(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 788 734**

(51) Int. CI.:

A61K 38/12 (2006.01)
C07K 7/54 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 15/14 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
C07K 7/56 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2016 PCT/EP2016/069380**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17029271**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2016 E 16757590 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3337494**

(54) Título: **Lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina**

(30) Prioridad:

17.08.2015 EP 15181209

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2020

(73) Titular/es:

BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (100.0%)
Kaiser-Wilhelm-Allee 10
51373 Leverkusen, DE

(72) Inventor/es:

SCHIFFER, GUIDO;
FÄLKER, STEFAN;
DAUBE, GERT;
FRAATZ, KRISTINE;
WIEHL, WOLFGANG y
KÖBBERLING, JOHANNES

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

Lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina

La presente invención se refiere a lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina.

La mastitis es la inflamación del tejido de la ubre y continúa siendo la enfermedad más frecuente y costosa del ganado lechero. Las pérdidas financieras ocasionadas por la mastitis aparecen tanto en las etapas subclínicas como clínicas de la enfermedad. Las pérdidas ocasionadas por la mastitis subclínica están bien documentadas. Cada duplicación del recuento de células somáticas (RCS) por encima de las 50.000 células/ml tiene como resultado una pérdida de 0,4 kg y 0,6 kg de leche por día en vacas de primera lactancia y con más edad, respectivamente (Hortet P, H. Seegers. 1998. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. Vet Res. 29(6):497-510). Las pérdidas ocasionadas por la mastitis clínica incluyen desechar leche, reducciones transitorias de la producción de leche y descartes prematuros. El tratamiento de la mastitis debe orientarse a las bacterias causantes siempre que sea posible.

Pyörälä S en Irish Veterinary Journal, Volumen 62 Suplemento 40-44 2009 tiene las siguientes sugerencias de tratamiento antimicrobiano de la mastitis clínica debida a distintos patógenos:

Especie de	**microorganismo**	**Fármaco elegido**	**Alternativa**
Estreptococos	*Streptococcus agalacticae* *Streptococcus dysgalacticae* *Streptococcus uberis* *Enterococci*	Penicilina G Según análisis de susceptibilidad	
Estafilococos	*Staphylococcus aureus* Estafilococos coagulasa negativos ß-lactamasa -ve *Staphylococcus aureus* Estafilococos coagulasa negativos ß-lactamasa +ve	Penicilina G Sin agentes antimicrobianos	 Cloxacilina Macrólidos Lincosamidas
Coliformes	*Escherichia coli* *Klebsiella spp.*	Sin agentes antimicrobianos	Fluoroquinolonas Cefalosporinas

Una composición farmacéutica reciente para el tratamiento de la mastitis en vacas lecheras es Ubrolexin®, un antibiótico de amplio espectro contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas que provocan mastitis. Ubrolexin® es una combinación de cefalexina y kanamicina y se indica para el tratamiento de la mastitis clínica ocasionada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalacticae, Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*. El modo de acción de la cefalexina es una unión irreversible a la D-alanina transpeptidasa que altera la síntesis de la pared celular bacteriana. La kanamicina actúa uniéndose a la subunidad 30S de los ribosomas asociados a la membrana e inhibe la síntesis de proteínas bacterianas.

Un problema recurrente con los antibióticos en la técnica anterior es que los patógenos pueden desarrollar resistencia hacia los fármacos que se usan en el tratamiento de las enfermedades que causan. Por lo tanto, se buscan constantemente nuevos ingredientes farmacéuticos activos.

La lisobactina se aisló por primera vez a partir del caldo de fermentación de *Lysobacter sp*. SC-14076 (ATCC 53042). Independientemente, los científicos descubrieron la katanosina A y B a partir de una bacteria de suelo relacionada con el género *Cytophaga* (cepa productora PBJ-5356). La katanosina B resultó ser idéntica a la lisobactina. La biosíntesis de la pared celular bacteriana es la diana principal de estos antibióticos; sin embargo, el mecanismo de acción es diferente del de la vancomicina. Las lisobactinas son depsipétidos cíclicos que contienen varios aminoácidos D y L no proteinogénicos.

El producto natural lisobactina y algunos derivados se describen teniendo actividad antibacteriana en el documento US 4.754.018. El aislamiento y la actividad antibacteriana de la lisobactina también se describen en los documentos

EP 196 042 A1 y JP 01-132600.

La actividad antibacteriana de la lisobactina y la katanosina A se describe adicionalmente en O'Sullivan, J. y col., J. Antibiot. (1988) 41 :1740-1744, Bonner, D. P. y col., J. Antibiot. (1988) 41:1745-1751, Shoji, J. y col., J. Antibiot. (1988) 41:713-718 y Tymiak, A. A. y col., J. Org. Chem. (1989) 54:1149-1157.

A diferencia de los modos de acción de la cefalexina y la kanamicina, se ha sugerido que la lisobactina interactúa directamente con el precursor lípido II de la pared celular bacteriana (Breukink E. y de Kruijff B., Nat. Rev. Drug Disc. (2006) 5:321-323).

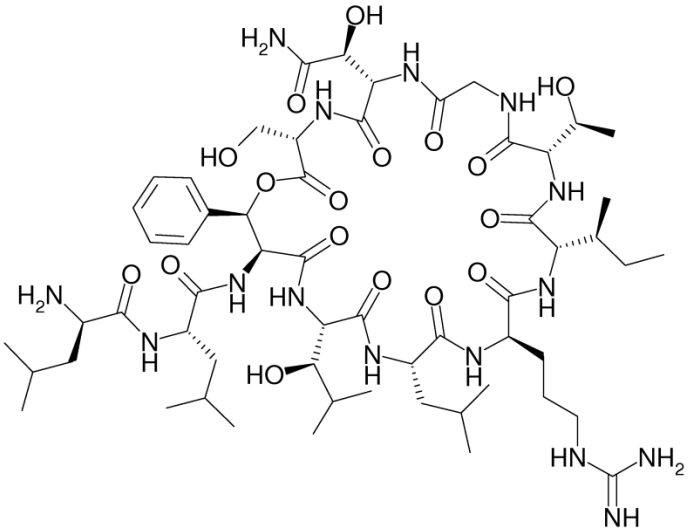
Los derivados de la lisobactina también son el objeto de las solicitudes de patente WO 2004/099239 A1, WO 2006/042653 A1, WO 2006/042654 A1, WO 2006/042655 A1, WO 2006/048139 A1, WO 2006/048140 A1, WO 2006/048156 A1, WO 2007/085456 A1, WO 2007/118691 A1 y WO 2007/118693 A1.

