(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 759 980**

(51) Int. CI.:

C07K 5/10 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/IL2013/050214**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140388**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13764905 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2828281**

(54) Título: **Péptidos para el manejo de la lactación**

(30) Prioridad:

19.03.2012 US 201261612410 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

(73) Titular/es:

MILEUTIS LTD. (100.0%)
P.O. Box 9139
70800 Gan-yavne, IL

(72) Inventor/es:

ISCOVICH, JOSE MARIO y
ISCOVICH, JAVIER

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Péptidos para el manejo de la lactación

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la lactación de las glándulas mamarias. En particular, la presente invención proporciona nuevos péptidos para la interrupción eficiente y rápida de la lactación y para tratar la mastitis.

Antecedentes de la invención

El cese de la extracción de la leche conduce a cambios en la secreción mamaria y al inicio del proceso de involución mamaria activa. Este proceso comprende una secuencia extensa y altamente ordenada de cambios en la composición del tejido y la leche, que ocurren durante la transición entre los estados de lactancia y no lactancia. La etapa inicial de la involución mamaria se desencadena por estímulos locales que inician la apoptosis, pero la involución puede revertirse reiniciando la extracción de leche (Capuco y Akers, 1999. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4: 137-144; Wilde et al., 1999 J. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4: 129-136). Este control local puede causar involución cuando se induce la estasis de la leche en glándulas individuales, como se observó en cabras lactantes después del cese unilateral del ordeño (Quarrie et al., 1994. Biochem. Soc. Trans. 22: 178S), o en ratones lactantes después del sellado de pezones (Li et al., 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3425-3430; Marti et al., 1997. Eur. J. Cell. Biol. 73: 158-165).

La etapa posterior de involución es persistente, y la extracción de leche no puede provocar la reanudación de la secreción de leche (Capuco y Akers, 1999. ibídem; Wilde et al., 1999. ibídem). La reversión del estado persistente de involución puede ocurrir solo en un período posterior de lactancia después del parto. Esta etapa posterior al parto se caracteriza por la activación de proteasas que destruyen la estructura lobular-alveolar de la glándula al degradar la matriz extracelular y la membrana basal, así como por la pérdida masiva de células alveolares.

En la industria láctea moderna, los animales lactantes en rebaños pasan por ciclos controlados de ordeño y preñez, ya que tales regímenes contribuyen a un aumento significativo en la producción de leche. En el manejo actual de los rebaños lecheros, por ejemplo, vacas y cabras, existe una superposición significativa entre la lactación y la preñez, en la que se impone un "período seco" entre 35 y 75 días antes del parto por el cese del ordeño. Este régimen es un compromiso entre la necesidad de inducir la involución, un proceso necesario para el período de lactancia saludable posterior y el requisito de una alta producción de leche durante todo el año.

El amamantamiento, o lactancia, se ha identificado como el procedimiento ideal para alimentar y nutrir a los bebés y se considera un factor primario para lograr una salud, crecimiento y desarrollo óptimos de los bebés y niños. La investigación epidemiológica muestra que la leche humana y el amamantamiento de bebés disminuye significativamente el riesgo o la gravedad de una gran cantidad de enfermedades agudas y crónicas, y también hay una serie de estudios que indican posibles beneficios para la salud de las madres lactantes.

Con estos beneficios para la salud, así como las ventajas sociales y económicas, la Academia Americana de Pediatría y la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud. (2003). Estrategia global para la alimentación de lactantes y niños pequeños. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud y UNICEF. ISBN0. 9241562218) emitió una declaración sobre las políticas que recomienda el amamantamiento exclusivamente durante los primeros seis meses, luego introduce gradualmente alimentos sólidos y continuar amamantando durante al menos seis meses más y luego durante el tiempo que se desee mutuamente. En las prácticas normales de amamantamiento, destetar a un bebé del amamantamiento a otra fuente de alimento, tal como alimentos sólidos, fórmulas o jugos de frutas, es un proceso gradual. A medida que la dieta del bebé incorpora otras fuentes de alimentos, la madre continúa amamantando pero disminuye la cantidad de tiempo en cada alimentación, disminuye la cantidad de amamantamientos por día y/o aumenta lentamente el tiempo entre amamantamientos. En estas condiciones, la leche materna disminuye naturalmente a un ritmo lento a medida que disminuye la demanda del bebé.

Sin embargo, existen circunstancias que impiden que una madre amamante o requieran que el amamantamiento se interrumpa abruptamente. Algunas madres prefieren alimentar con biberón en lugar de amamantar. La muerte de un bebé provoca la interrupción repentina del amamantamiento por la madre. Se puede aconsejar a las madres lactantes que quedan embarazadas que suspendan la lactancia, especialmente si el riesgo de aborto espontáneo es alto. Se recomienda el destete abrupto para el lactante con galactosemia; el bebé cuya madre usa drogas ilegales (Academia Estadounidense de Pediatría, Comité sobre Drogas, 1994); el lactante cuya madre no se ha tratado una tuberculosis activa y el lactante cuya madre ha sido infectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (Academia Estadounidense de Pediatría, Comité de Ayudas Pediátricas, 1995). Ya sea que una madre elija no amamantar o suspender el amamantamiento, la lactación continuará por un tiempo. Para las mujeres que producen leche materna pero no están amamantando, la estasis de la leche está asociada con la hinchazón de la mama hasta un punto que puede causar una agonía notable, tanto física como psicológica.

El cese del ordeño o de la lactancia también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar mastitis, una enfermedad causada por una infección intramamaria (IMI) con patógenos, principalmente bacterias, pero también levaduras, hongos o incluso algas. La mastitis puede ser clínica, con signos clínicos locales (y en algunos casos generales) y anormalidades de la leche, o subclínica con pérdidas de producción y baja calidad de la leche.

Se ha demostrado que la inyección de una preparación cruda de hidrolizado de caseína (CNH) que comprende proteosa-peptona (PP, también conocida como fosfopéptidos de caseína, CPP) en la ubre de una cabra o una vaca imita el fenómeno natural de involución, induciendo una respuesta inflamatoria local y pérdida de integridad de la unión estrecha (TJ), seguida de un rápido secado de la secreción mamaria (patente de los Estados Unidos No. 6.391.849; Shamay et al., 2002 Life Sci. 70: 2707-2719; Shamay et al., 2003. J. Dairy Sci. 86: 1250-1258). El proceso inducido por CNH fue más rápido que el inducido en el secado natural. Se demostró además que una fracción 1-28 de β-caseína pura (β-CN) subregula la secreción de leche en vacas y cabras. La actividad de este péptido se correlacionó con su capacidad para bloquear los canales de potasio en las membranas apicales de los epitelios mamarios (Silanikove et al., 2000. Life Sci. 67: 2201-2212).

