

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 041 155**

21 Número de solicitud: 202430358

51 Int. Cl.:

A61K 36/87 (2006.01)

A61P 15/14 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.05.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.11.2025

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.00%)
Pazo de San Xerome s/n
15520 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**LORES AGUÍN, Marta;
CELEIRO MONTERO, María;
CASTILLO ZAMORA, Aly Jesús;
MARTÍNEZ BORRAJO, Rebeca;
TOUZA OTERO, Lara y
DÍAZ RODRIGUEZ, Patricia**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **FORMULACIONES INTRAMAMARIAS PARA MASTITIS**

57 Resumen:

Formulaciones intramamarias para mastitis.
La presente invención se relaciona con un extracto de uva blanca rico en polifenoles, un procedimiento para la obtención de dicho extracto. El extracto presenta actividad en el tratamiento y/o prevención de la mastitis y por lo tanto la invención se relaciona además con una composición farmacéutica para administración intramamaria que comprende dicho extracto y con su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

ES 3 041 155 A1

DESCRIPCIÓN

FORMULACIONES INTRAMAMARIAS PARA MASTITIS

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo del tratamiento y/o prevención de la mastitis en mamíferos no humanos.

Antecedentes de la invención

La mastitis, especialmente en el ganado bovino, es una de las enfermedades de mayor prevalencia en la industria ganadera europea, afectando al 40% de las vacas en granjas que carecen de programas de control de la mastitis. Además, representa una carga económica superior a los 185€ por vaca al año (1.500 millones de euros al año en la UE). La mastitis es así la enfermedad más importante que afecta al ganado lechero, no solo en términos de salud animal por su alta prevalencia, sino también por las consecuencias económicas asociadas [(Kromker V, Leimbach S. 2017. *Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. Reprod Domest Anim* 52 Suppl 3: 21-29); y (Nalon E, Stevenson P. 2019. *Protection of Dairy Cattle in the EU: State of Play and Directions for Policymaking from a Legal and Animal Advocacy Perspective. Animals, Basel*, 9)].

La mastitis se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria y los tejidos de la ubre a causa de un traumatismo, una irritación química o, más comúnmente, de una infección por agentes patógenos [(Ruegg PL. 2017. *A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci* 100: 10381-97); y (Gomes F, Henriques M. 2016. *Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. Curr Microbiol* 72: 377-82)]. Atendiendo a los síntomas, la mastitis se puede clasificar en clínica o subclínica. La mastitis subclínica conlleva un aumento en el recuento de células somáticas (RCS), pero sin modificaciones significativas en las características de la leche. Este tipo de mastitis no representa un riesgo fatal para las vacas; es menos grave, pero más frecuente. Provoca una reducción en la producción y la calidad de la leche, por lo que conlleva grandes pérdidas económicas. Por otra parte, la mastitis clínica se caracteriza por signos locales de inflamación en la ubre afectada y anomalías visibles en la leche siendo, en algunos casos, potencialmente mortal para los animales [(Kromker V, Leimbach S. 2017. *Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. Reprod Domest Anim* 52 Suppl 3: 21-29); y (Tezera M, Aman Ali E. 2021. *Prevalence and associated risk factors of Bovine mastitis in dairy cows in and around Assosa town, Benishangul-Gumuz Regional State, Western Ethiopia. Vet Med Sci* 7: 1280-86)].

Entre los microorganismos que causan la mastitis se encuentran hongos, virus, algas y bacterias; siendo estas últimas las más comunes y reportándose más de 140 especies diferentes. Según el microorganismo causal o el modo de transmisión, también se puede clasificar la patología en contagiosa o ambiental. La mastitis contagiosa es causada principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Mycoplasma spp.* Se transmite entre animales o entre cuartos infectados de un mismo animal durante el ordeño a través de pezoneras contaminadas, manos del ordeñador, toallas de papel o paño usadas para lavar o secar más de una vaca, e inclusive insectos como las moscas. La mastitis ambiental, por otra parte, está asociada con diferentes patógenos del hábitat de: las heces, el suelo, el agua contaminada o el equipo de ordeño. Los más frecuentes son *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella spp.*

Los fármacos antimicrobianos han sido indispensables en la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas en el último siglo. Sin embargo, su uso indiscriminado ha conllevado una disminución en su eficacia y un aumento en la aparición de cepas bacterianas resistentes, convirtiéndose en un problema de salud mundial. Numerosas entidades internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), han identificado la resistencia a los antimicrobianos (RAM) como la amenaza sanitaria más importante del siglo XXI, responsable en la actualidad de 700.000 muertes al año [(Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. 2017. *Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. Crit Rev Food Sci Nutr* 57: 2857-76); y (Xiong W, Sun Y, Zeng Z. 2018. *Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. Environ Sci Pollut Res Int* 25: 18377-84)]. En consonancia con el plan “One Health” de la Unión Europea [EU. 2017. *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*], es necesario desarrollar estrategias para reducir el uso de los antimicrobianos actuales y encontrar nuevas terapias alternativas, especialmente en veterinaria, donde se estima que el consumo de antibióticos es el doble que en humanos (Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, et al. 2015. *Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5649-54).

Las infecciones bacterianas están detrás de la mayoría de las mastitis bovinas, por lo que los antibióticos han sido los protagonistas de sus terapias desde la industrialización de la leche. Son administrados por dos vías: intramamaria local y/o parenteral sistémica. La administración intramamaria presenta ventajas como alcanzar concentraciones locales elevadas del fármaco con una absorción sistémica mínima, permitiendo reducir los efectos secundarios [(Roberson JR. 2012. *Treatment of clinical mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 271-88); y

(Gehring R, Smith GWJ Jovp, therapeutics. 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. 29 4: 237-41)].

En España existen actualmente 106 formulaciones destinadas a la terapia de la mastitis en animales lecheros, de las cuales 56 incluyen antibióticos. Las formulaciones antibióticas son
5 soluciones, suspensiones o emulsiones para administración intramamaria, intramuscular, intravenosa o subcutánea que incluyen: amoxicilina, bencilpenicilina, cefalexina, cefquinona, enrofloxacino, eritromicina, marbofloxacino, oxitetraciclina o penetamato.

Se estima que el 80% de los antibióticos utilizados en animales lecheros están destinados al control y tratamiento de la mastitis en todo el mundo (Ashraf A, Imran M. 2020. Causes, types,
10 etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. Anim Health Res Rev 21: 36-49).

No obstante, el uso de antibióticos no es del todo satisfactorio ya que los antibióticos pueden pasar a la leche obtenida, lo cual no es deseable, y los antibióticos pueden requerir un tratamiento a largo plazo, siendo costoso en términos de pérdida de producción de leche,
15 precio del antibiótico, y posibilidad de generación de cepas resistentes. Este escenario hace necesaria la búsqueda de alternativas no antibióticas para la prevención y el tratamiento de la mastitis.

Por este motivo, el desarrollo de productos antimicrobianos con principios activos de origen natural para la prevención y/o el tratamiento de esta patología, se presenta como un enfoque
20 de gran interés. Concretamente, el orujo o bagazo de uva, el prensado de uvas que comprende principalmente la piel, pulpa residual, semillas y tallos, es una fuente importante de fitoquímicos naturales (WO2014013122A1). Estos fitoquímicos son metabolitos secundarios que juegan un papel en los mecanismos de defensa de las plantas, entre los que se incluyen los polifenoles. Los polifenoles tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias
25 y antimicrobianas, resultando útiles en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Además, el cultivo de uva es uno de los más abundantes en el mundo, generando gran cantidad de residuos que deben ser tratados, eliminados o reutilizados.

Terapias basadas en extractos naturales derivados del orujo de uva permitirán reducir el uso de los agentes antimicrobianos habituales abordando la problemática de las RAM, mejorar la
30 salud y el bienestar animal y favorecer la economía circular.

La pomada intramamaria “KATA MAST®”, de “Laboratorios Ovejero S.A.”, es la única formulación disponible en España que comprende extractos naturales como principios activos, en concreto, extractos de *Avena sativa*, *Calendula officinales*, *Echinacea purpurea*, *Hypericum*

perforatum, *Phytolacca americana* y *Solidago vigaurea*. Sin embargo, se trata de un producto homeopático sin indicaciones terapéuticas aprobadas.

En los demás países de Europa, solo existen 3 composiciones en el mercado (Eslovaquia, Italia y Bulgaria) con principios activos diferentes de antibióticos y/o subnitrato de bismuto.

5 Estos también, son productos homeopáticos. Como principios activos comprenden *Thymus vulgaris*, *Atropa belladonna* o *Phytolacca decandra*. Ninguno de ellos contiene ningún extracto de orujo de uva entre sus principios activos.

Los documentos GR20190100213A, EP3158868A y AU2015202530A1 describen formulaciones tópicas para prevención mamaria, que comprenden aceites vegetales y
10 subnitrato de bismuto como principios activos.

Por tanto, existe en el mercado una necesidad de formulaciones para el tratamiento de la mastitis que no sean a base de antibióticos, sino a base de extractos naturales de fuentes abundantes y sostenibles como las de origen vitivinícola, que puedan ser administradas por vía intramamaria.

15

Breve descripción de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto de manera sorprendente que los extractos de orujo de uva blanca exhiben actividad contra la mastitis. Los inventores han desarrollado así formulaciones intramamarias que comprenden extractos de uva blanca. Estas
20 formulaciones constituyen una alternativa a los tratamientos antimicrobianos habituales utilizados en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis en animales. Hasta la fecha, no existían formulaciones intramamarias para la prevención y/o tratamiento de la mastitis en animales basadas en extractos de orujo de uva blanca con actividad antimicrobiana.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftárico,
25 procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.

Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para la obtención
30 de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;

- b) Someter la mezcla a una elución con un disolvente que comprende propilenglicol y/o acetona;
- c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
- d) Opcionalmente, eliminar el disolvente.

5 Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según el procedimiento de la invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende, como principio activo, el extracto de uva blanca de la invención.

10 Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a una jeringa intramamaria que comprende la composición farmacéutica de la invención.

Un sexto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano, caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende, como principio activo, el extracto de uva blanca de la invención.

15 Un séptimo aspecto de la presente invención se dirige al extracto de la invención, o al extracto obtenible según el procedimiento de la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

20 **Breve descripción de la figura**

Figura 1. Comportamiento reológico de las formulaciones de la invención comparado con formulaciones comerciales. Eje abscisas: Fuerza de cizalla (s^{-1}). Eje ordenadas: Viscosidad (Pa.s). En la gráfica: los datos "1" se corresponden a la formulación comercial 1 (Ilovet-clox®); los datos "2" se corresponden a la formulación comercial 2 (Mammicurine 800®); los datos "3" se corresponden a una formulación de la invención sin esterilizar y los datos "4" se corresponden a la formulación de la invención estéril formulada en aséptico.

25

Descripción detallada de la invención

Extracto de uva blanca

30 Los extractos de orujo de uva blanca son ricos en polifenoles, presentando propiedades antimicrobianas y antioxidantes que pueden utilizarse en la prevención y el tratamiento de mastitis. El principio activo de la invención es por tanto un extracto de uva blanca.

Así, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftarico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.

En una realización particular, el extracto de uva blanca es un extracto de orujo de uva blanca. El orujo de uva, o bagazo de uva, es el principal subproducto de la vinificación: el prensado de uvas que comprende principalmente la piel, pulpa residual, semillas y tallos. El extracto empleado en la presente invención se obtiene sometiendo el orujo (y opcionalmente orujos agotados) a un procedimiento de extracción, que es el procedimiento de la invención.