Nada de la técnica anterior se refiere al tratamiento de la mastitis bovina usando lisobactina.

Existe una necesidad en la técnica de un tratamiento para la mastitis bovina que no sufra la desventaja de la resistencia bacteriana hacia el principio activo. La presente invención tiene el objeto de proporcionar un agente para tal tratamiento.

En consecuencia, la presente invención se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina.

En el contexto de la presente invención, el término "lisobactina" se refiere a la sustancia con el número CAS 118374-47-3 y sus sales fisiológicamente aceptables. La lisobactina tiene la siguiente estructura:



La mastitis bovina que se aborda es en particular la mastitis del ganado lechero.

Las sales fisiológicamente aceptables de la lisobactina incluyen sales de adición de ácido de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, por ejemplo sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Las sales fisiológicamente aceptables de la lisobactina también incluyen sales de bases convencionales, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, sales de metal alcalino (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales de metal alcalinotérreo (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas que tienen de 1 a 16 átomos de C, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropiletilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, diciclohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, N-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y N-metilpiperidina.

La lisobactina puede actuar a nivel sistémico y/o local. Para este fin, puede administrarse de forma adecuada, tal como, por ejemplo, mediante la vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, intraauricular, dérmica o transdérmica o como implante o endoprótesis.

La lisobactina puede administrarse en formas de administración adecuadas para estas vías de administración.

Las formas de administración oral adecuadas para administración oral son las que funcionan de acuerdo con la técnica

anterior y administran lisobactina rápidamente y/o de forma modificada y que contienen lisobactina en forma cristalina y/o amorfa y/o disuelta, tales como, por ejemplo, comprimidos (comprimidos recubiertos o no recubiertos, por ejemplo con recubrimientos entéricos o recubrimientos insolubles o se disuelven con un retardo que controlan la liberación de lisobactina), comprimidos que se desintegran rápidamente en la boca o películas/obleas, películas/liofilizados, cápsulas (por ejemplo cápsulas de gelatina dura o blanda), comprimidos recubiertos con azúcar, gránulos, microgránulos, polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones.

La administración parenteral puede tener lugar evitando una etapa de absorción (por ejemplo, intramamaria, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intraespinal o intralumbar) o con la inclusión de absorción (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para administración parenteral son, entre otras, preparaciones para inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Son adecuadas para las otras vías de administración, por ejemplo, formas farmacéuticas para suspensiones acuosas (lociones, mezclas de agitación), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (tales como, por ejemplo, parches), leches, pastas, espumas, polvos para espolvorear, implantes o endoprótesis.

La lisobactina puede convertirse en las formas de administración mencionadas. Esto puede tener lugar de forma conocida en sí misma mezclando con excipientes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes incluyen, entre otros, vehículos (por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y dispersantes o agentes de humectación (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizantes (por ejemplo antioxidantes, tales como, por ejemplo, ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos, tales como, por ejemplo, óxidos de hierro) y sabores y/u olores para enmascarar.

La presente invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes aspectos y realizaciones. Pueden combinarse libremente a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Una realización se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bobina, en la que la lisobactina se administra por vía intramamaria.

Otra realización se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina, en la que la mastitis bovina es una mastitis bovina que se manifiesta clínicamente.

Otra realización se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina, en la que la mastitis bovina es una mastitis bovina subclínica.

Otra realización se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina, en la que la lisobactina se proporciona en una dosis de 25 a 1000 mg por cuarto de ubre, preferentemente en una dosis de 50 a 500 mg por cuarto de ubre y más preferentemente en una dosis de 100 a 300 mg por cuarto de ubre.

De todas formas puede ser necesario cuando corresponda desviarse de las cantidades establecidas, específicamente como función del peso corporal, vía de administración, respuesta individual al principio activo, naturaleza de la preparación y tiempo o intervalo durante el cual se lleva a cabo la administración. Por lo tanto, puede ser suficiente en algunos casos conformarse con menos de la cantidad mínima mencionada anteriormente, los que en otros casos puede superarse el límite máximo establecido. En caso de la administración de cantidades mayores puede ser recomendable dividirlas en múltiples dosis individuales durante el día.

Otra realización se refiere a la lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina, en la que la mastitis bovina está provocada por bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus, bacterias Trueperella* y/o bacterias *Corynebacterium*. En particular, la mastitis bovina puede estar provocada por *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalacticae* y/o *Streptococcus agalacticae*. Adicionalmente, la mastitis bovina puede estar provocada por *Trueperella pyogenes*. También, la mastitis bovina puede estar provocada por *Corynebacterium bovis*. Estos microorganismos son los patógenos más comunes que se encuentran en los casos de mastitis bovina y que se descubrió que eran particularmente susceptibles a un tratamiento con lisobactina de acuerdo con la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que se formula para la administración intramamaria en las mamas bovinas, en el que la composición comprende lisobactina. Preferentemente, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable y en particular un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Estos excipientes incluyen, entre otros, vehículos (por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y dispersantes o agentes de humectación (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizantes (por ejemplo antioxidantes, tales como, por ejemplo, ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos, tales como, por ejemplo, óxidos de hierro) y sabores y/u

olores para enmascarar.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de lisobactina para la preparación de agentes farmacéuticos para el tratamiento de la mastitis bovina.

En una realización del uso de acuerdo con la invención la mastitis bovina es una mastitis bovina que se manifiesta clínicamente.

En otra realización del uso de acuerdo con la invención la mastitis bovina es una mastitis bovina subclínica.

En otra realización del uso de acuerdo con la invención la mastitis bovina está provocada por bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcus, bacterias Trueperella* y/o bacterias *Corynebacterium*.

En particular, la mastitis bovina puede estar provocada por *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalacticae* y/o *Streptococcus agalacticae*. Adicionalmente, la mastitis bovina puede estar provocada por *Trueperella pyogenes*. Además, la mastitis bovina puede estar provocada por *Corynebacterium bovis*.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para tratar la mastitis bovina, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a una vaca que necesite la misma, una cantidad terapéuticamente eficaz de lisobactina.

Ejemplos:

La presente invención se aclarará adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos y figuras sin quedar limitada a los mismos.

