500 Dalton.

40 El animal lactante puede ser seleccionado del grupo de animales consistente de humanos, vacas, cabras, ovejas, búfalos, camellos, burros, llamas, caballos, cerdos, gatos y perros.

45 El animal lactante puede ser un humano. En las últimas décadas la lactancia materna ha disminuido en todas las sociedades tecnológicamente avanzadas del mundo y también, aunque en menor medida, en los países en desarrollo. Muchas mujeres eligen no amamantar a sus bebés o cesar de amamantar después de un corto periodo de tiempo. otras no pueden amamantar debido a varias razones médicas, incluyendo mujeres que sufren de ciertas enfermedades transmisibles o no transmisibles, un ejemplo específico siendo las mujeres portadoras del VIH. La recomendación actual de las autoridades sanitarias a las portadoras de VIH es mantener la lactancia materna durante sólo alrededor de 10 semanas después del parto, después de lo cual sólo se deben proporcionar sustitutos de leche. Las mujeres que han dado a luz a bebés prematuros, o bebés a término que no han sobrevivido también son impedidas de amamantar. En todos estos casos, la leche es producida por la glándula mamaria pero no es ordeñada. Dicho estasis de leche está asociado con hinchazón del pecho a una extensión que puede causar agonía conspicua, tanto física como psicológicamente. Además, el estasis de leche se asocia frecuentemente con pérdida de la secreción mamaria, que posteriormente aumenta el riesgo de adquirir una infección intramamaria. Las composiciones farmacéuticas y usos responden en consecuencia a la necesidad de una inducción rápida y eficiente de la involución y cese de la producción de elche para evitar las condiciones no deseables anteriormente descritas.

50 El animal puede ser un animal de ganadería seleccionado del grupo consistente de vacas, búfalos, cabras y ovejas.

55 La nuevas composiciones farmacéuticas de la presente invención son efectivas para inducir el cese de leche transitorio o persistente. El efecto transitorio en la producción de leche puede ser obtenido en una glándula mamaria de un animal lactante en respuesta a una única aplicación, típicamente por inyección directa o infusión en

60

65

la cisterna de la glándula a través del canal del pezón de la composición farmacéutica de la invención. Típicamente, una única inyección o infusión causa una disminución aguda en la producción de leche después de alrededor de 8 horas. La presente invención divulga ahora que una única administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden también causar el cese de leche persistente y la involución. El cese de la producción de leche tiene lugar sólo en la glándula tratada; este fenómeno es de una importancia significativa, ya que el ordeño de las glándulas no tratadas puede continuar para limitar la pérdida de la producción de leche. Alternativamente, si se desea, pueden ser tratadas todas las glándulas mamarias de un animal lactante para inducir el cese de la producción de leche.

El proceso de involución inducido por las composiciones farmacéuticas de la presente invención es más rápido y sincronizado en comparación con la involución inducida por el cese del ordeño, y la producción de leche puede ser reanudada por estímulos mecánicos como el ordeño. La reanudación de la producción de leche también tiene lugar, como en el proceso natural de involución, después de un embarazo y parto posterior. La involución rápida inducida por las composiciones de la presente invención no interfiere con la reconstrucción del tejido de la glándula mamaria y la restauración de la capacidad de secreción de leche hacia el parto.

Las composiciones farmacéuticas nuevas de la presente invención son además útiles para el tratamiento de una infección de la glándula mamaria. Como se usa en la presente, el término "tratamiento" se refiere a la prevención de la infección así como al tratamiento de una glándula infectada para revertir la invención y curar la glándula mamaria, tanto en humanos como en mamíferos no humanos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles en el tratamiento de un amplio rango de infecciones microbianas, incluyendo infecciones causadas por bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, hongos, micoplasmas y virus.

De acuerdo con ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son útiles para tratar mastitis, específicamente en animales de ganadería incluyendo vacas, ovejas, búfalos y cabras.

La mastitis clínica y subclínica son estados inflamatorios de la ubre resultantes principalmente de infecciones bacterianas. La mastitis tiene una variedad de etiologías bacterianas y causa grandes pérdidas en la producción de leche anualmente. Los microorganismos patógenos que más frecuentemente causan la mastitis se pueden dividir en dos grupos en base a su origen: patógenos ambientales y patógenos contagiosos. Los patógenos contagiosos principales son el *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *staphylococcus coagulasa-negativos* (CNS) y *E. Coli*. Con la excepción de algunas infecciones micoplásmicas que pueden originarse en otros lugares del cuerpo y propagarse sistemáticamente., estos cinco tipos principales de microorganismos ganan la entrada a la glándula mamaria a través del canal del pezón. Los organismos contagiosos están bien adaptados a la supervivencia y crecimiento en la glándula mamaria y causan frecuentemente infecciones que duran semanas, meses o años. La glándula infectada es la fuente principal de estos organismos en un rebaño lechero y la transmisión de patógenos contagiosos a cuartos y vacas no infectados tiene lugar principalmente durante el momento del ordeño.

La mastitis clínica es fácilmente diagnosticada debido a alteraciones marcadas en la composición y apariencia de la leche, producción disminuida de leche, elevada temperatura corporal e hinchazón, enrojecimiento, o fiebre en las glándulas infectadas. la mastitis subclínica, la forma más frecuente de la enfermedad, a menudo permanece sin detectar ya que los signos no son fácilmente aparentes. Muchas IMI subclínicas tienden a persistir, resultando en un descenso de la calidad de la leche debido al elevado SCC de la leche, y también debido a una disminución en la producción de leche. La IMI localizada en una única glándula mamaria puede llevar al desarrollo de mastitis clínica y a la propagación de ciertos patógenos de la mastitis de cuartos mamarios infectados a los no infectados. Al contrario que con la mastitis clínica, no se habitualmente aconsejable tratar animales de ganadería que tienen mastitis subclínica por administración de antibióticos durante la lactancia (Gruet y otros, 2001. *Adv. Drug Delivery Rev.* 50:245-259) ya que la tasa de curación es baja y debido al costo del tratamiento y a un periodo de retirada de 4-5 días de la leche lo hacen económicamente injustificable (Yamagata y otros, 1987. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1556-1561). Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas durante el periodo de lactancia. Como se ha descrito en la presente, las composiciones de la invención pueden tener un efecto local, de tal forma que el tratamiento puede ser administrado sólo a las glándulas mamarias infectadas, mientras que el ordeño de las glándulas no infectadas puede continuar, reduciendo la pérdida de leche al mínimo.

Para tratar la mastitis, se puede requerir la administración de dosis repetidas de las composiciones farmacéuticas de la invención en la glándula mamaria infectada. Típicamente, la administración se repite al menos una vez, preferiblemente entre 1-10 veces, más preferiblemente entre 1 y 3 veces, a un intervalo seleccionado del grupo consistente de alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 20 horas y alrededor de 24 horas durante de 1 a 10 días, preferiblemente de 1 a 3 días.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas para el tratamiento de infecciones de la ubre durante el periodo seco. El tratamiento puede o ser dirigido a tratar las glándulas infectadas (terapia de vaca seca) o como una terapia profiláctica (terapia preventiva de vaca seca). El tratamiento de infecciones en el comienzo o

durante el periodo seco es ventajoso durante el tratamiento durante la lactancia ya que permite administrar la composición farmacéutica no solo a una glándula infectada que tiene signos de infección visibles sino a todas las glándulas de la ubre. Dicha administración resulta en la erradicación de la infección existente, y evita adquirir nuevas infecciones durante el periodo seco. Además, se ha demostrado que administrar las composiciones farmacéuticas durante el periodo seco disminuye dramáticamente la incidencia de la infección en el periodo de lactancia posterior. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas a una glándula mamaria identificada teniendo mastitis clínica o subclínica, a una glándula no infectada como tratamiento profiláctico, o a ambas.

La composición farmacéutica puede ser administrada en combinación con un tratamiento anti-microbiano adicional seleccionado del grupo consistente de antibiótico, bactericida, tratamiento antiinflamatorio esteroideo y no esteroideo, tratamiento con un inmunomodulador y vacunación. La composición farmacéutica y el tratamiento anti-microbiano adicional pueden ser co-administrados, ya sea como una composición farmacéutica única, combinada o como composiciones separadas. Alternativamente, la composición farmacéutica puede ser administrada como un pre-tratamiento seguido por la aplicación del tratamiento anti-microbiano adicional, y viceversa.

Los siguientes ejemplo se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de la Composición Farmacéutica

Se disolvió (11 g/litro) caseína bovina comercial (por ejemplo, sigma) en 25 mM de regulador Tris, pH 8 y se digirió con tripsina (500 U/litro) durante 4 h a 37° C. La solución fue acidificada a un pH de 4,7 con HCl, y la caseína no digerida fue peletizada por centrifugación. El sobrenadante fue hervido durante 15 minutos, enfriado a temperatura ambiente, y ajustado a un pH 7 con solución NaOH. El material que no se disolvió bajo estas condiciones fue retirado por centrifugación y desechado. Alternativamente, se usó un hidrolizado de caseína comercial de calidad alimentaria como material de comienzo, y se disolvieron 1 -40 g/litro en solución salina o agua produciendo un pH de aproximadamente 7,2. El agua y la solución salina usadas a lo largo del proceso cumplen con las monografías USP para "Agua para Inyección". La solución fue después calentada a 40-60° C y después de enfriarse, filtrada a través de filtros de 5 micrones usando gas inerte como nitrógeno o Argón a baja presión (1-6 psi). Varios lotes requirieron una filtración adicional a través de filtros de 3 micrones. El filtrado fue después calentado de 50° C a 70° C para aumentar la solubilidad de los péptidos.

