



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 658**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 31/277 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/223 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/325 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03753579 .6**
86 Fecha de presentación : **12.08.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1536777**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Uso de inhibidores de NF- κ B para el tratamiento de la mastitis.**

30 Prioridad: **14.08.2002 EP 02078352**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es: **Boulanger, Delphine;**
Bureau, Fabrice y
Lekeux, Pierre

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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

Uso de inhibidores de NF- κ B para el tratamiento de la mastitis.

5 La presente invención se refiere al uso de inhibidores de NF- κ B (NF-kappa B) de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la mastitis.

10 La mastitis es una de las enfermedades más costosas en rebaños de ordeño. Los costes aumentan principalmente por menor producción y calidad de leche, intervenciones terapéuticas, pérdida de leche contaminada con antibiótico y trabajo adicional. La mastitis, definida como una afección inflamatoria de la glándula mamaria, es provocada habitualmente por bacterias patógenas. Los patógenos más comunes que provocan la mastitis incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium pyogenes* y coliformes. Estos microorganismos pueden invadir la ubre por el canal del pezón y producir inflamación del tejido productor de leche provocando la formación de tejido cicatrizado que, una vez formado, puede provocar una reducción permanente en la producción de leche de la vaca. Una infección también puede alterar la composición, cantidad, apariencia y calidad de la leche.

20 La mastitis en ganado de ordeño es tratada habitualmente con antibióticos. Sin embargo, se ha encontrado que es deseable reemplazar tal tratamiento de antibióticos con tratamiento mediante fármacos quimio-terapéuticos no antibióticos para evitar la generación de resistencia de cepas bacterianas. Además, la leche producida por ganado de ordeño tratado con antibiótico tiene que ser desechada ya que contiene antibióticos residuales.

25 NF- κ B (factor nuclear-kappa B) es un nombre genérico para factores de transcripción diméricos inducibles compuestos por miembros de la familia Rel de proteínas de unión a ADN que reconocen un motivo de la secuencia común. NF- κ B se encuentra esencialmente en todos los tipos de células y está involucrado en la activación de un número excepcionalmente grande de genes en respuesta a infecciones, inflamación, y otras situaciones de tensión que requieren la reprogramación rápida de la expresión génica.

30 Bouchard y col. describen en J. Dairy Science, 1999, 82(12), 2574-2581 que el inhibidor de iNOS aminoguanidina puede prevenir la liberación de NO durante la mastitis y sugiere un valor terapéutico potencial. Se menciona además que sería de interés investigar el potencial anti-inflamatorio de sustancias que interfieren con la acción de NF- κ B en un modelo de mastitis.

35 El documento WO-A-0056341 describe el uso de un inhibidor de NF- κ B para el tratamiento de trastornos mediados por bacterias debidos a bacterias Gram negativas o Gram positivas.

De forma sorprendente, se ha encontrado que los compuestos capaces de inhibir la activación de NF- κ B, es decir, inhibidores de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1, se pueden usar en el tratamiento de mastitis.

40 Son inhibidores de NF- κ B conocidos, por ejemplo:

- 15d-PGJ2 (15-deoxi- Δ .12,14-prostaglandin J2) (véase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(9), 4844-4849 (2000));
- tepoxalina (véase *Immunology Letters*, 53(2,3), 109-113 (1996));
- 45 - cicloepoxidona y sus estereoisómeros (+) y (-) (véase *J. Am. Chem. Soc.*, 123(45), 11308-11309 (2001));
- dietilditiocarbamato de sodio (Na-DDTC) (véase *Brain Research Bulletin*, 55/3, 375-386 (2001));
- 50 - gliotoxina, MG-132 (N-[(fenilmetoxi)carbonil]-L-leucil-N-[(1S)-1-formil-3-metilbutil]-L-leucinamida), BAY 11-7082 (3-[[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-sulfonil]-2-propenonitrilo), BAY 11-7085 ((E)-(3-[[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-sulfonil]-2-propenonitrilo), (véase *Human Pathology*, 31(12), 1482-1490 (2000));
- ciclopentanona prostaglandina A1 (PGA1), (véase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 746-750 (1997));
- 55 - ciclopentabenzofuranos como se describen en el documento WO-00/08007; y
- ácido [(1R)-3-metil-1-[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(pirazinilcarbonil)amino]propil]amino]butil]-bórico también conocido con el nombre INN de bortezomib.