FIGURA 1 muestra la actividad cinética destructora de la lisobactina contra *Staphylococcus aureus y Streptococcus uberis* (ejemplo 2)

FIGURA 2 muestra los cambios de la CMI de lisobactina contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* durante el pasaje en serie (ejemplo 4)

FIGURA 3 muestra la efectividad de la lisobactina en un modelo de mastitis aguda de ratón por *Staphylococcus aureus* (ejemplo 5)

FIGURA 4 muestra la efectividad de la lisobactina en un modelo de mastitis de ratón de exposición a *Staphylococcus aureus* (ejemplo 6)

FIGURA 5 muestra el perfil de concentración-tiempo de lisobactina en la leche después de la aplicación intramamaria (IMAM) a vacas Holstein lactantes (ejemplo 7)

Ejemplo 1: Actividad antibacteriana *in vitro* contra los patógenos de la mastitis

La actividad antibacteriana *in vitro* de la lisobactina contra patógenos comunes de la mastitis tales como *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae* se evaluó mediante metodología CMI de dilución de microcaldo como describe el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLS) para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se define como la menor concentración de una sustancia que evita un crecimiento visible de una bacteria. Los resultados expresados como CIM_{90} se resumen en la tabla siguiente, en la que CIM_{90} se define como la concentración en la cual se inhibe el crecimiento de al menos el 90 % de las cepas de una especie determinada.

Bacterias analizadas	**CIM_{90} [µg/ml] de lisobactina**
Staphylococcus aureus	0,5
Estafilococos coagulasa negativos	0,5
Streptococcus uberis	0,125
Streptococcus dysgalacticae	0,25
Streptococcus agalacticae	0,25
Trueperella pyogenes	0,5
Escherichia coli	>16

Bacterias analizadas	CIM_{90} [µg/ml] de lisobactina
Klebsiella pneumoniae	>16

Ejemplo 2: Cinética de destrucción *in vitro* para patógenos de la mastitis

Con el fin de evaluar la capacidad de la lisobactina para destruir las bacterias presentes en la leche, se inocularon matraces con distintas concentraciones de lisobactina en leche entera comprada con 1-2 x 10^6 unidades formadoras de colonias/ml de una cepa representante de *Staphylococcus aureus* o bien *Streptococcus uberis.* Los matraces se incubaron durante 24-48 horas en un baño de agua en agitación a 35 +/- 2°C, y se determinaron los recuentos bacterianos viables en cada matraz en distintos puntos de tiempo mediante dilución y colocación de las muestras en placas de agar. Una reducción de al menos el 99,9 % de la cantidad de bacterias viables en el inoculante inicial se define como actividad bactericida.

Se determinó actividad cinética de destrucción de la lisobactina contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 y *Streptococcus uberis* ATCC 27958 en la leche en concentraciones de lisobactina de 4, 8, 16, 32 y 64 µg/ml. Los resultados se describen en la FIGURA 1 (UFC: unidades formadoras de colonias). Puede postularse una cidalidad a las 24 h y 48 h respectivamente para *S. aureus* y *S. uberis*.

Ejemplo 3: Evaluación *in vitro* del desarrollo de resistencia espontánea:

La frecuencia del desarrollo de la resistencia espontánea se evaluó mediante la colocación en placas de al menos 1x10^9 unidades formadoras de colonias de la cepa bacteriana respectiva en placas de agar que contienen lisobactina en 4x y 8x la CMI e incubando las placas a 35 +/- 2 °C. Después de 48 h, la cantidad de colonias que crecieron en las placas con la concentración de lisobactina por encima de la CMI se dividió por la cantidad de bacterias que se colocaron inicialmente en las placas. La cantidad resultante se define como la frecuencia de resistencia espontánea y es un indicativo de la probabilidad de que aislados resistentes aparezcan durante una infección.

Como conclusión, la lisobactina en 4 y 8 veces la CMI muestra un muy buen perfil de resistencia: no se detectó ningún aislado resistente. Los resultados se resumen en las siguientes tablas.

Staphylococcus aureus ATCC 29740:

Concentración de lisobactina	**UFC colocadas en placas**	**24 h**		**48 h**	
		Colonias obtenidas	**Frecuencia de la resistencia**	**Colonias obtenidas**	**Frecuencia de la resistencia**
2 µg/ml (4x CMI)	3,52 x 10^9	0	< 2,84 x 10^{-10}	0	< 2,84 x 10^{-10}
4 µg/ml (8x CMI)	3,52 x 10^9	0	< 2,84 x 10^{-10}	0	< 2,84 x 10^{-10}

Streptococcus uberis ATCC 27958:

Concentración de lisobactina	**UFC colocadas en placas**	**24 h**		**48 h**	
		Colonias obtenidas	**Frecuencia de la resistencia**	**Colonias obtenidas**	**Frecuencia de la resistencia**
2 µg/ml (4x CMI)	2,4 x 10^{10}	0	< 4,17 x 10^{-11}	0	< 4,17 x 10^{-11}
4 µg/ml (8x CMI)	2,4 x 10^{10}	0	< 4,17 x 10^{-11}	0	< 4,17 x 10^{-11}

Ejemplo 4: Evaluación *in vitro* del desarrollo de la resistencia durante el pasaje en serie

La aparición de cambios de la CMI durante la exposición constante de las bacterias a concentraciones por debajo de la CMI de lisobactina se evaluó mediante experimentos de pasajes en serie. En el primer día, se evaluaron las CMI de *S. aureus* y *S. uberis* mediante metodología de CMI de dilución de microcaldo tal como describe el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Cada día durante los 33 días siguientes consecutivos, se recogieron las bacterias del pocillo con las mayores concentraciones que permiten un crecimiento pleno y se usaron para inocular placas de 96 pocillos y evaluar la CMI durante la exposición constante a la lisobactina. La CMI obtenida en cada día se graficó en el tiempo. Los resultados se muestran en la FIGURA 2. Se usó rifampicina como control positivo, que se sabe que tiene como resultado cambios rápidos de la CMI.

Los resultados indican un muy buen perfil de la lisobactina para el desarrollo de resistencia durante la exposición constante, ya que las CMI de *S. aureus* y *S. uberis* permanecen constantes durante el período de 33 días.