La solicitud de patente europea No. EP1375513 describe que entre los péptidos derivados de la caseína, los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden residuos de fosfoserina plurales muestran una fuerte actividad inmunopotenciadora. Específicamente, la invención se refiere a un agente inmunopotenciador que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos Q1-SerP-X-SerP-Q2, en la que, SerP representa el residuo de fosfoserina, X representa uno a tres de cualquier residuo de aminoácido, y Q1 y Q2 están independientemente ausentes o representan al menos uno de cualquier residuo de aminoácido.

Young et al., (J. of Agricult. Y Food Chem., 59: 17, 2011, páginas 9207-9218) describe la secuencia de aminoácidos de la yema de huevo fosvitina y los fosfopéptidos derivados de la fosvitina.

Himali et al., (J. of Food Sci., 76: 1, 2011, páginas R143-R150) describe un fosfopéptido de fosvitina derivado de yema de huevo de gallina que consiste en una secuencia correspondiente a los residuos de aminoácidos 155-197 de fosfitina con residuos de serina fosforilados, y su actividad contra el estrés oxidativo en células Caco-2.

Los inventores de la presente invención y los colaboradores han descrito previamente composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos derivados de caseína en forma de una solución transparente, estéril, lista para usar, sustancialmente desprovista de micelas y con un pH superior a 6,0 (publicación de la solicitud internacional de patente No. WO2006/117784). Se sugirió que el péptido activo mínimo comprende la secuencia Ser(p)-Ser(p)-Ser (p)-Glu-Glu. Sin embargo, estas composiciones farmacéuticas comprenden una pluralidad de péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína.

Por lo tanto, existe una necesidad reconocida y sería muy ventajoso tener una composición farmacéutica que comprenda péptidos que se definen por su secuencia y concentración de aminoácidos. Dicha composición se puede producir a escala comercial de manera reproducible.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido sintético o recombinante, composiciones farmacéuticas que lo comprenden, y al péptido o composición farmacéutica para su uso en la inducción del cese y la atenuación de la producción de leche y la involución en una glándula mamaria de un animal lactante. Particularmente, la presente invención proporciona péptidos bien definidos efectivos para inducir la involución y tratar la mastitis, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y su uso.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que un péptido que comprende el motivo Ser(P)-Ser(P)-Ser(P) unido a al menos un residuo de aminoácido cargado positivamente es suficiente para inducir el cese de la producción de leche y la involución en una glándula mamaria de un animal lactante. La contribución de la presente invención sobre la técnica anterior es proporcionar nuevos péptidos cortos sintéticos o recombinantes, que son al menos tan efectivos para inducir la involución en comparación con las composiciones conocidas hasta ahora para la inducción de la involución que comprende hidrolizado de caseína. Estos péptidos pueden producirse de manera fácil y reproducible, esencialmente sin residuos y con alta esterilidad, y pueden formularse de acuerdo con las necesidades.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un péptido sintético o recombinante que comprende una secuencia de 4-7 aminoácidos de la fórmula $X_{1(n)}$-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-$X_{2(n)}$ (SEQ ID NO: 1), en la que al menos uno de X_1 y X_2 es un aminoácido cargado positivamente y en el que en cada aparición n = 0, 1 o 2, en el que la fórmula de la SEQ ID NO: 1 comprende además un grupo de bloqueo en el terminal C, y en el que el péptido sintético o recombinante es una serie lineal de 4-30 residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el aminoácido cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. De acuerdo con ciertas realizaciones actualmente típicas, el aminoácido cargado positivamente es lisina.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el grupo de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en amida y éster. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P) (SEQ ID NO: 2); Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 3); Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 4); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 5); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 6); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P) (SEQ ID NO: 7); Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 8); y Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 9). Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido sintético o recombinante descrito en este documento, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse de acuerdo con las necesidades específicas, particularmente de acuerdo con el tipo de población tratada. De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está formulada para aplicación tópica, por ejemplo, a una mama o ubre como una formulación de gel, pomada, crema, emulsión o liberación sostenida que incluye un parche transdérmico.

De acuerdo con otras realizaciones, la composición farmacéutica está formulada para administración parenteral. La composición farmacéutica también puede formularse para administración intracanal, por ejemplo, por infusión o por inyección. Cuando la población tratada es un animal de granja, la composición farmacéutica se formula para inyección en una cisterna glandular a través de un canal del pezón de la glándula mamaria del animal lactante. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan para administración oral sistémica.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el péptido sintético o recombinante o la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en la inducción de una interrupción transitoria de la producción de leche, una interrupción persistente de la producción de leche o involución en una glándula mamaria de un mamífero lactante.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para uso se administra mientras la glándula mamaria está lactando. De acuerdo con otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra al mismo tiempo que cesa el ordeño o la lactancia. En las realizaciones en las que el mamífero lactante es un animal de granja, el tiempo de cese del ordeño incluye, pero no se limita a, el tiempo en el que se induce un período de secado antes del parto. Se contempla la administración única, así como las administraciones múltiples.

Normalmente, la composición farmacéutica se administra una o varias veces, típicamente de 1 a 6 veces, más típicamente de 1 a 3 veces, en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 2 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas o aproximadamente 72 horas. La composición farmacéutica también se puede administrar solo una vez.

En esos casos, en los que el mamífero lactante es un animal de granja, la interrupción del ordeño puede ocurrir aproximadamente de 60 a 70 días antes de un parto esperado, típicamente de aproximadamente 40 a 60 días, o entre aproximadamente 20 a aproximadamente 40 días antes de un parto esperado. Por consiguiente, la composición farmacéutica se administra aproximadamente 60 a 90 días antes de un parto esperado, típicamente aproximadamente 40 a 60 días, o entre aproximadamente 20 a aproximadamente 40 días antes de un parto esperado.

Se puede observar el cese de la producción de leche dentro de aproximadamente 2-3 días después de la administración del péptido, sin afectar negativamente la reconstitución de los tejidos de la glándula mamaria con miras al próximo período de lactación. Los péptidos de la presente invención pueden administrarse en cualquier etapa del ciclo de lactación, incluso en el pico de lactación.

Como se describió anteriormente, el cese abrupto del ordeño y la inducción de la involución conducen a un mayor riesgo y una mayor incidencia de infecciones intra mamarias y mastitis. La inducción rápida de la involución por los péptidos y las composiciones de la invención reduce significativamente la incidencia de mastitis causada por el cese del ordeño. Además, los péptidos de la presente invención son eficientes para tratar y aliviar la mastitis. También se

describe, pero no forma parte de la invención, un procedimiento para prevenir, tratar y revertir una infección microbiológica, que comprende administrar a un animal lactante las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

El procedimiento puede comprender la administración tópica o parenteral de la composición farmacéutica, o la administración intracanal de la composición farmacéutica que comprende el péptido o los péptidos. La composición farmacéutica puede administrarse en un canal del pezón de una glándula mamaria del mamífero lactante. La administración al canal del pezón puede ser por inyección o infusión. La composición puede administrarse tópicamente a la glándula mamaria. La composición puede administrarse a una o más glándulas mamarias, incluida la administración concomitante a todas las glándulas mamarias del mamífero lactante. La composición puede administrarse en cualquier etapa de la lactación.