En una realización particular, la uva blanca se selecciona del grupo que consiste en albariño, albillo, arinto, chardonnay, chenin blanc, garnacha blanca, gewürztraminer, godello o gouveio, loureira, macabeo (o viura), malvasía, moscatel, müller-thurgau, riesling, roussanne, palomino, parellada, pedro ximénez, pinot blanc, sauvignon blanc, silvaner, semillón, tocai, trebbiano, treixadura, verdejo, viognier, xarel-lo, o mezclas. En una realización preferida, la uva se selecciona del grupo que consiste en albariño, arinto, godello o gouveio, loureira, treixadura, o mezclas. En una realización aún más preferida, la uva es albariño.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende un índice de polifenoles totales de entre 1000 y 45000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L).

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende un índice de polifenoles totales de entre 1000 y 9000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L). Preferiblemente, dicho extracto es un extracto obtenible empleando propilenglicol o una mezcla de propilenglicol:agua como disolvente.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende un índice de polifenoles totales de entre 7000 y 45000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L). Preferiblemente, dicho extracto es un extracto obtenible empleando acetona como disolvente. En una realización más preferida, el extracto de uva blanca es un extracto volatilizado, obtenible empleando acetona como disolvente, y comprende un índice de polifenoles totales de entre 10000 y 45000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L). En otra realización igualmente preferida, el extracto de uva blanca es un extracto no volatilizado, obtenible empleando acetona como disolvente, y comprende un índice de polifenoles totales de entre 7000 y 15000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L).

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende al menos una de las siguientes:

- una concentración de ácido gálico de entre 8 y 40 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 30 mg/L de extracto;
- 5 - una concentración de ácido caftárico de entre 0,5 y 7,0 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 50 y 150 mg/L de extracto;
- 10 - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 65 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 5,0 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 120 mg/L de extracto;
- una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto; y/o
- 15 - una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico de entre 10 y 40 mg/L de extracto, preferiblemente entre 11 y 39 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o superior a 11, más preferiblemente igual o superior a 15
20 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o inferior a 35, más preferiblemente igual o inferior a 30 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto, preferiblemente entre 10 y 20 mg/L de extracto.
25 En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o superior a 11, más preferiblemente igual o superior a 13 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o inferior a 19, más preferiblemente igual o inferior a 17 mg/L de extracto.

30 En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 5 mg/L de extracto, preferiblemente entre 1 y 3 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o superior a 1,5, más preferiblemente igual o superior a 2 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores,

el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o inferior a 4, más preferiblemente igual o inferior a 3 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto, preferiblemente entre 2 y 30 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o superior a 3, más preferiblemente igual o superior a 4 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o inferior a 10, más preferiblemente igual o inferior a 8 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico de entre 4 y 7 mg/L de extracto, preferiblemente entre 5 y 7 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o superior a 5,2, más preferiblemente igual o superior a 5,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o inferior a 6,5, más preferiblemente igual o inferior a 6 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,10 y 3,50 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o superior a 0,20, más preferiblemente igual o superior a 0,40 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o inferior a 3,00, más preferiblemente igual o inferior a 2,00 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto, preferiblemente entre 65 y 125 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o superior a 70, más preferiblemente igual o superior a 75 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o inferior a 120, más preferiblemente igual o inferior a 100 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto, preferiblemente entre 100 y 270 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca

comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o superior a 105, más preferiblemente igual o superior a 110 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o inferior a 230, más preferiblemente igual o inferior a 200 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto, preferiblemente entre 53 y 69 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o superior a 54, más preferiblemente igual o superior a 55 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o inferior a 65, más preferiblemente igual o inferior a 60 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto, preferiblemente entre 50 y 125 mg/L de extracto.

En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o superior a 55, más preferiblemente igual o superior a 60 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o inferior a 120, más preferiblemente igual o inferior a 115 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,1 y 2,6 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina igual o superior a 0,5, más preferiblemente igual o superior a 1,0 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina igual o inferior a 2,5, más preferiblemente igual o inferior a 2,0 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,05 y 1,00 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina igual o superior a 0,10, más preferiblemente igual o superior a 0,20 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina igual o inferior a 0,70, más preferiblemente igual o inferior a 0,50 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto, preferiblemente entre 55 y 68 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o superior a 57, más preferiblemente igual o superior a 63 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o inferior a 65, más preferiblemente igual o inferior a 63 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto, preferiblemente entre 10 y 140 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o superior a 30, más preferiblemente igual o superior a 60 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o inferior a 130, más preferiblemente igual o inferior a 125 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina de entre 3 y 20 mg/L de extracto, preferiblemente entre 5 y 20 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o superior a 6, más preferiblemente igual o superior a 7 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o inferior a 17, más preferiblemente igual o inferior a 12 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto, preferiblemente entre 5 y 45 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o superior a 10, más preferiblemente igual o superior a 13 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o inferior a 40, más preferiblemente igual o inferior a 35 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto, preferiblemente entre 15 y 20 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido igual o superior a 15, más preferiblemente igual o superior a 16 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de

quercetina-3-glucurónido igual o inferior a 19, más preferiblemente igual o inferior a 18 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto, preferiblemente entre 28 y 60

5 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido igual o superior a 30, más preferiblemente igual o superior a 32 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido igual o inferior a 55, más preferiblemente igual o inferior a 45 mg/L

10 de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,3 y 0,8 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca

15 comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o superior a 0,4 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o inferior a 0,7 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto, preferiblemente entre 2 y 5 mg/L de

20 extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o superior a 3 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o inferior a 4 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto, preferiblemente entre 11 y 21 mg/L

25 de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o superior a 11, más preferiblemente igual o superior a 15 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o

30 inferior a 21, más preferiblemente igual o inferior a 19 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto, preferiblemente entre 30 y 120 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o superior a 35, más

preferiblemente igual o superior a 40 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o inferior a 100, más preferiblemente igual o inferior a 60 mg/L de extracto.

- 5 En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,2 y 2,5 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol igual o superior a 0,2, más preferiblemente igual o superior a 0,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de
- 10 uva blanca comprende una concentración de kaempferol igual o inferior a 2,1, más preferiblemente igual o inferior a 1,5 mg/L de extracto.

- En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,2 y 2,0 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una
- 15 concentración de kaempferol igual o superior a 0,3, más preferiblemente igual o superior a 0,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol igual o inferior a 1,5, más preferiblemente igual o inferior a 1,0 mg/L de extracto.

- En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de
- 20 quercetina de entre 1,0 y 5,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 1,5 y 4,5 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina igual o superior a 1,5, más preferiblemente igual o superior a 2,0 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina igual o inferior a 4,5, más
- 25 preferiblemente igual o inferior a 4,0 mg/L de extracto, aún más preferiblemente igual o inferior a 3,5 mg/L de extracto.

- En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,3 y 15,0 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una
- 30 concentración de quercetina igual o superior a 0,4, más preferiblemente igual o superior a 0,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina igual o inferior a 12, más preferiblemente igual o inferior a 5 mg/L de extracto, aún más preferiblemente igual o inferior a 2 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende al menos una de las siguientes:

- una concentración de ácido gálico de entre 10 y 40 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- 5 - una concentración de ácido caftárico de entre 4 y 7 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
- 10 - una concentración de galato de epicatequina de entre 3 y 20 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1,0 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
- una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3 mg/L de extracto; y/o
- 15 - una concentración de quercetina de entre 1,0 y 5,0 mg/L de extracto.

En una realización preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1,0 mg/L de extracto;
- 20 - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;

En una realización preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto; y
- 25 - una concentración de galato de epicatequina de entre 3 y 20 mg/L de extracto.

En una realización más preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de ácido gálico de entre 10 y 40 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- 30 - una concentración de ácido caftárico de entre 4 y 7 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;

- una concentración de galato de epicatequina de entre 3 y 20 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1,0 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
- 5 - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3 mg/L de extracto; y
- una concentración de quercetina de entre 1,0 y 5,0 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende al menos una de las siguientes:

- una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
- 10 - una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
- 15 - una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
- 20 - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y/o
- una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.

En otra realización preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- 25 - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto; y
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto.

En otra realización preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- 30 - una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto; y
- una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto.

En otra realización más preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- 5 - una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- 10 - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y
- una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.

En la presente invención, la expresión de transición “comprende” se emplea como expresión
 15 de tipo abierto, cuya interpretación es más amplia que cuando se emplea la expresión de tipo
 cerrado “consiste en”. Una reivindicación que incluya la expresión “consiste en” se limita
 únicamente a los elementos técnicos definidos en dicha reivindicación y no cabe interpretarla
 como englobando cualquier otro elemento. Por otro lado, una reivindicación que contiene la
 expresión de tipo abierto “comprende”, debe interpretarse en el sentido más amplio, y puede
 20 incluir (o no) otros elementos técnicos que no se mencionen explícitamente, además de los
 definidos explícitamente, que son los elementos técnicos esenciales de la invención.

En una realización particular de todos los aspectos descritos en la presente memoria, y salvo
 indicación expresa en contrario, el término “comprende” puede sustituirse por “consiste en”,
 en cuyo caso aplicarían las consideraciones del párrafo anterior.

25 En una realización particular, el extracto de uva blanca se caracteriza por la ausencia de
 antocianos. “Antocianos” se refiere a un grupo de polifenoles flavonoides que comprende el
 conjunto formado por antocianinas y antocianidinas, que también incluye las combinaciones
 osídicas de una antocianidina con un azúcar. Son los responsables del color rojo azulado de
 la piel de las uvas tintas.

30 En otra realización particular, el extracto de uva blanca se caracteriza por un pH de entre 4 y
 8 medido en disolución acuosa.

El extracto de uva de la invención tiene aplicación en el tratamiento de mastitis,
 preferiblemente en una composición farmacéutica para inyección. Así, en una realización
 particular, el extracto se encuentra en disolución, en suspensión, en emulsión, o en forma

sólida, como un polvo o una pasta (obtenible por ejemplo mediante liofilizado o secado por pulverización).

En el procedimiento de extracción con disolvente orgánico se puede añadir opcionalmente agua, pero el bagazo de uva empleado como materia prima para la extracción ya contiene
 5 humedad residual. Así, en una realización preferida, el extracto de uva de la invención es un extracto acuoso. El disolvente orgánico empleado en la extracción puede evaporarse, dejando como resultado un extracto de uva blanca que comprende agua. El experto en la materia entenderá que el disolvente orgánico puede evaporarse en su totalidad o parcialmente. En este contexto, el extracto comprende no más de un 60% de disolvente orgánico, no más de
 10 un 50% de disolvente orgánico, no más de un 40% de disolvente orgánico, no más de un 20% de disolvente orgánico, no más de un 10% de disolvente orgánico, no más de un 5% de disolvente orgánico, no más de un 1% de disolvente orgánico, y preferiblemente no más de un 0,5% de disolvente orgánico.

En una realización particular, el extracto de uva de la invención es un extracto que no contiene
 15 disolventes orgánicos, o solo contiene trazas de los mismos. En una realización preferida, el extracto de uva de la invención es un extracto que solo contiene agua como disolvente. En el caso de que no se añada agua durante el proceso, el extracto acuoso comprende agua que procede de la humedad residual del propio bagazo.

Procedimiento de obtención

20 El segundo aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;
- b) Someter la mezcla a una elución con un disolvente que comprende propilenglicol y/o
 25 acetona;
- c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
- d) Opcionalmente, eliminar el disolvente.

El procedimiento de extracción que permite la obtención del extracto de la invención se lleva a cabo a partir del método descrito en WO 2014013122 A1, pero empleando disolventes de
 30 elución que no habían sido descritos previamente. Esta adaptación exhibe dos ventajas principales. Por un lado, el extracto obtenido comprende una composición polifenólica distinta, de gran utilidad en el tratamiento de mastitis. Por otro lado, el extracto obtenido puede ser

fácilmente volatilizado, resultando en un extracto acuoso que puede emplearse directamente en composiciones para inyección.