Ejemplo 5: Efectividad en un modelo de mastitis de ratón aguda con *S. aureus*

Se analizó la eficacia de la lisobactina (formulada en un hidrogel a un pH de 4,7) en un modelo de mastitis aguda de ratón con *Staphylococcus aureus* establecido en la Universidad de Sherbooke, Canadá (Broui-llette y col, Vet. Microbiol. (2004) 4:253-262), que se incorpora de esta manera por referencia. Ambas glándulas mamarias abdominales (L4 y R4) de los ratones CD-1 lactantes se infectaron por vía intramamaria con 100 UFC (unidades formadoras de colonias) de *S. aureus.* Los ratones se trataron por vía intramamaria con lisobactina cuatro horas después de la infección. Cada grupo de tratamiento contenía al menos 3 ratones (6 cuartos), 14 horas más tarde (18 horas después de la inoculación) los ratones se sacrificaron, las glándulas mamarias se cosecharon y se evaluó el contenido de UFC colocando en placas diluciones en serie de 10 veces de homogenatos de glándulas mamarias. El contenido de UFC se expresó como un recuento $\log_{10}$. El límite de detección fue de 200 UFC/g de glándula. Las glándulas con menos de 200 UFC/g se consideraron limpias. Los resultados se muestran en la FIGURA 3.

La instilación intramamaria de 50 µg de lisobactina reduce el contenido medio de UFC en aproximadamente 4 $\log_{10}$, 400 µg de lisobactina eliminan la infección de todas las glándulas infectadas.

Ejemplo 6: Efectividad en un modelo de mastitis de ratón aguda con *S. uberis*

La eficacia de la lisobactina (formulada en un hidrogel con un pH de 4,7) se analizó en un modelo de mastitis de ratón estimulado con *Streptococcus uberis.* Los resultados se muestran en la FIG. 4.

Veinte ratones lactantes se infectaron de forma experimental en el cuarto par de glándulas mamarias con *S. uberis* alrededor de 12-15 días después del nacimiento de las crías. Cuatro horas después de la inoculación, grupos de cuatro ratones se trataron en las mismas glándulas con lisobactina a 100, 200, 400 u 800 µg/glándula formulada como hidrogel. El quinto grupo se trató únicamente con el vehículo de hidrogel como control negativo. Dieciocho horas después de la infección se sometió a eutanasia a los animales, se quitaron las glándulas, se homogenizaron y se determinaron las unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) mediante los procedimientos microbiológicos establecidos. Posteriormente se calculó el homogenato de UFC/ml así como las UFC/g de glándula. El límite de detección fue de aproximadamente 100 UFC/g de glándula. La actividad antimicrobiana de la lisobactina contra *Strep uberis* se determinó comparando las UFC/glándula media de los distintos grupos de dosificación y el grupo control negativo.

Las glándulas de todos los animales del grupo de control presentaron una tasa de infección óptima ($\geq 10^7$ UFC/g de glándula) 18 horas después de la infección. Con una excepción en el grupo de dosificación más alto, todas las glándulas de los grupos tratados con lisobactina tuvieron conteos bacterianos por debajo del límite de detección (10^2 UFC/g). Puede concluirse que la lisobactina formulada como hidrogel tiene una eficacia antibacteriana destacable contra *S. uberis* en dosis por vía intramamaria de entre 100 y 800 µg/glándula.

Ejemplo 7: Datos de ganado *in vivo* de lisobactina - estudio farmacocinético de la leche en vacas Holstein lactantes

El estudio se diseñó como estudio no pivotal adecuado para investigar las actividades farmacocinéticas de la leche de la sustancia activa lisobactina después de una única aplicación intracisternal a vacas lecheras lactantes.

La sustancia activa se proporcionó en una formulación de servicio con base en parafina adecuada para la aplicación intracisternal que contiene 150 mg de lisobactina B en 10 g de suspensión oleaginosa.

La unidad de prueba se administró como tratamiento intracisternal único en una tasa de dosis de 150 mg de lisobactina en un único cuarto trasero de cuatro vacas lecheras lactantes cada una.

Las vacas lecheras del estudio (vacas Holstein) representaron la población diana en edad, número de lactancia, etapa de lactancia, producción de leche y raza. Los animales se dejaron en establo con cubículos y se los alimentó con alimento estándar para vacas lecheras que consiste en maíz y ensilados de pasto y alimento para el rendimiento lechero. Se ordenó dos veces al día en un intervalo de 12 horas usando un dispositivo de ordeñe de tipo cubo.

El muestreo frecuente de la leche se realizó a partir de los cuartos de control tratados y respectivos antes de (0 h) y

durante un período de 168 horas después del tratamiento (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, y 168 h) mediante el ordeñe manual de los cuartos de ubre respectivos. Las muestras de leche en los momentos de ordeñe rutinarios se recabaron antes del ordeñe.

Las concentraciones de la sustancia activa lisobactina en la leche se analizaron mediante HPLC con la detección mediante espectrometría de masa en tándem. El límite de la cuantificación fue de 0,05 mg/l.

La evaluación farmacocinética de los datos de concentración de leche se basó en procedimientos no compartimentales y abarcó parámetros farmacocinéticos para describir adecuadamente el perfil de absorción, distribución y eliminación de la sustancia activa en la leche.

En la tabla siguiente se presentan los resultados resumidos de los cuartos de ubre tratados. No se detectó lisobactina en las muestras de control (cuartos de ubre sin tratar).

Resultados farmacocinéticos medios de lisobactina en la leche después de un tratamiento único

Matriz	C_{max}[1]	T_{max}[2]	$t_{1/2}$[1]	AUC_{inf}[1]	AUC_{0-12h}[1]	AUC_{0-24h}[1]
	mg/l	h	h	mg*h/l	mg*h/l	mg*h/l
Leche	342	4	11,6	2321	1870	2213

La dosis aplicada a 1 cuarto por vaca fue de 150 mg de lisobactina;

las medias se proporcionan como 1) media geométrica, 2) mediana

La curva de concentración tiempo de la lisobactina se describe en la FIGURA 5.

