

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 964 618**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 36/71** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 15/00** (2006.01)  
**A61P 15/14** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)  
**A61P 31/20** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2019 PCT/CN2019/073239**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019 WO19149156**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2019 E 19746721 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3747445**

---

(54) Título: **Saponina B4 de pulsatilla para el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera**

(30) Prioridad:

**31.01.2018 CN 201810097221**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.04.2024**

(73) Titular/es:

**SICHUAN INLU WEITE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)  
1003, Block N2, Global Center 1700 Tianfu Avenue, North Section, High-tech Zone Chengdu, Sichuan 610000, CN**

(72) Inventor/es:

**YANG, SHILIN y SU, ZHETONG**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

ES 2 964 618 T3

---

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

## DESCRIPCIÓN

Saponina B4 de pulsatilla para el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera

La presente invención se refiere a la saponina B4 de *Pulsatilla* para su uso en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera

**5 Antecedentes**

*Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel es una planta del género *Pulsatilla* de la familia de las Ranunculáceas, cuya principal parte medicinal son sus raíces secas. El registro más antiguo sobre *Pulsatilla* es "Shen Nong's Materia Medica". Tiene un sabor amargo, es de naturaleza fría y vuelve a los meridianos del estómago, el riñón y el intestino grueso. Las principales funciones de la *Pulsatilla* son la reducción de la inflamación, el enfriamiento de la sangre, la detención de la diarrea, la reducción del calor interno, etc. *Pulsatilla* se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de la disentería bacteriana y también tiene buenos efectos terapéuticos sobre los síntomas de escalofríos y fiebre, hinchazón y dolor de ojo. La pulsatilla tiene diversas actividades farmacológicas, principalmente mejorar la capacidad del organismo para reconocer y resistir la invasión de cuerpos extraños, reducir la tasa de proliferación de células tumorales, reducir el número de microorganismos patógenos e inhibir con eficacia la reacción de oxidación de los radicales libres. Entre ellas, la aplicación más posible es el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios y antitumorales.

Feng Xiuzhi *et al.* estudiaron el papel de la pulsatilla en la apoptosis celular y pensaron que la pulsatilla tenía un buen efecto de inducción en las células de cáncer gástrico. Además, la proliferación de células cancerosas y la replicación del ADN están relacionadas con los principios activos de la pulsatilla, que puede inhibir el crecimiento de las células HL260 e inhibir la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7), células de cáncer de pulmón (PG), células de cáncer de colon (SW480), células de glioma maligno (U87MG) y otras células tumorales mediante la inducción de la apoptosis. Li Wenchao *et al.* aplicaron un extracto alcohólico de *Pulsatilla* a diversas bacterias patógenas y estudiaron el efecto antibacteriano de diferentes extractos con disolventes. Se descubrió que todos estos extractos tienen efectos antibacterianos, aunque los efectos son diferentes.

La mastitis de la vaca lechera es una de las tres principales enfermedades de las vacas reconocidas en el mundo. Aparece con frecuencia durante la lactancia. La razón principal de su aparición es una infección microbiana patógena. Otras causas son los procedimientos de ordeño inadecuadas, los daños mecánicos causados por traumatismos y los daños causados por reactivos químicos. La mastitis de la vaca lechera no sólo afecta a la producción de leche y causa pérdidas económicas, sino que también afecta a la calidad de la leche y perjudica a la salud humana.

La mastitis de la vaca lechera puede dividirse en dos categorías principales: mastitis latente y mastitis clínica. La mastitis clínica muestra síntomas clínicos evidentes y cambios visibles en la leche, y puede dividirse en tres grados en función del grado de aparición: Grado 1: leche anómala; Grado 2: leche anómala, la ubre se calienta, duele y se agranda; Grado 3: leche anómala, la ubre se calienta, duele y se agranda, las vacas muestran síntomas de infección sistémica. En la actualidad, la mastitis clínica es el principal objetivo del tratamiento en la práctica clínica. Cuando se detectan vacas con mastitis clínica, es necesario aplicar un tratamiento de aislamiento. La mastitis latente, también conocida como mastitis subclínica, es el tipo más común de mastitis en las vacas lecheras. Este tipo de mastitis no suele presentar ningún síntoma clínico, la diferencia entre su leche y la leche normal no puede distinguirse a simple vista y su diagnóstico requiere reactivos de laboratorio. Además, si este tipo de mastitis no alcanza una determinada proporción en el rebaño, no suele tratarse. Debido a su incidencia oculta, las pérdidas económicas causadas por la mastitis latente a las vacas lecheras son muy graves.

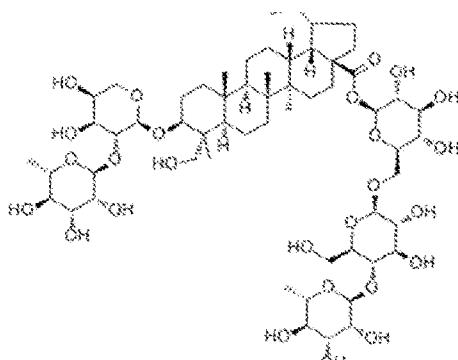
En la actualidad, el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera adopta principalmente procedimientos como la infusión en la ubre y la inyección intravenosa, y los fármacos terapéuticos utilizados son principalmente antibióticos, tales como cefquinoma, enrofloxacina, penicilina, estreptomicina y similares. Sin embargo, el uso prolongado de antibióticos tiene tendencia a provocar la resistencia a los fármacos y afecta al efecto del tratamiento; al mismo tiempo, cuando se utilizan antibióticos para el tratamiento, es fácil que se produzcan residuos de antibióticos, se contaminen las fuentes de leche y se ponga en peligro la salud humana. Cabe señalar que si la mastitis es una infección bacteriana por bacterias gramnegativas, el uso de antibióticos lactámicos destruirá la pared celular y liberará endotoxinas, lo que provoca enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor en toda la zona de la ubre, lo que agravará la afección. Por lo tanto, es de gran importancia descubrir un procedimiento seguro y eficaz para tratar la mastitis de la vaca lechera.

El documento CN107 441 086 A divulga la pulchinenosida B4 (también conocida como saponina B4 de pulsatilla) para su uso como agente antibacteriano. Tinling Inst. Technol., 2006, 22, 95, divulga el uso de un extracto de *Pulsatilla vulgaris* para inhibir las principales bacterias patógenas aisladas de bovinos enfermos.

En la actualidad, no existen informes sobre el uso de la saponina B4 de pulsatilla en el tratamiento de la mastitis en vacas lecheras.

**Resumen de la invención**

Para resolver el problema técnico anterior, la presente invención proporciona la saponina B4 de pulsatilla representada por la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera:

**Fórmula I.**

- 5 La invención proporciona además un medicamento para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera que comprende la saponina de B4 de pulsatilla o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo, y materiales auxiliares farmacéuticamente aceptables.

10 En otro aspecto, el preparado se presenta en forma de inyección, infusión intramamaria, polvo, pomada o loción; preferentemente, la forma es una inyección o una infusión intramamaria; más preferentemente, la forma es una inyección.

En otro aspecto, la mastitis de la vaca lechera es una mastitis clínica o una mastitis latente.

En otro aspecto, la mastitis clínica es una mastitis clínica tratada por primera vez o una mastitis clínica persistente, es decir, una mastitis clínica que ha sido tratada durante mucho tiempo, pero que no se ha curado.

15 El extracto de pulsatilla proporcionado por la presente invención es el compuesto saponina B4 de pulsatilla, y su nombre en inglés es Anemoside B4. Su n.º CAS es 129741-57-7, su fórmula molecular es C<sub>59</sub>H<sub>96</sub>O<sub>26</sub>, su peso molecular es 1221,38 y es un polvo cristalino blanco.