En la presente invención, “dispersante” es un material sólido que puede mezclarse opcionalmente con el bagazo. El mezclado con una muestra biológica (como el bagazo) permite su disrupción y su dispersión en su superficie, de modo que la mezcla mecánica perturba la arquitectura de la muestra, rompiendo el material en pedazos de menor tamaño e incrementando la liberación de los compuestos químicos presentes en el interior de las células vegetales de la muestra.

En una realización particular de la etapa (a), el orujo de uva blanca se proporciona previamente triturado.

En una realización particular, la etapa (a) del procedimiento comprende proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y un dispersante. Preferiblemente, el dispersante se selecciona de entre el grupo constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel. Más preferiblemente, el dispersante es arena, aún más preferiblemente arena de origen natural.

En una realización particular el tamaño del grano del dispersante se selecciona de entre 100 μm y 1 mm, preferiblemente de entre 250 μm y 320 μm .

En una realización particular, la etapa (a) del procedimiento comprende proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y un dispersante, en donde la proporción (en masa) de dispersante:orujo está comprendida entre 0,5:1 y 1:10, preferiblemente entre 0,5:1 y 1:7, más preferiblemente entre 0,5:1 y 1:5 y aún más preferiblemente entre 0,8:1 y 1:5.

En el caso de comprender un dispersante, la preparación de la mezcla en la etapa (a), que comprende residuo de uva blanca y un dispersante, se puede llevar a cabo utilizando un mortero (vidrio, porcelana, ágata), un disruptor de cuchillas, un equipo de molienda, un triturador, un tambor rotatorio o cualquier otro dispositivo que permita triturar y homogeneizar la mezcla mecánicamente.

En una realización particular, la etapa (a) transcurre en un rango de temperaturas de entre 10 °C y 40 °C. En otra realización particular, la etapa (a) transcurre a presión atmosférica. Estas realizaciones permiten evitar riesgos de degradación de los compuestos a extraer.

En una realización particular, el dispersante y el orujo se mezclan a una temperatura de entre 10 y 40 °C y/o a una presión de entre 0,8-1,2 atm.

En una realización particular, el disolvente de la etapa (b) está en una proporción de entre 0,2 y 10 volúmenes de disolvente respecto al peso de la mezcla que comprende orujo de uva blanca y, si está presente, el dispersante, preferiblemente de entre 0,2 y 6.

En una realización particular, la etapa (b) incluye mantener el disolvente en contacto con la mezcla entre 1 y 72 horas, preferiblemente entre 24 y 72 horas, más preferiblemente entre 48 y 72 horas. En otra realización particular, esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de entre 10 °C y 40 °C.

- 5 En otra realización particular, el disolvente de extracción que comprende propilenglicol y/o acetona, comprende además un disolvente seleccionado del grupo que consiste en agua, alcohol alquílico, glicoles, o sus mezclas, preferiblemente disolventes cuyo punto de ebullición no sea superior a 80 °C.

10 En la presente invención “alcohol alquílico” se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene un grupo hidroxilo, de entre 1 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 1 y 6 átomos de carbono. En una realización particular el alcohol alquílico se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol, y sus mezclas.

15 En la presente invención “glicoles” se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene dos o más grupos hidroxilo, de entre 2 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 2 y 8 átomos de carbono, y opcionalmente puede contener uno o más grupos éter. En una realización particular, el glicol se selecciona de entre 1,2-etanodiol (etilenglicol), propano-1,2-diol (propilenglicol), butano-1,4-diol (1,4-butilenglicol), butano-1,3-diol, 1,5-pentanodiol (pentilenglicol), 2-metil-2,4-pentanodiol (hexilenglicol), 2-(2-etoxietoxi)etanol (dietilenglicol monoetil éter), éter 2,2'-dihidroxidipropilo (dipropilenglicol) y
20 1,2-octanodiol (caprilil glicol).

En una realización preferida, el disolvente de la etapa (b) también comprende agua.

En una realización particular, el disolvente de la etapa (b) comprende acetona. Preferiblemente, acetona y agua.

25 En otra realización particular, el disolvente de la etapa (b) comprende propilenglicol. Preferiblemente, propilenglicol y agua.

En una realización particular, el disolvente de extracción o comprende propilenglicol, o comprende acetona. En una realización preferida, si el disolvente comprende propilenglicol, entonces no comprende acetona. En otra realización preferida, compatible con la anterior, si el disolvente comprende acetona, entonces no comprende propilenglicol.

30 En una realización particular, el disolvente de la etapa (b) puede tener un pH modificado de entre 0,5 y 3. Así, en una realización particular, el disolvente de la etapa (b) comprende además un ácido orgánico o inorgánico, preferiblemente un ácido seleccionado del grupo que

consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico y mezclas de los mismos.

En otra realización particular, los eluatos recogidos en la etapa (c) se utilizan para repetir la elución del extracto. La recirculación de los eluatos recogidos en la etapa (c) permite disminuir el volumen total de disolvente utilizado en el proceso. Si bien no es una característica necesaria para el correcto funcionamiento de la invención, una ventaja adicional asociada a la recirculación de los eluatos está en el eventual aumento de la cantidad de polifenoles totales extraídos de los orujos de uva blanca.

Así, en una realización particular la etapa (c) comprende, además de recoger los eluatos, recircular dichos eluatos por la mezcla que comprende el orujo de uva blanca, repitiéndose la elución con el disolvente entre 1 y 7 veces, preferiblemente 3, 4 o 5 veces. En otras palabras, en una realización particular, el procedimiento de la invención está caracterizado porque, tras recoger el extracto de uva blanca, la etapa (c) comprende además la recirculación del eluato obtenido, por la mezcla de la etapa (a). Esta realización se corresponde a la repetición del método de la etapa (b), pero en donde la mezcla de la etapa (a) comprende el orujo de uva sometido previamente por lo menos una vez a una elución con disolvente, y empleando un disolvente que ya ha sido utilizado por lo menos una vez en la elución. Esta realización se repite de manera que el disolvente se recircula por la mezcla.

La combinación de las etapas de maceración y de recirculación de los eluatos permite un procedimiento optimizado en cuanto a rendimiento del extracto obtenido y el bajo consumo de disolventes.

La etapa (d) es una etapa opcional de eliminación de disolvente, preferiblemente del disolvente orgánico. En una realización particular del procedimiento de la invención, la etapa (d) no se lleva a cabo, o se lleva a cabo para eliminar una parte del disolvente orgánico, de manera a que el extracto se obtiene con una cantidad de disolvente orgánico de no más de un 60% de disolvente orgánico, no más de un 50% de disolvente orgánico, preferiblemente no más de un 40% de disolvente orgánico. En una realización preferida de la anterior, el disolvente orgánico es propilenglicol.

En una realización particular, si en la etapa (b) se emplea acetona como disolvente orgánico, entonces el procedimiento de extracción comprende la etapa (d), caracterizada por ser una etapa de eliminación de la acetona.

La eliminación de disolvente en la etapa (d) puede ser parcial, o completa. En esta etapa, el extracto de orujo de uva blanca obtenido tras la elución, o las eluciones, se somete a una etapa de concentración, es decir, un procedimiento para reducir la cantidad de disolvente. En

una realización particular, la etapa (d) comprende la eliminación de disolvente hasta una cantidad final de no más de un 20% de disolvente orgánico, no más de un 10% de disolvente orgánico, no más de un 5% de disolvente orgánico, preferiblemente no más de un 1% de disolvente orgánico, y aún más preferiblemente no más de un 0,5% de disolvente orgánico.

5 En una realización preferida, la etapa (d) es una etapa de evaporación de disolvente orgánico, preferiblemente una etapa de evaporación completa del disolvente orgánico, de manera que el disolvente orgánico se elimina en su totalidad o esencialmente en su totalidad. En el contexto de la presente invención, la evaporación de disolvente orgánico es sinónimo de volatilización de disolvente orgánico, preferiblemente acetona. En una realización aún más
10 preferida, en la etapa (d) se evapora el disolvente orgánico en su totalidad o esencialmente en su totalidad, obteniéndose así como producto un extracto acuoso. El proceso para eliminar el disolvente orgánico es conocido por el experto en la materia, por ejemplo simplemente dejando el extracto a temperatura ambiente y presión atmosférica, bajo una corriente de nitrógeno, con aporte de temperatura, bajo vacío, en un rotavapor a vacío, en evaporador de
15 película fina, entre otros.

Los extractos también pueden obtenerse como un producto sólido. Así, en otra realización particular, el procedimiento de extracción comprende además una etapa de liofilización o una etapa de secado por pulverización (spray-drying). Esta etapa puede ser una etapa adicional tras llevarse a cabo la etapa (c). Alternativamente, puede ser una etapa adicional tras la etapa
20 (d), es decir, la liofilización o el secado por pulverización requieren como etapa previa la eliminación de disolvente orgánico, o puede ser la propia etapa (d), en cuyo caso el secado por pulverización eliminan directamente el disolvente orgánico. En una realización preferida de la anterior, cuando el procedimiento comprende una etapa de liofilización, esta se lleva a cabo tras la etapa (d), es decir, la liofilización requiere como etapa previa la eliminación de
25 disolvente orgánico.

En la liofilización es posible congelar previamente los eluatos recogidos o bien los eluatos tras la evaporación del disolvente. En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre -50 °C y -20 °C, preferiblemente entre -45 °C y -35 °C. En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre $1,31 \times 10^{-6}$ atm y $6,6 \times 10^{-6}$ atm (0,001 a 0,005 mmHg),
30 preferiblemente entre $1,31 \times 10^{-6}$ atm y $1,31 \times 10^{-5}$ atm (0,001 a 0,01 mmHg). El extracto es estable y no es necesaria la adición de estabilizantes en la etapa de liofilización. Sin embargo, es posible añadir pequeñas cantidades de azúcares a una concentración que oscila desde un 1 hasta un 5% u otras moléculas que actúen como crioprotectores y/o lioprotectores. En una realización particular, los azúcares se seleccionan del grupo que consiste en glucosa,

sacarosa, trehalosa, maltodextrina, goma arábica y goma xantana. El extracto de la invención después de la liofilización no se altera de ningún modo.

En el secado por pulverización, los eluatos recogidos o bien los eluatos tras la evaporación del disolvente se transforman en un polvo seco mediante secado rápido con aire, o un gas
5 inerte, caliente. Este método permite obtener materiales de tamaño de partícula fino y consistente. En una realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con un flujo de aire comprendido entre 15000 y 60000 L/h. En otra realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con un flujo de alimentación comprendido entre 1 L/h y 500 L/h, preferiblemente entre 1 L/h y 100 L/h, más preferiblemente entre 1 L/h y 20 L/h. En otra
10 realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con una presión de aire comprendida entre 2 y 10 bar. En otra realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo a una temperatura de secado comprendida entre 150 y 200 °C y una temperatura de entrada comprendida entre 15 y 35 °C.

En una realización particular, la eliminación del disolvente comprende recuperar el disolvente
15 para su posterior reutilización en la etapa (b), de extracción.

El procedimiento de la invención permite obtener un extracto de orujo de uva blanca que comprende polifenoles. Así, un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según el procedimiento de la invención. “Extracto obtenible” o “extracto obtenido”, significa el producto que se obtiene como
20 resultado de aplicar el procedimiento de la invención, con los elementos técnicos inherentes al procedimiento.

En una realización particular, el extracto se obtiene mediante empleo de acetona como disolvente de extracción. Así, en una realización preferida, el extracto de uva blanca obtenible según el procedimiento de la invención es un extracto que comprende acetona. En una
25 realización preferida de la anterior, la acetona se evapora en su totalidad y el extracto de uva obtenible según el procedimiento de la invención es un extracto acuoso.

En otra realización particular, el extracto se obtiene mediante empleo de propilenglicol como disolvente de extracción. Así, en otra realización preferida, el extracto de uva blanca obtenible según el procedimiento es un extracto que comprende propilenglicol.

30 Todas las realizaciones descritas arriba para el procedimiento, y también para el extracto, son aplicables a este tercer aspecto de la invención.