60 Se puede encontrar otros inhibidores de NF- κ B en la bibliografía y se pueden ensayar compuestos en cuanto a actividad inhibitoria de NF- κ B usando ensayos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 746-750 (1997).

65 Los inhibidores de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de mastitis pueden ser inhibidores específicos de NF- κ B o pueden ser no específicos.

La presente invención proporciona el uso de un inhibidor de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la mastitis.

Como se usa en esta invención, el término “sujeto” abarca especies animales de sangre caliente tales como, por ejemplo, rumiantes tales como ganado bovino, ovejas, cabras, búfalos etc.

Hay una variedad de formas o tipos de mastitis bovina, con gravedad y sintomatología variable, incluyendo las siguientes:

- mastitis aguda que es una inflamación abrupta y de corta duración de la ubre,
- mastitis crónica que es una inflamación moderada y persistente de la glándula mamaria.

La mastitis aguda es en general una forma clínica mientras que la mastitis crónica es frecuentemente una forma subclínica de la enfermedad. La mastitis subclínica es una forma de mastitis en la que no hay inflamación de la glándula o anomalía que se pueda observar de la leche, si bien hay cambios en la leche, tal como un aumento en el recuento de células somáticas (SCC), que se puede detectar con ensayos especiales. Este tipo de mastitis es con diferencia el más predominante y provoca la mayor pérdida global en la mayor parte de los rebaños. Frecuentemente se denomina como mastitis “oculta”. La mastitis clínica es una forma de mastitis en la que se pueden observar estados anormales y secreción de la ubre. La mastitis clínica leve incluye cambios en la leche tal como copos, coágulos, y una apariencia acuosa o inusual. El calor y la sensibilidad de la ubre son ligeros o ausentes, pero puede haber signos de inflamación. La mastitis clínica grave incluye un comienzo repentino con inflamación del cuarterón infectado que se encuentra caliente, duro y sensible. La leche parece anormal y la producción de leche disminuye. A veces, además de los efectos locales en la ubre, la propia vaca llega a enfermar. Hay indicios de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida de apetito. La combinación de estas condiciones se conoce frecuentemente como mastitis sistémica aguda, debido no sólo se ve afectada la ubre, sino todo el animal.

La cantidad efectiva de inhibidor de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de mastitis será determinada usando técnicas de optimización rutinarias y dependen de la afección particular que se trate, del estado del sujeto, de la vía de administración, de la formulación, y del juicio del facultativo y de otros factores evidentes para los expertos en la técnica. Se puede conseguir una cantidad efectiva mediante dosificación múltiple.

Se pueden administrar composiciones que comprenden un inhibidor de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1 por vía intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, o por infusión intramamaria usando formas conocidas en la técnica farmacéutica. Para administración por vía intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intramamaria se pueden combinar componentes farmacológicos activos con un vehículo adecuado tal como agua, solución salina, dextrosa acuosa, y similares. Formulaciones veterinarias que comprenden un inhibidor de NF- κ B se preparan normalmente mediante mezcla de dicho inhibidor de NF- κ B con un excipiente, diluyente con un excipiente o embebiéndolo dentro de un vehículo que puede estar en forma de una cápsula, bolsa, u otro envase. Cuando el excipiente sirve como un diluyente, este puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido que actúa como un portador, vehículo o medio para el inhibidor de NF- κ B. Ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir de forma adicional: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención se pueden formular para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras administración al huésped mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Las infusiones intramamarias puede estar basadas en aceite, por ejemplo, un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete o un aceite no vegetal tal como aceite mineral y pueden incluir además un agente espesante y de forma opcional también un tensioactivo.