La solución turbida resultante fue después filtrada a través de un filtro de 0,2 micrones usando gas inerte como el nitrógeno o el argón a baja presión (1-6 psi). Este paso de filtración eliminó las micelas de la caseína restantes, de tal forma que la solución obtenida después de la filtración era clara. El filtrado se muestreó y ensayó para el contenido de péptido total por el método Bradford, y la concentración de proteína fue ajustada a 5-15 mg/ml. El pH de la solución fue después ajustado o con HCl concentrado (reactivo grado ACS) o con 1,0 de NaOH normal a alrededor de 7,3-7,6, y la solución se filtró de nuevo a través de filtros de 0,2 micrones con gas inerte a baja presión. El filtrado final (alrededor de 10 ml) fue después filtrado y sellado en ampollas de cristal esterilizadas de 20 ml en una atmósfera de gas inerte.

Con ciertas fuentes de hidrolizado de caseína comerciales se puede requerir un paso de pre-filtración a través de un filtro de 5 micrones usando gas inerte como nitrógeno o argón a baja presión (1-6 psi) para evitar el taponamiento del filtro de 0,2 micrones al final del proceso.

La claridad de la solución se determinó por turbidímetro (Micro 100 General Purpose Turbidometer, Metex Corporation, Toronto, Canadá). La solución obtenida era clara, teniendo un NTU de 4,0. La composición resultante se designa en la presente como MLTS-2.

Ejemplo 2: Tratamiento de la Mastitis

Ejemplo 2.1: Terapia seca aplicada a vacas que tienen mastitis

Población de vacas

Participaron treinta y dos vacas en el estudio (8 casos, es decir vacas que recibieron un tratamiento, contra 24 controles, elegidas de acuerdo con el diseño del estudio, ver más abajo). Las 8 vacas del caso que diagnosticadas con mastitis clínica y/o subclínica de acuerdo con el diagnóstico bacteriológico fueron inscritas para recibir tratamiento con la composición de la invención preparada como se ha descrito en el ejemplo 1 anteriormente (MLTS-2). 24 vacas sirvieron como un control, de las cuales 6 se diagnosticó que tenían mastitis como antes y 18 no estaban infectadas. La mastitis clínica se caracteriza con signos visibles incluyendo copos o coágulos en la leche, aumento agudo en el SCC, fiebre, pulso rápido, pérdida de apetito, deshidratación y depresión. El cuarto infectado o la ubre también pueden estar hinchados. La mastitis subclínica se caracteriza por una disminución en la producción de leche, calidad de la leche reducida y SCC elevado que es detectado por un aumento en el recuento de células

somáticas del tanque a granel. Las vacas de control y ensayadas se muestrearon del mismo rebaño y eran de la misma raza.

5 Los criterios de inclusión para todas las vacas fueron: etapa tardía de lactancia, 1-2 semanas antes del primer día del periodo seco; cuatro cuartos funcionales, embarazo, sin lesión del pezón externa significativa; vacas que no recibieron terapia anti-mastitis sistémica 4 semanas antes del reclutamiento; vacas que no consumieron comida con antibiótico 4 semanas antes del reclutamiento; sin signos de morbilidad que puede tener una influencia potencial en el resultado del tratamiento de acuerdo con el juicio del investigador. Las vacas diagnosticadas con mastitis eran vacas con IMI y SCC confirmados de al menos 400.00 células/ml.

10 Las vacas fueron excluidas del estudio de acuerdo con los criterios de exclusión siguientes: las vacas que recibieron inmunoterapia 4 semanas antes del reclutamiento; vacas que recibieron terapias antibióticas, de hormonas, antiinflamatorias y/o anabólicas, ya sea sistémicas o por alimentación 4 semanas antes del reclutamiento; vacas que recibieron terapia de vacunas 12 meses antes del reclutamiento; el uso concurrente de terapias inmuno-
15 y de vacuna, ya sea sistémicas o por alimentación; otras terapias alternativas concurrentes; vacas con tuberculosis activa u otras enfermedades infecciosas de acuerdo con el juicio del investigador; el uso concurrente de esteroides anabolizantes; ya sea sistémico o por alimentación; el uso concurrente de hormonas; ya sea sistémico o por alimentación.

20 Diseño del Estudio

Las vacas tratadas (caso) y de control fueron seleccionadas para minimizar las variaciones externas, definiendo una puntuación de concordancia de acuerdo con las siguientes variables: rebaño, raza, número de terneros, fecha del ternero, número de periodos secos, fecha del secado, y fecha de nacimiento de la vaca. La concordancia completa fue puntuada como 5; ninguna concordancia fue puntuada como 0. Se requirió una concordancia completa para el rebaño y la raza. Los factores adicionales incluían del factor más importante al menos): número de partos (concordancia permitida ± 1), diferencia de la fecha de parto (concordancia permitida ± 2 meses), número de periodos secos (concordancia permitida ± 1), diferencia de la fecha de comienzo de un periodo seco (concordancia permitida ± 2 meses), fecha de nacimiento (concordancia permitida ± 3 meses).

30 Las vacas fueron inscritas en el estudio una o dos semanas antes de la entrada programada en el periodo seco, que es de alrededor de 75 días antes del parto. Dentro de este periodo, se midieron los siguientes parámetros para establecer unos datos de línea base: apariencia general de las ubres; SCC; existencia de IMI de acuerdo con la prueba bacteriológica y signos visibles. Alrededor de 60 días antes del parto, el ordeño se paro y se administró el tratamiento. Las vacas de ensayo recibieron 10 ml de MLTS-2 con 8 mg/ml de péptido dos veces al día durante 3 días. Las vacas de control que se diagnosticó que tenían mastitis recibieron tratamiento de vaca seca de un antibiótico de amplio espectro (Cefquinome, 75 mg por aplicación). La administración fue por inyección en una cisterna de la glándula a través del canal del pezón de la glándula mamaria como una única dosis en cada cuarto. Se trataron los cuatro cuartos de una ubre. Para cada dosis inyectada se usó un nuevo frasco. Los frascos usados se mantuvieron para la verificación del cumplimiento y cuentas por el encargado del estudio. Después del último tratamiento las vacas no fueron ordeñadas más hasta el siguiente periodo de lactancia después del parto. Después de la terminación de los 3 días de tratamiento, las vacas fueron seguidas durante alrededor de 9 semanas durante el periodo seco para signos visibles de mastitis. Se examinó la presencia de microorganismos en cada cuarto de la ubre por prueba bacteriológica, la apariencia general de la ubre y el SCC durante el siguiente periodo de lactancia uno, dos y tres meses después del parto.

Resultados

50 La tabla 1 a continuación muestra que ninguno de los microorganismos detectados antes del tratamiento estaban presentes después del tratamiento (es decir, la tasa de curación de la infección existente fue del 100%).

Tabla 1: Efecto de los tratamientos de periodo seco en la cura bacteriana y nuevas infecciones en vacas tratadas con hidrolizado de caseína (8 vacas, 32 cuartos) en comparación con las vacas de control correspondientes (24 vacas, 96 cuartos)

	Microorganismo detectado antes del tratamiento (Nº de Cuartos)		Mismo microorganismo detectado en la siguiente lactancia (0-89 días después del parto) (Nº de Cuartos)	
	Casos	Controles	Casos	Controles
S. aureus	3	5	0	2
S. DYSGALACTIA	4	7	0	4
S. chromoge	0	5	0	2
S. uberis	1	4	0	2
E. coli	1	6	0	3
CNS	2	4	0	0
Otros	0	3	0	5
Cuartos Infectados	11	34	0	18
Tasa de Curación (%)	-	-	100%	47.1%

Nota: S denota Staphylococcus; CNS denota streptococcus coagulasa negativos

No se diagnosticó que las vacas de control tuviesen mastitis al comienzo del estudio, y no recibieron ningún tratamiento, mastitis desarrollada durante este periodo (n = 12 cuartos de 18 cuartos); otros 6 cuartos infección recurrente, uno por el mismo microorganismo y el resto de los 5 cuartos por microorganismos de tipo diferente.

Ejemplo 2.2: Terapia seca de una dosis aplicada a vacas a nivel de rebaño comprendiendo con y sin mastitis

Diseño del Estudio

El objetivo de este experimento era estudiar la eficacia del MLTS-2 como una terapia de vaca seca a nivel de rebaño. Cincuenta y cinco vacas Holstein de un rebaño lechero al menos en el segundo periodo de lactancia, participaron en el experimento desde el 25 de julio del 2005 al 11 de noviembre del 2005.

El estudio fue realizado de acuerdo con las Directrices de la International Coordination of Harmonization in Veterinary. Los criterios de inclusión y exclusión fueron como se ha descrito en el Ejemplo 2.1.