Composición farmacéutica

Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende un extracto de uva blanca de la invención como principio activo.

- 5 En una realización particular, el extracto de uva blanca de la composición farmacéutica es el extracto de uva blanca de la invención, o el extracto de uva blanca obtenido según el procedimiento de la invención.

En otra realización particular, la composición farmacéutica se caracteriza porque es una composición inyectable. En esta realización, la composición farmacéutica se formula como
 10 una composición inyectable para inyección intramamaria. Por tanto, en la presente invención, la composición puede formularse como solución, emulsión, suspensión, dispersión, o cualquier otra forma adecuada para inyección. Preferiblemente, la composición se formula como emulsión o dispersión.

En el caso de que sea una emulsión, la composición comprende una fase acuosa, una fase
 15 oleosa, y un surfactante. El extracto de uva, que es el principio activo, corresponde a la fase acuosa, mientras que la fase oleosa comprende una grasa o aceite adecuados como excipiente para inyección. En una realización particular, la fase acuosa comprende agua purificada para inyección, solución salina fisiológica, alcoholes inferiores (etanol, isopropanol, propanol) y/o alcoholes superiores (glicerina, propilenglicol, dipropilenglicol, 1,3-butilenglicol).

20 En una realización preferida, la fase acuosa comprende agua purificada para inyección, solución salina fisiológica, etanol, isopropanol, propanol, glicerina y/o propilenglicol, más preferiblemente agua purificada para inyección, etanol, isopropanol, propanol, y/o propilenglicol. En el contexto de la presente invención, el extracto acuoso puede comprender trazas de disolvente orgánico, preferiblemente acetona. Alternativamente, el extracto acuoso
 25 puede comprender un disolvente orgánico. Así, en una realización particular, el extracto comprende no más de un 60% de disolvente orgánico, no más de un 50% de disolvente orgánico, no más de un 40% de disolvente orgánico, no más de un 20% de disolvente orgánico, no más de un 10% de disolvente orgánico, no más de un 5% de disolvente orgánico, no más de un 1% de disolvente orgánico, y preferiblemente no más de un 0,5% de disolvente
 30 orgánico.

En una realización particular, el aceite es un aceite mineral o vegetal. En una realización preferida, la grasa o aceite son seleccionados del grupo que consiste en aceite de parafina, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, poliisobuteno hidrogenado, aceite de maíz, aceite de oliva, mono-, di-, o triglicéridos de ácidos grasos de cadena media (de 6 a 12

átomos de carbono), triglicérido cáprico/caprílico, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de cártamo, aceite de maní, aceite de semilla de amapola, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de ricino, y mezclas de los mismos. En otra realización más preferida, la grasa o aceite son seleccionados del grupo que

5 consiste en aceite de parafina, aceite de soja, aceite de sésamo, poliisobuteno hidrogenado, aceite de maíz, aceite de oliva, mono-, di-, o triglicéridos de ácidos grasos de cadena media (de 6 a 12 átomos de carbono), triglicérido cáprico/caprílico, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de cártamo, aceite de maní, aceite de semilla de amapola, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de palma, aceite de ricino, y mezclas de los

10 mismos.

El mono-, di-, o triglicérido de ácido graso de cadena media (de 6 a 12 átomos de carbono) puede seleccionarse del grupo de compuestos que consisten en glicerina unida a al menos un ácido graso. Ejemplos de ácidos grasos son el ácido hexanoico (ácido caproico), ácido octanoico (ácido caprílico), ácido nonanoico (ácido pelargónico), el ácido decanoico (ácido

15 cáprico), el ácido undecanoico (ácido undecílico), o el ácido dodecanoico (ácido láurico). Ejemplos preferidos de ácidos grasos son el ácido hexanoico (ácido caproico), el ácido octanoico (ácido caprílico), el ácido undecanoico (ácido undecílico), o el ácido dodecanoico (ácido láurico).

En una realización preferida, la fase oleosa no comprende un glicérido de ácido graso. En otra

20 realización preferida, la fase oleosa no es aceite de cacahuete.

En una realización preferida, el aceite es aceite de parafina. En una realización particular, el principio activo es el extracto de uva mientras que el aceite es el excipiente comprendido en la fase oleosa. Este excipiente no es un aceite que presenta actividad biológica. En otra

25 realización compatible con todas las anteriores, el aceite es un excipiente que no comprende principios activos que exhiban actividad biológica contra la mastitis.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se caracteriza porque es una emulsión que comprende una fase acuosa, una fase oleosa y un surfactante, en la cual:

- la fase acuosa comprende agua purificada para inyección, etanol, isopropanol, propanol, propilenglicol, o mezclas de los mismos; y/o
 - la fase oleosa comprende aceite de parafina, aceite de cacahuete, o mezclas de los
- 30 mismos.

En una realización particular, la composición comprende el aceite en una cantidad de 0,5 al 8%, preferiblemente del 1 al 6%, más preferiblemente del 2,5 al 5%, con respecto al peso total de la composición.

5 En una realización particular, la proporción entre la fase oleosa y la fase acuosa (que puede ser, por ejemplo, aceite de parafina como fase oleosa y extracto de propilenglicol:agua como fase acuosa) es de 1:0,1-1, preferiblemente 1:0,1-0,9, 1:0,1-0,8, 1:0,1-0,7, 1:0,1-0,6, 1:0,1-0,5, 1:0,2-0,5, más preferiblemente 1:0,2-0,4, o aún más preferiblemente 1:0,3. En una realización preferida, la proporción entre la fase oleosa y la fase acuosa es de 1:1, más preferiblemente 1:0,8, 1:0,5, 1:0,4, o aún más preferiblemente 1:0,3.

10 En el contexto de la presente invención, un número debe interpretarse como el resultado de haber sido redondeado a la última cifra decimal indicada. Por ejemplo, el número 0,3 comprende el rango 0,25-0,34. Asimismo, a modo de ejemplo adicional, el número 1 comprende el rango 0,5-1,4.

15 El surfactante, que puede ser un excipiente adicional de la composición, puede seleccionarse del grupo que consiste en Tween 20, Tween 80, Span 20 (monolaurato de sorbitan), Span 40 (monopalmitato de sorbitan), Span 60 (monoestearato de sorbitan), Span 65 (triestearato de sorbitan), Span 80 (monooleato de sorbitan), Span 85 (trioleato de sorbitan), dodecilsulfato de sodio (SDS), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Lauril Sulfato de Sodio, Tritón X-100, lecitina, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic, por ejemplo Pluronic F-68,
20 Pluronic F-127, o Pluronic L-44), o mezclas.

"Tween 20" es un nombre comercial común para un tensioactivo conocido como polisorbato 20, un tensioactivo no iónico que pertenece a la familia de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán. El polisorbato 20 se crea etoxilando monolaurato de sorbitán, lo que significa que tiene múltiples unidades de óxido de etileno (OE) agregadas a su estructura. El
25 número "20" en "Tween 20" representa el número aproximado de unidades de óxido de etileno en la molécula.

"Tween 80" es otro nombre comercial común para un tensioactivo conocido como polisorbato 80. Al igual que el polisorbato 20 (Tween 20), el polisorbato 80 es un tensioactivo no iónico que pertenece a la familia de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán. El polisorbato
30 80 se crea etoxilando monooleato de sorbitán, lo que significa que tiene múltiples unidades de óxido de etileno (EO) agregadas a su estructura. El número "80" en "Tween 80" representa el número aproximado de unidades de óxido de etileno en la molécula, lo que indica un mayor grado de etoxilación en comparación con Tween 20.

"Triton X-100" es el nombre comercial específico de un tensioactivo no iónico conocido como etoxilato de octilfenol, que pertenece a la familia de tensioactivos etoxilados de alquilfenol.

En el caso de que la composición sea una dispersión, además de comprender el extracto de uva como principio activo, la composición comprende como excipiente un agente de dispersión, preferiblemente uno o más polímeros biodegradables.

En una realización particular, el polímero biodegradable es un carboxipolimetileno, tal como los disponibles comercialmente por Lubrizol Corporation de Wickliffe, Ohio, con el nombre comercial Carbopol®. En una realización particular, el polímero biodegradable se selecciona de Carbopol, carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos. Los polímeros Carbopol® que pueden estar presentes en la composición de la presente invención incluyen, entre otros, Carbopol® 974P NF, como los homo-polímeros de tipo A, tipo B y/o tipo C; Carbopol® Ultrez 10, 20, 21 NF; Carbopol® 971P NF; Carbopol® 980 homopolímero tipo C, Carbopol® 980 NF, Carbopol® 980P, Carbopol® ETD 2020 NF, Carbopol® 71 G NF, Carbopol® 981P NF, Carbopol® 970P NF, Carbopol® 981P NF, Carbopol® 5984P NF, Carbopol® 934P NF, Carbopol® 940P NF, Carbopol® 941P NF, Carbopol® 13242 NF, Carbopol® AA-1 USP NF, Carbopol® TR1 NF y/o Carbopol® TR2 NF. Preferiblemente, el polímero es Carbopol® 974P NF.

El pH de la composición de la invención ha de ser un pH compatible con inyección. En una realización preferida, el pH está comprendido entre 4 y 8, preferiblemente entre 5 y 7, más preferiblemente entre 5,5 y 6,5.

La composición de la invención es una composición estable, al menos durante 6 meses, preferiblemente al menos durante 12 meses. Composición estable significa que el principio activo y los excipientes no sufren degradación significativa y el efecto terapéutico se mantiene, al menos en un 90% del efecto en el momento de preparación de la composición.

En una realización particular, la composición farmacéutica puede comprender un principio activo adicional no obtenido a partir del extracto de uva. En una realización particular, la composición farmacéutica comprende un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en amoxicilina, bencilpenicilina, cefalexina, cefquinona, enrofloxacino, eritromicina, marbofloxacino, oxitetraciclina, penetamato y mezclas. En una realización preferida, la composición farmacéutica no comprende un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en amoxicilina, bencilpenicilina, cefalexina, cefquinona, enrofloxacino, eritromicina, marbofloxacino, oxitetraciclina, penetamato y mezclas. En una realización más preferida, la composición farmacéutica no comprende un antibiótico.

En una realización particular, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica veterinaria. La composición farmacéutica puede aplicarse a todos los mamíferos no humanos productores de leche que necesiten tratamiento o prevención de mastitis. En una realización particular, el mamífero no humano es un animal lechero. En el contexto de la presente invención, "animal lechero" se corresponde a todo animal capaz de producir leche.

Así, en una realización particular, la composición farmacéutica es para administración en un mamífero no humano, preferiblemente vacas, camellos, búfalas, cabras u ovejas. Más preferiblemente, el mamífero no humano se selecciona del grupo que consiste en vacas, búfalas, cabras u ovejas, aún más preferiblemente vacas y búfalas, y lo más preferible vacas.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende además el resto de agua. Es decir, comprende agua para alcanzar el volumen final deseado de la composición.

El agua en la composición de la invención es preferiblemente agua para inyección, tal como agua destilada y/o estéril para inyección.

El término "agua para inyección" se refiere a agua purificada de manera que sea adecuada para administración intramamaria; como agua que cumpla con los requisitos de la USP (o equivalente extranjero) para agua para inyección.

La composición de la invención puede comprender vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. Los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, conservantes, incluidos los conservantes antimicrobianos y conservantes químicos, agentes de tonicidad, agentes tampón, antioxidantes, agentes quelantes, agentes de carga (bulking agent), agentes solubilizantes, tensioactivos, co-disolventes y combinaciones de los anteriores. Los vehículos o excipientes farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de A. Adejare, 23ª edición, 2021.

Los conservantes pueden incluir cloruro de benzalconio, cloruro de bentezonio, alcohol bencílico, ácido benzoico, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, fenol, 2-fenoxietanol, nitrato de fenilmercúrico, acetato de fenilmercúrico, borato de fenilmercúrico, timerosal y mezclas de los mismos.