20 En la actualidad, los antibióticos se utilizan principalmente para el tratamiento de la mastitis. Entre ellos, la esterilización de amplio espectro y los antibióticos de ácido nucleico que dañan las células son los más utilizados. Durante el tratamiento y 4 o 5 días después del mismo, es necesario desechar la leche, lo que supone una gran pérdida económica para los ganaderos y el riesgo de que se produzcan resistencias a los medicamentos. La saponina B4 de pulsatilla es un principio activo natural extraído de la hierba medicinal china *Pulsatilla*, no es tóxica ni produce farmacorresistencia. El compuesto saponina B4 de pulsatilla de la presente invención tiene una fuerte actividad biológica y un excelente efecto terapéutico en la mastitis de la vaca lechera. No es necesario desechar la leche durante el tratamiento ni al final del mismo, lo que no sólo reduce las pérdidas económicas de los ganaderos, sino que también disminuye el riesgo de farmacorresistencia. Además, la saponina B4 de pulsatilla no sólo tiene un excelente efecto terapéutico sobre la mastitis clínica, sino que también tiene un excelente efecto terapéutico sobre la mastitis clínica persistente y la mastitis latente. Al mismo tiempo, la inyección de saponina de pulsatilla tiene las ventajas de la seguridad, una alta eficiencia, no produce residuos, no provoca farmacorresistencia y no tiene efectos secundarios ni tóxicos cuando se utiliza en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera.

25 30 Obviamente, de acuerdo con los contenidos de la presente invención mencionados anteriormente, conforme a los conocimientos técnicos normales y los medios técnicos convencionales en la técnica, se pueden realizar diversas formas de modificación, sustitución o alteración sin apartarse de la idea técnica básica de la presente invención mencionada anteriormente.

35 El contenido anterior de la presente invención se describirá con más detalle a continuación mediante realizaciones específicas en forma de ejemplos. La invención se define en las reivindicaciones.

**Dibujos**

La figura 1 es una curva patrón para la determinación del contenido de saponina B4 de pulsatilla.

La figura 2 es una comparación de la leche de vacas que padecen mastitis clínica antes y después del tratamiento con inyecciones de saponina B4 de pulsatilla.

40 La figura 3 es una comparación de la leche de vacas que padecen mastitis clínica antes y después del tratamiento con inyecciones de saponina B4 de pulsatilla.

La figura 4 muestra el resultado del tratamiento del n.º 8558, una vaca que había sido tratada durante mucho tiempo, pero que no se había curado.

La figura 5 muestra el resultado del tratamiento de las vacas con mastitis latente.

### Realizaciones

5 Ejemplo 1: Preparación del compuesto de la presente invención

Se toman 100 kg de material medicinal de *Pulsatilla*, se añade 10 veces la cantidad de etanol al 70 % y se extrae dos veces por calentamiento y reflujo. El extracto se concentra a presión reducida a 75 °C, se centrifuga a 4000r/min durante 10 minutos. El sobrenadante se hace pasar a través de una columna de resina de adsorción macroporosa polar y, a continuación, se eluye secuencialmente con agua, etanol al 30 % y etanol al 70 %. La fracción eluida con etanol al 70 % se concentra a presión reducida a 75 °C y luego se seca por pulverización para obtener 3450 g de totales de extracto de saponina de *Pulsatilla*. Tras disolver el extracto con agua y filtrarlo, el filtrado se carga en un sistema chromatográfico preparativo axial dinámico 200 (cargado con ODS 10 µm), se eluye con metanol al 50 %, se recoge el eluyente correspondiente según el pico chromatográfico, se concentra a presión reducida y se liofiliza para obtener 1700 g de saponina B4 de pulsatilla.

15 Ejemplo 2: Determinación del contenido del compuesto de la presente invención

1. Instrumentos y reactivos

El cromatógrafo líquido de alto rendimiento Agilent 1260 y el detector ultravioleta DAD se adquirieron en Agilent Technologies (China) Co., Ltd., la balanza analítica electrónica BP211D se adquirió en la empresa alemana Sartorius, y el limpiador ultrasónico de control numérico KQ-400DB se adquirió en Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.

20 La muestra de saponina B4 de pulsatilla fue la preparada en el ejemplo 1.

La sustancia de referencia saponina B4 de pulsatilla (número de lote: 111766-201702, contenido: al 94,7 %) se adquirió en los Institutos Nacionales de Control de Alimentos y Medicamentos.

25 2. Condiciones chromatográficas

Columna de cromatografía: SepaxBio-C18 (4,6 × 250mm, 5 µm); fase móvil: metanol-agua (64:36); longitud de onda de detección: 201 nm; caudal: 1,0 ml/min.

30 3. Preparación de la solución de sustancia de referencia

Se pesó con precisión una cantidad adecuada de sustancia de referencia de saponina B4 de pulsatilla, se introdujo en un matraz aforado de 10 ml, se añadió fase móvil para disolverla y se llevó el volumen hasta la marca para obtener la solución de sustancia de referencia (que contiene 1 mg/ml de saponina B4 de pulsatilla).

35 4. Preparación de la solución de muestra

Se pesó con precisión 10 mg de la muestra de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 1, se introdujo en un matraz aforado de 10 ml, se añadió fase móvil para disolver y se llevó el volumen a la marca para obtener la solución de muestra.

40 5. Determinación

35 Se midió con precisión 20 µl de la solución de referencia y de la solución de muestra, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, se registró el cromatograma y se calculó el contenido según el procedimiento del patrón externo.

6. Curva patrón y ecuación de regresión lineal

40 Se tomó la sustancia de referencia saponina B4 de pulsatilla, se pesó con precisión y se introdujo en un matraz aforado de 10 ml, se añadió fase móvil para disolver, se llevó el volumen a la marca para preparar soluciones de sustancia de referencia con concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml y 20 mg/ml, respectivamente. Se midió con precisión 20 µl de cada solución y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos, y se registró el cromatograma.

Tabla 1. Ecuación de regresión lineal para la determinación del contenido de sustancia de referencia saponina B4 de pulsatilla

Muestra	Concentración (mg/ml)	Área del pico	Ecuación de regresión
1	0,98488	115,7	Y = 100,07 + 10,721 R = 0,9999

Muestra	Concentración (mg/ml)	Área del pico	Ecuación de regresión
2	4,92440	529,5	
3	9,84880	1057,8	
4	14,77320	1560,3	
5	19,69760	2097,9	

Se puede observar a partir de los resultados experimentales que la saponina B4 de pulsatilla tiene una buena relación lineal en el intervalo de concentraciones de 1,04-20,80 mg/ml,  $R = 0,9999$ , y es adecuada para la determinación del contenido de saponina B4 de pulsatilla.

5 7. Determinación del contenido de la muestra de saponina B4 de pulsatilla

Según el procedimiento descrito en el punto "3" anterior, se pesaron con precisión 2 partes de sustancia de referencia saponina B4 de pulsatilla, de 10 mg cada una, se introdujeron en un matraz aforado de 10 ml, se añadió fase móvil para disolver y se llevó el volumen hasta la marca para obtener la solución de referencia 1 y la solución de referencia 2.

10 Según el procedimiento descrito en el punto "4" anterior, se pesaron con precisión 2 partes de la muestra de saponina B4 de pulsatilla, de 10 mg cada una, se introdujeron en un matraz aforado de 10 ml, se añadió fase móvil para disolver y se llevó el volumen hasta la marca para obtener la solución de muestra 1 y la solución de muestra 2.

Según las condiciones cromatográficas anteriores, se midieron con precisión 20  $\mu$ l de cada solución, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos y se registró el cromatograma.

15 Tabla 2. Resultados de la determinación del contenido de saponina B4 de pulsatilla

Muestra	Peso (mg)	Área del pico	Conc. (mg/ml)	Contenido (%)	Contenido promedio (%)	
Solución de referencia 1	10,22	1039,6	0,968	//	//	
		1044,4				
Solución de referencia 2	10,05	1025,6	0,952	//	//	
		1022,5				
Solución de muestra 1	10,13	1081,8	1,013	99,7	99,4	
		1092,6				
Solución de muestra 2	10,10	1075,1	1,010	99,1		
		1079,2				

Según los resultados del ensayo, el contenido de saponina B4 de pulsatilla obtenido en este experimento fue del 99,4 %.

Ejemplo 3: Preparación de una inyección de saponina B4 de pulsatilla

20 1) Formulación: Solución inyectable de 1000 ml preparada a partir de 50 g de saponina B4 de pulsatilla con agua.

2) Procedimiento de preparación: Se pesaron 50 g de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 1, se añadieron 800 ml de agua para inyección para disolverla completamente, se filtró, se ajustó el pH a 7,0,

se añadió agua para inyección hasta un volumen de 1000 ml, se filtró con malla fina, se introdujo en un recipiente, se selló y se esterilizó a 100 °C durante 30 min.

Ejemplo 4: Preparación del polvo de saponina B4 de pulsatilla

1) Formulación: 1000 gramos de polvo de saponina B4 de pulsatilla.