Las vacas fueron inscritas en el estudio una o dos semanas antes de la entrada programada en el periodo seco, que es de alrededor de 75 días antes del parto. Las muestras de leche fueron recogidas asépticamente y cultivadas de acuerdo con las directrices establecidas de cada cuarto al menos dos veces antes del momento programado del tratamiento de secado. La infección intramamaria (IMI) pre-secado se definió por la identificación de al menos dos cultivos posibles. Dentro del periodo de pre-tratamiento, se midieron los siguientes parámetros para establecer unos datos de línea base: apariencia general de la ubre; SCC; existencia de IMI de acuerdo con la prueba bacteriológica y signos visibles. Alrededor de 60 días antes del parto, se paró el ordeño y se administró el tratamiento. Los tratamientos fueron administrados asépticamente por infusión intramamaria en los cuatro cuartos de las cincuenta y cinco vacas del ensayo. Cada cuarto fue se infundió una vez con 10 ml de MLTS-2 que contenía 8 mg de péptido por ml. Para cada dosis inyectada se usó un nuevo frasco. Los frascos usados se mantuvieron para la verificación del cumplimiento y cuentas por el encargado del estudio. Después del último tratamiento las vacas no fueron ordeñadas más hasta el siguiente periodo de lactancia después del parto. Después de la terminación del tratamiento, las vacas fueron seguidas durante alrededor de 9 semanas durante el periodo seco para signos visibles de mastitis. Para evaluar la tasa de curación y la tasa de nuevas infecciones a nivel de cuartos, se tomaron muestras de calostro de todos los cuartos durante los primeros dos meses de la lactancia posterior y se cultivaron en medio apropiado. Los cuartos con dos cultivos de leche negativos consecutivos se supone que tienen una cura microbiológica o cuarto no infectado. Uno y dos meses después del parto, se examinó la apariencia general de la ubre y el SCC. Todos los parámetros se recopilaron para cada cuarto y se analizaron con el paquete SAS/STAT para efectos antes frente a después usando la prueba chi-cuadrado.

Resultados

En el muestro inicial, se descubrió que 14 vacas (25,5%) tenían una infección, de los cuales estaban infectados 19 cuartos (8,6%). Los organismos predominantes detectados fueron variantes de staphylococcus (14/19)

(Tabla 2)

Tabla 2: IMI detectado antes y después del tratamiento (vacas n = 55, cuartos n = 220)

Antes del tratamiento		IMI en vacas tratadas después del parto (Muestras examinadas para la misma bacteria que el tratamiento anterior)			
		IMI		Non-IMI	
Vacas	Cuartos	Vaca	Cuarto	Vacas	Cuartos
14	19	1	1	13	18
14/55	19/220	Prev.: 1/14	1/19	Cura: 13/14	18/19
Bacteria Detectada: <i>S. epidermidis</i> , n= 2 <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. dysgalactiea</i> , n= 3 <i>Strep. Uberis</i> , n= 1		Bacteria Detectada <i>S. chromogens</i>			
Nota: S. denota Staphylococcus; CNS Staphylococci coagulasa negativos; NOS no especificado de otra manera. Strep, streptococcus. Prev. denota prevalencia. La diferencia en la existencia de IMI entre antes y después del tratamiento fue estadísticamente significativa, p<0.005.					

Los datos muestran que después del parto sólo un cuarto permaneció infectado con el mismo tipo de organismo hasta 89 días.

Ejemplo 2.3: Tratamiento de mastitis durante la lactancia

Se inscribieron treinta y siete vacas para este estudio. Se diagnosticó que todas las vacas tenían mastitis clínica en una glándula. el hidrolizado de caseína fue administrado por inyección en la cisterna de la glándula infectada a través del canal del pezón de la glándula mamaria dos veces al día: una vez a lo largo de la mañana y una vez a lo largo de la tarde.

Las vacas que participaron en el estudio estaban en diferentes etapas referente al número de parto y, en consecuencia, al número de lactancia. Los organismos fueron identificados y cuantificados por técnicas de laboratorio estándar (Leitner y otros, 2004 Dairy Sci. 87:46-52). Los resultados positivos se basaron en dos identificaciones consecutivas de patógenos de mastitis conocidos. Como es evidente de la Tabla 3 a continuación, la composición farmacéutica de la presente invención es altamente efectiva para tratar la mastitis durante el periodo de lactancia.

Tabla 3: Efecto del MLTS-2 en la cura bacteriana en vacas que tienen IMI durante la lactancia

Patógenos	Número de glándulas infectadas con microorganismos antes del tratamiento	Número de glándulas infectadas con microorganismos después del tratamiento
S. aureus	5	1
TODOS LOS STREPTOCOCCI	6	2
E. coli	4	1
A. pyogenes	10	0
Otros	8	0
Tasa de curación total (%)	33	4

Ejemplo 3: Acortando el Periodo Seco

Población de vacas

5 Las vacas se inscribieron para el estudio de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión descritos en el Ejemplo 2.1 anterior. La puntuación de concordancia entre una tratada (n=5) y un grupo de control (n=15) es también como en el ejemplo anterior. Dentro del grupo de control, se diagnosticó que al menos un quinto de las vacas tenían mastitis y fueron tratadas con terapia de vaca seca antibiótica.

10 Diseño del estudio

15 Las vacas fueron inscritas en el estudio dos semanas antes de la entrada programada en el estudio. La entrada en el estudio tuvo lugar alrededor de 60, 40, 30, 20 y 10 días antes del parto anticipado. Antes de la entrada en el estudio, se midieron los siguientes parámetros para establecer unos datos de línea base: SCC, existencia de IMI de acuerdo con pruebas bacteriológicas y signos visibles, y producción de leche. el hidrolizado de caseína, preparado como se describe en el Ejemplo 4 en la presente más adelante, fue administrado sólo una vez un día. Reducir el número de administraciones a una única aplicación es altamente deseable, ya que un único tratamiento simplifica considerablemente los procedimientos y la carga de trabajo en una granja dada, por lo tanto, la probabilidad de que los granjeros adopten el procedimiento. La administración fue por inyección en una cisterna de la glándula a través del canal del pezón de la glándula mamaria. Por cada dosis inyectada, se usó un nuevo frasco. Los frascos usados se mantuvieron para la verificación del cumplimiento y cuentas por el encargado del estudio. Después del tratamiento las vacas no fueron ordeñadas más hasta la siguiente lactancia. Después de la terminación del tratamiento, las vacas fueron seguidas (incluyendo examen de las ubres) durante el periodo seco impuesto. Además, después del parto, se examinaron los siguientes parámetros: SCC, IMI por pruebas bacteriológicas y signos visibles, y valoración del canal del pezón incluyendo valoración del canal abierto o cerrado y consistencia del tapón. También se midió el rendimiento de leche. Un tratamiento se definió como exitoso cuando causa el cese completo de la producción de leche, y no tiene ningún efecto adverso en los parámetros medidos después del parto. Acortar el periodo seco a 45 días o menos se define como altamente exitoso. Los análisis estadísticos fueron como se describe en el Ejemplo 2.2 en la presente anteriormente. Como se conoce, las producciones de leche aumentan desde el primer periodo de lactancia (después del primer parto) hasta al menos el cuarto periodo de lactancia. Por lo tanto, para estandarizar la producción de leche de vacas tratadas frente a no tratadas, los datos de producción de leche fueron corregidos de acuerdo con el número de lactancia como sigue: para la primera lactancia, el litro de leche por día fue dividido por 0,795, para la segunda lactancia el litro de leche por día fue dividido por 0,965; para la tercera lactancia, el litro de leche por día fue dividido por 1,001, y para la cuarta y más - no se realizó estandarización. Estos factores de corrección se usan actualmente por la Israeli Cow Breeding Association (ICBA) para la selección genética de vacas en Israel.

Resultados

40 Todas las vacas de casos y de control parieron de acuerdo con el diseño del estudio, y no se registro ningún caso de aborto u otro tipo de enfermedad postparto. La duración del periodo seco (en días) en la lactancia precedente fue el mismo para los casos y los controles. Por otro lado, en la lactancia actual la duración del periodo seco fue significativamente más corta ($p < 0,01$) en los casos en comparación con los controles después del tratamiento con hidrolizado de caseína (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto del tratamiento con hidrolizado de caseína en la duración del periodo seco

	Periodo seco después de la lactancia anterior		Periodo seco después de la lactancia actual	
	Casos	Controles	Casos	Controles
Duración (día)	60.8	63.9	39.2	62.1
Intervalo	55.69	60.70	31.45	55.71

55 Después del parto, la producción de leche después del parto no difirió entre vacas en las que el periodo seco fue acortado al menos durante los periodos de tiempo descritos en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Producción de leche después del tratamiento con hidrolizado de caseína aplicado para acortar el periodo seco

Días de lactancia	Periodo de lactancia anterior			Periodo de lactancia actual		
	Producción de leche media por día (litros)		Diferencia entre casos y controles	Producción de leche media por día (litros)		Diferencia entre casos y controles
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

Ejemplo 4: Reducción de los Recuentos de Células Somáticas de la leche

Ejemplo 4.1: recuento de células somáticas en vacas lactantes tratadas con hidrolizado de caseína durante tres días

Población de vacas

Treinta y siete vacas completaron el estudio, después de una inscripción inicial de 42. Las vacas fueron elegibles para la inscripción en este estudio si tenían cuatro cuartos funcionales, de los cuales al menos uno estaba infectado, no tenían lesión en el pezón significativa, estaban en buena salud y no habían recibido terapia de antibióticos y/o antiinflamatoria en los 30 días antes del comienzo del tratamiento. Además, no se usaron vacunas de mastitis en ninguno de los rebaños de los cuales las vacas fueron seleccionadas al menos durante el año anterior. Las vacas en estas granjas fueron alimentadas con una ración mixta total Israelí típica que comprendía 65% de concentrados y 35% de forraje conteniendo un 17% de proteínas.