Los agentes de tonicidad utilizados típicamente son cloruro sódico, dextrosa, glicerol, glicerina, manitol, cloruro potásico, propilenglicol y mezclas de los mismos.

Los agentes tampón pueden incluir tampón citrato y/o fosfato de sodio/potasio, ácido acético/ácido acético glacial/acetato de amonio, hidróxido de sodio, tris acetato, sulfato de amonio, hidróxido de amonio, arginina, ácido bencenosulfónico, benzoato de sodio,

bicarbonato de sodio, ácido bórico, carbonato de sodio, dióxido de carbono, dietanolamina, glucono delta lactona, glicina/glicina HCl, histidina/histidina HCl, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, lisina, ácido maleico, ácido metanosulfónico, monoetanolamina, succinato sódico/disódico, ácido sulfúrico, tartrato sódico/ácido y mezclas de los mismos.

- 5 Los antioxidantes pueden incluir ácido ascórbico, acetilcisteína, palmitato de ascorbilo, ascorbato de sodio, hidroxitolueno butilado, butilhidroxianisol, ácido cítrico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso (bisulfito, metabisulfito), metionina, metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, metabisulfito de acetona, clorhidrato de cisteína, ditionito de sodio, ácido gentísico, glutamato de sodio, glutatión, tioglicerol, galato de propilo, sulfito de sodio, 10 bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, tiourea, alfa tocoferol y mezclas de los mismos.

Los agentes quelantes pueden incluir edetato disódico, edetato sódico, edetato cálcico disódico, DTPA, monohidrato de ácido cítrico, versetamida cálcica, calteridol, ácido etilendiaminotetraacético y mezclas de los mismos.

- 15 Los agentes de carga pueden incluir manitol, sacarosa, lactosa, dextrano, trehalosa, sorbitol, glucosa, rafinosa, glicina, histidina y mezclas de los mismos.

Los agentes solubilizantes y co-disolventes pueden incluir alcoholes como etanol, benzoato de bencilo, dimetilacetamida, glicerina, sorbitol, polietilenglicol, pirrolidona y propilenglicol.

- En una realización, la composición farmacéutica de la invención puede comprender vehículos 20 o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales en una cantidad de 0 a 50 % p/v, de 0 a 40 % p/v o incluso de 0 a 30 % p/v. Es decir, la composición puede no incluir vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales (0 % p/v) o puede incluir vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales en una cantidad máxima de 50 % p/v, 40 % p/v o 30 % p/v, respectivamente. En una realización particular, la composición 25 farmacéutica de la invención puede comprender vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales en una cantidad de 0 a 20 % p/v o incluso de 0 a 10 % p/v.

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo, diluyente o adyuvante que se administra con el ingrediente activo.

- Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a una jeringa intramamaria que 30 comprende la composición farmacéutica de la invención.

En una realización particular, la jeringa intramamaria del quinto aspecto comprende un polímero biodegradable de carboxipolimetileno Carbopol®.

Indicación terapéutica

Un sexto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano, caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende un extracto de
5 uva blanca como principio activo. En una realización preferida, dicho extracto es el extracto de uva blanca de la invención, o el extracto de uva blanca obtenible según el método de la invención.

En una realización particular, la composición farmacéutica para su uso según el sexto aspecto comprende un polímero biodegradable de carboxipolimetileno Carbopol®.

10 El término "tratamiento" o "tratar" significa la administración de una composición según la invención para mejorar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. "Tratamiento" también abarca mejorar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. En una realización particular, la mastitis a tratar se selecciona de mastitis clínica o subclínica, preferiblemente mastitis clínica.

15 Por el término "mejorar" en el contexto de esta invención se entiende cualquier mejora de la situación del mamífero tratado.

El término "prevención" o "prevenir" significa la administración de una composición según la invención para reducir el riesgo de adquirir o desarrollar la enfermedad o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. En una realización particular, dicha enfermedad a prevenir
20 es mastitis clínica o subclínica, preferiblemente subclínica. La prevención también incluye el tratamiento de animales mamíferos no humanos, por ejemplo, vacas, que no exhiben ningún signo de mastitis pero están en presencia de otros animales que tienen al menos un signo de mastitis para minimizar o prevenir la transmisión o la transmisión potencial de mastitis de un animal a otro.

25 Definiciones alternativas del sexto aspecto de la invención son:

Método para el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano, caracterizado porque el método comprende la administración a un sujeto que necesita dicho tratamiento y/o prevención, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una
30 composición farmacéutica para administración intramamaria que comprende un extracto de uva blanca.

Uso de una composición farmacéutica para administración intramamaria que comprende un extracto de uva blanca, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de composición que, cuando se administra, suministra una cantidad de uno o más agentes farmacéuticamente activos contenidos en el mismo para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad o afección.

- 5 El tratamiento de mastitis es la cura o la mejora de un animal que tiene mastitis contraída, es decir, la reducción de al menos un síntoma de mastitis. La mastitis se refiere a una inflamación de la glándula mamaria. Los cambios físicos, químicos y usualmente bacteriológicos en la leche y los cambios patológicos en el tejido glandular la caracterizan. Los cambios glandulares dan como resultado a menudo una serie de cuadros sintomáticos tales como decoloración de
- 10 la leche, la presencia de coágulos y la presencia de grandes números de leucocitos. Clínicamente, la mastitis se ve como hinchazón, calor, dolor e induración de la glándula mamaria que, a menudo, da como resultado la deformación de la ubre. Una ubre inflamada se puede observar visiblemente o determinar por medio de palpación de la ubre. En muchos casos, la diagnosis de infecciones subclínicas ha llegado a depender ampliamente de pruebas
- 15 indirectas que dependen del contenido de leucocitos de la leche (copos, coágulos o leche serosa), al menos se detecta 1 bacteria en al menos 100 µL de leche proveniente de la ubre, el recuento celular somático elevado (SCC) usualmente mayor que 300.000 células/mL y/o la conductividad eléctrica de la leche se incrementa respecto de lo normal. En una realización particular, se considera que el tratamiento de mastitis ocurre cuando el recuento celular
- 20 somático elevado (SCC) es inferior a 300.000 células/mL, preferiblemente inferior a 200.000 células/mL y más preferiblemente inferior a 100.000 células/mL.

La composición inyectable para mastitis de la presente invención se puede usar como agente terapéutico para mejorar la mastitis a un estado normal y/o como agente preventivo para suprimir la aparición de mastitis. En la presente invención, "mastitis" incluye tanto mastitis

25 clínica como mastitis subclínica. La mastitis clínica tiene anomalías macroscópicas como hinchazón roja, fiebre, dolor o grumos en la leche, mientras que la mastitis subclínica puede ocurrir en la glándula mamaria sin tales anomalías.

Ejemplos de bacterias que causan la mastitis son *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Shigella spp.*, *Edwardsiella*

30 *spp.*, *Hafnia spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus spp.*, *Enterococci*, *Corynebacterium spp.*, *Arcanobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Prototheca spp.*, *Mycoplasma spp.*, y *Erwinia spp.*.

En una realización particular, la composición inyectable es una composición antibacteriana contra bacterias Gram-positivo.

El experto en la técnica podrá determinar apropiadamente el mejor momento de la administración. Por ejemplo, la composición de la invención puede administrarse durante el período de lactancia, y dado que se puede permitir que el extracto actúe en la mama durante un largo período de tiempo, también puede administrarse durante el período cuando no hay ordeño.

La frecuencia de administración también podrá ser determinada según la necesidad de cada caso. En una realización particular, la composición se administra al menos una vez cada día (diariamente), al menos una vez cada dos días, o al menos una vez cada semana.

En una realización particular, la dosis administrada de la composición farmacéutica veterinaria de la invención es de entre 0,002 mL a 0,030 mL de composición farmacéutica por kg de peso del animal. Preferiblemente, la dosis es de 0,006 a 0,019 mL, más preferiblemente de 0,008 a 0,016 mL, aún más preferiblemente de 0,009 a 0,014 mL por kg de peso del animal.

En otra realización particular, la dosis administrada de la composición farmacéutica veterinaria de la invención comprende entre 0,0004 a 0,0288 g del extracto de uva (peso seco) por kg de peso del animal. Preferiblemente, la dosis es de 0,0011 a 0,0182 g, más preferiblemente de 0,0016 a 0,0154 g, aún más preferiblemente de 0,0018 a 0,0134 g por kg de peso del animal.

En el ámbito del tratamiento de la mastitis en animales, se han empleado varias vías de administración, cada una con sus propias ventajas y consideraciones. La composición farmacéutica de la presente invención se formula como una composición inyectable para inyección intramamaria. En el contexto de la presente invención, “inyección intramamaria” incluye “infusión de ubre”.

La infusión de ubre implica la inyección directa de fármacos en la región afectada de la ubre a través del pezón. El objetivo principal es lograr una administración localizada y una terapia de precisión. La eficacia de la infusión de ubre radica en su capacidad de administrar el tratamiento directamente al sitio de la infección, minimizando la exposición sistémica.

Un séptimo aspecto de la presente invención se dirige al extracto de la invención, o al extracto obtenible según el procedimiento de la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

Definiciones alternativas del séptimo aspecto de la invención son:

Método para el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano, caracterizado porque el método comprende la administración a un sujeto que necesita

dicho tratamiento y/o prevención, de una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto de la invención, o del extracto obtenible según el procedimiento de la invención.

Uso del extracto de la invención, o del extracto obtenible según el procedimiento de la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

Parte experimental

Estos ejemplos sirven para ilustrar realizaciones de la invención, pero que en ningún caso se deben considerar limitativos.

Ejemplo 1. Preparación y análisis de los extractos.

Los extractos seleccionados como ingredientes activos para las composiciones veterinarias intramamarias de la invención se han obtenido de dos maneras. Por un lado, se utilizó una mezcla de disolventes compuesta por una mezcla isovolumétrica de propilenglicol y agua (50/50). Por otro lado, se utilizó acetona como disolvente y se sometió el extracto líquido obtenido a un proceso de volatilización de la acetona, para obtener un extracto acuoso.

Utilizando arena como dispersante, se mezcló y trituró con bagazo de uva blanca de la variedad Albariño en una relación 1:5. Esta mezcla se introdujo en una columna de acero inoxidable de dimensiones apropiadas con una capa de dispersante en el fondo, que actúa a modo de filtro, y se compactó ligeramente. La cantidad de disolvente utilizado como disolvente de extracción fue de 0,75 volúmenes respecto al volumen de mezcla extractiva cuando se utilizó acetona y de 0,625 volúmenes cuando se utilizó la mezcla isovolumétrica de propilenglicol y agua. Tras 48 h de maceración, se procede a la obtención del eluato correspondiente. Posteriormente, cuando el disolvente de extracción fue acetona, dicho eluato se concentró a vacío hasta tener un valor de acetona residual inferior al 0,5%.

Ejemplo 2. Caracterización analítica

Índice de polifenoles totales (IPT)

El contenido polifenólico total de varios extractos de orujo de uva blanca obtenidos según el método descrito en el Ejemplo 1 se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu siguiendo el protocolo para la microtitulación en placas de 96 pocillos adaptado de Zhang et al. (Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. *A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds*. J Appl Phycol. (2006) 18:445–

50). Así, 20 µL de extracto diluido se mezclaron con 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) y 80 µL de una disolución de carbonato de sodio (7,5% p/p). La mezcla se agitó en oscuridad durante 30 minutos, para ser posteriormente medida a 760 nm en el lector de microplacas SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), que realiza mediciones de absorbancia en el rango de longitudes de onda 220-1000 nm. Las mediciones se realizaron en microplacas de polipropileno de 96 pocillos con un volumen de 300 µL. Para expresar el índice polifenólico total se utilizó el ácido gálico como patrón, en un rango de concentración con 12 niveles comprendidos entre 30 y 200 mg/L (0,2-0,8 UA). El contenido en polifenoles totales de las muestras se expresa así como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L).