El procedimiento puede comprender además la coadministración de una terapia antimicrobiana seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico y un bactericida; un inmunomodulador; una terapia antiinflamatoria o una combinación de los mismos. El procedimiento puede comprender además la administración de un sello de pezón no antibiótico o un sello de pezón en combinación con un antibiótico, un bactericida o un inmunomodulador. La terapia se puede seleccionar del grupo que consiste en tratamiento antibiótico, bactericida, antiinflamatorio esteroideo y no esteroideo, el tratamiento con un inmunomodulador y vacunación. La administración de la terapia antimicrobiana es útil, en ciertas realizaciones, para prevenir una posible infección resultante del proceso de administración de una composición farmacéutica en un canal del pezón de una glándula mamaria, particularmente cuando la administración se realiza en el sitio donde está el rebaño.

Se describen aspectos y realizaciones adicionales en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción y dibujos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos péptidos sintéticos o recombinantes que son altamente eficientes para inducir un proceso de involución y cese de la producción de leche en una glándula mamaria de un mamífero lactante, que incluye un animal de granja lactante y un ser humano lactante.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en este documento tienen fines descriptivos y no deben considerarse como limitantes.

Definiciones

El término "péptido" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para designar una serie lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos. Los péptidos de acuerdo con los principios de la presente invención son sintéticos o recombinantes y son distintos de cualquier proteína intacta conocida.

Como se usa en el presente documento, el término "fosfopéptido" designa un péptido fosforilado en forma de un péptido conjugado en el que la porción no peptídica es un residuo de ácido fosfórico. En particular, la expresión "fosfopéptido" o "fosfoserina" designa serina conjugada en la que la porción no peptídica es un residuo de ácido fosfórico.

Como se usa en este documento, la expresión "cese de la producción de leche" se refiere al cese transitorio así como al cese persistente de la producción de leche. El cese transitorio de la producción de leche se refiere al cese reversible. La interrupción persistente se refiere a la interrupción de la lactación, que es reversible solo por el parto después del embarazo y/o por un tratamiento con hormonas sexuales. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los estímulos mecánicos (es decir, ordeño o lactancia) pueden revertir una interrupción transitoria de la producción de leche inducida por las composiciones y procedimientos de la invención.

El término "involución", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso complejo de apoptosis controlada y remodelación de tejidos dentro de la glándula mamaria, que da como resultado el cese de la producción de leche por la glándula mamaria. Durante las etapas iniciales de la involución, la muerte apoptótica de las células endoteliales generalmente produce un aumento en el recuento de células somáticas dentro de las secreciones residuales de leche.

Como se usa en el presente documento, el término "mastitis" se refiere a una inflamación de una glándula mamaria, una mama o una ubre, causada por una lesión física, introducción de productos químicos, virus, hongos, parásitos o,

más comúnmente, invasión bacteriana y sus toxinas. "Mastitis" se usa para describir todas las formas de dicha inflamación, incluida la mastitis subclínica y clínica, la mastitis clínica, incluida la mastitis leve, grave y crónica.

En la mastitis subclínica, no se detecta hinchazón de la mama o la ubre ni hay anomalías observables en la leche. Este tipo de mastitis se conoce comúnmente como "subclínica". En animales de granja, especialmente vacas lecheras, las pruebas de detección especiales, que incluyen la prueba de mastitis de California (CMT), la prueba de mastitis de Wisconsin (WMT) que se basan en una estimación de los recuentos de células somáticas y la prueba de catalasa mostrará cambios en la composición de la leche en caso de mastitis subclínica. 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 el aspecto de la leche, incluida la presencia de copos o coágulos, leche acuosa u otras formas inusuales de la leche. La mastitis clínica leve puede estar acompañada de otros síntomas, como mama o ubre caliente, sensible o inflamada.

La mastitis clínica severa implica los síntomas de mama o ubre caliente, sensible y firme que es bastante dolorosa para el sujeto lactante. El inicio de la mastitis clínica grave es repentino y el sujeto lactante puede enfermarse y presentar signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida de apetito. Cuando todo el sistema de lactación del sujeto se ve afectado, la afección se denomina mastitis sistémica aguda. Los síntomas graves también pueden acompañarse con el cese de la producción de leche.

La mastitis crónica es una infección persistente de la ubre o de la mama, típicamente en forma de mastitis subclínica, que ocasionalmente puede desarrollarse en la forma clínica y volver a la forma subclínica. La mastitis crónica se caracteriza por un bulto duro dentro de la glándula mamaria debido al establecimiento de bacterias y la formación de tejido conectivo excesivo.

Modos preferentes de llevar a cabo la invención

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un péptido sintético o recombinante que comprende una secuencia de 4-7 aminoácidos de la fórmula $X_{1(n)}$-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-$X_{2(n)}$ (SEQ ID NO: 1), en la que al menos uno de X_1 y X_2 es un aminoácido cargado positivamente y en el que cada vez que aparece n = 0, 1 o 2.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el aminoácido cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. De acuerdo con ciertas realizaciones actualmente típicas, el aminoácido cargado positivamente es lisina.

Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica que incluyen síntesis química y tecnología de ADN recombinante. La síntesis se puede realizar en solución o mediante síntesis de péptidos en fase sólida como lo describe Merrifield (véase J. Am. Chem. Soc., 85: 2149, 1964). Típicamente, los péptidos se sintetizan usando técnicas estándar en fase sólida. Estos procedimientos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, procedimientos de síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos y síntesis clásica en solución. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y lo describen adicionalmente, por ejemplo, John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2ª ed., Pierce Chemical Company, 1984).

La fosforilación de los residuos de serina se puede realizar por cualquier procedimiento como se conoce en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Meggio et al., 1991. FEBS Lett. 283 (2): 303-306 y Perich JW 1997. Methods Enzymol. 289: 245-246, entre otros.

En general, los procedimientos de síntesis de péptidos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos adecuadamente protegidos o derivados a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, el grupo amino o el grupo carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivado puede unirse a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución agregando el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido, en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. Luego se elimina el grupo protector de este residuo de aminoácido recién agregado y luego se agrega el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), y así sucesivamente; tradicionalmente, este proceso también se acompaña de etapas de lavado. Después de que todos los aminoácidos deseados se hayan unido en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) se puede eliminar de forma secuencial o concurrente, para proporcionar el péptido final. Mediante la simple modificación de este procedimiento general, es posible agregar más de un aminoácido a la vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo, mediante el acoplamiento (en condiciones que no racemicen los centros quirales) de un tripéptido protegido con un dipéptido debidamente protegido para formar, después de la desprotección, un pentapéptido, y así sucesivamente.