Preparación de los Fosfopéptidos de Caseína

El hidrolizado de caseína, que comprende fosfopéptidos de caseína se preparó como se ha descrito anteriormente (Shamay y otros, 2003, supra). El procedimiento tuvo lugar en los Laboratorios Hy (Rehovot, Israel), asegurando que el producto final era estéril y que el producto fue embotellado en frascos estériles. El nivel de endotoxinas en el producto final fue de 0,48 EU/ml de acuerdo con la prueba del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL). La cantidad de endotoxina inyectada con 10 ml de esta solución, 0,0001 EU/kg de peso corporal (asumiendo un peso corporal de una vaca medio de 500 kg), es 2000 veces más bajo que el límite de tolerancia de la endotoxina en fármacos humanos administrados intratecales (K = límite de tolerancia en EU/kg = 5 EU/kg para fármacos parenterales y 0,2 EU/kg para fármacos intratecales). Los productos finales para una única inyección en un único cuarto contenían 10 ml de CNH con una concentración de péptido de 10 mg/ml.

Diseño del estudio y resultados

El hidrolizado de caseína fue administrado dos veces al día durante tres (3) días a la única glándula mamaria infectada de la ubre a través del canal del pezón. El ordeño y la inducción del periodo seco se continuaron de acuerdo con el programa regular del rebaño.

Las muestras de leche se examinaron en el laboratorio central de la Israeli Cow Breeding Association (ICBA), Caesarea, Israel o en el National Mastitis Reference Center, Kimron Veterinary Institute. Los organismos fueron identificados y cuantificados por técnicas de laboratorio estándar (Leitner y otros, 2004. Dairy Sci. 87:46-52). Los resultados positivos se basaron en dos identificaciones consecutivas de patógenos de mastitis conocidos.

Los recuentos de células somáticas en la leche antes de aplicar el tratamiento (SCC-PRE) se compararon con los SCC observados después del parto (SCC-POST). El SCC-PRE presentado en la Tabla 6 más adelante es la media de dos mediciones hasta 15 días antes de la aplicación del tratamiento de hidrolizado de caseína. el SCC-POST presentado es la media de al menos dos mediciones entre 15-60 días después del parto. Para 27 vacas, el SCC fue seguido también una vez al mes hasta 10 meses después del parto.

Análisis Estadístico

El SCC-PRE se comparó con el SCC-PSOT con el paquete SAS/STAT usando una prueba chi-cuadrado para el SCC y la ANOVA de una vía para las variables continuas. Todas las muestras de leche fueron analizadas

para el SCC con un Fossomatic 360 en el laboratorio de la ICBA y se convirtieron a escala logarítmica para análisis estadístico.

Resultados

Los datos fueron recogidos de 37 vacas de 9 rebaños (de 2 a 7 vacas/rebaño) con un diagnóstico confirmado de mastitis en un cuarto. Los patógenos identificados más frecuentes fueron Arcanobacterium pyogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia Coli y Streptococcus uberis, La infección con especies de Streptococcus, P. auroginosa, Corynobacteruim bovis y Micrococcus fueron exclusivamente sub-clínicas, mientras ~ 60% de las infecciones con S. aureus, E. Coli and A. pyogenes fueron clínicas y ~ subclínicas.

Hubo diferencias significativas entre el SCC-PRE (media 2.210.200) y el SCC-POST (media 205.000) ya sea probado para patógenos individuales o en el grupo de estudio completo (p<0,001) (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto del hidrolizado de caseína en el SCC post-parto en vacas lactantes tratadas en una glándula infectada

		Recuentos de células somáticas	
		SCC-PRE	SCC-POST
Patógenos	Número	Media	Media
Staphylococcus aureus	5	1,235.2	147.4
Todo Streptococcus	7	3,357.4	262.3
Escherichia Coli	5	1,781.2	275.4
Arcanobacterium pyogenes	10	1,465.1	145.6
Otros	6	3,283.5	226.7
Todos			
SCC medio		2,210.2	205.0
Desviación estándar		2,374.3	170.2

En las glándulas infectadas clínicamente, el SCC-POST en el 75% de las vacas (n=9/12) fue de 201.000 células/ml o menos después del tratamiento, y en todas las vacas tratadas el SCC-POST fue de 401.000 células/ml o menos (Tabla 7). En las glándulas infectadas subclínicamente, el SCC-POST en el 57% (n=12/21) de las vacas fue de 201.000 células o menos después del tratamiento y en el 81% de los casos de 401.000 células/ml o menos. Cuando se considera todo el conjunto de datos, el SCC-POST en el 63,6% (n=21/33) de los casos estaba por debajo de 201.000 células/ml, que era significativamente más alto (p<0,01) que el número de casos (n=12/33) en los que el SCC-POST estaba por encima de 201.000 células/ml.

Tabla 7: Efecto del hidrolizado de caseína en el SCC post-parto en vacas lactantes tratadas en glándulas infectadas individuales

		SCC Después del Tratamiento		
Etapa de Mastitis antes del tratamiento		0 -200	201 -400	>401
Clínica		9 vacas	3 vacas	0 vacas
Subclínica		12 vacas	5 vacas	4 vacas
SCC Medio		95.6	329.4	530.9
Desviación estándar		45.8	67.1	133.4

Para 27 vacas, de media, transcurrieron 6,1 meses entre tratamientos y la inducción del secado, es decir, el parto fue después del periodo seco. De este modo, el SCC-POST representa el SCC observado en el periodo de lactancia después del periodo seco. En el 59,3% de las vacas (16/27), el SCC-POST estaba por debajo de 201.000 células/ml, que no es significativamente diferente de 21/23, el número de casos en los que el SCC-POST estaba por debajo de 201.000 células/ml en el periodo entre el tratamiento y el secado. Vale la pena señalar que en casi el 26% de las vacas el SCC-POST estaba por debajo de 101.000 células/ml durante la observación de seguimiento completa y en el 85% (23/27) el SCC-POST estaba por debajo de 401.000 células/ml.

Ejemplo 4.2: Efecto de una dosis de hidrolizado de caseína administrada a las cuatro glándulas en el recuento de células somáticas post-parto

5 Reducir el número de tratamientos a una única dosis es muy importante desde un punto de vista práctico ya que un único tratamiento simplificará considerablemente los procedimientos y la carga de trabajo en una granja dada, por lo tanto, la probabilidad de que los granjeros adopten este procedimiento.

10 El objetivo de este experimento era estudiar el efecto del tratamiento de hidrolizado de caseína aplicado en una dosis a cuatro glándulas en el recuento de células somáticas post-parto. Participaron en el experimento vacas Holstein (55), estando al menos en el segundo periodo de lactancia, de un rebaño lechero desde el 25 de Julio al 11 de Noviembre del 2005.

15 Las vacas de estudio, criterios de inclusión y exclusión, muestreo de la leche, y protocolos de estudio son esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2.1 anteriormente en la presente. Los recuentos de células somáticas en la leche antes de aplicar el tratamiento (SCC-PRE) se compararon con el SCC observado después del parto (SCC-POST). El SCC-PRE fue la media de dos mediciones hasta 15 días antes del tratamiento en cada glándula individual. El SCC-POST fue la media de al menos dos mediciones entre 15-60 días (intervalo 15-30, 31-60) después de la fecha de parto. Los datos y el SCC fueron analizados como en el ejemplo 4.1.

20 Resultados

25 Antes del tratamiento, el SCC-PRE medio medido en cuartos infectados (19 cuartos de 13 vacas) era de 557.278 células/ml en comparación con 183.381 células/ml ($p < 0,001$) en cuartos no con IMI. Como se muestra en la Tabla 8 a continuación, el tratamiento fue efectivo para reducir el SCC-POST ($p < 0,01$). La diferencia entre el SCC antes y después del tratamiento fue más notable en las glándulas infectadas intramamarias ($p < 0,01$) en comparación con la diferencia para las glándulas sin IMI ($p < 0,05$); sin embargo, estos resultados demuestran claramente que la aplicación de péptidos derivados de la caseína reduce el SCC en la leche, y mejora de este modo la higiene de la leche cuando se aplican a tanto glándulas infectadas como no infectadas.