- 5 2) Procedimiento de preparación: Se pesaron 1000 g de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 1, se pulverizaron hasta obtener un polvo fino, que se hizo pasar a través de un tamiz de malla 100 y se mezcló bien.

Ejemplo 5: Preparación de una infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla

1) Formulación: 1000 ml de infusión intramamaria preparados a partir de 50 g de saponina B4 de pulsatilla.

- 10 2) Procedimiento de preparación: Se pesaron 50 g de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 1, se añadieron 800 ml de agua destilada para disolverla completamente, se filtró, se ajustó el pH a 7,0, se añadió agua destilada hasta un volumen de 1000 ml, se filtró con malla fina, se introdujo en un recipiente, se selló y se esterilizó a 100 °C durante 30 min.

Los efectos beneficiosos de la presente invención se describirán a continuación mediante ejemplos de ensayo.

- 15 Ejemplo de ensayo 1: Efectos de diferentes vías de administración del compuesto de la presente invención sobre el efecto terapéutico en la mastitis de la vaca lechera

Las vías de administración actuales para tratar la mastitis incluyen la infusión en la ubre, la inyección intramuscular y la inyección intravenosa.

- 20 Entre ellas, la infusión en la ubre es la vía de administración más habitual. Los fármacos terapéuticos se inyectan directamente en la zona de la ubre afectada a través del pezón para lograr el efecto de la administración local y la terapia de precisión. En la actualidad, existe una gran diversidad de preparados farmacéuticos en el mercado para la infusión en la ubre, tales como Aonaikang (澳乃康, infusión intramamaria de sulfato de cefquinoma) de Eastern Along Pharmaceutical Co., Ltd., Ruchang (inyección de cefotifur) de Pfizer, etc.

- 25 La inyección intramuscular consiste en inyectar fármacos en el tejido muscular de los animales, de modo que los fármacos lleguen a la zona de la ubre afectada a través de la circulación sanguínea y ejerzan el efecto terapéutico. La inyección intramuscular es fácil de administrar y puede controlar hasta cierto punto los síntomas de inflamación sistémica y fiebre causados por la mastitis.

- 30 La inyección intravenosa consiste en inyectar el fármaco directamente en la sangre venosa del animal, de modo que los fármacos lleguen a la zona de la ubre afectada a través de la circulación sanguínea. Mediante la inyección intravenosa, el fármaco llega rápidamente al lugar de acción y puede tratar síntomas sistémicos. Sin embargo, la inyección intravenosa tiene determinados requisitos para las propiedades del fármaco, que no puede ser una suspensión y debe causar poca irritación de los vasos sanguíneos. Bayer (Alemania) recomienda el tratamiento de la mastitis mediante la inyección intravenosa de su producto Baytrli (enrofloxacina), que puede alcanzar una mayor concentración en la zona de la ubre afectada y ejercer allí el efecto terapéutico y, al mismo tiempo, controlar las infecciones sistémicas.

- 35 Las tres vías de administración anteriores para el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera tienen sus propias ventajas y desventajas. Este ensayo pretende explorar el efecto terapéutico de la saponina B4 de pulsatilla en la mastitis de la vaca lechera y la vía de administración más adecuada. Los resultados de este estudio proporcionarán una referencia importante para conseguir que la saponina B4 de pulsatilla ejerza el mejor efecto terapéutico y para el futuro desarrollo y envasado del fármaco.

40 1. Fármacos de ensayo

Inyección de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 3 a una concentración de 50 mg/ml; infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla preparada en el ejemplo 5 a una concentración de 50 mg/ml.

- 45 Control positivo: Infusión intramamaria de sulfato de cefquinoma, 8 g/unidad (Eastern Along Pharmaceutical Co., Ltd., Nanhai, Foshan).

2. Animales de ensayo

Se seleccionaron 130 vacas enfermas (mastitis clínica de grado 2) y se dividieron aleatoriamente en 13 grupos con 10 vacas en cada grupo.

3. Posología y modo de administración

Tabla 3. Posología y modo de administración

Grupo	Dosis (ml/área afectada de la ubre/tiempo)	Modo de administración
Grupo de control en blanco	Solución salina normal	/
Grupo de control positivo	1 pieza	Infusión intraductal
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis baja	10	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis intermedia	20	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis alta	30	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis baja	40	Inyección intravenosa
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis intermedia	60	Inyección intravenosa
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis alta	80	Inyección intravenosa
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis baja	20	Infusión intraductal
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis intermedia	30	Infusión intraductal
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis alta	40	Infusión intraductal

5 Administración por inyección intramuscular en la zona afectada de la ubre: Se utiliza una inyección de saponina B4 de pulsatilla para la inyección intramuscular local en la zona de la ubre afectada, una vez cada mañana y cada noche durante 7 días;

10 Administración por inyección intravenosa: La inyección de saponina B4 de pulsatilla se administra por vía intravenosa una vez al día durante 7 días;

15 Administración por infusión intramamaria: La infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla y el control positivo (infusión intramamaria de sulfato de cefquinoma) se administran mediante infusión intraductal en la zona de la ubre afectada, una vez cada mañana y cada noche durante 7 días.

Cada vía de administración de la saponina B4 de pulsatilla de la presente invención se suministra con un grupo de control en blanco, que se administra con solución salina normal al mismo volumen.

#### 4. Guía de evaluación

15 Antes de cada administración, comprobar la temperatura corporal de la vaca, la respiración, el estado mental, el estado de alimentación y otros indicadores para observar los cambios en la ubre y la leche.

Completamente curada: Los síntomas clínicos, tales como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor en la zona de la ubre afectada, desaparecieron por completo y la lactancia volvió a la normalidad.

Clínicamente curada: Los síntomas clínicos, tales como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor en la zona de la ubre afectada, desaparecieron sustancialmente y la lactancia volvió sustancialmente a la normalidad.

Inválido: La ausencia de mejoría significativa o incluso el empeoramiento de los síntomas clínicos en la zona de la ubre afectada, o la reaparición en las dos semanas siguientes a la retirada del fármaco, se consideran inválidos.

La tasa de curación se calcula como sigue:

$$\text{Tasa de curación} = \frac{\text{número de vacas completamente curadas} + \text{número de vacas clínicamente curadas}}{\text{número de vacas en el grupo experimental}} \times 100 \%$$

## 5 5. Resultados

Tabla 4. Tasa y tiempo de curación de la mastitis de vacas lecheras tratadas por diferentes vías de administración

Grupo	Tasa de curación (%)	Tiempo de curación
Grupo de control en blanco	0	/
Grupo de control positivo	60	5-7
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis baja	50	5-7
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis intermedia	60	5-6
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis alta	80	4-6
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis baja	40	5-7
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis intermedia	60	5-6
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intravenosa, grupo de dosis alta	70	4-7
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis baja	40	6-7
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis intermedia	50	5-6
Infusión intramamaria de saponina B4 de pulsatilla, grupo de dosis alta	70	4-7

10 La tasa de curación total y el tiempo de curación de las saponinas B4 de pulsatilla administradas a través de diferentes vías de administración se muestran en la tabla 4. Todas las vías de administración tienen efectos significativos en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera, y las tasas de curación del grupo de dosis alta de cada vía de administración son superiores a las del control positivo (infusión intramamaria de sulfato de cefquinoma). Entre ellas, la inyección intramuscular de saponina B4 de pulsatilla tiene el mejor efecto curativo y el periodo de tratamiento más corto.

15 Ejemplo de ensayo 2: Estudio de la saponina B4 de pulsatilla de la presente invención en el tratamiento de la mastitis clínica

### 1. Fármacos de ensayo

Inyección de saponina B4 de pulsatilla preparada por el procedimiento de preparación del ejemplo 3 a una concentración de 50 mg/ml; fármaco de control: inyección de SHUANGDING (双丁注射液) (10 ml/unidad, número de lote: DV3180701), Hebei Yuanzheng Pharmaceutical Co.

### 20 2. Animales de ensayo

Se seleccionaron 60 vacas Holstein chinas con un peso aproximado de  $612 \pm 47$  kg, de 3 a 5 años de edad, paridad de 2 a 4, sanas en el examen clínico y con mastitis clínica natural durante el periodo de lactancia y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, 12 en cada grupo.