Los péptidos sintéticos pueden purificarse mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (Creighton T. 1983. Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman y Co. N.Y.) y cuya composición se puede confirmar mediante secuenciación de aminoácidos.

Los péptidos de la presente invención también pueden generarse usando técnicas recombinantes como se conocen en el arte, tal como se describe, por ejemplo, por Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544 y Studier et al., (1990) Methods in Enzymol. 185: 60-89.

El grupo carboxilo en el terminal C del péptido está protegido. El grupo protector se puede seleccionar entre, pero no limitado a, una amida (es decir, el grupo hidroxilo en el terminal C se reemplaza con NH_2, NHR_2 y NR_2R_3) o éster (es decir, el grupo hidroxilo en el terminal C se reemplaza con OR_2). R_2 y R_3 son opcionalmente independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido. Además, tomados junto con el átomo de nitrógeno, R_2 y R_3 pueden formar opcionalmente un anillo heterocíclico C_4 a C_8 con aproximadamente 0-2 heteroátomos adicionales tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Ejemplos adecuados no limitantes de anillos heterocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, morfolino, tiomorfolino o piperazinilo. Los ejemplos de grupos protectores del terminal C incluyen, pero no se limitan a -NH_2, -$NHCH_3$, -$N(CH_3)_2$, -NH(etil), -$N(etil)_2$, -N(metil)(etil), -NH(bencilo), -N(alquil C_1-C_4)(bencilo), -NH(fenilo), -N(alquil C_1-C_4)(fenilo), -OCH_3, -O-(etilo), -O-(n-propilo), -O-(n-butilo), -O-(iso-propilo), -O-(sec-butilo), -O-(t-butilo), -O-bencilo y -O-fenilo.

De acuerdo con ciertas realizaciones actualmente típicas, el terminal C del péptido está protegido por amida.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P) (SEQ ID NO: 2); -Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 3); Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 4); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 5); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 6); Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P) (SEQ ID NO: 7); Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys-Lys (SEQ ID NO: 8); y Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Lys (SEQ ID NO: 9). Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con ciertas realizaciones típicas, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención.

Los compuestos y la composición conocidos hasta ahora para inducir la involución y el cese del ordeño en un mamífero lactante se obtuvieron típicamente por hidrólisis de caseína y/o purificación de los péptidos relevantes del hidrolizado. Es muy deseable tener péptidos pequeños y definidos que sean efectivos para inducir el cese de la producción de leche y la involución, ya que dichos péptidos pueden sintetizarse consistentemente. Además, el proceso de síntesis de péptidos es menos propenso a la contaminación en comparación con los procesos que implican la purificación de péptidos a partir de material de origen natural. Los péptidos de la invención son al menos tan eficientes, típicamente más eficientes en comparación con los péptidos conocidos derivados de caseína.

El término "composición farmacéutica" se entiende en su sentido amplio y se refiere a una preparación de uno o más de los péptidos de la invención con otros componentes químicos tales como diluyentes y vehículos farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo. La composición farmacéutica de la invención debe contener una cantidad terapéutica de un péptido de la invención, es decir, esa cantidad necesaria para inducir el cese de la producción de leche y la involución.

La concentración de péptido en la composición farmacéutica puede variar de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 5000 µg/ml, típicamente entre 40 µg/ml hasta aproximadamente 800 µg/ml.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento, se refiere a un vehículo o 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 vehículos son: agua, propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de solventes orgánicos con agua. Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. De acuerdo con ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan para administración parenteral, por ejemplo, para administración intracanal, particularmente para inyección o infusión en el canal del pezón de una glándula mamaria. Para la inyección, los péptidos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer o en un tampón salino fisiológico con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol y 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 describe en el presente documento, la administración intracanal de la composición farmacéutica de la invención puede tener un efecto local, por ejemplo, induciendo la involución solo en la glándula mamaria tratada, y por lo tanto puede denominarse tópica. Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar tópicamente como un gel, pomada, crema, emulsión o formulación de liberación sostenida que incluye un parche transdérmico.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona el péptido o la composición farmacéutica para su uso en la inducción de una interrupción transitoria de la producción de leche, una interrupción persistente de la producción de leche o involución en una glándula mamaria de un mamífero lactante.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el aminoácido cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. De acuerdo con ciertas realizaciones actualmente típicas, el aminoácido cargado positivamente es lisina.

El péptido comprende además un grupo de bloqueo en el terminal C. De acuerdo con ciertas realizaciones, el grupo de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en amida y éster. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

El mamífero lactante puede seleccionarse del grupo que consiste en seres humanos, vacas, cabras, ovejas, búfalos, camellos, burros, llamas, caballos, cerdos, gatos y perros.

El animal lactante puede ser un ser humano. En seres humanos, la producción de leche sin lactancia puede ser el resultado de la decisión de la mujer de no amamantar o de una afección que impide el amamantamiento como se describió anteriormente en este documento. Dicha estasis de la leche está asociada con la hinchazón de la mama hasta un punto que causa dolor, con frecuencia se asocia con una fuga de la secreción mamaria que posteriormente aumenta el riesgo de contraer una infección intramamaria. Las composiciones farmacéuticas y los procedimientos descritos en el presente documento responden así a la necesidad de una inducción rápida y eficiente de la involución y el cese de la producción de leche para evitar las condiciones indeseables descritas anteriormente.

El animal puede ser un animal de granja seleccionado del grupo que consiste en vacas, búfalos, cabras, ovejas y cerdos. En particular, el animal de granja puede ser vaca lechera.

En la industria láctea moderna, el animal lactante da a luz una vez al año, de modo que el ordeño continúa mientras el animal está preñado. La imposición del período seco en un animal lactante antes del parto es una práctica tomada para inducir el proceso de involución en la glándula mamaria, a fin de permitir la restauración del tejido mamario hacia el próximo período de lactancia. Es necesario inducir el período seco, entre otras cosas, para mantener una producción de leche similar antes y después del parto. En las vacas, el proceso natural de involución se completa unos 21 a 30 días después de su inducción por cese del ordeño. La presente invención ahora revela que, sorprendentemente, los péptidos sintéticos o recombinantes de la invención inducen el cese de la producción de leche y el proceso de involución.

El efecto transitorio o persistente sobre la producción de leche puede obtenerse en una glándula mamaria de un animal lactante en respuesta a la aplicación de la composición farmacéutica de la invención, típicamente mediante inyección directa o infusión en la cisterna de la glándula a través del canal del pezón. La interrupción de la producción de leche puede ocurrir solo en la glándula tratada o en todas las glándulas mamarias tratadas. La administración se puede realizar en cualquier etapa del período de lactación. En los casos en que el mamífero lactante es un animal de granja, la administración también se puede realizar durante el denominado período de secado.