Ejemplo 8: Datos de ganado *in vivo* de lisobactina - modelo de infección de ubre de vaca lechera con *S. aureus*

Quince vacas lecheras lactantes saludables se infectaron de forma experimental con el patógeno de mastitis *Staphylococcus aureus* en todos los cuatro cuartos de ubre. Tan pronto como el cuarto de ubre mostró síntomas clínicos de mastitis, tales como hinchazón, dolor, consistencia anormal de leche, se trató con un ungüento de lisobactina con base de parafina en dos concentraciones distintas, o con Ubrolexin® (Cefalexina + Kanamicina, Boehringer Ingelheim), Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a 42 cuartos de ubre en total, ya sea con 50 mg de lisobactina por cuarto (en 11 cuartos), o 150 mg de lisobactina (en 11 cuartos) o Ubrolexin® (en 9 cuartos) o solución salina (en 11 cuartos). Solo los cuartos de ubre bacteriológicamente positivos para el organismo de estimulación inmediatamente antes del tratamiento (n=42) se eligieron para evaluar la cura microbiológica y clínica. Los cuartos enfermos se trataron con estas formulaciones intramamarias dos veces con un intervalo de 24 horas entre sí. Las ubres se examinaron clínicamente y se tomaron muestras de la leche antes del tratamiento y varias veces después hasta tres semanas después de la segunda administración. La leche se inspeccionó visualmente por desviaciones de consistencia y las muestras se evaluaron para determinar la presencia del organismo de estimulación y para el recuento de células somáticas para confirmar el diagnóstico de mastitis. Los cuartos de ubre enfermos se consideraron microbiológicamente curados cuando la bacteria *Staphylococcus aureus* que se encontró en las muestras de leche brevemente antes del tratamiento no pudo aislarse de ninguna muestra de leche tomada dentro del período de tiempo entre el tercer y el vigésimo primer día después del segundo tratamiento. La cura clínica se logró cuando los síntomas locales de mastitis desaparecieron completamente y la recuperación de los recuentos de células somáticas (RCS) como parámetro de la inflamación de ubre se logró cuando todos los recuentos permanecieron por debajo de las 500.000 células por ml de leche en el período mencionado anteriormente.

La tasa de cura microbiológica en el Día 3 y el Día 21 después del segundo tratamiento fue del 73 % y 27 % para la lisobactina 50 mg, 73 % y 45 % para la lisobactina 150 mg, 78 % y 44 % para Ubrolexin®, y 0 % y 0 % para la solución salina, respectivamente. La tasa de cura clínica en el Día 3 y el Día 21 después del segundo tratamiento fue del 45 % y 73 % para la lisobactina 50 mg, 37 % y 82 % para la lisobactina 150 mg, 33 % y 67 % para Ubrolexin®, y 55 % y 73 % para la solución salina, respectivamente. La tasa de recuperación del RCS en el Día 3 y el Día 21 después del segundo tratamiento fue del 36 % y 45 % para la lisobactina 50 mg, 36 % y 91 % para la lisobactina 150 mg, 56 % y 67 % para Ubrolexin®, y 36 % y 27 % para la solución salina, respectivamente.

Es posible concluir que 150 mg de lisobactina muestran una efectividad similar o incluso mejor en comparación con el producto de control positivo Ubrolexin® y superioridad respecto de los 50 mg de lisobactina y la solución salina en los parámetros de cura microbiológica y clínica y la recuperación del RCS.

Ejemplo 9: Datos de ganado in vivo de lisobactina - modelo de infección de ubre de vaca lechera con *S. uberis*

Setenta y dos vacas lecheras lactantes saludables se infectaron de forma experimental con el patógeno de mastitis *Streptococcus uberis* en dos cuartos de ubre por vaca. Tan pronto como el cuarto de ubre mostró síntomas clínicos de mastitis, (por ejemplo, calor, hinchazón, enrojecimiento, dolor, consistencia anormal de la leche), se trató con un ungüento de lisobactina con base de parafina en dos concentraciones distintas o Ubrolexin® (Cefalexina + Kanamicina, Boehringer Ingelheim),

Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a 41 (clínicos) o 37 (microbiológicos) cuartos de ubre en total, ya sea con 50 mg de lisobactina por cuarto (en 15/13 cuartos), o 150 mg de lisobactina (en 15/14 cuartos) o Ubrolexin® (en 11/10 cuartos) como control positivo. Los cuartos enfermos se trataron con estas formulaciones intramamarias dos veces con un intervalo de 24 horas entre sí. Las ubres se examinaron clínicamente y se tomaron muestras de la leche antes del tratamiento y varias veces después hasta tres semanas después de la segunda administración. La leche se inspeccionó visualmente por desviaciones de consistencia y las muestras se evaluaron para determinar la presencia del organismo de estimulación para confirmar el diagnóstico de mastitis. Los cuartos de ubre enfermos se consideraron microbiológicamente curados cuando la bacteria *Streptococcus uberis* que se encontró en las muestras de leche brevemente antes del tratamiento no pudo aislarse de ninguna muestra de leche tomada dentro del período de tiempo entre el séptimo y el vigésimo primer día después del segundo tratamiento. La cura clínica se logró cuando los síntomas locales de mastitis desaparecieron completamente o como máximo eran muy suaves.

La tasa de cura microbiológica en el Día 7 y el Día 21 después del segundo tratamiento fue del 84,6 % y 92,31 % para la lisobactina 50 mg, 71,4 % y 85,71 % para la lisobactina 150 mg, y 30 % y 30 % para Ubrolexin®, respectivamente. La tasa de cura clínica local en el Día 7 después del segundo tratamiento fue del 86,7 % tanto para la lisobactina 50 mg y lisobactina 150 mg, y 36,4 % para Ubrolexin®, respectivamente.

Puede concluirse que los 50 y 150 mg de lisobactina fueron claramente más efectivos en comparación con el producto de control positivo Ubrolexin® en los parámetros centrales de cura clínica y microbiológica.

REIVINDICACIONES

1. Lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina.

2. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la lisobactina se administra intramamariamente.

3. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la mastitis bovina es una mastitis bovina que se manifiesta clínicamente.

4. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la mastitis bovina es una mastitis bovina subclínica.

5. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la lisobactina se proporciona a una dosis de 25 a 1000 mg por cuarto de ubre.

6. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la mastitis bovina está provocada por bacterias *Staphylococcus*, bacterias *Streptococcu*s, bacterias *Trueperella* y/o bacterias *Corynebacterium*.

7. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la mastitis bovina está provocada por *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalacticae* y/o *Streptococcus agalacticae*.

8. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la mastitis bovina está provocada por *Trueperella pyogenes*.

9. La lisobactina para su uso en el tratamiento de la mastitis bovina de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la mastitis bovina está provocada por *Corynebacterium bovis*.