### 3. Procedimiento de ensayo

#### 5 3.1 Posología y modo de administración

Tabla 5. Posología y modo de administración

Grupo	Dosis (ml/kg de peso corporal)	Modo de administración
Grupo de control en blanco	Solución salina normal	Inyección intramuscular
Grupo de control positivo de fármacos	0,1	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis baja	0,025	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis intermedia	0,05	Inyección intramuscular
Inyección de saponina B4 de pulsatilla, inyección intramuscular, grupo de dosis alta	0,1	Inyección intramuscular

Tras reunir las vacas de ensayo, se registró el día anterior a la administración como D0. Se calculó la cantidad de dosis en función del peso corporal de acuerdo con la sustancia a administrar y la dosis prediseñadas (tabla 5). A partir del día D1, se administró a cada grupo de vacas con mastitis clínica el fármaco de ensayo (inyección de saponina B4 de pulsatilla) o el fármaco de control (inyección de SHUANGDING) mediante inyección intramuscular, una vez al día

10 durante 4 a 7 días, en función de la curación de la enfermedad. Se observaron los síntomas clínicos de las vacas de cada grupo antes y después de la administración del fármaco (D0-D12), se puntuaron según la norma (véase la tabla 6 para más detalles) y registraron la dosis. Al final de la prueba (D12), en función de los resultados de la observación de los indicadores anteriores, se juzgó el efecto terapéutico en cada vaca según la norma, y se calcularon la tasa de curación y la tasa efectiva de cada grupo de vacas.

#### 15 3.2 Norma de puntuación de los síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis clínica

En D0 (después de la revelación de la mastitis clínica, antes de la administración), D1 (después de la primera administración, antes de la segunda administración), D2-D7 (en las vacas curadas se retira el fármaco, y las vacas no curadas continúan recibiendo el fármaco), D8-D12 (se retira el fármaco de todas las vacas), se comprobaron con regularidad los síntomas clínicos y los síntomas de la ubre de cada vaca, tales como el estado mental, el apetito y la sed, etc., y se puntuaron según la siguiente tabla (ver tabla 6). Se registraron los síntomas clínicos (puntuación local de los síntomas de la ubre).

20 Tabla 6. Norma de puntuación de los síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis clínica

Observaciones	Puntuación	Norma de puntuación
Estado mental	0	Bueno
	1	Ligeramente malo
	2	Excitada o deprimida
	3	Tumbada en el suelo o incluso comatosa
Apetito y sed	0	Mucho apetito; sed moderada

Observaciones	Puntuación	Norma de puntuación
	1	Alimentación ligeramente reducida; sed ligeramente disminuida o aumentada
	2	Reducción significativa de la alimentación; disminución o aumento grave de la sed
	3	Pérdida de apetito; bebe mucha agua o no bebe
Capacidad de lactancia	0	Producción normal de leche
	1	Reducción de la producción de leche
	2	Reducción significativa de la producción de leche
	3	Lactancia casi ausente
Características de la leche	0	Características normales de la leche
	1	La leche tiene una pequeña cantidad de copos y coágulos
	2	Presencia de muchos coágulos en la leche
	3	La leche tiene restos de sangre, pus y un olor evidente
Síntomas locales de la ubre	0	Normal
	1	Enrojecimiento e hinchazón leves, sin reacción evidente de dolor por calor a la palpación
	2	Enrojecimiento e hinchazón moderados, con reacción de dolor por calor a la palpación
	3	Enrojecimiento e hinchazón graves, reacción evidente de dolor por calor a la palpación

### 3.3 Procedimiento de detección del número de células somáticas en la leche de vaca

Se recoge la leche de las vacas que padecen mastitis clínica los días D0, D7 y D12 del ensayo, se detectan y se registran el número de células somáticas.

### 5 3.4 Evaluación de la eficacia

A juzgar por la puntuación del examen de síntomas clínicos

*Tasa de curación diaria del tratamiento en los días 2 a 7:* A partir de D2, si la vaca que padece mastitis satisface "la suma de puntuaciones < 1", se considera que el tratamiento ha logrado la curación. Tasa de curación diaria del tratamiento en

$$10 \quad \text{Días } 2 - 7 = \frac{\text{número de vacas curadas en los días } 2 - 7}{\text{número de vacas en el grupo experimental}} \times 100 \%$$

; la tasa de curación en 7 días es la suma de la tasa de curación diaria del tratamiento en los días 2 a 7.

*Tasa diaria efectiva de tratamiento en los días 2 a 7:* A partir de D2, si la vaca que sufre mastitis satisface "1 ≤ la suma de puntuaciones ≤ 2", el tratamiento se considera eficaz. Tasa diaria efectiva de tratamiento en

$$\text{Días } 2 - 7 = \frac{\text{número de vacas tratadas eficazmente en los días } 2 - 7}{\text{número de vacas en el grupo experimental}} \times 100 \%$$

; la tasa efectiva en 7 días es la suma de la tasa diaria efectiva de tratamiento en los días 2 a 7.

**Tasa de recurrencia:** Durante el período comprendido entre D5 y D12, si la vaca enferma considerada como tratada con éxito satisface "la suma de las puntuaciones > 2" tras la retirada del fármaco, se considera como recidiva.

$$\text{Tasa de recurrencia} = \frac{\text{número de vacas en recidiva después de haber sido tratadas con éxito}}{\text{número de vacas tratadas con éxito}} \times 100 \%$$

5

**Tasa de curación del tratamiento en el día 12 (tasa de curación total):** En el D12, si la vaca que padece mastitis satisface "la suma de puntuaciones < 1", se considera curada en el día 12. La tasa de curación en el día 12

$$= \frac{\text{número de vacas curadas en el días 12}}{\text{número de vacas en el grupo experimental}} \times 100 \%$$

10 **Tasa efectiva de tratamiento el día 12 (tasa efectiva total):** En D12, si la vaca que sufre mastitis satisface "1 ≤ la suma de las puntuaciones ≤ 2", el tratamiento se considera eficaz. La tasa efectiva en

$$\text{Día 12} = \frac{\text{número de vacas tratadas eficazmente en el día 12}}{\text{número de vacas en el grupo experimental}} \times 100 \%$$

15 Con la tasa de curación como indicador principal, y la eficacia, la puntuación de los síntomas clínicos y el número de células somáticas como indicadores secundarios, se evaluó exhaustivamente el efecto terapéutico del fármaco de ensayo (inyección de saponina B4 de pulsatilla) sobre la mastitis clínica de vacas infectadas naturalmente, y se comparó con el efecto terapéutico del fármaco de control (inyección de SHUANGDING) para determinar la dosis clínica recomendada del fármaco de ensayo.

#### 4. Resultados de los ensayos

##### 4.1 Resultados del tratamiento de las vacas con mastitis clínica en cada grupo

20 A partir de la tabla 7 se puede observar que, cuando se utiliza la inyección de saponina B4 de pulsatilla para tratar la mastitis clínica en vacas lecheras, independientemente de la dosis baja, intermedia o alta, la tasa de curación en 7 días y la tasa de curación total son superiores a las del grupo de control que utiliza la inyección de SHUANGDING, y el tiempo promedio de curación es más corto que el del grupo de control, lo que indica que la inyección de saponina B4 de pulsatilla es superior a la inyección de SHUANGDING en el tratamiento de la mastitis clínica. La tasa de curación total del grupo de dosis alta es superior a la de los grupos de dosis intermedias y baja. La tasa de curación total del grupo de dosis intermedia es la misma que la del grupo de dosis baja, pero no hay recurrencia, y el tiempo promedio de curación es más corto que el del grupo de dosis baja, lo que demuestra una cierta relación de dosis-efecto.