El proceso de involución inducido por los péptidos sintéticos o recombinantes y las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede ser más rápido y sincronizado en comparación con la involución inducida por el cese del ordeño, y la producción de leche puede reanudarse mediante estímulos mecánicos como el ordeño. La reanudación de la producción de leche también puede ocurrir, como en el proceso natural de involución, después de un embarazo y parto posteriores. La involución 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.

La involución inducida por los péptidos y las composiciones de la invención previene la infección intramamaria y la mastitis típicamente asociada con el cese abrupto del ordeño. Por lo tanto, las composiciones de la invención son útiles para prevenir una infección de la glándula mamaria. Además, los péptidos y las composiciones de la invención son útiles para tratar y curar la infección intra mamaria, incluidas las infecciones relacionadas con el cese permanente o transitorio del ordeño.

Los péptidos y las composiciones de la presente invención también pueden usarse para promover las capacidades de regeneración de la piel alrededor del pezón del mamífero.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la materia puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en el presente documento sin apartarse del ámbito de la invención.

Ejemplos

Todos los experimentos se realizan de acuerdo con las directrices para la regulación de experimentos con animales en el estado de Israel, y de acuerdo con el comité de ética de la institución de investigación.

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos

Los péptidos sintéticos de la invención se diseñaron para evaluar la actividad de péptidos cortos que comprenden un motivo Ser(P) en la involución. Los péptidos que tienen la misma secuencia pero con residuos de serina no fosforilados también se sintetizaron para examinar la función de la fosforilación en la actividad del péptido. El péptido derivado de caseína y el hidrolizado de caseína sirvieron como controles positivos.

Se sintetizaron químicamente diez péptidos empleando la fase sólida de fluoroenilmetiloxicarbonilo (Fields G. B. y Nobel R. 1990. Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161-214). El grupo α-carboxilo del terminal C de cada péptido se convirtió en un grupo amida. Para cada péptido que incluye el motivo de fosfoserina, se sintetizó un péptido de control que tenía la misma secuencia, pero con serina no fosforilada. La Tabla 1 a continuación muestra las secuencias de todos los péptidos sintetizados.

Tabla 1: Secuencias y códigos para los péptidos sintéticos.

Código de ensayo y formulación	Código de análisis	Secuencia	SEQ ID NO.
P241210-01-01	A(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-NH_2	10
P241210-01-02	A	Lys-Lys-Ser-Leu-Ser-Ser-NH_2	11
P241210-01-03	B(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-NH_2	12
P241210-01-04	B	Lys-Lys-Ser-Ser-Ser-NH_2	13
P241210-01-05	C(p)	Lys-Lys-Ser(P)-Ser(P)-NH_2	14
P241210-01-06	C	Lys-Lys-Ser-Ser-NH_2	15
P241210-01-07	D(p)	Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-NH_2	16
P241210-01-08	D	Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-NH_2	17
P241210-01-09	E(p)	Lys-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-NH_2	18
P241210-01-010	E	Lys-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-NH_2	19

Todos los péptidos fueron validados por espectrometría de masas de tiempo de vuelo. La pureza se midió mediante el procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa y se encontró que era al menos del 98%. Todos los fragmentos secos sintetizados químicamente se almacenan a -20 °C.

Ejemplo 2: Preparación de hidrolizado de caseína

Se sabe que el hidrolizado de caseína es eficaz para inducir la involución en una glándula mamaria (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 6.391.849; Shamay et al., 2002 ibídem; Shamay et al., 2003 ibídem). Por lo tanto, el hidrolizado de caseína se preparó como un control positivo en la evaluación de la actividad de los péptidos para inducir la involución.

Se añadió caseinato de sodio (DMV Int., NL) con un peso total de 4000 g en una solución de Tris HCl 25 mM pH = 8,0 para producir una solución al 20% (p/v). Después de agregar el caseinato de sodio, la solución se agitó suavemente hasta equilibrarla, mientras se mantenía el pH a 8,0 y la temperatura a 45 °C. El caseinato de sodio generalmente se disuelve en aproximadamente 15-60 minutos para producir una solución final al 20% (p/v).

A continuación, se agregaron cuatro (4) g de tripsina porcina en polvo en una relación de 1:1000 de tripsina: caseinato de sodio, y la solución se agitó suavemente en un agitador magnético o desfloculante con agitación suave a 45 ºC. La hidrólisis se dejó proceder durante un total de 1 hora.

Al final del tiempo establecido para la hidrólisis, la tripsina se inactivó dentro del hidrolizado crudo elevando la temperatura a 90-95 °C y manteniendo la solución en este intervalo de temperatura durante 1 hora. Después de 1 hora, la solución se enfrió a temperatura ambiente usando hielo en un baño externo y el pH se ajustó a 4,7 usando HCl 10 N. La solución se mantuvo a este pH durante 15-30 minutos.

El material insoluble se eliminó de la solución por centrifugación durante 20 minutos, a 2-8 °C, 4500 rpm (~ 4400 g) usando una centrífuga IEC (modelo DPR 6000, Damon\división IEC). El sobrenadante resultante se transfirió a una nueva botella de vidrio estéril, y el pH se ajustó a 7,0 usando NaOH 10 N. El volumen de la solución se ajustó luego a 20 litros con solución de Tris HCl 25 mM, pH 7,0.

El sobrenadante final obtenido se filtró a través de prefiltros de 3,0 µm/1,2 µm/0,65 µm y a través de dos cápsulas de filtro de membrana de CA estériles de 0,45/0,22 µm [cápsula filtrante de 3,0 µm Sartopure PP2 (Sartorius, Cat. No. 5592502P1), cápsula filtrante de 1,2 µm Sartoclean DGF (Sartorius, Cat. No. 5642803A1), cápsula filtrante 0,8/0,65 µm Sartoclean GF (Sartorius, Cat. No. 5602805G1)]

La botella de suero de vidrio (20 ml, 50 ml, 100 ml y 200 ml) se llenó con 20 ml, 40 ml, 90 ml o 170 ml respectivamente de la solución filtrada mediante llenado aséptico en un banco estéril (clase 100, ISO 5) ubicado en una sala limpia clase 1000 (ISO 6). Cada botella se selló con un sello de aluminio usando prensadores. El hidrolizado de caseína resultante se mantuvo congelado a 20 °C hasta su uso.

Ejemplo 3: Formulación de los péptidos sintetizados.