Las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, bolsas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, infusiones, jarabes, aerosoles, ungüentos, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos en envases estériles. Independientemente de la vía de administración seleccionada, estas composiciones se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los inhibidores de NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 1 se pueden usar también en terapia de combinación con antibióticos, seleccionados entre antibióticos beta-lactámicos seleccionados de ampicilina, cloxacilina, hetacilina, nafcilina, penicilina G, penicilina procaína; cefalosporinas seleccionadas de cefoperazona, cefuroxima, cefalonio, cefapirina, cefoxazol, cefracetrilo; antibióticos aminoglucósidos seleccionados de frameticina, neomicina, novobiocina, estreptomycin; antibióticos macrólidos seleccionados de eritromicina; tetraciclinas seleccionadas entre clorotetraciclina, oxitetraciclina; o antibióticos polipeptídicos seleccionados de polimixina B.

Detalles experimentales

Se midió el nivel de actividad de NF- κ B en células de la leche de vacas sanas y afectadas por mastitis aguda y crónica.

A. Medida de actividad de NF- κ B en vacas afectadas por mastitis

1. Animales

Se usaron en este estudio veinte vacas sanas Holstein-Friesian, seis afectadas por mastitis aguda y veinte de mastitis crónica. Las vacas sanas presentaban bajo recuento de células somáticas (SCC) ($<10^5$ células/ml) y estaban exentas de cualquier indicio clínico de mastitis. Las vacas afectadas por mastitis aguda presentaban SCC elevado ($>4 \times 10^5$ células/ml) y mostraban indicios clínicos de enfermedad. Ninguna de las vacas sanas ni las afectadas por mastitis aguda presentaban registros recientes de enfermedad en la ubre, medidos por síntomas clínicos y registros de SCC mensuales. Las vacas afectadas por mastitis crónica presentaban SCC persistentemente elevado ($>4 \times 10^5$ células/ml), determinado por medidas de SCC mensuales, pero estaban exentas de cualquier indicio clínico de la enfermedad. Todas las vacas tenían entre 2 y 7 años de edad, presentaban un número de lactancia que varía de 1 a 5 y estuvieron en periodo de lactancia de 1 a 6 meses. Ninguna de las vacas recibió tratamiento alguno durante el mes anterior a los experimentos.

2. Toma de muestras de leche estéril

Se recogió leche usando un aparato estéril de infusión por cánula al pezón. Este aparato consistía en una cánula estéril y exenta de pirógenos insertada en el canal del pezón y conectada al extremo libre de un dispositivo de infusión unido a una bolsa de recogida estéril de 2000 ml. Se tomaron muestras de leche de un cuarterón. Ante de la toma de muestra, el cuarterón se desinfectó por completo con una solución que contiene 70% de alcohol y 30% de clorohexidina. Inmediatamente tras la toma de muestra de leche se sometió a análisis microbiológico una alícuota de 50 μ l. Las muestras que se encontraba que estaban contaminadas con bacterias se excluían del estudio.

3. Recuento de células somáticas

Inmediatamente tras la recogida de leche, se expidió 50 ml de cada muestra de leche a una laboratorio especializado (Laboratory of the Milk Committee, Battice, Bélgica), donde se llevó a cabo un recuento de células somáticas siguiendo el procedimiento clásico.

4. Aislamiento de células de la leche

Se centrifugaron en primer lugar muestras de leche (300 g) durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron luego los agregados en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron (300 g) durante otros 30 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendieron las células agregadas en 1 ml de PBS antes de la extracción de proteína. Se llevaron a cabo diferenciaciones de células en preparaciones de citospina teñidas con Diff-Quick (Dade Behring, Dudingon, Alemania).