25

Tabla 7. Resultados de los efectos terapéuticos de las vacas con mastitis clínica en cada grupo

Grupo	Tasa de curación en 7 días	Tasa de recurrencia	Tasa de curación total	Tasa efectiva total	Tiempo promedio de curación
Grupo de dosis baja	83,33 %	8,33 %	75,00 %	100 %	6,33 días
Grupo de dosis intermedia	66,67 %	0	75,00 %	100 %	6,11 días
Grupo de dosis alta	75,00 %	0	91,67 %	100 %	6,91 días
Grupo de control	41,67 %	0	58,33 %	66,67 %	7,00 días

##### 4.2 Puntuación del examen de los síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis en cada grupo

30 A partir de la tabla 8 puede observarse que la puntuación del examen de síntomas clínicos de vacas lecheras con mastitis en el grupo de dosis baja no fue significativamente diferente entre DO-D4 y entre D5-D12 ( $p > 0,05$ ), pero fue significativamente diferente entre D5-D12 y DO-D2, entre D7-D12 y DO-D4 ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, en el grupo de dosis baja, las vacas con mastitis mejoraron significativamente en D5 y se curaron significativamente en D7. La puntuación del examen de los síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis en el grupo de dosis intermedia no fue significativamente diferente entre DO-D1, entre D2-D5 y entre D4-D12 ( $p > 0,05$ ), pero fue significativamente diferente entre D3-D12 y DO-D2, entre D6-D12 y DO-D3 ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, en el grupo de dosis intermedia, las vacas mejoraron significativamente en D3 y se curaron significativamente en D6. La puntuación del examen de los

35

5 síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis en el grupo de dosis alta no fue significativamente diferente entre DO-D3, entre D1-D5, entre D3-D6 y entre D7-D12 ( $p > 0,05$ ), pero fue significativamente diferente entre D4-D12 y D0, entre D6-D12 y DO-D2, y entre D7-D12 y DO-D6 ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, en el grupo de dosis alta, las vacas con mastitis generalmente empezaron a mejorar en D4, el número de vacas curadas aumentaron significativamente en D6 y algunas vacas se curaron en D7. La puntuación del examen de los síntomas clínicos de las vacas lecheras con mastitis en el grupo de control no fue significativamente diferente entre DO-D4, entre D2-D6 y entre D3-D12 ( $p > 0,05$ ), pero fue significativamente diferente entre D5-D12 y DO-D4, y entre D7-D12 y DO-D6 ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, en el grupo de control, las vacas mejoraron en D5 y un determinado número de vacas se curaron en D7.

10 La puntuación del examen de los síntomas clínicos del grupo de dosis intermedia en D0 fue significativamente más alta que la del grupo de dosis baja y el grupo de dosis alta ( $p < 0,05$ ), lo que indica que la enfermedad de las vacas del grupo de dosis intermedia era más grave; la puntuación del examen de los síntomas clínicos del grupo de dosis intermedia en D1 fue significativamente más alta que la de los otros 3 grupos ( $p < 0,05$ ), la puntuación del examen de los síntomas clínicos del grupo de dosis intermedia en D2 fue significativamente más alta que la del grupo de dosis baja y el grupo de dosis alta ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, en la fase temprana del tratamiento, el grupo de dosis intermedia mostraba un efecto evidente de mejoría de los síntomas clínicos de las vacas con mastitis; las diferencias en la puntuación del examen de los síntomas clínicos de vacas entre los cuatro grupos en D3-D5 y D7 no fueron significativas ( $p > 0,05$ ); la puntuación del examen de los síntomas clínicos de las vacas del grupo de control en D12 fue significativamente superior a la del grupo de dosis alta ( $p < 0,05$ ), lo que indica que el efecto terapéutico del grupo de control es inferior al del grupo de tratamiento con *Pulsatilla*.

15

20 Tabla 8. Puntuación del examen de síntomas clínicos de las vacas lecheras de cada grupo

G	N	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D12
B	1	1,58 ± 0,6	1,42 ± 0,5	1,17 ± 0,5	1,08 ± 0,2	1,08 ± 0,2	0,83 ± 0,5	0,83 ± 0,8	0,33 ± 0,8	0,50 ± 1,0
	2	7 <sup>A</sup> <sub>B</sub>	1 <sup>A</sup> <sub>B</sub>	8 <sup>AB</sup> <sub>B</sub>	9 <sup>AB</sup> <sub>A</sub>	9 <sup>AB</sup> <sub>A</sub>	8 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	3 <sup>BC</sup> <sub>AB</sub>	9 <sup>C</sup> <sub>A</sub>	0 <sup>C</sup> <sub>AB</sub>
I	1	2,92 ± 2,1	2,67 ± 1,6	2,17 ± 1,1	1,42 ± 0,9	1,08 ± 0,6	1,00 ± 0,7	0,50 ± 0,5	0,33 ± 0,4	0,25 ± 0,4
	2	1 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	1 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	1 <sup>AB</sup> <sub>A</sub>	0 <sup>B</sup> <sub>A</sub>	7 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	4 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	2 <sup>C</sup> <sub>B</sub>	9 <sup>C</sup> <sub>A</sub>	5 <sup>C</sup> <sub>AB</sub>
A	1	1,50 ± 0,6	1,33 ± 0,6	1,42 ± 0,6	1,17 ± 0,5	1,00 ± 0,4	1,00 ± 0,6	0,83 ± 0,5	0,33 ± 0,6	0,08 ± 0,2
	2	7 <sup>A</sup> <sub>B</sub>	5 <sup>AB</sup> <sub>B</sub>	7 <sup>AB</sup> <sub>B</sub>	8 <sup>ABC</sup> <sub>A</sub>	3 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	0 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	8 <sup>C</sup> <sub>AB</sub>	5 <sup>D</sup> <sub>A</sub>	9 <sup>D</sup> <sub>B</sub>
C	1	2,08 ± 0,6	1,83 ± 0,7	1,75 ± 0,7	1,50 ± 0,6	1,42 ± 0,9	1,33 ± 0,7	1,17 ± 0,8	0,92 ± 1,0	0,92 ± 1,2
	2	7 <sup>A</sup> <sub>AB</sub>	2 <sup>AB</sup> <sub>B</sub>	5 <sup>AB</sup> <sub>AB</sub>	7 <sup>ABC</sup> <sub>A</sub>	0 <sup>ABC</sup> <sub>A</sub>	8 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	3 <sup>BC</sup> <sub>A</sub>	0 <sup>C</sup> <sub>A</sub>	4 <sup>C</sup> <sub>A</sub>

Nota: "G" significa "Grupo", "N" significa "Número de reses", "B" significa "Grupo de dosis baja", "I" significa "Grupo de dosis intermedia", "A" significa "Grupo de dosis alta"; "C" significa "Grupo de control"; y

25 En la misma línea, los superíndices con letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), y los superíndices con las mismas letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); en la misma columna, los subíndices con letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), y los subíndices con las mismas letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Lo mismo puede decirse de la tabla siguiente.

#### 4.3 Resultados de la detección de células somáticas en la leche de vaca de cada grupo

Tabla 9. Resultados de la detección de células somáticas en la leche de vacas curadas de cada grupo ( $10^{4/ml}$ )

Grupo	Número de reses	D0	D7	D12
Grupo de dosis baja	9	255,8 ± 38,9 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	90,5 ± 55,8 <sup>B</sup> <sub>AB</sub>	47,5 ± 35,6 <sup>B</sup> <sub>AB</sub>
Grupo de dosis intermedia	9	244,6 ± 42,0 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	65,8 ± 51,5 <sup>B</sup> <sub>B</sub>	38,1 ± 23,0 <sup>B</sup> <sub>B</sub>
Grupo de dosis alta	11	310,6 ± 132,4 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	182,3 ± 151,7 <sup>B</sup> <sub>A</sub>	48,8 ± 58,9 <sup>C</sup> <sub>AB</sub>

Grupo	Número de reses	D0	D7	D12
Grupo de control	7	267,9 ± 123,7 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	180,7 ± 119,2 <sup>A</sup> <sub>A</sub>	88,8 ± 67,4 <sup>B</sup> <sub>A</sub>

A partir de la tabla 9 se puede observar que las células somáticas en la leche de las vacas de cada grupo mostraron una tendencia descendente en D0-D7. La diferencia entre D7 y D12 en el grupo de dosis baja, el grupo de dosis intermedia y el grupo de control no fue significativa, pero D7 fue significativamente diferente de D0, lo que indica que,

5 con el tratamiento del fármaco, las células somáticas de la leche mejoraron significativamente en D7 y no se recuperó después. En el grupo de dosis altas, D0, D7 y D12 fueron significativamente diferentes, lo que, por un lado, demostraba una mejora significativa de las células somáticas de la leche y, por otro, también estaba relacionado con el mayor tiempo medio de curación de las vacas de este grupo. La diferencia en las células somáticas de la leche de los cuatro grupos de vacas en D0 no fue significativa, lo que indica que, desde el punto de vista de las células somáticas de la leche, las vacas de cada grupo presentaban un estado similar de la enfermedad en el momento de la aparición.

10 En D7, las células somáticas de la leche de las vacas del grupo de dosis intermedia eran significativamente inferiores a las del grupo de dosis alta y el grupo de control, lo que estaba relacionado con el menor tiempo medio de curación del grupo de dosis intermedia. En D12, las células somáticas de la leche de las vacas del grupo de control fueron significativamente superiores que las del grupo de dosis intermedia, lo que indica que el efecto terapéutico de la inyección de saponina B4 de pulsatilla en la mastitis de la vaca lechera es mejor que la inyección de SHUANGDING.