30 **Tabla 8:** Efecto del hidrolizado de caseína en el SCC post-parto en glándulas infectadas y no infectadas

	SCC-PRE (Células/ml)	SCC-POST (Células/ml)		
		15-30 días	31-60 días	Media
Infectadas-IMI	557,278*	146,851*	154,301*	149,201*
No Infectadas/IMI	183,381***	160,945***	175,813	167,232***
Todas	214,777**	156,480**	169,230**	164,914**
* $p < 0.00.1$; ** $p < 0.41$; *** $p < 0.05$				

45 Ejemplo 5: Efecto del Hidrolizado de Caseína en La Producción de Leche Después del Parto**Ejemplo 5.1: Efecto de aplicaciones múltiples del hidrolizado de caseína**Población de vacas

50 Once vacas (casos) diagnosticados con mastitis clínica y/o subclínica por diagnóstico bacteriológico fueron inscritas para recibir el tratamiento con hidrolizado de caseína. 33 vacas sirvieron como control, de las cuales 6 fueron diagnosticadas con mastitis como anteriormente y 27 no estaban infectadas. Las vacas de control y de ensayo fueron muestreadas del mismo rebaño y eran de la misma raza.

55 Alrededor de 60 días antes del parto, se paró el ordeño y se administró el tratamiento. Las vacas de ensayo recibieron 10 ml de MLTS-2 con 8 mg/ml de péptido dos veces al día durante 3 días. Las vacas de control recibieron tratamiento de vaca seca antibiótico como único tratamiento. Se trataron los cuatro cuartos de una ubre. Las vacas no fueron ordeñadas entre tratamientos; la acumulación de leche residual se descartó de la glándula tratada antes del tratamiento de hidrolizado de caseína.

60 Los datos de este ensayo se sometieron a ANOVA de tres vías con un diseño de mediciones repetidas ("parcelas divididas") usando Grupos (vacas tratadas contra vacas de control); lactancia (lactancia probada: 1, 2, 3, ó 4-5) y mes después del parto (1º, 2º, 3º, ó 4º en lactancia). Para la comparación de la producción de leche media antes y después del tratamiento se estandarizó la producción de leche por día como se ha descrito en el Ejemplo 3 en la presente anteriormente.

65

Resultados

La Figura 1 y 2 recogen la respuesta típica al hidrolizado de caseína (vaca N° 2424 y 2331 respectivamente). Ambas vacas fueron infectadas con Staphilococcus aureus en el momento del tratamiento. se puede ver, que la infección causó una disminución en el rendimiento de producción de leche durante el segundo periodo de lactancia. Después del tratamiento, sin embargo, la producción de leche ha aumentado significativamente desde el parto hasta la última medición (60 días después del parto). La Tabla 9 muestra que el aumento en la producción de leche no afecta negativamente a la calidad de la leche, medida por concentración de proteínas y grasas.

Tabla 9: Efecto del tratamiento con hidrolizado de caseína en concentración de proteínas y grasas en la leche obtenida después del parto hasta 100 días de lactancia

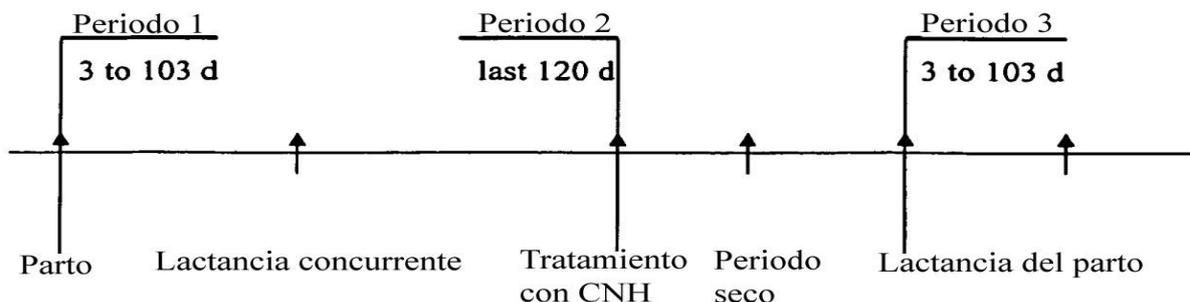
	Control		Tratadas	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
Proteínas (%)	3.0	2.9	3.1	3.2
Grasa (%)	3.5	3.6	3.5	3.3

ejemplo 5.2: Efecto de aplicaciones individuales de hidrolizado de caseína

El objetivo de este experimento era estudiar el efecto de un tratamiento individual con hidrolizado de caseína, aplicado a cuatro glándulas en seco antes del parto en la producción de leche post-parto. La importancia de un régimen de una aplicación individual reside en la reducción de la carga de trabajo en un granja y en el cumplimiento del personal con la administración del tratamiento.

Participaron en el experimento vacas Holstein (55), que estaban al menos en el segundo periodo de lactancia, de un rebaño lechero desde el 25 de Julio del 2005 al 11 de Noviembre del 2005.

Las vacas de estudio, criterios de inclusión y exclusión, muestreo de la leche, pruebas bacteriológicas, y protocolos de estudio son similares al Ejemplo 2.2 y al 4.2. La producción de leche de vaca individual fue registrada automáticamente tres veces al día. El efecto del hidrolizado de caseína en la producción de leche post parto (de 4 a 103 días) se evaluó comparando la producción de leche en los siguientes periodos definidos:



La producción de leche del periodo 3 se comparó con la producción de leche de los periodos 1 y 2 (Ver el esquema anterior para la definición de los periodos).

Las vacas que participaron en el estudio estaban en diferentes etapas con relación al número de partos, y, por consiguiente, número de lactancia. La estandarización de la producción de leche entre vacas en lactancias diferentes se corrigió de acuerdo no la producción de leche del número de lactancia como se describe en el Ejemplo 3 en la presente anteriormente. Veintiocho vacas fueron tratadas el final de la primera lactancia, 17 al final de la segunda y 10 al final de la tercera lactancia o más. La producción de leche en litros se presenta como resultados brutos y después de la estandarización. Los datos fueron analizados por el paquete SAS/STAT como se describe en el ejemplo 5.1.

Resultados

Los datos fueron recogidos de 55 vacas. La producción de leche en el periodo 3 aumento un 11,60% (p<0,01) en comparación con la producción de leche en el periodo 1 (Tabla 10).

Tabla 10: Efecto del hidrolizado de caseína tratado como una dosis individual en el secado en la producción de leche después del parto

Días desde la fecha de parto	Periodo 1		Periodo 3	
	Bruto	Tras la corrección	Bruto	Tras la corrección
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

En vacas que tenían infección intramamaria (IMI) (n = 13, glándulas = 19) el efecto del tratamiento de hidrolizado de caseína fue más prominente (p<0,01) porque la cantidad de leche diaria en el periodo 2 (Tabla 11) fue 2,2 litros menor en comparación con la cantidad de leche obtenida de vacas sin IMI, mientras que en el periodo 3 la producción de leche de las vacas que tenían IMI y las vacas que no tenían IMI fue similar (Tabla 12).

Tabal 11: producción de leche en el periodo 2 en IMI y no IMI

Días antes de la fecha de secado	Vacas IMI		Vacas No IMI	
	Bruto	Después de la Factorización	Bruto	Después de la Factorización
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

Tabla 12: efecto del hidrolizado de caseína tratado como una dosis individual en el secado de la producción de leche después del parto (periodo 3)

Días después de la fecha de parto	Periodo 3 de Vacas IMI en Periodo 2		Periodo 3 de Vacas no IMI en Periodo 2	
	Bruto	Después de la Estandarización	Bruto	Después de la Estandarización
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

Ejemplo 6: Efecto del Hidrolizado de Caseína en el Bienestar de las Vacas Inducidas al Secado

De acuerdo con las prácticas estándar, las vacas lecheras modernas se secan 60 días antes del parto esperado como un compromiso entre el deseo del granjero de maximizar la producción de leche y la necesidad para un "periodo de secado" mínimo que evitará el descenso de la producción de leche en la próxima lactancia (Annen y otros, 2004, *ibid*). Esta práctica está asociada con el cese abrupto del ordeño de vacas que todavía producen

cantidades considerables de leche, de 20 a 40 litros por día y algunas veces incluso 50 litros por día. Dicha práctica resulta en la acumulación de cantidades masivas de leche en la ubre y está asociada con la congestión de la ubre y pérdidas de leche, que causa frecuentemente una agonía evidente a la vaca asociada con gritos fuertes durante varios días. Así, la práctica actual para secar vacas en la ganadería lechera moderna dificulta considerablemente el estado de bienestar de las vacas.

El objeto de este experimento es probar la influencia del tratamiento con hidrolizado de caseína en el comportamiento y bienestar de las vacas productoras de leche inducidas al secado por el cese abrupto del ordeño.

Entraron en el estudio 20 vacas Holstein hacia el final de la lactancia (~60 días) y que producían 17-35 litros de leche por día. Las vacas fueron emparejadas de acuerdo con el número de lactancia, días en ordeño, días para el parto, integridad de final del pezón, producción de leche, SCC por ml de leche por vaca o cuarto y número de cuartos infectados en el día del secado (Tabla 13).