5. Extracción de proteína

Se centrifugaron células de leche aisladas durante 10 minutos a 300 g y se resuspendió el agregado en 600 μ l de tampón de lisis (0,1% de nonidet P-40; Tris HCl 10 mM, pH 7,4; NaCl 10 mM; MgCl₂ 3 mM; EDTA 1 mM; ortovanadato 2 mM; fluorofosfatos de diisopropilo (DFP) 1 mM; 10 μ g/ml de leupeptina; 10 μ g/ml de aprotinina). Se agitaron las células durante 15 segundos, se mantuvieron en hielo durante 5 minutos, y se centrifugaron durante 10 minutos a 300 g. Se resuspendió el agregado resultante en un tampón de KCl (Hepes 10 mM, pH 7,4; KCl 400 mM; glicerol al 10%; EDTA 2 mM; ácido etilenglicol-bis[β -aminoetil-éter]-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) 1 mM; 1% de nonidet P-40, ditiotretitol (DTT) 1 mM; ortovanadato 2 mM; 10 μ g/ml de leupeptina; 10 μ g/ml de aprotinina; DFP 1 mM) y se mantuvo a 4°C durante 10 minutos antes de la centrifugación durante 15 minutos a 12.000 g. Se diluyó el sobrenadante tres veces y se conservó a -80°C hasta el uso.

6. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) de NF- κ B

Se llevaron a cabo reacciones de unión durante 30 minutos a temperatura ambiente con 5 μ g de extractos de proteína total en Hepes 20 mM (pH 7,9), KCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol al 20% (v/v), albúmina de suero bovino acetilada al 1% (p/v), 3 μ g de poli(DI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech, Aylesbury, Reino Unido), DTT 1 mM (ditiotretitol), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 100.000 cpm de sondas de oligonucleótido de doble hebra marcado con ³²P. Se prepararon las sondas mediante hibridación de los oligonucleótidos de hebra simple (Eurogentech, Lieja, Bélgica) a 65°C durante 10 minutos en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, y NaCl 10 mM, seguido de enfriamiento lento hasta temperatura ambiente. Se marcaron las sondas rematando los extremos con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* (Roche, Mannheim, Alemania), con [³²P]dATP y [³²P]dCTP (Dupont-New England Nuclear, Les Ulis, Francia). Se purificaron las sondas marcadas mediante cromatografía de espín sobre columnas de Sephadex G-25 (Roche). Se separaron complejos de ADN-proteína a partir de sonda no unida sobre geles de poliacrilamida nativa al 4% a 150 v en Tris 0,25 M, borato de sodio 0,25 M, y EDTA 0,5 mM, pH 8,0. Se secaron a vacío los geles y se expusieron a película

de rayos x a -80°C durante 12 horas. Se determinó la cantidad de complejos específicos mediante fotodensitometría de la autoradiografía. Para confirmar la especificidad se llevaron a cabo ensayos de competición con un exceso de 50 veces de sondas de tipo natural y mutadas no marcadas. Para los experimentos de superdesplazamiento, se incubó 1,5 µl de cada anticuerpo con los extractos durante 30 minutos antes de la adición de la sonda radiomarcada. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron las siguientes: sonda κB palindrómica de tipo natural, 5'-TTG GCA ACG GCA GGG GAA TTC CCC TCT CCT TAG GTT-3', sonda κB palindrómica mutada, 5'-TTG, GCA ACG GCA GAT CTA TTC CCC TCT CCT TAG GTT-3'.

La actividad de NF-κB se valoró mediante fotodensitometría de las bandas específicas.

7. Resultados

Los complejos de NF-κB activos eran indetectables en células de leche de vacas sanas, determinados por EMSA. Recíprocamente, los extractos de proteína preparados de muestras de leche de vacas afectadas por mastitis aguda demostraron una elevada actividad de NF-κB. En células de leche de vacas que sufren de mastitis crónica la actividad de NF-κB variaba de baja a elevada.

Se llevaron a cabo regresiones lineales para valorar la relación entre el nivel de actividad de NF-κB en células de leche, valorado por fotodensitometría, y el grado de inflamación en la glándula mamaria. Este análisis de regresión demostró una correlación muy significativa ($P < 0,01$) entre actividad de NF-κB y los dos marcadores de inflamación de la ubre, concretamente SCC (figura 1A) y el porcentaje de neutrófilos en muestras de leche (figura 1B).