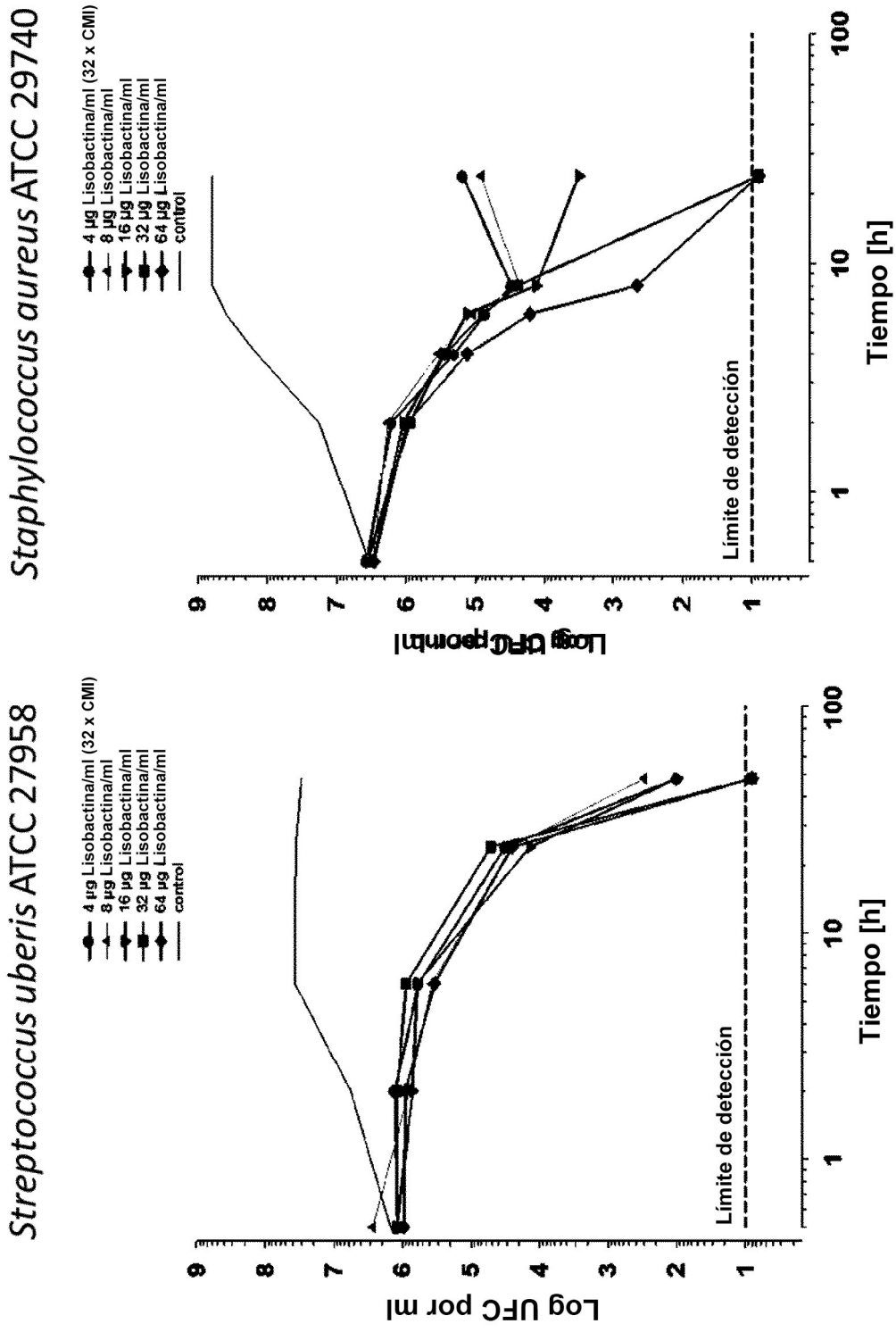

Staphylococcus aureus ATCC 29740
4 µg Lisobactina/ml (32 x CMI)
8 µg Lisobactina/ml
16 µg Lisobactina/ml
32 µg Lisobactina/ml
64 µg Lisobactina/ml
control
Límite de detección
Tiempo [h]
Streptococcus uberis ATCC 27958
Log UFC por ml