Tabla 13: Comparación del punto de partida para vacas de caso (CNH + Cefquinoma) y vacas de control (Cefquinoma) (n = 10 para cada grupo, los datos se presentan como media ±SD).

	Vacas de Caso CNH + Cefquinoma		Vacas de Control Cefquinoma	
	Media ± SD	Intervalo	Media ± SD	Intervalo
Número de lactancia	1.7±0.7	1 - 3	1.9±0.9	1 - 3
Días en ordeño	355.8±58.4	285 - 451	327.0±39.8	281 - 388
Días para el parto	59.3±9.8	42 - 70	61.2±10.6	38 - 75
Integridad del pezón	1.3±0.7	0 - 2	1.2±0.7	0 - 2
Producción de leche (kg/día)	25.1±5.3	17 - 32	26.4.1±5.2	21 - 35
SCC (x 1000)	171.6±219.9	41 - 704	205.8±250.6	54 - 900
Estado de infección bacterianas (vaca; cuartos)*	4;4		4;6	

Se probaron el SCC de la leche de los cuartos y el aislamiento bacteriano con una semana de separación durante 3 veces, antes del secado. Una vaca de cada pareja fue entonces asignada a un subgrupo aleatoriamente (lanzando una moneda). Las vacas en el subgrupo 1 fueron tratadas después del ordeño con hidrolizado de caseína y con el antibiótico de amplio espectro Cefquinoma, (75 mg por dosis) (N+C), mientras que las vacas en el subgrupo 2 fueron tratadas sólo con Cefquinoma (75 mg por dosis) (C). Las vacas de los 2 subgrupos fueron alojadas juntas para el ajuste en un refugio confinado proporcionando 10 metros cuadrados de suelo de rejilla sombreado y 10 metros cuadrados de patio con superficie de cemento para cada vaca para una semana antes del tratamiento, y después permanecieron en ese lugar durante 2 semanas. Después de tres semanas, desde una semana antes del tratamiento hasta el final de la segunda semana después del tratamiento, las vacas llevaron un sensor montado en la pierna computerizado (Afifarm Management System S.A.E. Afikim, Israel), que permite la monitorización, registro y transmisión de la actividad del animal (pisadas) y el comportamiento de acostado (LB), con el menor trastorno al comportamiento de otro animal libre.

El índice de presión de la ubre (UPI) se estableció de la manera siguiente: 0, 1, 2 y 3, donde 0 es sin presión, 1 es presión media, 2 es presión alta y 3 es presión extremadamente alta. Los valores de UPI arbitrarios se determinaron evaluando la presión de la ubre presionando un dedo en el tejido y evaluando su resistencia a la presión en dos áreas, la cisterna de la leche y el *corpus ubeis*, 10 cm por encima de los pezones. Todas las mediciones de UPI se llevaron a cabo por la misma persona capacitada una vez al día en la misma hora a lo largo del experimento.

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el procedimiento de modelo de ajuste para mediciones repetidas de JMP (Versión 5, SAS Institute, Cary, NC); el tratamiento fue el factor entre sujeto y el tiempo fue el factor dentro del sujeto. Las diferencias fueron consideradas significativas en P < 0,05. El modelo fue:

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + \alpha_j + C(ij)$$

donde Y_{ijklm} = la variable dependiente, μ = media general, P_i = efecto fijo del periodo (pre- y post- secado; $i = 1$ a 2); α_i = efecto del tratamiento fijo i ($i = 1$ a 2), $C_{(ij)k}$ = efecto aleatorio de la vaca k ($k = 1$ a 10) dentro del periodo i y el tratamiento j ; γ_l = efecto del día l ($l = 1$ a 9); $\alpha\gamma_{il}$ = efecto de la interacción del tratamiento j y el día l ; y ε_{ijklm} = error aleatorio asociado con la vaca k en el periodo i y el tratamiento j en el día l .

5 la comparación entre los tratamientos para el periodo, o para el día específico post-tratamiento se hicieron por el test t usando el Tukey-Kramer HSD.

10 Además, se llevo a cabo un análisis de regresión lineal para cada tratamiento separadamente en dos casos: (i) días en el experimento como variable independiente frente a número acumulativo de pasos, y (ii) Δ (donde Δ se refiere a la diferencia de datos medidos en un día dado post-parto menos la media de los mismos datos durante el pre-parto) del UPI como una variable independiente frente al Δ de la proporción entre el número de pasos y la duración del acostado. La significancia de la regresión se evaluó desde el coeficiente de regresión y n , mientras que las diferencias entre las pendientes de regresión fueron evaluadas desde la pendiente de regresión (b), error estándar de la pendiente (S_b) y n por prueba t .

15 Los valores arbitrarios del UPI (Figura 3) aumentaron marcadamente desde $\sim 1,2$ antes del tratamiento a valores en el intervalo de 1,8 a 2,5 en las vacas tratadas sólo con antibióticos (C), en comparación con la caída aguda en las vacas tratadas con N+C durante los primeros 4 días después de inducir las vacas a la involución, así, durante estos 4 días los valores del UPI fueron significativamente diferentes entre los grupos ($p < 0,01$). Sólo después del 5º día después de ser inducidas al secado, disminuyó el UPI de las vacas de control. La Figura 4 presenta la fotografía de la ubre de 2 vacas en el día 4 después del tratamiento. La producción de leche de estas dos vacas particulares fue por encima de 30 litros por día seco. La imagen en la figura 3 demuestra las diferencias entre la vaca tratada con UPI = 0 (panel B), y la de la vaca no tratada, con UPI = ~ 2 (panel A).

20 La proporción entre el número de pasos y la duración del acostado (RSL) se uso como una media para evaluar el "confort del animal" (Figura 5). La proporción se volvió más pequeña para las vacas tratadas con N+C, comenzando desde el segundo día después del tratamiento mientras en las vacas tratadas con C la proporción no cambió. Como resultado, al diferencia entre los grupos se amplió y se volvió significativa ($p < 0,005$) desde el 3º día después del tratamiento y en adelante.

25 En conjunto, la presión de la ubre, la actividad y el comportamiento de acostado de las vacas tratadas con hidrolizado de caseína estaba claramente asociado con signos de que las vacas no sufrían y que estaban más calmadas y más confortables que las vacas inducidas al secado por el método convencional.

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> MILEUTIS LTD.

40 <120> Composiciones Farmacéuticas que comprenden Péptidos Derivados de la Caseína y Métodos para el uso de los Mismos

<130> MLTS/001 PCT

45 <150> 60/676,292
<151> 2005-05-02

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

50 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> Synthetic peptide

<220>
<221> fosforilación
65 <222> (1)..(3)

5 <220>
 <221> fosforilación
 <222> (1)..(3)
 <223> Ser- Fosforilación
 <400> 1

10 **ser ser ser Gly Gly**
1 5

15 <210> 2
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

20 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (15)..(15)

25 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (15)..(15)
 <223> Ser-Fosforilación

30 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (17)..(19)

35 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (17)..(19)
 <223> Ser-Fosforilación

<400> 2

40 **Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn**
1 5

45 **ser ser ser Glu Glu ser Ile**
20

50 <210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

55 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (8)..(10)

60 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (8)..(10)
 <223> Ser-Fosforilación

<400> 3

65

Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile
1 5

5

Ser Val Glu Gln Lys
20

10 <210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético

20 <220>
<221> Fosforilación
<222> (8)..(10)