Para los extractos obtenidos empleando acetona como disolvente, se realizó el análisis y el rango obtenido de IPT fue de entre 7000 y 10000 mgGAE/L en el caso de los extractos sin volatilizar (12 muestras, promedio de 8699 mgGAE/L), y de entre 11000 y 43000 mgGAE/L en el caso de los extractos volatilizados (33 muestras, promedio de 27866 mgGAE/L).

Para los extractos sin volatilizar, obtenidos empleando una mezcla de propilenglicol:agua (50:50) como disolvente, se realizó el análisis y el rango obtenido de IPT fue de entre 1000 y 8500 mgGAE/L (15 muestras, promedio de 6287 mgGAE/L).

Identificación de polifenoles objetivo por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Los extractos obtenidos según el Ejemplo 1 se filtraron a través de filtros de jeringa de PTFE de 0,22 µm sobre un vial de vidrio de 2 mL para realizar los análisis correspondientes.

Se identificaron los principales polifenoles presentes en los extractos del Ejemplo 1 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, triple cuadrupolo (LC-MS/MS_QqQ). Las condiciones instrumentales óptimas para la detección de los polifenoles objetivo se adaptaron de Celeiro, M.; Lamas, J.P.; Arcas, R.; Lores, M. *Antioxidants Profiling of By-Products from Eucalyptus Greenboards Manufacture*, *Antioxidants*. 2019, 8(8), 263. El análisis LC-MS/MS se realizó empleando un instrumento Thermo Scientific (San José, CA, EE.UU.) basado en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum Ultra™ equipado con una fuente HESI-II (ionización por electrospray calentado) y un automuestreador Accela Open con un bucle de 20 µL. La separación cromatográfica se logró en una columna Kinetex C18 (2,6 µm, 100 × 2,1 mm) con una precolumna (SecurityGuard™ ULTRA Holder) obtenida de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.). El volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura de la columna se fijó en 50 °C. La fase móvil consistió en agua (A) y metanol (B), ambas con un 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente cromatográfico fue del 5% B al 90% B en 11 min y se mantuvo constante durante 3 min. Las condiciones iniciales se alcanzaron en 6

min. El caudal de fase móvil fue de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. El tiempo total de ejecución de cada inyección fue de 20 min. El espectrómetro de masas y la fuente HESI-II trabajaron simultáneamente en modo positivo y negativo (véase el modo de ionización para cada compuesto objetivo en la Tabla 1). Se implementó el modo de adquisición Selected Reaction Monitoring (SRM) monitorizando 2 o 3 transiciones por compuesto (ver Tabla 1), para una identificación inequívoca de los compuestos objetivo. El sistema se gestionó con los programas informáticos Xcalibur 2.2 y Trace FinderTM 3.2.

Tabla 1. Compuestos estudiados por cromatografía. Modo de ionización, número CAS, tiempo de retención y transiciones MS/MS.

Modo de ionización	Compuesto	CAS	Tiempo retención (min)	Transiciones MS/MS (energía colisión, eV)
-	Ácido gálico	149-91-7	2.25	169.02 \rightarrow 125.04 (17) 169.02 \rightarrow 153.1 (15)
+	Ácido 2-4-6-trihidrobenczoico	487-70-7	3.23	168.98 \rightarrow 150.99 (17) 168.98 \rightarrow 83.02 (23) 168.98 \rightarrow 107.02 (22)
-	Ácido caftárico	67879-58-7	4.21	310.96 \rightarrow 178.97 (17) 310.96 \rightarrow 148.96 (14)
-	Procianidina B1	20315-25-7	4.76	577.03 \rightarrow 407.06 (26) 577.03 \rightarrow 288.93 (25) 577.03 \rightarrow 424.97 (26)
+	Catequina	225937-10-0	5.02	289.00 \rightarrow 245.02 (17) 289.00 \rightarrow 203.11 (22)
-	Procianidina B2	29106-49-8	5.50	577.03 \rightarrow 407.06 (26) 577.03 \rightarrow 288.93 (25) 577.03 \rightarrow 424.97 (26)
+	Galato de epigallocatequina	989-51-5	6.00	457.15 \rightarrow 169.05 (21) 457.15 \rightarrow 125.09 (42) 457.15 \rightarrow 305.09 (21)
-	Procianidina C1	37064-30-5	6.01	577.03 \rightarrow 288.93 (25) 577.03 \rightarrow 407.06 (26) 577.03 \rightarrow 424.97 (26)
+	Epicatequina	490-46-0	6.11	289.00 \rightarrow 245.02 (17) 289.00 \rightarrow 203.11 (22)
+	Galato de epicatequina	1257-08-5	7.13	441.13 \rightarrow 289.13 (30) 441.13 \rightarrow 125.08 (42) 441.13 \rightarrow 169.05 (24)
+	Quercetina-3-glucurónido	22688-79-5	9.21	479.09 \rightarrow 461.50 (14) 479.09 \rightarrow 302.96 (18)
-	Quercetina-3-rutinósido	207671-50-9	9.39	609.18 \rightarrow 270.92 (96) 609.18 \rightarrow 178.87 (44) 609.18 \rightarrow 300.01 (37)
+	Quercetina-3-glucósido	482-35-9	9.41	465.07 \rightarrow 256.90 (41) 465.07 \rightarrow 302.97 (14)
-	Kaempferol	520-18-3	12.27	285.07 \rightarrow 184.91 (30) 285.07 \rightarrow 239.12 (35)

Se han determinado los principales polifenoles presentes en los extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, triple cuádrupolo (LC-MS/MS_QqQ) mediante el método descrito arriba. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Rangos de polifenoles presentes en extractos de uva blanca obtenidos tras extracción con mezcla de 50/50 propilenglicol/agua (14 extractos) o acetona (12 extractos). Valores expresados en ppm (mg/L).

Polifenoles	Extracto de propilenglicol agua	Extracto de acetona
Ácido gálico	10-40	8-30
Ácido 2-4-6-trihidrobenczoico	1-3	1-30
Ácido caftárico	4-7	0,1-4
Procianidinas B1+B2+C1	60-130	100-280
Catequina	50-70	60-130
Galato de epigallocatequina	0,1-3	0,1-1,2
Epicatequina	50-70	10-150
Galato de epicatequina	3-20	15-50
Quercetina-3-glucurónido	10-25	30-65
Quercetina-3-rutinósido	0,2-1	2-5
Quercetina-3-glucósido	10-25	30-120
Kaempferol	0,1-3	0,1-2,5
Quercetina	1-5	0,1-15

Ejemplo 3. Actividad antibacteriana de los extractos.

Se han realizado ensayos antimicrobianos *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos de la invención.

Metodología

Las pruebas antimicrobianas se realizaron de acuerdo con las recomendaciones EUCAST, utilizando el método colorimétrico/fluorométrico Alamar-Blue y leyendo las placas por fluorometría. La metodología implica la incubación de las células en caldo Müller-Hinton suplementado con diferentes concentraciones (que van del 0,625 al 20%) de la sustancia antimicrobiana que se desea evaluar y la cantidad adecuada de resazurina. Esta molécula no fluorescente se convierte en la molécula fluorescente resorufina en presencia de células metabólicamente activas. Esta reacción permite cuantificar la cantidad de células vivas midiendo la fluorescencia liberada por la resorufina producida durante el proceso.

Este protocolo ofrece valores de Concentraciones Bactericidas Mínimas (Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)), por lo que se calcula la Concentración Inhibitoria Mínima (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) como el valor medio entre la MBC y la concentración inmediatamente anterior ensayada. Los valores de IC50 (la concentración de extracto que

5 inhibe el crecimiento de la mitad de un inóculo de la bacteria ensayada) se han obtenido utilizando el programa IC50 calculator (AAT Bioquest).

Los microorganismos ensayados incluyeron cepas bacterianas grampositivas, siendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 la cepa de referencia y *Streptococcus uberis* ATCC 19436 el principal microorganismo objetivo; ya que la mastitis está causada, entre otras, por

10 dicha bacteria, la cual invade el tejido mamario provocando una inflamación de la glándula mamaria.

Resultados

Los resultados del efecto antimicrobiano de los extractos, evaluado en ensayos por triplicado,

15 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos en las cepas *S. aureus* y *S. uberis*. IC50 es la concentración de extracto responsable del 50% de la inhibición bacteriana. IC50 (%) es el porcentaje de dilución del extracto responsable del 50% de la inhibición bacteriana. MIC (concentración inhibitoria mínima) es la concentración más baja de extracto

20 que inhibe el crecimiento de las bacterias, después de su incubación. Asimismo, MIC(%) es el porcentaje de dilución del extracto más bajo que inhibe el crecimiento de las bacterias, después de su incubación.

Extracto	<i>S. aureus</i> (Gram +)		<i>S. uberis</i> (Gram +)	
	IC50 (%)	MIC (%)	IC50 (%)	MIC (%)
Propilenglicol/agua	1,79	< 5	7,5	< 10
acetona	0,33	< 0,625	1,88	< 2,5

Ejemplo 4. Preparación de formulaciones intramamarias.

Emulsión de aceite de parafina en agua cargado con el extracto de propilenglicol:agua.

25

Se desarrolló una emulsión de aceite de parafina en agua (O/W) utilizando el aceite de parafina como fase oleosa y el extracto de 1:1 propilenglicol:agua (PG:W) como fase acuosa en una proporción de 1:0,3. Se utilizó Tween 80 al 2,5% (v/v) como surfactante. Los componentes y proporciones de la formulación se seleccionaron de acuerdo con el balance

30 hidrófilo-lipofílico (HLB). Para la preparación de 10 mL de formulación se utilizaron 2,25 mL de extracto PG: W, 7,5 mL de aceite de parafina y 0,25 mL de Tween 80. Ambas fases (y el

surfactante) se mezclaron utilizando un homogeneizador de alta cizalladura (Ultra-Turrax, IKA) a 10.000 rpm durante 5 minutos.

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de la formulación para evaluar su estabilidad y propiedades. El comportamiento reológico de las formulaciones junto con el pH, el signo de la emulsión, el tamaño de glóbulo y la miscibilidad con la leche se evaluaron y se describen en la Tabla 4.

El pH se evaluó empleando un pH-metro Hanna Instruments equipado con una sonda para muestras viscosas (HI1053B).

La jeringabilidad de la formulación a temperatura ambiente se evaluó utilizando un Analizador de Textura TA XT Plus (Surrey, Reino Unido), calculando el trabajo necesario para expulsar la formulación cargada en cánulas intramamarias. En resumen, las cánulas se cargaron con la formulación evitando la formación de burbujas de aire. Luego, se colocaron verticalmente sobre un soporte y el émbolo del texturómetro descendió a 2 mm/s, presionando el pistón de la cánula a una distancia de 2 cm. Todas las mediciones se realizaron seis veces.

La viscosidad se evaluó utilizando un reómetro AR1000-N (TA Instruments, Reino Unido). Se utilizó una geometría de cono-plato de 6 cm Ø y 2.1° para registrar los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') a una frecuencia angular de 5 rad/s.

El signo de la emulsión se identificó utilizando una cámara de Neubauer tiñendo la fase oleosa con Sudan III. El tamaño y la dispersión de tamaño de glóbulo se evaluaron de acuerdo con el método USP utilizando dispersión dinámica de luz empleando un Zetasizer Pro (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Las muestras se diluyeron con agua Milli-Q® (1:1000), se colocaron en una celda específica (DTS 1070) y se midieron mediante un proceso automático de medición. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La miscibilidad con la leche se evaluó observando cualquier separación de fases después de la dilución de las formulaciones con leche.