FIG. 1

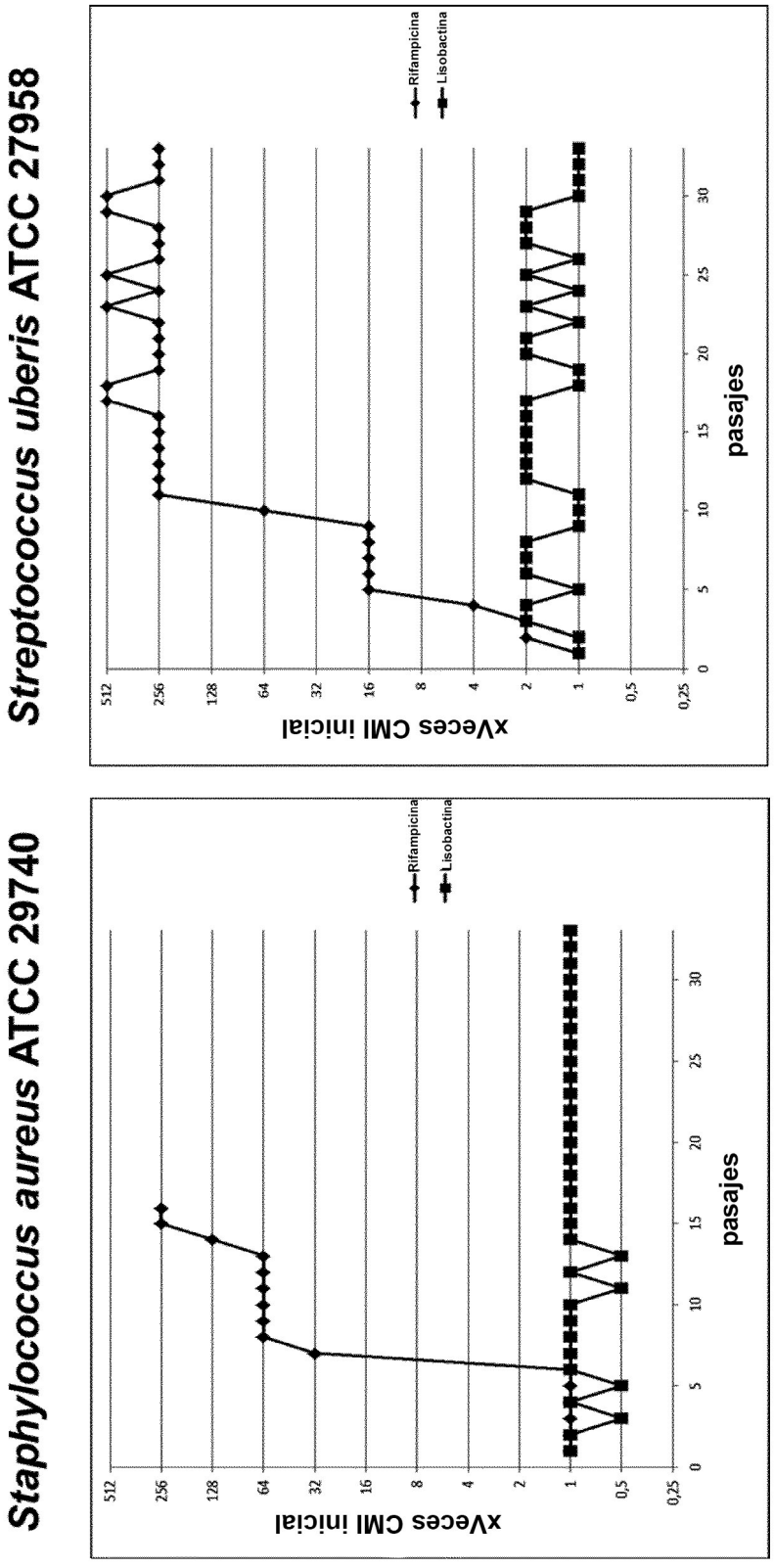

Streptococcus uberis ATCC 27958
Rifampicina
Lisobactina
xVeces CMI inicial
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0
5
10
15
20
25
30
pasajes
Staphylococcus aureus ATCC 29740
Rifampicina
Lisobactina
xVeces CMI inicial
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0
5
10
15
20
25
30
pasajes

FIG. 2

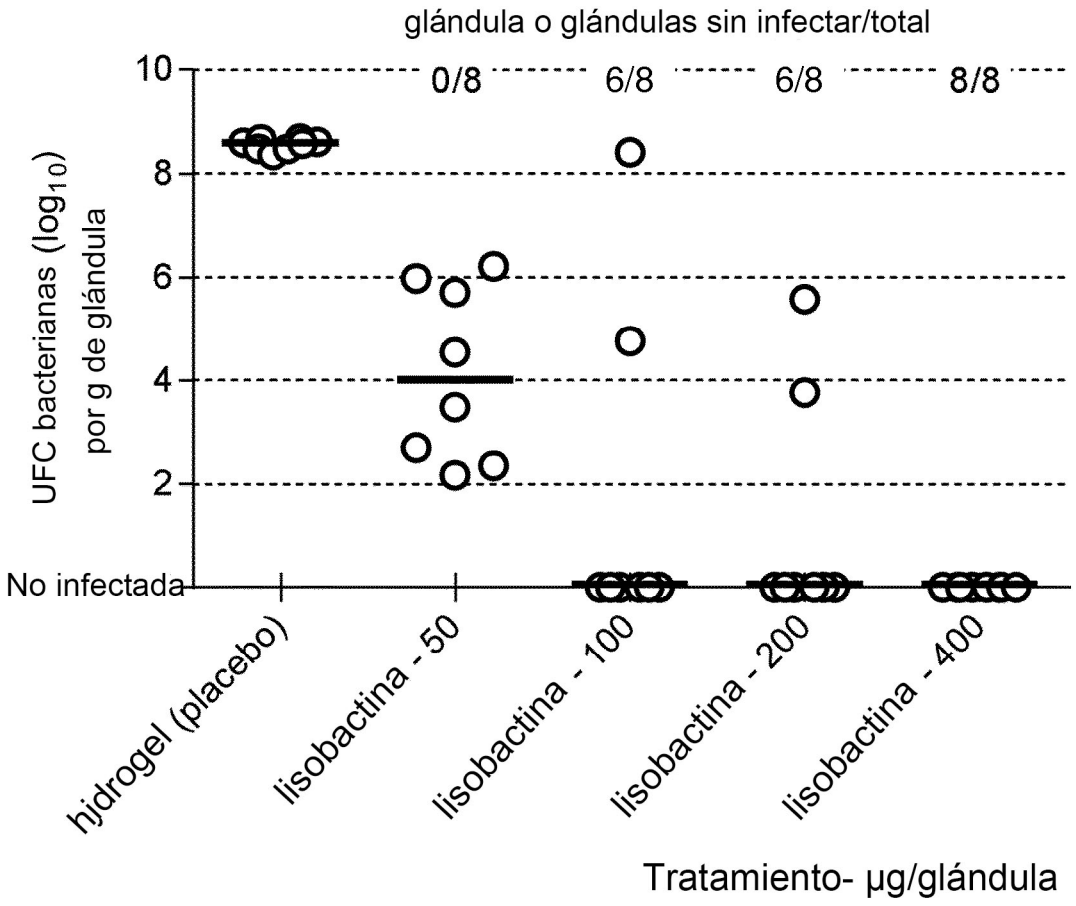

glándula o glándulas sin infectar/total
0/8
6/8
6/8
8/8
10
8
6
4
2
No infectada
UFC bacterianas (log_{10}) por g de glándula
hjdrogel (placebo)
lisobactina - 50
lisobactina - 100
lisobactina - 200
lisobactina - 400
Tratamiento- µg/glándula