25 <220>
<221> Fosforilación
<222> (8)..(10)
<223> Ser-Fosforilación

<400> 4

30 Lys Asn Thr Met Glu His Val
1 5

Asn Glu Thr Tyr Lys
20

35 <210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

45 <220>
<221> Fosforilación
<222> (11)..(13)
<223> Ser-Fosforilación

50 <400> 5

Asn Ala Asn Glu Glu Glu Ty
1 5

55 Ala Glu Val Ala Thr Glu Gl
20

60

65

REIVINDICACIONES

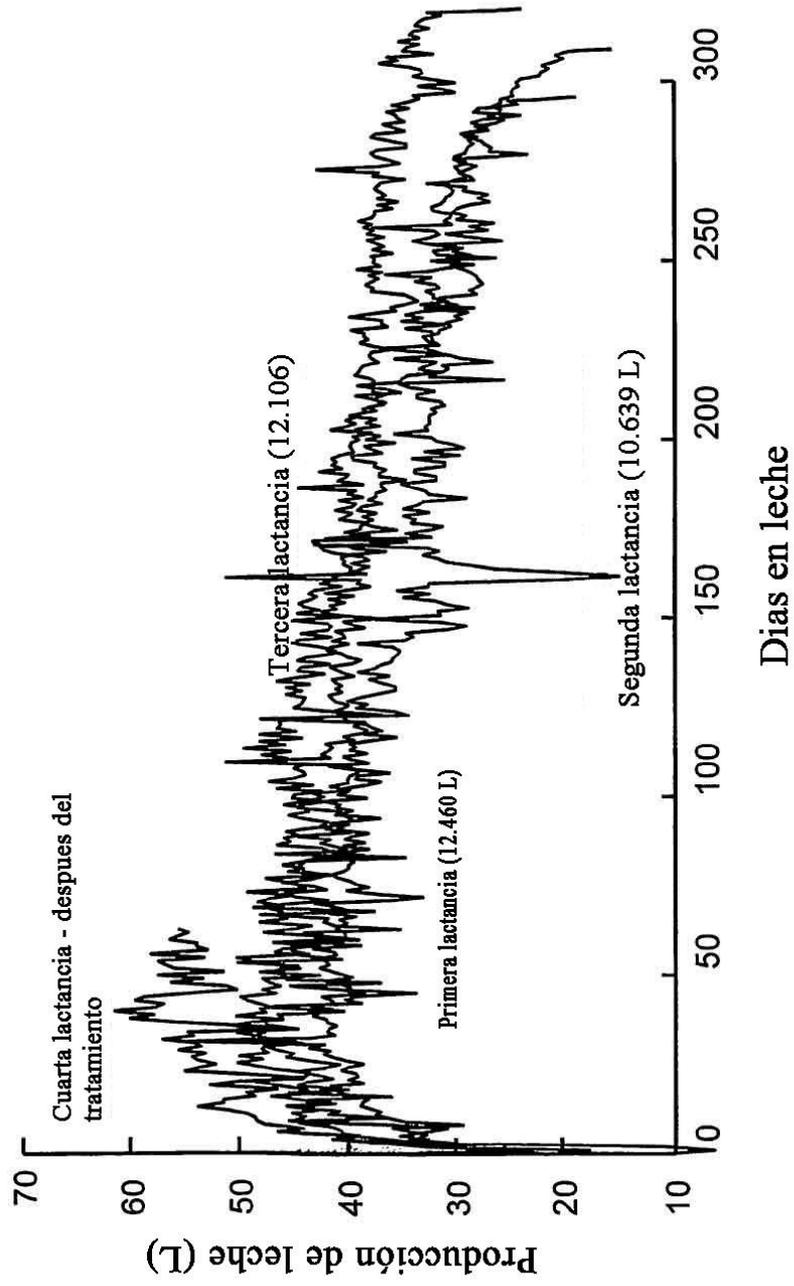
- 5 **1.** El uso de la menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para reducir la duración del periodo seco entre ciclos de lactancia en un animal lactante sin afectar negativamente a la producción de leche, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 10 **2.** El uso de la reivindicación 1, en donde el periodo seco se reduce a menos de 50 días, preferiblemente en donde la duración del periodo seco se reduce a entre alrededor de 20 días a alrededor de 30 días; o
 en donde el al menos un péptido derivado de la caseína se obtiene por hidrólisis de caseína; o
 en donde el al menos un péptido derivado de la caseína es un péptido sintético; o
 en donde el péptido se va a administrar al mismo tiempo que el cese del ordeño; o
 en donde el péptido se va a administrar entre una y cinco veces a intervalos de alrededor de 6 horas a alrededor de 24 horas; o
 15 en donde el péptido se va a administrar sólo una vez.
- 3.** El uso de la reivindicación 1, en donde el fosfopéptido está derivado de un subgrupo de la caseína seleccionado del grupo consistente de la β -caseína, α S1-caseína y α S2-caseína.
- 20 **4.** El uso de la reivindicación 3, en donde el fosfopéptido derivado de la β -caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2; o
 en donde el fosfopéptido derivado de la α S1-caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:3; o
 25 en donde el fosfopéptido derivado de la α S2-caseína es seleccionado del grupo consistente de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO.:5.
- 5.** El uso de la reivindicación 1, en donde el al menos un péptido se va a administrar en al menos una glándula mamaria del animal lactante.
- 30 **6.** El método de la reivindicación 5, en donde el al menos un péptido se va a administrar en el canal del pezón de la glándula mamaria.
- 35 **7.** El uso de la menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para aumentar la producción de leche de un animal lactante de ganadería después del parto en comparación con la producción de leche del animal lactante antes del parto, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 40 **8.** El uso de la reivindicación 7,
 en donde el aumento medio en la producción de leche es al menos de alrededor del 3· en los primeros 100 días después del parto; o
 en donde el parto es posterior a un periodo seco; o
 en donde el al menos un péptido derivado de la caseína se obtiene por hidrólisis de caseína; o
 45 en donde el al menos un péptido derivado de la caseína es un péptido sintético; o
 en donde el péptido se va a administrar en al menos una glándula mamaria del animal lactante, preferiblemente en donde el al menos un péptido se va a administrar en el canal del pezón de la glándula mamaria; o
 en donde el péptido se va a administrar al mismo tiempo del cese del ordeño; o
 en donde el péptido se va a administrar entre una y cinco veces a intervalos de desde alrededor de 6 horas a
 50 alrededor de 24 horas; o
 en donde el péptido se va a administrar sólo una vez.
- 9.** El uso de la reivindicación 7, en donde el fosfopéptido está derivado de un subgrupo de la caseína seleccionado del grupo consistente de β -caseína, α S1-caseína y α S2-caseína.
- 55 **10.** el uso de la reivindicación 9,
 en donde el fosfopéptido derivado de la β -caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2; o
 en donde el fosfopéptido derivado de la α S1-caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en
 60 la SEQ ID NO:3; o
 en donde el fosfopéptido derivado de la α S2-caseína es seleccionado del grupo consistente de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:5.
- 65 **11.** El uso de al menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para aumentar la higiene de la leche de un animal lactante, en donde el medicamento se va a administrar a al menos una glándula

mamaria del animal lactante, para reducir los recuentos de células somáticas en la leche en comparación con el SCC antes de la administración del péptido, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.

- 5
12. El uso de la reivindicación 11, en donde el recuento de células somáticas en la leche es menor de 400.000 células/ml.
- 10
13. El uso de la reivindicación 11, en donde el fosfopéptido está derivado de un subgrupo de la caseína consistente de β -caseína, α S1-caseína y α S2-caseína.
- 15
14. El uso de la reivindicación 13, en donde el fosfopéptido derivado de la β -caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2; o
- en donde el fosfopéptido derivado de la α S1-caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:3; o
- en donde el fosfopéptido derivado de la α S2-caseína es seleccionado del grupo consistente de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:5; o
- 20
- en donde el al menos un péptido derivado de la caseína se obtiene por hidrólisis de caseína; o
- en donde el al menos un péptido derivado de la caseína es un péptido sintético; o
- en donde el al menos un péptido se va a administrar en el canal del pezón de la glándula mamaria; o
- en donde el péptido se va a administrar al mismo tiempo que el cese del ordeño; o
- 25
- en donde el péptido se va a administrar entre una y cinco veces en intervalos de desde alrededor de 6 horas a alrededor de 24 horas; o
- en donde el péptido se va a administrar sólo una vez.
- 30
15. El uso de al menos un péptido derivado de la caseína para la preparación de un medicamento para prevenir el sufrimiento asociado con la infección de la glándula mamaria en animales lactantes de ganadería, en donde el medicamento se va a administrar a al menos una glándula mamaria del animal lactante, mejorando de este modo el bienestar del animal lactante, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 35
16. El uso de la reivindicación 15, en donde mejorar el bienestar del animal lactante se mide por la reducción del número de pasos por día y por la prolongación del periodo acostado por día de dicho animal.
- 40
17. El uso de la reivindicación 16, en donde el fosfopéptido está derivado de un subgrupo de la caseína seleccionado del grupo consistente de β -caseína, α S1-caseína y α S2-caseína.
- 45
18. El uso de la reivindicación 17, en donde el fosfopéptido derivado de la β -caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2; o
- en donde el fosfopéptido derivado de la α S1-caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:3; o
- 50
- en donde el fosfopéptido derivado de la α S2-caseína es seleccionado del grupo consistente de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:5.
- 55
19. El uso de la reivindicación 15, en donde el al menos un péptido derivado de la caseína se obtiene por hidrólisis de caseína; o
- en donde el al menos un péptido derivado de la caseína es un péptido sintético; o
- en donde el péptido se va a administrar al mismo tiempo que el cese del ordeño; o
- en donde el péptido se va a administrar entre una y cinco veces en intervalos de desde alrededor de 6 horas a alrededor de 24 horas; o
- 60
- en donde el péptido se va a administrar sólo una vez.
20. El uso de la reivindicación 15, en donde el péptido se va a administrar a una glándula mamaria seleccionada del grupo consistente de una glándula mamaria infectada y una glándula mamaria no infectada; o
- 65
- en donde el al menos un péptido se va a administrar en el canal del pezón de la glándula mamaria.
21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína, en donde la composición está en la forma de una solución clara estéril lista para usar, sustancialmente carente de micelas que tiene un pH por encima de 6,0, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el fosfopéptido está derivado de un subgrupo de la caseína seleccionado del grupo consistente de β -caseína, α S1-caseína y α S2-caseína.
- 5 23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en donde el fosfopéptido derivado de la β -caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2;
- 10 24. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en donde el fosfopéptido derivado de la α S1-caseína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:3; o en donde el fosfopéptido derivado de la α S2-caseína es seleccionado del grupo consistente de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:4, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:5.
- 15 25. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el al menos un péptido derivado de la caseína se obtiene por hidrólisis de caseína; o en donde el al menos un péptido derivado de la caseína es un péptido sintético; o comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una pluralidad de péptidos que tienen un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton; o comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido consistente esencialmente de una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, o cualquier combinación de las mismas teniendo un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton; o
- 20 tiene un valor de turbidez de menos de 6 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU); o comprende de alrededor de 10 ng/ml a alrededor de 15 mg/ml de al menos un péptido; o en donde el pH de dicha composición está en el intervalo de alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0; o en donde el al menos un péptido es estable al calentar dicha composición a 50° C-70° C; o
- 25 en donde el al menos un péptido es estable en el momento al congelar dicha composición.
- 30 26. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido derivado de la caseína en la forma de un polvo liofilizado, en donde el polvo es reconstituido a un líquido antes del uso para formar una solución clara, sustancialmente carente de micelas y que tiene un pH por encima de 6,0, en donde el al menos un péptido es un fosfopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos Ser(p)-Ser(p)-Ser(p)-Glu-Glu (SEQ. ID NO:1) y tiene un peso molecular de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 35 27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el medicamento está en la forma de una solución estéril lista para usar clara, sustancialmente carente de micelas, que tiene un pH por encima de 6,0.
- 40 28. El uso de la reivindicación 27, en donde el tratar la glándula mamaria es seleccionado del grupo consistente de inducir el cese transitorio de la producción de leche, inducir el cese persistente de la producción de leche e inducir la involución; o prevenir, tratar y revertir una infección microbiológica.
- 45 29. El uso de la reivindicación 27, en donde la infección es mastitis, y en donde el medicamento se va a administrar a una glándula mamaria infectada de un animal lactante.
- 50 30. El uso de la reivindicación 29, en donde el medicamento se va a administrar en un periodo de tiempo seleccionado del grupo consistente del periodo de lactancia, el comienzo del periodo seco en el cese del ordeño y el periodo seco; o en donde el medicamento se va a administrar en combinación con terapia anti-microbiana adicional, seleccionado del grupo consistente de tratamiento antibiótico, tratamiento bactericida, tratamiento antiinflamatorio esteroideo y no esteroideo, tratamiento con un inmunomodulador y vacunación; o en donde el medicamento va a ser administrado a al menos una glándula mamaria de un animal lactante, preferiblemente en donde el medicamento se va a administrar a todas las glándulas mamarias del animal lactante, o en donde el animal lactante es seleccionado del grupo consistente de una vaca, una cabra, una oveja, un búfalo, un camello, un burro, una llama, un caballo, un cerdo, un gato y un perro, o en donde el animal lactante es un ser humano.