Se prepararon además formulaciones estériles mediante dos estrategias; 1) empleando los componentes de las formulaciones estériles y formulado los sistemas en aséptico empleando una cabina de flujo laminar o 2) esterilizando las formulaciones empleando una estrategia de esterilización terminal mediante radiación gamma con una radiación de 25kGy. En ambos casos el extracto se basificó empleando NaOH 10M hasta alcanzar un pH de aproximadamente 7. Para la formulación en aséptico el extracto, se filtró por un filtro de 0,22 µm para esterilizarlo de igual manera que la solución de surfactantes mientras que el aceite de parafina se esterilizó por calor seco. El homogeneizador de alta cizalladura utilizado para la mezcla también fue previamente esterilizado utilizando etanol. La Tabla 4 muestra los resultados de las formulaciones no estériles o siguiendo ambas estrategias de esterilización.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de la emulsión de aceite de parafina y el extracto de propilenglicol:agua.

Esterilización	-	Formulación en aséptico	Esterilización terminal
Jeringabilidad (Pa·s)	342,10 ± 14,00	-	-
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	35,00 ± 5,34	21,54 ± 2,64	-
pH	4,74 ± 0,02	5,84 ± 0,10	4,56
Signo de la emulsión	O/W	O/W	O/W
Tamaño de glóbulo (nm)	3660,8 ± 28,6	4387,8 ± 54,7	5223,3 ± 212,6
Dispersión del tamaño de glóbulo (PDI)	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
Miscible con la leche	SÍ	SÍ	SÍ

Las propiedades de flujo de las formulaciones se analizaron en comparación con dos formulaciones intramamarias comerciales aprobadas para el tratamiento de la mastitis bovina, la formulación comercial 1 (Ilovet-clox[®], cuya composición por jeringa comprende 250 mg de sulfato de neomicina y 500 mg de cloxacilina benzatina 500 mg) y la formulación comercial 2 (Mammicurine 800[®], para inyección intramamaria, que comprende 0,25 mL *Calendula officinalis*, 0,25 mL *Solanum lycopersicum*, 0,04 mL *Echinacea*, 0,25 mL *Phytolacca americana*, y 0,10 mL *Solidago virgaurea* L), empleando un reómetro de esfuerzo controlado AR1000-N (TA Instruments, Reino Unido). Se empleó un barrido de frecuencia entre 0,05 y 50 rad/s y un estrés oscilatorio de 0,1 Pa con una geometría de cono-plato de 6 cm Ø y 2.1°. La Figura 1 muestra el comportamiento similar entre las formulaciones desarrolladas y las comercializadas.

Las propiedades de flujo fueron muy similares a las obtenidas para las formulaciones comerciales mostrando un comportamiento en el que al incrementar la fuerza de cizalla se disminuye la viscosidad facilitando la administración de la formulación.

Las formulaciones sin esterilizar fueron caracterizadas de nuevo a tiempos posteriores (tras 1, 3 y 6 meses) para evaluar su estabilidad. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para las formulaciones no estériles a diferentes tiempos tras su almacenamiento a 4°C. Las formulaciones fueron estables durante al menos seis meses.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las emulsión de aceite de parafina y el extracto de propilenglicol:agua evaluadas a diferentes tiempos.

Tiempo	1 mes	3 meses	6 meses
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	34,46 ± 6,37	45,92 ± 16,09	18,59 ± 4,57
pH	4,25 ± 0,03	4,22 ± 0,04	4,75 ± 0,06
Signo de la emulsión	O/W	O/W	O/W
Tamaño de glóbulo (nm)	5597,2 ± 938,6	4128,4 ± 722,8	2610,8 ± 758,7
Dispersión del tamaño de glóbulo (PDI)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Miscible con la leche	SÍ	SÍ	SÍ

Emulsión de aceite de cacahuete en agua cargado con el extracto de propilenglicol:agua

Se desarrolló una emulsión de aceite de cacahuete en agua utilizando el balance hidrófilo-lipofílico HLB. En este caso se requirieron dos surfactantes: un surfactante acuoso y un surfactante oleoso, siendo los componentes finales Tween 80 4,60% (v/v) y Span 65 15,80% (v/v). El aceite de cacahuete fue el componente de la fase oleosa y el extracto de propilenglicol:agua (PG:W) fue la fase acuosa en una proporción de 1:0,3. Para la preparación de 10 mL de formulación se utilizaron 1,84 mL de extracto PG:W, 6,12 mL de aceite de cacahuete, 0,46 mL de Tween 80 y 1,58 mL de Span 65. Ambas fases se mezclaron utilizando un homogeneizador de alta cizalladura (Ultra-Turrax, IKA) a 10.000 rpm durante 5 minutos en un baño de hielo. Las propiedades de la formulación se caracterizaron como se describió previamente para la emulsión de aceite de parafina. La Tabla 6 muestra los datos experimentales obtenidos.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de la emulsión de aceite de cacahuete y el extracto de propilenglicol:agua. Formulación sin esterilizar.

Jeringabilidad (Pa·s)	545,30 ± 72,40
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	913,90 ± 425,60
pH	4,60 ± 0,00
Signo de la emulsión	O/W
Miscible con la leche	SÍ

Las formulaciones no fueron estables durante más de un mes cuando se almacenaron a 4°C.

Dispersión polimérica cargada con el extracto de propilenglicol:agua

Se probaron diferentes dispersiones poliméricas preparadas utilizando el extracto de propilenglicol:agua para el manejo de la mastitis. Para la preparación de 10 mL de formulación se utilizaron 9,6 mL de extracto PG:W y 0,4 g de Carbopol 974. La dispersión polimérica se obtuvo añadiendo el polímero sobre el extracto seguido de su homogeneización empleando un Silverson L4R. La formulación fue completamente caracterizada como se describió para los ejemplos anteriores y los datos experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Se prepararon además formulaciones estériles mediante dos estrategias: 1) empleando los componentes de las formulaciones estériles y formulado los sistemas en aséptico empleando una cabina de flujo laminar o 2) esterilizando las formulaciones empleando una estrategia de esterilización terminal mediante radiación gamma a con una radiación de 25kGy. En este caso las dispersiones poliméricas fueron basificadas empleando NaOH 10M previo a la radiación. Para la formulación en aséptico, el extracto se filtró por un filtro de 0,22 µm para esterilizarlo, mientras que el polímero se esterilizó por radiación UV en la propia cabina de flujo laminar. El

homogeneizador de alta cizalladura utilizado para la mezcla también fue previamente esterilizado utilizando etanol 70%.

La Tabla 7 muestra los resultados de las formulaciones no estériles o siguiendo ambas estrategias de esterilización.

5

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de las dispersiones poliméricas Carbopol 4% conteniendo propilenglicol:agua.

Esterilización	-	Formulación en aséptico	Esterilización terminal
Jeringabilidad (Pa·s)	348,90 ± 26,20	-	-
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	34,30 ± 7,10	34,28 ± 6,07	-
pH	3,84 ± 0,02	3,68 ± 0,01	6,20 ± 0,16
Miscible con la leche	SÍ	SÍ	SÍ

Las propiedades de flujo de las formulaciones se analizaron en comparación con dos formulaciones intramamarias comerciales aprobadas para el tratamiento de la mastitis bovina (formulación comercial 1 y 2) tal y como se describió anteriormente. Las propiedades de flujo fueron muy similares a las obtenidas para las formulaciones comerciales mostrando un comportamiento en el que al incrementar la fuerza de cizalla se disminuye la viscosidad facilitando la administración de la formulación (gráfica omitida por ser similar a la Figura 1).

Las formulaciones sin esterilizar fueron caracterizadas de nuevo a tiempos posteriores (tras 1, 3 y 6 meses) para evaluar su estabilidad. La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos para las formulaciones no estériles a diferentes tiempos tras su almacenamiento a 4°C. Las dispersiones poliméricas fueron estables durante al menos seis meses.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de las dispersiones poliméricas de Carbopol al 4% y el extracto de propilenglicol:agua evaluadas a diferentes tiempos.

Tiempo	1 mes	3 meses	6 meses
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	39,01 ± 12,38	42,03 ± 13,53	14,89 ± 1,95
pH	3,34 ± 0,09	3,29 ± 0,05	3,97 ± 0,07
Miscible con la leche	SÍ	SÍ	SÍ

Emulsión de aceite de parafina en agua cargado con el extracto de acetona volatilizado

Se desarrolló una emulsión de aceite de parafina en agua (O/W) utilizando el aceite de parafina como fase oleosa y el extracto de acetona (AC), tras la evaporación del disolvente, como fase acuosa en una proporción de 1:0.3 La evaporación de la acetona tras la extracción dio lugar a una dispersión acuosa. El extracto se basificó empleando NaOH 10M hasta

alcanzar un pH de aproximadamente 7, se filtró por un filtro de 0,22 μm para esterilizarlo de igual manera que la solución de surfactantes, mientras que el aceite de parafina se esterilizó por calor seco. Para la emulsificación se utilizó Tween 80 al 2,5% (v/v) como surfactante, y los componentes de la formulación se seleccionaron de acuerdo con el balance hidrófilo-lipofílico HLB. Para la preparación de 10 mL de formulación se utilizaron 2,25 mL de extracto AC, 7,5 mL de aceite de parafina y 0,25 mL de Tween 80. Ambas fases se mezclaron en una cabina de flujo laminar utilizando un homogeneizador de alta cizalladura (Ultra-Turrax, IKA), previamente esterilizado con etanol, a 10,000 rpm durante 5 minutos. Estas formulaciones preparadas en aséptico se caracterizaron en cuanto a propiedades fisicoquímicas como se mencionó anteriormente. Alternativamente se prepararon formulaciones con igual composición, pero sin sufrir los procesos de esterilización previa de los materiales. En estos casos, las formulaciones sufrieron una esterilización terminal mediante radiación gamma con una dosis de 25kGy. Las propiedades de las formulaciones esterilizadas por ambas estrategias se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la emulsión de aceite de parafina y el extracto de acetona volatilizado.

Esterilización	Formulación en aséptico	Esterilización terminal
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	28,15 \pm 0,85	-
pH	6,27 \pm 0,02	4,18
Signo de la emulsión	O/W	O/W
Tamaño de glóbulo (nm)	3643,3 \pm 721,7	1982,5 \pm 715,5
Dispersión del tamaño de glóbulo (PDI)	0,2 \pm 0,0	0,7 \pm 0,3
Miscible con la leche	SÍ	SÍ

Las propiedades de flujo de las formulaciones se analizaron en comparación con dos formulaciones intramamarias comerciales aprobadas para el tratamiento de la mastitis bovina (formulación comercial 1 y 2) tal y como se describió anteriormente. Las propiedades de flujo fueron muy similares a las obtenidas para las formulaciones comerciales mostrando un comportamiento en el que al incrementar la fuerza de cizalla se disminuye la viscosidad facilitando la administración de la formulación (gráfica omitida por ser similar a la Figura 1).

Dispersión polimérica cargada con el extracto de acetona volatilizado

Se desarrollaron jeringas intramamarias de tipo dispersión polimérica empleando como base el polímero Carbopol 974 al 4% (p/v). Para la preparación de 10 mL de formulación se utilizaron 9,6 mL de extracto AC y 0,4 g de Carbopol 974. La dispersión polimérica se obtuvo

añadiendo el polímero previamente esterilizado por radiación UV sobre el extracto previamente esterilizado a través de filtros de 0,22 μm seguido de su homogeneización en cabina de flujo laminar. Estas formulaciones preparadas en aséptico se caracterizaron en cuanto a propiedades fisicoquímicas como se mencionó anteriormente. Alternativamente se prepararon formulaciones con igual composición, pero sin sufrir los procesos de esterilización previa de los materiales. En estos casos, las formulaciones sufrieron una esterilización terminal mediante radiación gamma con una radiación de 25kGy. En este caso las dispersiones poliméricas fueron basificadas empleando NaOH 10M previo a la radiación. Las propiedades de las formulaciones esterilizadas por ambas estrategias se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas de las dispersiones poliméricas conteniendo el extracto de acetona volatizado.