15

A partir del efecto terapéutico de la inyección de saponina B4 de pulsatilla en la mastitis clínica de vacas lecheras, el número de células somáticas de la leche, la tasa de curación clínica y las observaciones del ensayo de curación, se puede observar que todas las inyecciones de saponina B4 de pulsatilla con diferentes concentraciones tienen un efecto terapéutico evidente en la mastitis clínica de la vaca lechera, y el efecto es mejor que el control positivo de la inyección de SHUANGDING. Además, la inyección de saponina B4 de pulsatilla no es tóxica ni produce farmacorresistencia, y no es necesario desechar la leche durante el tratamiento ni al final del mismo, lo que no sólo reduce las pérdidas económicas de los ganaderos, sino que también reduce el riesgo de farmacorresistencia.

20 Las figuras 2 y 3 muestran la comparación de la leche de vacas con mastitis clínica antes y después del tratamiento con inyecciones de saponina B4 de pulsatilla. Tal como puede observarse en las figuras 2 y 3, en el primer día de tratamiento, las vacas con mastitis clínica tenían más flóculos en la leche. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento, los flóculos disminuyen gradualmente y la leche vuelve poco a poco a la normalidad. Después del sexto día de tratamiento, la leche volvió a la normalidad. Esto demuestra que las inyecciones de saponina B4 de pulsatilla tienen un efecto significativo en el tratamiento de la mastitis clínica y en la mejora de la calidad de la leche.

25

30 Ejemplo de ensayo 3: Estudio de la saponina B4 de pulsatilla de la presente invención en el tratamiento de la mastitis clínica persistente y la mastitis latente

#### 1. Fármacos de ensayo

Inyección de saponina B4 de pulsatilla preparada por el procedimiento de preparación del ejemplo 3 a una concentración de 50 mg/ml;

#### 2. Vacas de ensayo

35 En el ensayo se seleccionaron 8 vacas que padecían mastitis clínica en la granja lechera de Shijiazhuang Tianquan Dairy Cows Co., Ltd. Estas 8 vacas habían sido tratadas durante aproximadamente un mes, pero no se habían curado (2 de ellas estaban casi secas, es decir, casi no producían leche). Estas 8 vacas habían sido tratadas por veterinarios de la granja, y los fármacos y procedimientos de tratamiento incluyeron infusión intramamaria de sulfato de cefquinoma en la ubre, inyección intravenosa de céfalosporinas y sonda oral con Gongying San (公英散), etc.

40 El ensayo seleccionó al azar 6 vacas con mastitis latente en la granja lechera Tianquan, todas las cuales tenían al menos una zona de la ubre de "++" o superior en la última prueba LMT realizada por el veterinario.

#### 3. Contenido del ensayo

Estudiar el efecto de la inyección de saponina B4 de pulsatilla sobre la mastitis clínica persistente y el efecto de la inyección de saponina B4 de pulsatilla sobre la mastitis latente.

#### 45 4. Fármacos de ensayo, dosis y modo de administración

En el ensayo, la inyección de saponina B4 de pulsatilla preparada por el procedimiento de preparación del ejemplo 3 se utilizó para tratar 6 vacas con mastitis clínica persistente y 2 vacas con mastitis clínica persistente y próximas a secarse. Independientemente del número de zonas de la ubre inflamadas, se administró una inyección intramuscular (60 ml) una vez al día.

Para 6 vacas seleccionadas al azar con mastitis latente, sin importar cuántas zonas de la ubre estuvieran inflamadas, se aplicó una inyección intramuscular (30 ml) una vez al día.

Tabla 10. Fármacos de ensayo, dosis y modo de administración

Vaca de ensayo	Número de reses	Volumen de inyección	Modo de administración
Mastitis clínica persistente	6	60 ml	Inyección intramuscular, una vez al día
Casi seca	2	60 ml	Inyección intramuscular, una vez al día
Mastitis latente	6	30 ml	Inyección intramuscular, una vez al día
Total	15	//	Inyección intramuscular, una vez al día

## 5 5. Resultados de los ensayos

### 5.1 Resultado del tratamiento de vacas con mastitis clínica persistente

En el ensayo, se seleccionaron y trajeron 8 vacas con mastitis clínica y que llevaban mucho tiempo sin alcanzar la curación. Después de 3 administraciones, cuatro vacas se curaron, una vaca mejoró significativamente y una vaca no mostró ningún efecto significativo; no fue eficaz para dos vacas próximas a secarse. Los resultados del estudio demostraron que la saponina B4 de pulsatilla tiene buenos efectos en la mastitis de la vaca lechera para las que el tratamiento con antibióticos u otros medios no es eficaz.

Resultados del tratamiento en algunas vacas que llevaban mucho tiempo sin alcanzar la curación: En el caso de la vaca con una marca auricular numerada 8558, la leche de la vaca antes del tratamiento era poco espesa y contenía una pequeña cantidad de flóculos, y el resultado de la prueba LMT fue "+++", tras una única inyección intramuscular de 60 ml de saponina B4 de pulsatilla, no había flóculos visibles en la leche y el color de la leche era ligeramente amarillo. Tras la segunda administración, la leche volvió a la normalidad, y el resultado de la prueba LMT realizada por el veterinario fue "+". A continuación, el veterinario trasladó la vaca al establo.

La figura 4 muestra el tratamiento de la vaca numerada 8558, que llevaba mucho tiempo sin alcanzar la curación. La figura 4 demuestra que, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, la secreción de leche de la vaca 8558 se normaliza gradualmente. Después de 2 tandas de administración, la leche volvió a la normalidad y la vaca estaba clínicamente curada.

### 5.2 Tratamiento de las vacas con mastitis latente

Según los resultados de la prueba LMT del veterinario de la granja, se seleccionaron al azar 6 vacas con mastitis latente, todas las cuales tenían al menos una zona de la ubre de "++" o superior. Se administró una inyección intramuscular de 30 ml de saponina B4 de pulsatilla. Tres días después, los resultados de la prueba LMT de 5 vacas mejoraron significativamente. La mejoría de la otra vaca (n.º 532006) no fue significativa, pero no se produjo un empeoramiento.

Tabla 11. Resultados de las pruebas de mastitis latente

Número de marca auricular	Último resultado LMT	Células somáticas antes de la prueba	Resultados de LMT tres días después de la administración
131213	Delantera derecha y trasera derecha +++	1323	Delantera derecha-, trasera derecha++
0909041	Trasera izquierda++, delantera derecha+++	1294	Trasera izquierda+, delantera derecha-
131208	Delantera derecha+++, trasera derecha++	847	Delantera derecha-, trasera derecha+
160128	Cuatro zonas de la ubre +++	5450	Cuatro zonas de la ubre ++

Número de marca auricular	Último resultado LMT	Células somáticas antes de la prueba	Resultados de LMT tres días después de la administración
532006	Cuatro zonas de la ubre +++	2041	Cuatro zonas de la ubre +++
1106021	Delantera izquierda++, trasera izquierda+++	-	Delantera izquierda-, trasera izquierda++

Nota: Dado que no había detector de células somáticas en la explotación, fue necesario realizar la prueba en otras explotaciones. El veterinario de la explotación lechera no completó la prueba de células somáticas, pero los resultados de la prueba LMT tras tres días de administración mostraron una mejora significativa en 5 vacas con mastitis latente.

Observaciones sobre las vacas especiales: En la vaca n.º 1106021, antes de la administración, dos zonas de la ubre de la izquierda sufrían de mastitis latente, los resultados de la prueba LMT de la parte delantera izquierda y trasera izquierda eran "++" y "+++", respectivamente; la parte trasera derecha estaba completamente seca y no se podía ordeñar leche; la leche de los tres primeros ordeños de la parte delantera derecha era espesa y de color amarillo, y después de ordeñar un poco más, apareció un líquido sanguinolento parecido al moco sin características lácteas. Con la inyección intramuscular de 30 ml de saponina B4 de pulsatilla una vez al día, y después de 3 días de administración, no hubo mejoría en la parte delantera derecha, los resultados de la prueba LMT de la parte delantera izquierda y trasera izquierda fueron "-" y "+", respectivamente, las células somáticas se redujeron significativamente y el efecto fue significativo.