Cada uno de los péptidos sintetizados químicamente se disolvió en solución salina hasta 7 días antes de la administración. Las pruebas de estabilidad de hasta 7 días mostraron una estabilidad superior al 98% para estos productos. La concentración del péptido fue de 0,4 mg/ml de solución salina. Se mantuvieron muestras de 10 ml en viales a 4 °C-8 °C hasta su uso. La dosis de administración fue de 4 mg (10 ml de solución).

Ejemplo 4: Un estudio de campo que examina la inducción de la involución por los péptidos aislados

Los cambios en la composición de las secreciones mamarias durante la involución temprana reflejan un aumento de la transferencia de factores derivados de la sangre y una disminución de la síntesis y secreción de fluido lácteo. Por ejemplo, la concentración de lactosa disminuye notablemente durante los días de involución, mientras que las concentraciones del activador de plasmina-plasminógeno y el pH de las secreciones mamarias aumentan durante el período inicial no lactante (Oliver y Sordillo 1989. J. Dairy Sci. 1989 ; 72: 1647-1664).

Se realizó un estudio archivado para evaluar el potencial de una dosis intramamaria única de los péptidos sintéticos de la invención administrada en seco (es decir, en el día en que cesa el ordeño), para inducir una involución rápida.

Diseño del estudio

Se inscribió un total de 107 vacas lecheras en el estudio, de las cuales 45 recibieron tratamiento y 62 sirvieron como control. Todas las vacas eran vacas lecheras en su primera lactación o más que cumplen los criterios de inclusión/exclusión. El estudio fue un estudio ciego controlado de caso - control.

Los sujetos del caso recibieron una dosis mediante infusión intramamaria de un péptido particular. Los controles fueron vacas lactantes que recibieron los siguientes productos mediante administración intramamaria:

i) Péptidos desfosforilados;

ii) Hidrolizado de caseína.

Grupos de tratamiento

Grupos de caso

Se programaron cinco grupos de 9 vacas (un total de 36 cuartos de ubre por grupo) como grupos de caso. Cada grupo se trató con uno de los cinco (5) fosfopéptidos descritos en el Ejemplo 1 anterior (P241210-01-01; 03; 05; 07 y 09). Los péptidos se administraron una vez por infusión intramamaria de 10 ml que contenían 4 mg de péptido.

Grupos de control

Conjunto uno: Cinco grupos de 9 vacas (un total de 36 cuartos de ubre por grupo) se programaron como primer conjunto de control. Cada grupo se trató con uno de los cinco (5) péptidos desfosforilados descritos en el Ejemplo 1 anterior (P241210-01-02; 04; 06; 08 y 10). Los péptidos se administraron una vez por infusión intramamaria de 10 ml que contenían 4 mg de péptido.

El segundo conjunto de control incluyó:

(i) Once vacas (un total de 44 cuartos de ubre) tratadas con hidrolizado de caseína (20 ml) administrado una vez mediante infusión intramamaria de 20 ml (alrededor de 1,8 mg/ml de fosfopéptido de caseína (CPP), total = 36 mg de CPP por 20 ml)

ii) Seis vacas (24 cuartos de ubre) que recibieron solución salina (10 ml) por infusión intramamaria.

Las vacas inscritas en el estudio fueron seleccionadas de tres rebaños. Las vacas de caso, que recibieron cada uno de los péptidos identificados por un número de lote que termina con un número no par (es decir, MLT-P241210-01-

01, MLT-P241210-01-03, MLT-P241210-01-05, MLT- P241210-01-07 y MLT-P241210-01-09), fueron seleccionados de los rebaños que participaron en el estudio. Posteriormente, las vacas que recibieron péptidos con número de lote consecutivo (terminado en par, es decir, MLT-P241210-01-02, MLT-P241210-01-04, MLT-P241210-01-06, MLT-P241210-01-08, y MLT-P241210-01-10) se asignaron de los mismos rebaños.

El sujeto de control tratado con hidrolizado de caseína o solución salina se distribuyó y comparó con los sujetos del caso. La distribución del último grupo de control se distribuyó en proporción a cada uno de los rebaños incluidos en el estudio.

Criterios de exclusión

Las vacas que caen bajo una o más de las definiciones a continuación no se inscribieron en el estudio:

- Vacas que recibieron terapia con antibióticos para la mastitis o para cualquier otra afección en un período de 4 semanas antes del secado;
- Vacas que tienen menos de cuatro (4) cuartos completamente funcionales;
- Vacas no lactantes;
- Vacas con evidencia de mastitis clínica (como dolor, enrojecimiento, hinchazón o calor en la glándula mamaria, secreción anormal de leche, depresión, consumo reducido de alimento, molestias generales u otras indicaciones);
- Vacas que muestran otras condiciones de salud identificadas por el investigador que impiden la inscripción;
- Vacas destinadas al sacrificio.

Tratamiento

Todos los tratamientos (péptidos, hidrolizado de caseína y solución salina) se administraron en el punto de tiempo programado para el cese del ordeño (secado). El día de administración se estableció como Día 0.

Muestreo y Mediciones

Se recogieron conjuntos de muestras de leche aséptica en dos viales separados una vez al día en la instalación de ordeño después del ordeño matutino, en el día 0 y en los días 1, 2 y 3 posteriores al tratamiento. Los puntos de tiempo de muestreo se fijaron hasta tres días después de la administración del tratamiento para garantizar una secreción de leche suficiente para las mediciones de todos los parámetros de involución. El volumen de las muestras fue de entre 30 y 50 ml. El pH de la muestra de leche se midió *in situ* utilizando un medidor de pH Cyberscan pH11 (Eutech Instruments, Singapur). El aparato se calibró cada día sumergiendo el receptor en tampones estándar de pH 7,0 y pH 4,01. Las mediciones se tomaron dos veces para cada muestra obtenida de una glándula mamaria, con un intervalo de 30 segundos entre mediciones. La medición del pH se repitió en el sitio utilizando el mismo vial de muestra. Antes de la medición de doble pH, los viales de muestra de leche se agitaron suavemente tres (3) veces. Después de la medición del pH, los viales de las muestras de leche se mantuvieron en almacenamiento frío con un producto conservante (Microtabs II de amplio espectro - Bronopol y Metamicina - D&F Control System Inc., Two Technology Way, Norwood MA 02062 USA).

Los valores de lactosa en las muestras de leche se determinaron en el Laboratorio Central de Calidad de la Leche, Parque Industrial Caesaria, Israel, de acuerdo con la norma ISO 22662 | IDF 198: 2007.

El recuento de células somáticas también se determinó en muestras de leche mediante un Fossomatic 360 (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca), y con base en las directrices del Concejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos. Manual de laboratorio sobre mastitis bovina. 1999. Ed. National Mastitis Council, Verona, WI 53593 Estados Unidos.