Esterilización	Formulación en aséptico	Esterilización terminal
Viscosidad a 22 °C (Pa·s)	13,36 \pm 1,10	23,86
pH	3,40 \pm 0,13	5,70 \pm 0,36
Miscible con la leche	SÍ	SÍ

Las propiedades de flujo de las formulaciones se analizaron en comparación con dos formulaciones intramamarias comerciales aprobadas para el tratamiento de la mastitis bovina (formulación comercial 1 y 2) tal y como se describió anteriormente. Las propiedades de flujo fueron muy similares a las obtenidas para las formulaciones comerciales mostrando un comportamiento en el que al incrementar la fuerza de cizalla se disminuye la viscosidad facilitando la administración de la formulación (gráfica omitida por ser similar a la Figura 1). La dispersión polimérica se mantuvo estable durante tres meses a 4°C.

Ejemplo 5. Actividad antimicrobiana de las formulaciones intramamarias que comprenden los extractos.

Se han realizado ensayos antimicrobianos *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de las formulaciones descritas en el ejemplo 4, que comprenden los extractos polifenólicos de la invención.

El protocolo experimental fue el descrito en el ejemplo 3.

Los resultados del efecto antimicrobiano de las formulaciones, evaluado en ensayos por triplicado, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de las formulaciones descritas arriba esterilizadas mediante radiación gamma en la cepa *S. aureus* y *S. uberis*. IC50 es la concentración de extracto responsable del 50% de la inhibición bacteriana. IC50 (%) es el porcentaje de dilución del extracto responsable del 50% de la inhibición bacteriana. MIC (concentración inhibitoria mínima) es la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias, después de su incubación. Asimismo, MIC(%) es el porcentaje de dilución del extracto más bajo que inhibe el crecimiento de las bacterias, después de su incubación. n/a hace referencia a no aplicable ya que el número de células viables superó el 50%.

Formulación	<i>S. aureus</i> (Gram +)		<i>S. uberis</i> (Gram +)	
	IC50 (%)	MIC (%)	IC50 (%)	MIC (%)
Emulsión de aceite de parafina en agua cargado con el extracto de propilenglicol:agua	n/a	> 55,56	n/a	> 55,56
Dispersión de extracto de propilenglicol:agua y Carbopol 974 al 4% (p/v)	2,70	≤ 20	1,94	> 20
Emulsión de aceite de parafina en agua cargado con el extracto de acetona volatilizado	n/a	> 55,56	n/a	> 55,56
Dispersión de extracto de acetona volatilizado y Carbopol 974 al 4% (p/v)	< 0,625	≤ 0,625	0,71	≤ 1,25

REIVINDICACIONES

1. Extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftárico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigalocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.
2. Extracto según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de ácido gálico de entre 10 y 40 mg/L de extracto;
 - una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
 - una concentración de ácido caftárico de entre 4 y 7 mg/L de extracto;
 - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
 - una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
 - una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto;
 - una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
 - una concentración de galato de epicatequina de entre 3 y 20 mg/L de extracto;
 - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
 - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1,0 mg/L de extracto;
 - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
 - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3,0 mg/L de extracto; y/o
 - una concentración de quercetina de entre 1,0 y 5,0 mg/L de extracto.
3. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto.
4. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto.
5. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto.
6. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 20 mg/L de extracto.
7. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
 - una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
 - una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto; y
 - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 20 mg/L de extracto.

8. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende:
 - una concentración de ácido gálico de entre 10 y 40 mg/L de extracto;
 - una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 3 mg/L de extracto;
 - una concentración de ácido caftárico de entre 4 y 7 mg/L de extracto;
 - 5 - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 60 y 130 mg/L de extracto;
 - una concentración de catequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
 - una concentración de galato de epigalocatequina de entre 1 y 3 mg/L de extracto;
 - una concentración de epicatequina de entre 50 y 70 mg/L de extracto;
 - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 20 mg/L de extracto;
 - 10 - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
 - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 0,2 y 1 mg/L de extracto;
 - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 10 y 25 mg/L de extracto;
 - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 3 mg/L de extracto; y
 - una concentración de quercetina de entre 1 y 5 mg/L de extracto.
- 15 9. Procedimiento para la obtención de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;
 - b) Someter la mezcla a una elución con un disolvente que comprende propilenglicol y/o acetona;
 - 20 c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
 - d) Opcionalmente, eliminar el disolvente.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque en la etapa (a) se emplea un dispersante.
- 25 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizado porque en la etapa (a) se emplea un dispersante seleccionado de entre el grupo constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel.
12. Procedimiento según la reivindicación 9 a 11, caracterizado porque el disolvente comprende propilenglicol o acetona.
- 30 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque el disolvente también comprende agua.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque, tras recoger el extracto de uva blanca, la etapa (c) comprende además la recirculación

del eluato obtenido, por la mezcla de la etapa (a).

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizado porque comprende la etapa adicional (d), llevada a cabo después de la etapa (c), de reducción de disolvente.
- 5 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizado porque la etapa (d) comprende un paso de evaporación, liofilización y/o secado por pulverización.
17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, caracterizado porque la etapa (d) comprende la eliminación de disolvente hasta una cantidad final de no más de un 20%, preferiblemente no más de un 1% de disolvente.
- 10 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, caracterizado porque la etapa (d) comprende un paso de evaporación de disolvente, seguido de un paso de liofilización y/o secado por pulverización produciendo así el extracto sólido.
19. Extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18.
- 15 20. Composición farmacéutica caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende, como principio activo, el extracto de uva blanca definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el extracto definido en la reivindicación 19.
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, caracterizada porque es una composición inyectable.
- 20 22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, caracterizada porque es una emulsión o dispersión.
23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizada porque es una emulsión que comprende una fase acuosa, una fase oleosa y un surfactante, en la cual:
 - 25 - la fase acuosa comprende agua purificada para inyección, etanol, isopropanol, propanol, propilenglicol, o mezclas de los mismos; y/o
 - la fase oleosa comprende aceite de parafina.
24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizada porque comprende un polímero biodegradable de carboxipolimetileno Carbopol®.
- 30 25. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, caracterizada porque es para administración en un mamífero no humano, preferiblemente

vacas, camellos, búfalas, cabras u ovejas.

26. Jeringa intramamaria que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.
27. Jeringa intramamaria según la reivindicación 26, caracterizada porque comprende un
5 polímero biodegradable de carboxipolimetileno Carbopol®.
28. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano, caracterizada porque es una composición para administración intramamaria que comprende, como principio activo, el extracto de uva blanca definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el extracto definido en la reivindicación 19.
- 10 29. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 28, caracterizada porque comprende un polímero biodegradable de carboxipolimetileno Carbopol®.
30. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o según la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un mamífero no humano.

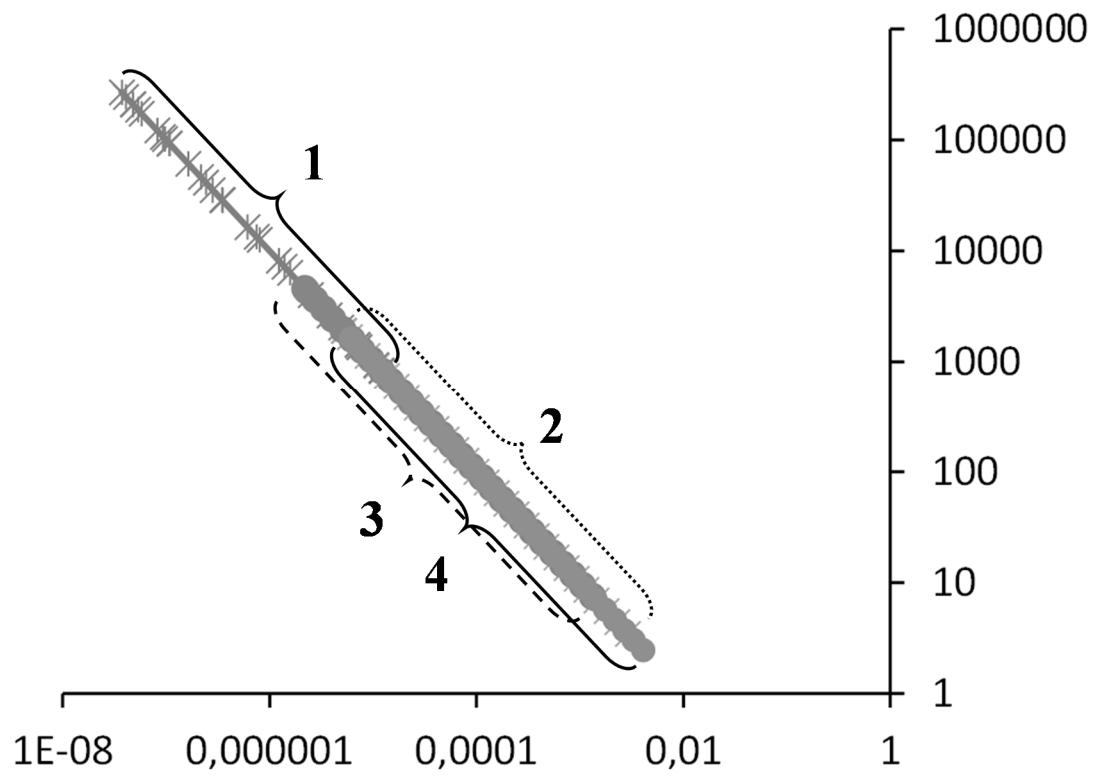


Figura 1



21 N.º solicitud: 202430358
22 Fecha de presentación de la solicitud: 07.05.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MANSO, T. et al.: "Antibacterial activity against clinical strains of a natural polyphenolic extract from <i>Albariño</i> white grape marc", Pharmaceuticals, 2023, vol. 16, nº 7, artículo nº 950 ISSN 1424-8247 (Print), DOI:10.3390/ph16070950, todo el documento; en particular: tercer párrafo de la discusión; apartado 4.6. <i>Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography Coupled to a Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)</i> ; tablas 8 y 9.	1-19
X	MANSO GÓMEZ, T. "Evaluación de la actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de un extracto natural rico en polifenoles procedente de bagazo de uva blanca <i>Albariño</i> ". Tesis doctoral. Escuela de Doctorado Internacional de la Universidad de Santiago de Compostela, 2023, todo el documento; en particular: apartado 1.7.3.6 <i>Extracción mediante un sistema a mediana escala y temperatura ambiente (MSAT)</i> ; apartado 1.7.3.7.1. <i>Disolventes GRAS</i> ; apartado 3.1.4.1 <i>Bagazo de uva</i> ; apartado 3.2.1 <i>Procedimiento de extracción MSAT</i> ; dos últimos párrafos de la pág. 74; apartado 3.2.5 <i>Métodos in vitro para la evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto natural procedente de bagazo de uva blanca Albariño</i> y tercer punto del apartado <i>Conclusiones</i> .	1-30
X	ES 2443547 A1 (UNIV SANTIAGO COMPOSTELA) 19/02/2014, todo el documento; en particular: reivindicaciones 1-16	1-19
X	RODRÍGUEZ RAMA, J. L. et al.: "Exploring the powerful phytoarsenal of white grape marc against bacteria and parasites causing significant diseases", Environmental Science and Pollution Research International, 2021, vol. 28, nº 19, páginas 24270 - 24278, ISSN 1614-7499 (Electronic), DOI: 10.1007/s11356-019-07472-1, todo el documento; en particular: resumen; <i>Material and methods</i> : apartados <i>Extracts production and polyphenolic evaluation</i> y <i>Anti-bacterial assays</i> .	1-30

Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:		
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Fecha de realización del informe 25.09.2024	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/2
------------------------------------------------	------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K36/87 (2006.01)
A61P15/14 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, INTERNET.