Las otras 5 vacas que padecían mastitis latente recibieron una inyección intramuscular de 30 ml una vez al día de saponina B4 de pulsatilla. Tras tres días de tratamiento, 4 vacas mejoraron y los resultados de LMT demostraron que las células somáticas se habían reducido; la mejora de la otra vaca (n.º 532006) no fue significativa. La figura 5 muestra los resultados del tratamiento de algunas vacas que padecían mastitis latente después de tres días de tratamiento con inyecciones de saponina B4 de pulsatilla. De la figura 5 se desprende que el estado de las vacas con mastitis latente mejoró tras la administración de la medicación.

Los resultados del estudio demostraron que la saponina B4 de pulsatilla tiene un buen efecto sobre la mastitis latente.

Las vacas enfermas habían sido tratadas por veterinarios de la granja mediante infusión intramamaria de sulfato de

公英散

cefquinoma en la ubre, inyección intravenosa de cefalosporinas y sonda oral con Gongying San (公英散) durante aproximadamente un mes, pero el tratamiento no fue eficaz, y la enfermedad se convirtió entonces en mastitis crónica, que se manifestó por leche poco espesa y flóculos continuos en la leche. La razón de la situación anterior podría ser, en primer lugar, que la variedad de fármaco utilizado en la granja para el tratamiento de la mastitis era simple, sólo se utilizaban fármacos antibacterianos en el proceso de tratamiento sin tener en cuenta los antiinflamatorios; en segundo lugar, que la variedad de antibióticos utilizados era simple y las bacterias patógenas no estaban aisladas e identificadas, lo que provocaba resistencia bacteriana e insensibilidad a los fármacos; en tercer lugar, que el tratamiento a largo plazo conduce a la hiperplasia del tejido mamario, causando inflamación crónica, lo que a su vez hace más difícil que el fármaco llegue a la zona eficaz, haciendo que el trastorno sea difícil de tratar. Cuando se utilizó la inyección de saponina B4 de pulsatilla para tratar a 8 vacas reclutadas en el ensayo, después de 3 administraciones, cuatro vacas se curaron, una vaca mejoró significativamente y una vaca no mostró ningún efecto significativo; no fue eficaz para dos vacas próximas a secarse. Los resultados del estudio demostraron que la saponina B4 de pulsatilla tiene un buen efecto sobre la mastitis de vacas lecheras para las que el tratamiento con antibióticos u otros medios no es eficaz.

La mastitis latente es uno de los tipos más comunes de mastitis en vacas lecheras. Este tipo de mastitis no suele presentar ningún síntoma clínico, la diferencia entre su leche y la leche normal no puede distinguirse a simple vista y su diagnóstico requiere reactivos de laboratorio. Si este tipo de mastitis no alcanza cierta proporción en el rebaño, no suele tratarse. Debido a su incidencia oculta, las pérdidas económicas causadas por la mastitis latente a las vacas lecheras son muy graves. Cuando se utilizó la inyección de saponina B4 de pulsatilla para tratar a 6 vacas que padecían mastitis latente, cuatro vacas mejoraron; una vaca mostró un efecto significativo y se redujeron las células somáticas en la prueba LMT; una vaca no presentó ninguna mejora significativa. Los resultados del estudio demostraron que la saponina B4 de pulsatilla tiene un buen efecto sobre la mastitis latente.

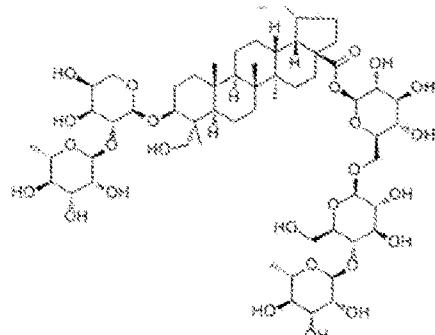
Además, durante el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera, se seleccionó al azar la inyección de saponina B4 de pulsatilla ensayada y se encargó al Instituto de Inspección de Medicamentos Veterinarios de la Provincia de Sichuan que realizara más de 200 pruebas de antibióticos y no detectó ningún componente antibiótico. Al segundo día de la administración a las vacas lecheras, toda la leche puede pasar la prueba de residuos de antibióticos realizada en la explotación. La saponina B4 de pulsatilla tiene poco efecto sobre la inmunoglobulina y los factores inflamatorios de la

leche de vaca, por lo que puede garantizar la estabilidad de la composición de la leche. Además, al no tener residuos, no afectará a la calidad de la leche fresca en las explotaciones lecheras.

En la actualidad, los antibióticos se utilizan principalmente para el tratamiento de la mastitis. Entre ellos, la esterilización de amplio espectro y los antibióticos de ácido nucleico que dañan las células son los más utilizados. Durante el tratamiento y 4 o 5 días después del mismo, es necesario desechar la leche, lo que supone una gran pérdida económica para los ganaderos y el riesgo de que se produzcan resistencias a los medicamentos. La saponina B4 de pulsatilla es un principio activo natural extraído de la hierba medicinal china *Pulsatilla*, no es tóxica ni produce farmacorresistencia. El compuesto saponina B4 de pulsatilla de la presente invención tiene una fuerte actividad biológica y un excelente efecto terapéutico en la mastitis de la vaca lechera. No es necesario desechar la leche durante el tratamiento ni al final del mismo, lo que no sólo reduce las pérdidas económicas de los ganaderos, sino que también disminuye el riesgo de farmacorresistencia. Además, la saponina B4 de pulsatilla no sólo tiene un excelente efecto terapéutico sobre la mastitis clínica, sino que también tiene un excelente efecto terapéutico sobre la mastitis clínica persistente y la mastitis latente. Al mismo tiempo, la inyección de saponina de pulsatilla tiene las ventajas de la seguridad, una alta eficiencia, no produce residuos, no provoca farmacorresistencia y no tiene efectos secundarios ni tóxicos cuando se utiliza en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera.

## REIVINDICACIONES

1. El compuesto saponina B4 de pulsatilla representado por la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera:



Fórmula I.

- 5      2. El compuesto saponina B4 de pulsatilla de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la mastitis de la vaca lechera es mastitis clínica o mastitis latente.
- 10     3. El compuesto saponina B4 de pulsatilla de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la mastitis clínica es mastitis clínica tratada por primera vez o mastitis clínica persistente.
- 15     4. Un medicamento para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la mastitis de la vaca lechera, **caracterizado porque** comprende saponina B4 de pulsatilla según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como principio activo, y materiales auxiliares farmacéuticamente aceptables.
- 20     5. El medicamento para su uso según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la preparación está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una inyección, una infusión intramamaria, un polvo, una pomada o una loción; preferentemente, la forma se selecciona del grupo que consiste en una inyección o una infusión intramamaria; más preferentemente, la forma es una inyección.
- 6. El medicamento para su uso según la reivindicación 4. **caracterizado porque** la mastitis de la vaca lechera es mastitis clínica o mastitis latente; preferentemente, la mastitis clínica es mastitis clínica tratada por primera vez o mastitis clínica persistente.

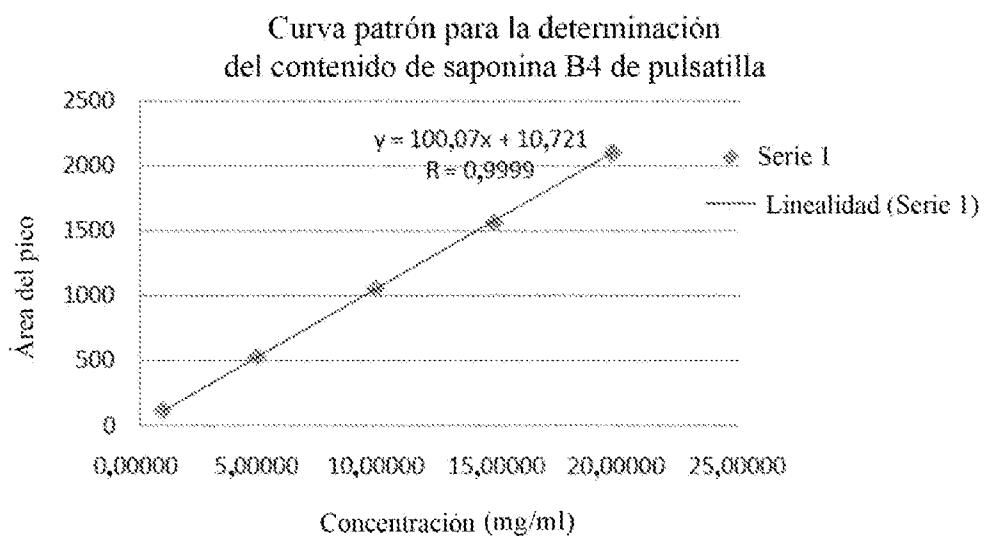


Fig. 1

ES 2 964 618 T3

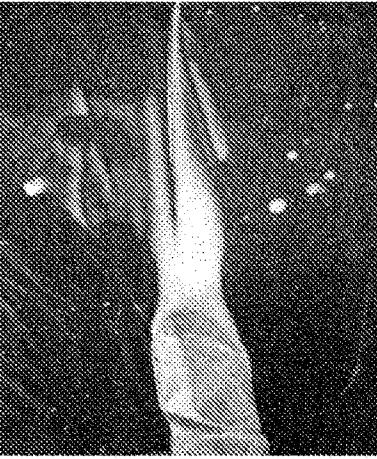
	
Día 1, más flóculos en la leche	Día 2, los flóculos fueron sensiblemente más pequeños
	