La práctica estándar de manejo de la vaca seca se aplicó en cada sitio después de la aplicación del tratamiento, con observaciones clínicas de las vacas inscritas en el estudio durante los tres días siguientes. La observación clínica incluyó la administración de medicamentos (tipo de medicamentos, dosis, vías de administración), examen físico (por decisión del investigador) y monitoreo de eventos adversos. Después de tres días, las vacas fueron manejadas de acuerdo con el horario normal del rebaño.

Los datos de seis cuartos se excluyeron del análisis de los cambios de lactosa. Los datos de uno de esos cuartos se omitieron debido a la falta de un valor inicial. Para los otros cinco cuartos, las concentraciones de lactosa tomadas durante los tres días de seguimiento no pudieron analizarse debido a un rápido proceso de involución mamaria, lo que resultó en una muestra de leche insuficiente para el análisis de lactosa.

Tamaño de la muestra

La variable fundamental principal se estableció como la clasificación del éxito de involución. El tamaño mínimo de muestra calculado para cada péptido de serina a analizar fue de 36 cuartos (nueve vacas). Las suposiciones para el cálculo fueron: un porcentaje de éxito del 55% para los péptidos de fosfoserina frente a un porcentaje de éxito del 35% para los péptidos sin fosfoserina, y una potencia del 80% para alcanzar una significancia del 5%.

Resultados

Medidas de punto final: se tomaron los valores de pH, lactosa y recuento de células somáticas (SCC) de las secreciones de leche en el día 0 y durante tres (3) días después del tratamiento. Los resultados se describen como la diferencia entre las medidas en cada uno de los 3 días posteriores al tratamiento y el nivel medido en el día 0. Los resultados se presentan en las Tablas 1-3 a continuación.

pH

El pH de la leche producida en una glándula mamaria después de la inducción del proceso de involución aumenta, lo que sugiere principalmente la ruptura de la unión estrecha de la glándula mamaria. La Tabla 2 a continuación resume el efecto de los péptidos examinados y del hidrolizado de caseína (CNH) sobre el pH de las muestras de leche tomadas 1, 2 y 3 días después del tratamiento de una dosis con cada péptido o CNH. Los resultados se presentan como la diferencia en el valor de pH entre cada uno de los días posteriores al tratamiento y el Día 0 (antes del tratamiento).

Tabla 2: Cambios de pH en muestras de leche en todo el estudio

	Día					
	Día 1		Día 2		Día 3	
Tratamiento	Media	SE	Media	SE	Media	SE
A(p) (SEQ ID NO:10)	0,016	0,017	0,020	0,037	0,118	0,036
A (SEQ ID NO:11)	0,048	0,018	-0,002	0,021	0,072	0,021
B(p) (SEQ ID NO:12)	0,171	0,026	0,165	0,035	0,163	0,033
B (SEQ ID NO:13)	-0,015	0,013	-0,019	0,017	0,065	0,020
C(p) SEQ ID NO:14)	0,066	0,020	0,046	0,025	0,119	0,035
C (SEQ ID NO:15)	0,034	0,013	-0,006	0,019	-0,001	0,028
D(p) (SEQ ID NO:16)	0,027	0,015	-0,018	0,019	0,077	0,025
D (SEQ ID NO:17)	0,000	0,012	-0,027	0,012	0,013	0,021
E(p) (SEQ ID NO:18)	0,045	0,012	0,061	0,028	0,128	0,034
E (SEQ ID NO:19)	0,047	0,018	-0,028	0,052	0,115	0,032
Hidrolizado de caseína	0,083	0,018	0,106	0,023	0,167	0,033

Como se desprende de la Tabla 1, el péptido B(p), que tiene la SEQ ID NO: 12, Lys-Lys-(SerP)-(SerP)-(SerP)-NH_2 (es decir, la SEQ ID NO: 2 con amida como grupo bloqueador en el terminal C) mostró el efecto más significativo sobre el pH de la leche, particularmente en los primeros 2 días después del tratamiento. La administración de hidrolizado de caseína alcanzó la magnitud del efecto del péptido B(p) solo al tercer día. Debe observarse que el efecto del nuevo péptido de la invención fue superior al efecto de los péptidos derivados de caseína D(p) (SEQ ID NO: 16) y E(p) (SEQ ID NO: 18).

Lactosa

Uno de los resultados más significativos de la involución en términos de composición de la leche es una reducción en el contenido de lactosa. Por lo tanto, la concentración de lactosa también se midió en las muestras de leche tomadas antes y después de la administración de péptidos o CNH como se describe para las mediciones de pH anteriores. La Tabla 3 resume los cambios en la concentración de lactosa entre las muestras de leche tomadas en cada punto de tiempo y una muestra tomada en el Día 0 (antes del tratamiento).

Tabla 3: Cambios en el contenido de lactosa en muestras de leche en todo el estudio

	Día					
	Día 1		Día 2		Día 3	
Tratamiento	Media	SE	Media	SE	Media	SE
A(p) (SEQ ID NO:10)	-0,462	0,071	-1,364	0,122	-1,771	0,130
A (SEQ ID NO:11)	-0,463	0,060	-1,268	0,109	-1,773	0,160
B(p) (SEQ ID NO:12)	-1,250	0,164	-2,013	0,132	-2,521	0,140
B (SEQ ID NO:13)	-0,320	0,105	-0,969	0,103	-1,412	0,158

C(p) SEQ ID NO:14)	-0,509	0,195	-1,427	0,173	-0,345	0,220

(continuación)

	Día					
	Día 1		Día 2		Día 3	
Tratamiento	Media	SE	Media	SE	Media	SE
C (SEQ ID NO:15)	-0,846	0,126	-1,554	0,110	-0,387	0,242
D(p) (SEQ ID NO:16)	-0,431	0,083	-1,460	0,088	-2,180	0,103
D (SEQ ID NO:17)	-0,749	0,201	-1,387	0,188	-0,090	0,174
E(p) (SEQ ID NO:18)	-0,354	0,075	-1,530	0,089	-2,042	0,120
E (SEQ ID NO:19)	-0,368	0,077	-1,531	0,141	-1,675	0,202
Hidrolizado de caseína	-0,293	0,121	-1,048	0,124	-1,383	0,205

En todos los puntos de tiempo examinados, el péptido B(p) tuvo un mayor efecto sobre la reducción del contenido de lactosa en comparación con el efecto de CNH, que se sabe que es altamente eficaz para inducir la involución. El péptido B(p) también mostró un efecto mayor en comparación con los péptidos derivados de caseína D(p) y E(p). Sin embargo, después de tres días, el efecto del péptido B(p) fue similar al efecto del péptido derivado de caseína D(p).

Recuentos de células somáticas

El parámetro adicional que puede usarse para establecer la progresión del proceso de involución es la presencia de células somáticas dentro de la leche. El aumento en el recuento celular dentro de la leche es el resultado del alto grado de muerte celular epitelial apoptótica asociada con la involución. La Tabla 4 a continuación muestra los cambios en los recuentos de células somáticas (SCC) en comparación con el Día 0 (véase más arriba). Los resultados presentados en la tabla se calcularon a partir de la transformación logarítmica de los datos sin procesar que fueron altamente variables.