Este estudio demostró que la actividad de NF-κB se vio aumentada en células de leche de vacas afectadas por mastitis y por tanto se cree que los inhibidores de NF-κB son de uso potencial en el tratamiento de mastitis.

B. Efectos de administración de un inhibidor de NF-κB sobre células de leche obtenidas de vacas afectadas por mastitis crónica

1. Animales

Se usaron en este estudio cuatro vacas Holstein-Friesian afectadas por mastitis crónica. Estas vacas presentaban SCC persistentemente elevado ($>4 \times 10^5$ células/ml), determinado por medidas de SCC mensuales, pero estaban exentas de cualquier indicio clínico de la enfermedad. Ninguna de las vacas recibió tratamiento alguno durante el mes anterior a los experimentos.

2. Toma de muestra de leche estéril

Se recogió leche como se describió anteriormente.

3. Recuento de células somáticas

Inmediatamente tras la recogida de leche, se expidió 50 ml de cada muestra de leche a un laboratorio especializado (Laboratory of the Milk Committee, Battice, Bélgica), donde se llevó a cabo un recuento de células somáticas siguiendo el procedimiento clásico.

4. Aislamiento de células de leche

Se centrifugaron en primer lugar muestras de leche (300 g) durante 30 minutos a 4°C. Luego se lavaron los agregados en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron (300 g) durante otros 30 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendieron las células agregadas en 1 ml de PBS antes de la extracción de proteína. Se llevaron a cabo diferenciaciones de células en preparaciones de citospina teñidas con Diff-Quick (Dade Behring, Dudingén, Alemania).

5. Cultivo y tratamiento de células de leche

Se cultivaron células de leche a 4×10^6 por ml en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica) complementado con glutamina al 1%, suero bovino fetal al 10%, 50 µg/ml de estreptomicina y 50 UI/ml de penicilina. Se incubaron en primer lugar las células a 37°C en una mezcla de 5% de CO₂-95% de aire durante 90 minutos, luego se trató con distintas dosis de inhibidores de NF-κB (15-dPGJ2 a concentraciones de 40 µM, 50 µM, 60 µM y 80 µM; o gliotoxina a una concentración de 1 µl/ml). Se incubaron las células tratadas durante 3 horas antes de la extracción de proteína.

6. Extracción de proteína

Véase el procedimiento descrito anteriormente

7. *Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) de NF- κ B*

Véase el procedimiento descrito anteriormente para la valoración de la actividad de NF- κ B mediante fotodensitometría.

8. *Resultados*

En células de leche no tratada de vacas afectadas por mastitis crónica, se detectó un nivel elevado de actividad de NF- κ B, determinado por EMSA. Recíprocamente, los extractos de proteína preparados de células de leche tratada con 15d-PGJ2 o gliotoxina demostraron una actividad de NF- κ B reducida.

Descripción de los dibujos

Figura 1 muestra la relación entre actividad de NF- κ B específica mostrada por células de leche, determinada por fotodensitometría, y SCC(A) y el porcentaje de neutrófilos (B) en vacas Holstein-Friesian sanas (■, n = 6) y afectadas por mastitis aguda (●, n = 6) y crónica (▲, n = 20). r es el coeficiente de correlación.

Figura 2: 15d-PGJ2 y gliotoxina muestran activación de NF- κ B en células de leche de vacas afectadas por mastitis crónica. Tras aislamiento se incubaron células de leche durante 90 minutos y luego se trataron con las concentraciones indicadas de 15d-PGJ2 y gliotoxina. Se valoraron los extractos de proteína 3 horas después del tratamiento para actividad de unión NF- κ B - ADN mediante EMSA.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de NF- κ B seleccionado de 15d-PGJ2, tepoxalina, cicloepoxidona, (+)-cicloepoxidona, (-)-cicloepoxidona, dietilditiocarbamato de sodio, gliotoxina, MG-132 (N-[(fenilmetoxi)carbonil]-L-leucil-N-[(1S)-formil-3-metilbutil]-L-leucinamida), BAY 11-7082 (3-[[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-sulfonil]-2-propenonitrilo), BAY 11-7085 ((E)-(3-[[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-sulfonil]-2-propenonitrilo) o bortezomib para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la mastitis.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mastitis es mastitis crónica.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mastitis es mastitis aguda.