FIG. 3

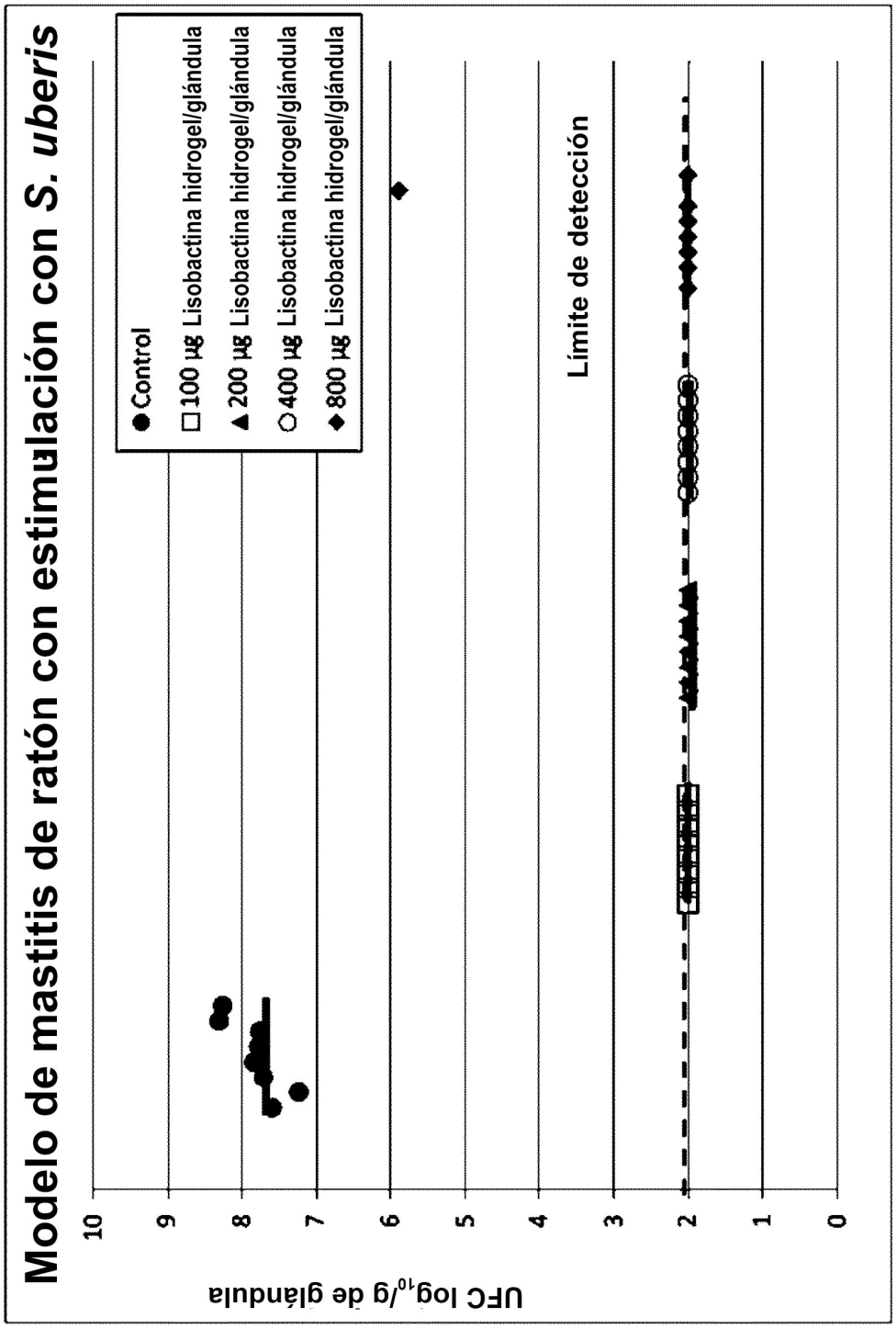

Modelo de mastitis de ratón con estimulación con S. uberis
Control
100 µg Lisobactina hidrogel/glándula
200 µg Lisobactina hidrogel/glándula
400 µg Lisobactina hidrogel/glándula
800 µg Lisobactina hidrogel/glándula
Límite de detección
UFC log10/g de glándula
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0

FIG. 4

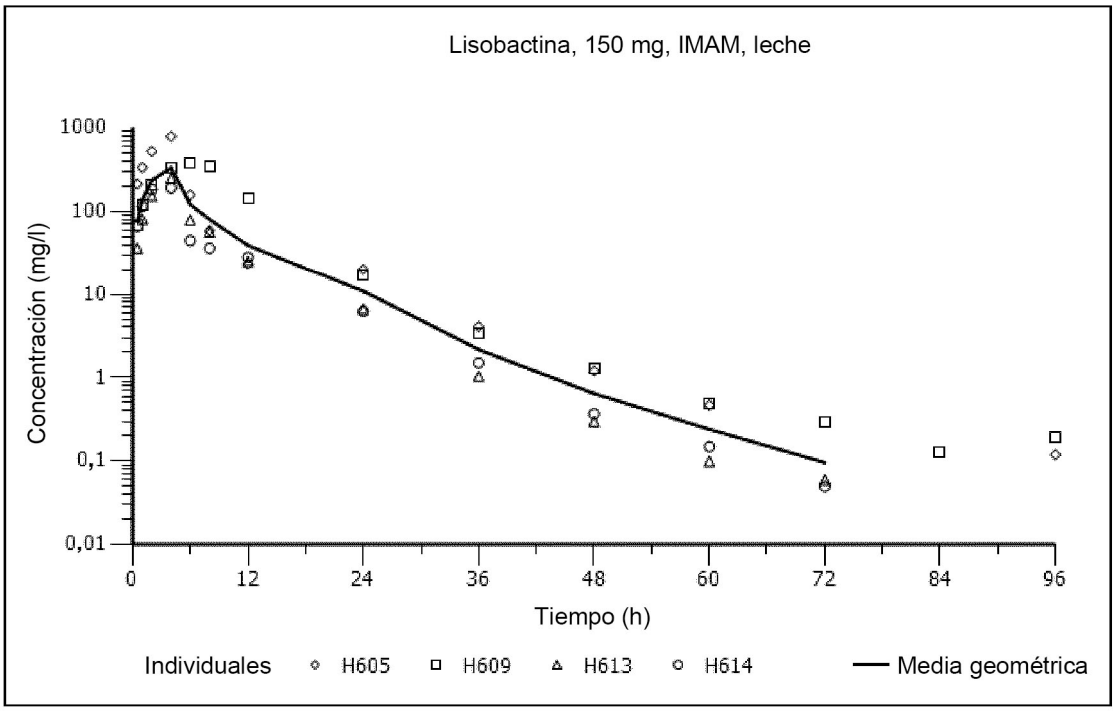

Lisobactina, 150 mg, IMAM, leche
Concentración (mg/l)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0
12
24
36
48
60
72
84
96
Tiempo (h)
Individuales
H605
H609
H613
H614
Media geométrica

FIG. 5