Tabla 4: Cambios en el recuento de células somáticas en muestras de leche en todo el estudio

	Día					
	Día 1		Día 2		Día 3	
Tratamiento	Media	SE	Media	SE	Media	SE
A(p) (SEQ ID NO:10)	0,592	0,176	1,212	0,195	1,829	0,236
A (SEQ ID NO:11)	0,911	0,202	1,571	0,161	2,090	0,183
B(p) (SEQ ID NO:12)	3,129	0,141	3,099	0,231	3,451	0,181
B (SEQ ID NO:13)	0,109	0,191	0,664	0,182	1,191	0,216
C(p) SEQ ID NO:14)	-0,129	0,342	0,961	0,273	0,195	0,308
C (SEQ ID NO:15)	0,511	0,204	1,194	0,211	0,650	0,326
D(p) (SEQ ID NO:16)	0,383	0,214	1,181	0,209	1,998	0,202
D (SEQ ID NO:17)	0,387	0,290	1,023	0,240	-0,249	0,270
E(p) (SEQ ID NO:18)	0,060	0,158	1,175	0,176	1,847	0,226
E (SEQ ID NO:19)	-0,186	0,172	0,843	0,258	1,492	0,207
Hidrolizado de caseína	0,181	0,182	0,818	0,179	1,048	0,256

Concomitante con los resultados obtenidos para el efecto de los péptidos probados sobre el valor de pH y el contenido de lactosa en la leche, se encontró que el péptido B(p) era superior al hidrolizado de caseína o a los péptidos derivados de caseína. Por lo tanto, se concluye que este péptido es altamente efectivo para inducir la involución.

Debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en este documento tiene el propósito de descripción y no de limitación.

Listado de secuencias

<110> MILEUTIS LTD.

<120> PEPTIDOS PARA EL MANEJO DE LA LACTACIÓN

<130> MLTS/006 PCT

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa

<222> (1)..(1)
<223> X representa 0-2 aminoácidos; al menos uno de X en la posición 1 o 5 es un aminoácido cargado positivamente.

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(4)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> X representa 0-2 aminoácidos; al menos uno de X en la posición 1 o 5 es un aminoácido cargado positivamente.

<400> 1

Xaa Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(5)

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(5)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 2

Lys Lys Ser Ser Ser
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(5)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 3

Lys Lys Ser Ser Ser Lys
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (3)..(5)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 4

Lys Lys Ser Ser Ser Lys Lys
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (2)..(4)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 5

Lys Ser Ser Ser Lys Lys
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(4)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 6

Lys Ser Ser Ser Lys
1 5

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(4)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 7

Lys Ser Ser Ser
1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(3)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 8

Ser Ser Ser Lys Lys
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(3)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<400> 9

Ser Ser Ser Lys
1

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(7)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> Xaa

<222> (8)..(8)
<223> Amida

<400> 10

Lys Lys Ser Leu Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa
<222> (7)..(7)
<223> Amida

<400> 11

Lys Lys Ser Leu Ser Ser Xaa
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(5)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> Xaa
<222> (6)..(6)
<223> Amida

<400> 12

Lys Lys Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa
<222> (6)..(6)
<223> Amida

<400> 13

Lys Lys Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(4)

<223> Modificado por ácido fosfórico
<220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> Amida

<400> 14

Lys Lys Ser Ser Xaa
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> Amida

<400> 15

Lys Lys Ser Ser Xaa
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(6)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> Xaa
<222> (9)..(9)
<223> Amida

<400> 16

Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Xaa
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa
<222> (9)..(9)
<223> Amida

<400> 17

Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Xaa
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(4)
<223> Modificado por ácido fosfórico

<220>
<221> Xaa
<222> (7)..(7)
<223> Amida

<400> 18

Lys Ser Ser Ser Glu Glu Xaa
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> Xaa
<222> (7)..(7)
<223> Amida

<400> 19

Lys Ser Ser Ser Glu Glu Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético o recombinante que comprende una secuencia de 4-7 aminoácidos de fórmula X_1(n)-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-X_2(n) (SEQ ID NO: 1),
en el que al menos uno de X_1 y X_2 es un aminoácido cargado positivamente,
en el que cada vez que aparece n = 0,1 o 2,
en el que la fórmula de la SEQ ID NO: 1 comprende además un grupo de bloqueo en el terminal C, y
en el que el péptido sintético o recombinante es una serie lineal de 4-30 residuos de aminoácidos conectados entre sí mediante enlaces peptídicos.

2. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 1, en el que el aminoácido cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina.

3. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 2, en el que el aminoácido cargado positivamente es lisina.

4. El péptido sintético o recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo de bloqueo se selecciona de amida y éster.

5. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 4, en el que el grupo de bloqueo es amida.

6. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 1, en el que dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 12.

7. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 1, en el que dicho péptido consiste en la SEQ ID NO: 12.

8. El péptido sintético o recombinante de la reivindicación 1, en el que dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2-9; o en el que dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, o en el que dicho péptido consiste en la SEQ ID NO: 2.

9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido sintético o recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9,
en la que dicha composición está formulada para administración tópica en una forma seleccionada del grupo que consiste en un gel, pomada, crema, emulsión y un parche transdérmico; o
en la que dicha composición está formulada para administración parenteral, preferiblemente formulada para administración intramamaria.

11. Un péptido sintético o recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10 para su uso en la inducción de una interrupción transitoria de la producción de leche, una interrupción persistente de la producción de leche o involución en una glándula mamaria de un mamífero lactante.

12. Un péptido sintético o recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10 para uso en la prevención, tratamiento y reversión de una infección microbiológica en un mamífero lactante.

13. El péptido sintético o recombinante o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12,
en el que el mamífero lactante se selecciona de un animal de granja lactante y un ser humano lactante; o
en el que el péptido o la composición farmacéutica se administra mientras la glándula mamaria está lactando; o
en el que la composición farmacéutica comprende además un agente antimicrobiano seleccionado del grupo que consiste en antibióticos, bactericidas, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, o un inmunomodulador y una vacuna.

14. El péptido sintético o recombinante o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11,
en el que la composición farmacéutica se administra al mismo tiempo que cesa el ordeño o la lactancia; o
en el que la composición farmacéutica se administra de 1 a 6 veces en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas 24 horas, 48 horas o 72 horas, preferiblemente
en el que la composición farmacéutica se administra una vez; o
en el que la composición farmacéutica se administra en al menos una glándula mamaria del animal lactante, preferiblemente en el que la composición farmacéutica se administra en el canal del pezón de la glándula mamaria.