4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con un antibiótico seleccionado de ampicilina, cloxacilina, hetacilina, nafcilina, penicilina G, penicilina procaína, cefoperazona, cefuroxima, cefalonio, cefapirina, cefoxazol, cefracetrilo, framicitina, neomicina, novobiocina, estreptomina, eritromicina, clorotetraciclina, oxitetraciclina y polimixina B.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de NF- κ B se tiene que administrar por vía intramamaria.

Figura 1: Relación entre actividad de NF- κ B específica mostrada por células de leche, determinada por fotodensitometría, y SCC (A) y el porcentaje de neutrófilos (B) en vacas Holstein-Friesian sanas (■, n = 6) y afectadas por mastitis aguda (●, n = 6) y crónica (▲, n = 20).
r, coeficiente de correlación.

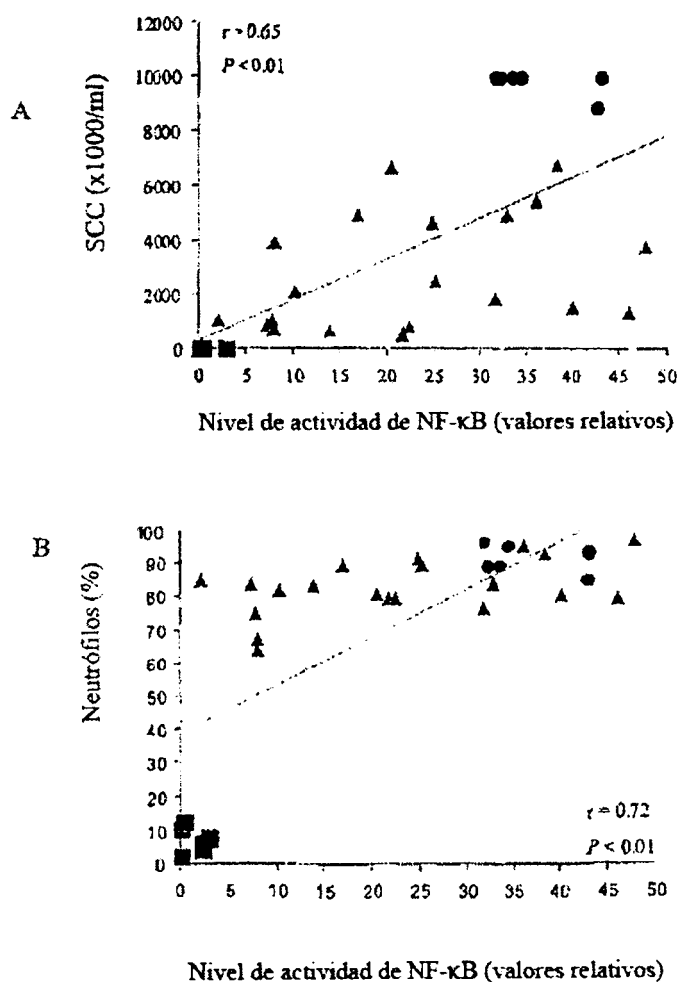


Figura 2: 15d-PGJ2 y gliotoxina inhiben la activación de NF- κ B en células de leche de vacas afectadas por mastitis crónica. Tras aislamiento se incubaron células de leche durante 90 minutos y luego se trataron con las concentraciones indicadas de 15d-PGJ2 y gliotoxina. Se valoraron los extractos de proteína 3 horas después del tratamiento para actividad de unión a ADN de NF- κ B mediante EMSA.

1-3-6: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche no tratada

2: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche tratados con 15-dPGJ2 40 μ M

4: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche tratados con 15-dPGJ2 50 μ M

5: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche tratados con 15-dPGJ2 60 μ M

7: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche tratados con 1 μ g/ml de gliotoxina

8: extractos de proteína obtenidos de neutrófilos de leche tratados con 15-dPGJ2 80 μ M