FIGURA 1



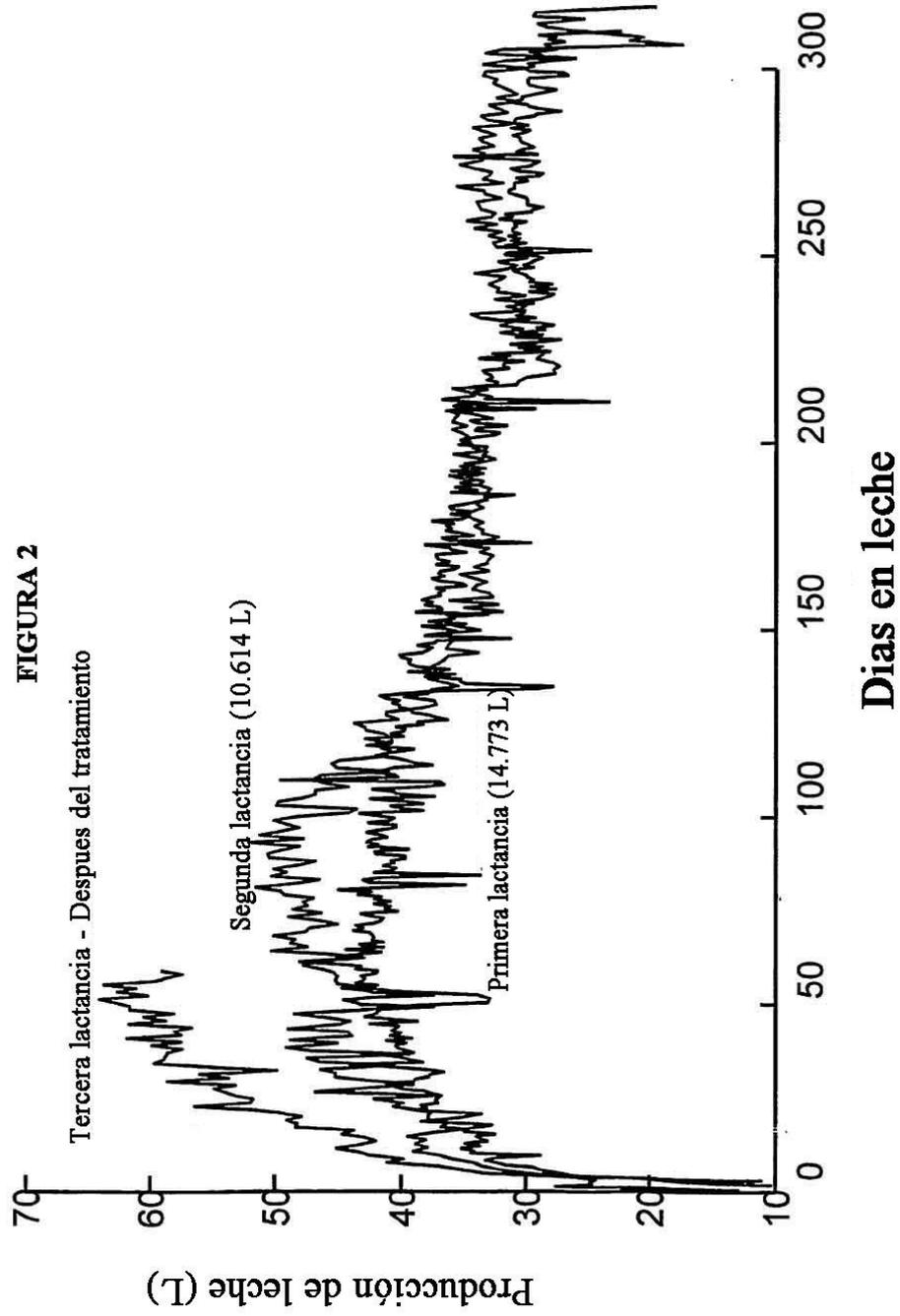


FIGURA 3

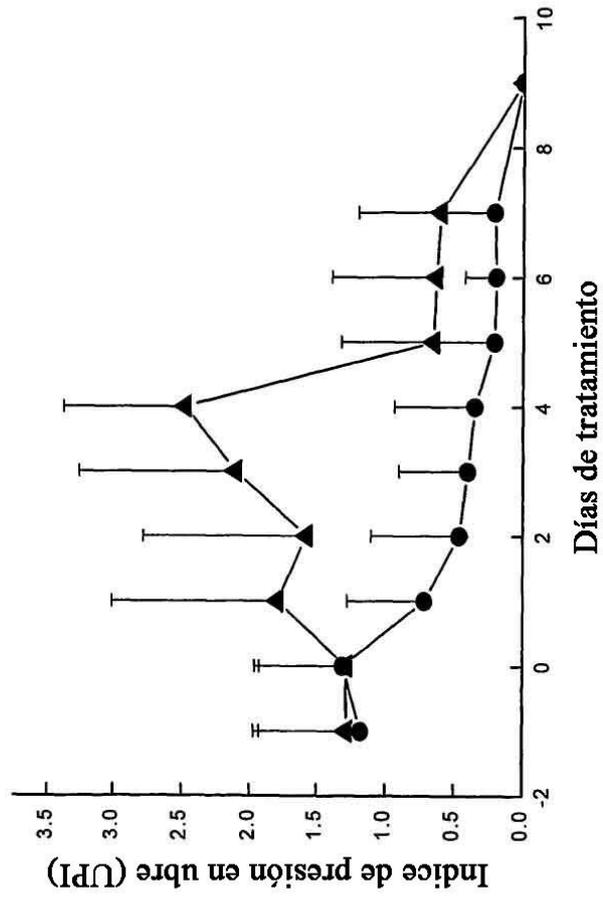


FIGURA 4B

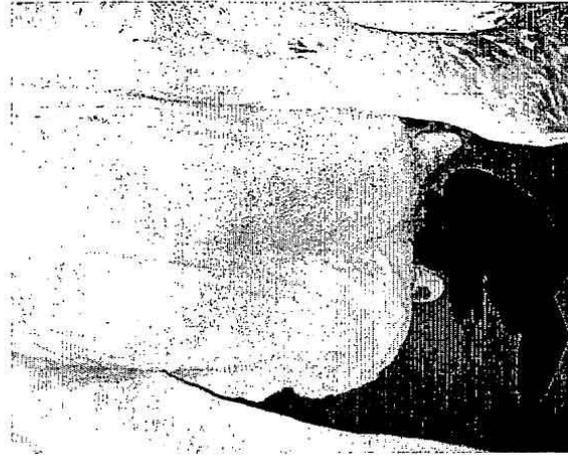


FIGURA 4A



FIGURA 5