Día 5, no se observaron flóculos, la leche volvió sustancialmente a la normalidad	Día 6, la leche fue sustancialmente normal

Fig. 2

# ES 2 964 618 T3

				
Día 1, más flóculos en la leche		Día 2, los flóculos fueron sensiblemente más pequeños		
				
Día 3, los flóculos se redujeron significativamente		Día 4, los flóculos se redujeron significativamente		
				
Día 5, no se observaron flóculos, la leche volvió sustancialmente a la normalidad		Día 6, la leche fue sustancialmente normal		

Fig. 3

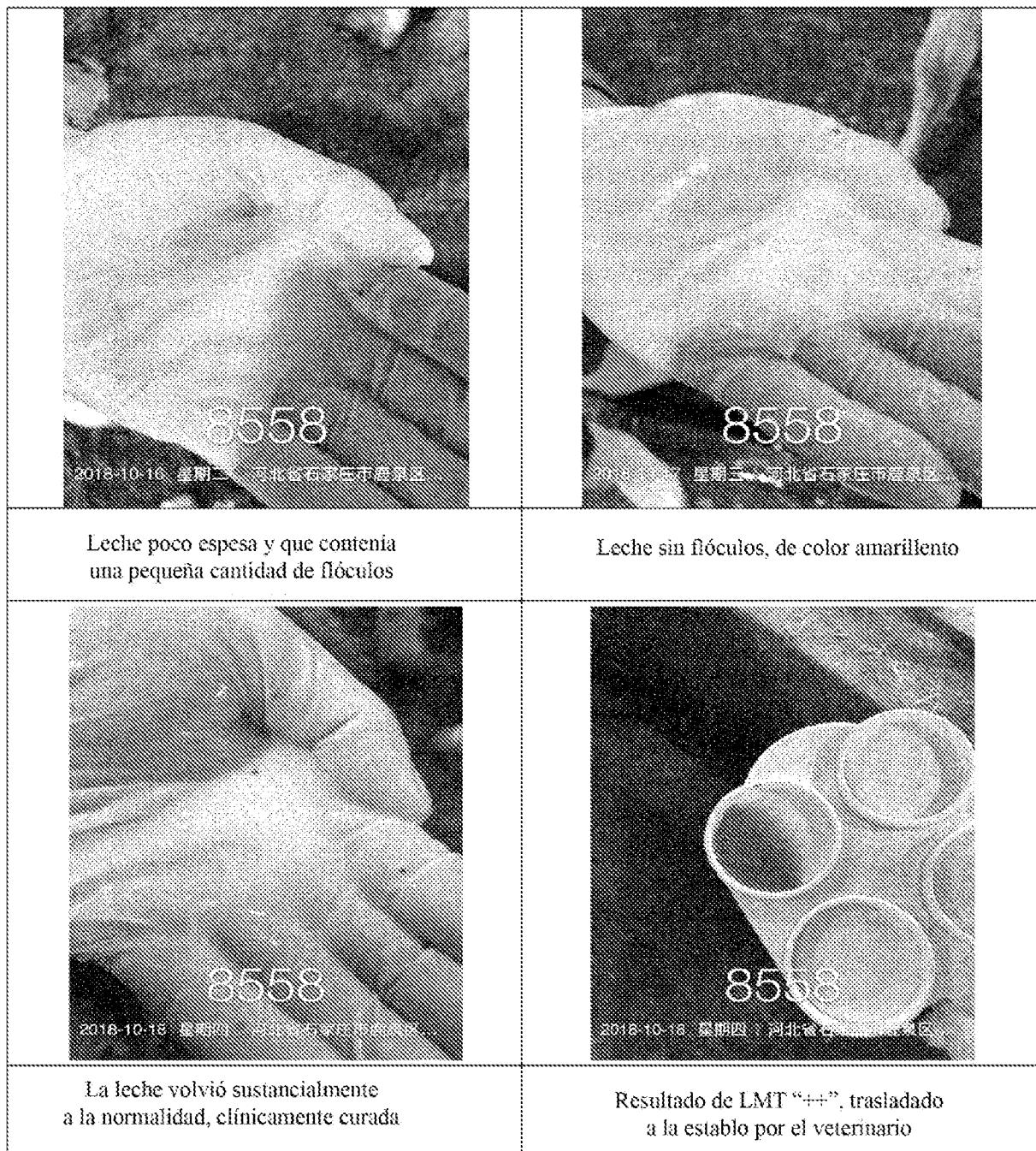


Fig. 4

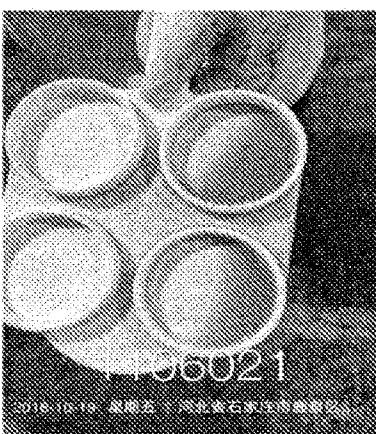
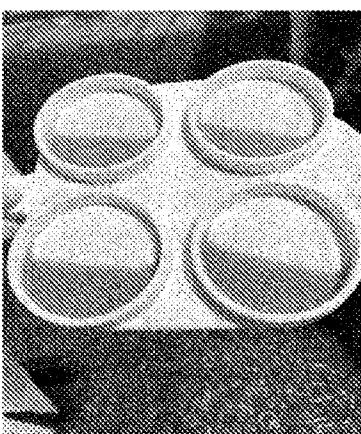
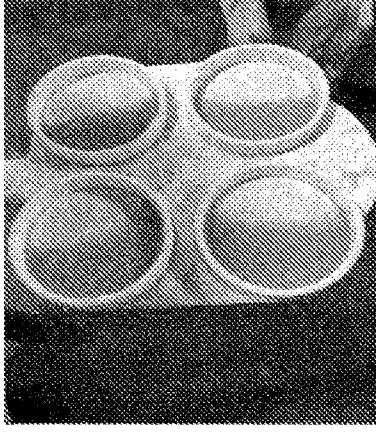
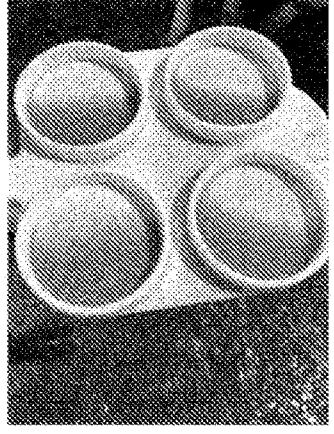
 <p>1106021 SOLVENTE DE CONTROL DE POSITIVO</p>	
<p>Resultado de la prueba LMT de la vaca n.º 1106021 3 días después de la administración, delantera izquierda “-”, trasera izquierda “++”</p>	<p>Resultado de la prueba LMf de la vaca n.º 131213 3 días después de la administración, trasera derecha “++”</p>
	
<p>Resultado de la prueba LMT de la vaca n.º 131208 3 días después de la administración, trasera derecha “+”</p>	<p>Resultado de la prueba LMf de la vaca n.º 0909041 3 días después de la administración, trasera izquierda “+”</p> <p>//</p>
<p>Resultado de la prueba LMT de la vaca n.º 532006 3 días después de la administración, cuatro áreas bajo la ubre “+++”</p>	<p>//</p>

Fig. 5