(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
01 de febrero de 2018 (01.02.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/018171 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 45/00 (2006.01) *A61K 36/00* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2016/050045

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de julio de 2016 (29.07.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante: **SAPONIN RESEARCH CENTER S.A.** [CL/CL]; Hernando de Aguirre 959, Dpto. 207, Providencia., Santiago de Chile (CL).

(72) Inventores: **SCHLOTTERBECK SUÁREZ, Trinidad**; Hernando de Aguirre 959, Dpto. 207, Providencia., Santiago de Chile (CL). **CAÑON JONES, Hernán Alberto**; Hernando de Aguirre 959, Dpto. 207, Providencia., Santiago de Chile (CL). **CASTILLO RUIZ, Mario Hernán**; Hernando de Aguirre 959, Dpto. 207, Providencia., Santiago de Chile (CL). **CORTÉS GONZÁLEZ, Hernán Danilo**; Limache 3405, oficina 57., Viña del Mar (CL). **SAN MARTÍN GAMBOA, Ricardo Manuel Guillermo**; Hernando de Aguirre 959, Dpto. 207, Providencia., Santiago de Chile (CL).

(74) Mandatario: **MORENO SAMPER, Olga Lidia** et al.; Av. Isidora Goyenechea 3250 oficina 302, Las Condes., Santiago de Chile, 7550083 (CL).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

WO 2018/018171 A1

(54) Title: USE OF EXTRACTS OF *QUILLAJA SAPONARIA* FOR THE PREVENTION AND CONTROL OF VIRAL INFECTIONS IN FISH

(54) Título: USO DE EXTRACTOS DE *QUILLAJA SAPONARIA* PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES VIRALES EN PECES

(57) Abstract: The present invention relates to a novel use of extracts of Quillaja saponaria that can be used to produce a medicinal composition for the prevention and control of a viral disease in fish, which composition is administered orally, preferably combined with food. The invention also relates to a medicinal composition and a food composition which comprise said extracts of Quillaja saponaria, for the prevention and control of a viral disease in fish.

(57) Resumen: La presente invención proporciona un nuevo uso de extractos de quillay útiles para fabricar una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad viral en peces, la que se administra por vía oral preferentemente en combinación con un alimento. Otros objetos de invención se relacionan con una composición medicinal y una composición alimentaria para la prevención y control de una enfermedad viral en peces que comprenden dichos extractos de quillay.

USO DE EXTRACTOS DE *QUILLAJA SAPONARIA* PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES VIRALES EN PECES

Campo Técnico

La presente invención se relaciona con la industria de la acuicultura, y particularmente proporciona un nuevo uso de extractos de la planta *Quillaja saponaria* para la prevención y control de enfermedades virales en peces, así como composiciones que comprenden dichos extractos.

Antecedentes de la invención

Es conocido que la industria salmonera ha crecido significativamente a nivel mundial en las últimas dos décadas; y en particular en Chile, este sector económico se ha vuelto uno de los de mayor relevancia del país. Sin embargo, existen diferentes enfermedades de origen viral que infectan a los peces y que finalmente afectan considerablemente su producción (Tobar, I. y cols. (2015). *Frontiers in immunology*, (6) 244).

Dentro de las enfermedades virales que afectan a los peces, la necrosis pancreática infecciosa (IPN, por sus siglas en inglés de *Infectious pancreatic necrosis*) es una patología altamente contagiosa que afecta a salmónidos en cultivo y que causa elevadas tasas de mortalidad en alevines en primera alimentación y en juveniles (smolts) luego de su transferencia al agua de mar. Esta enfermedad se encuentra dentro de las patologías más importantes en Chile y se considera endémica del país, causando grandes pérdidas económicas a la industria salmonera (Tapia, D. y cols. (2015). *Diseases of aquatic organisms*, 116(3), 173-184). Su agente etiológico es el virus de la IPN (IPNv). Actualmente, el IPNv es uno de los patógenos detectados con mayor frecuencia por laboratorios de diagnóstico en granjas marinas y de agua dulce, y es la segunda causa de mortalidad en salmones adultos del Atlántico en granjas marinas en Chile (Sernapesca (2013). Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos 2012, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Valparaíso). Sin embargo, la distribución geográfica de este patógeno no se limita exclusivamente a Chile, encontrándose históricamente en Noruega (Jensen, B. y cols. (2015). *Diseases of aquatic organisms*, 114(3), 177-187) y recientemente en la trucha arcoíris en Sudáfrica (Disertación doctoral Bragg, R. R. (2015). Isolation and Identification of

Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson) In South Africa), alcanzando una distribución mundial. Dado el impacto negativo sobre la salud de los peces causado por este virus es que existe la necesidad de buscar alternativas para su control.

El virus causante de la necrosis pancreática infecciosa pertenece a la familia *Birnaviridae* y al género *Aquabirnavirus*, y se caracteriza por ser de cápside no envuelta y poseer un genoma compuesto de ARN de doble hebra. Los síntomas clínicos de la infección incluyen inflamación del abdomen y ojos, oscurecimiento de la piel, necrosis del tejido pancreático y nado en espiral; lo que puede causar la muerte de los peces. En la etapa de alevín de agua dulce, un brote de IPNv puede provocar la pérdida total del cultivo. Para combatir a este agente viral se han diseñado diversas estrategias de vacunación, sin embargo el control de brotes depende de la bioseguridad de las piscinas y el nivel de resistencia de los peces (Robledo, D. y cols. (2016). *BMC genomics*, 17(1), 1).

Otro agente viral que genera estragos en la industria acuícola es el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA, por sus siglas en inglés de *Infectious salmon anemia*), el que ataca principalmente a salmónidos y puede conducir a elevadas tasas de mortalidad en la población de peces afectados, amenazando a las principales áreas de cultivo de peces en el mar Atlántico norte y en Chile. El virus ISA (ISAv) pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, género *Isavirus*, posee un genoma de ARN monocatenario negativo y posee una envoltura (Vike, S. y cols. (2014). *Aquaculture*, 420, 119-125). El virus una vez dentro del pez se distribuye en todos los órganos y de preferencia en los endotelios, provocando hemorragias, letargia, distensión del abdomen y anemia severa en el pez afectado. La mortalidad causada por esta enfermedad es elevada y pocos peces quedan vivos como portadores. En Chile los primeros brotes infecciosos ocurrieron a mediados del 2007 y se debió eliminar los salmones producidos.

Actualmente, debido a la naturaleza de los virus, el control mediante el uso de compuestos medicinales no es efectivo o económicamente viable y las medidas de prevención consisten en la mantención de una fuerte bioseguridad (control de ovas), uso de vacunas poco eficientes y la eliminación total de jaulas cuyos peces analizados presenten el virus.

Se han utilizado múltiples estrategias para incrementar la resistencia de los peces a los patógenos que los atacan, en forma paralela al desarrollo de vacunas. Una alternativa evaluada es la administración de una alimentación a los peces tal que les permita mejorar su salud. En este sentido se han ensayado dietas que contienen microalgas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, glucanos, carotenoides, entre otros. Estos ingredientes pueden promover el bienestar de los peces mejorando la salud intestinal y aumentando la resistencia a enfermedades (Kousoulaki, K. y cols. (2015). *Journal of nutritional science*, 4, e24).

El quillay es un árbol nativo de Chile cuya biomasa se utiliza principalmente como un sustituto del jabón debido a la presencia de saponinas (San Martín, R. (1999). *Economic Botany*, 53(3), 302-311). Las saponinas pueden obtenerse de forma industrial como extractos en polvo o líquidos, y pueden estar en un estado purificado, parcialmente purificado o no purificado. Estos extractos son comercializados por diversas empresas, siendo unas de las más importantes Natural Response y Desert King (San Martín, R. y Briones, R. (2000). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2063-2068).

A la fecha, los extractos ricos en saponinas son utilizados como emulsificantes naturales en cosméticos, alimentos y bebestibles. Adicionalmente se utilizan como adyuvantes para la producción de vacunas y formulaciones farmacéuticas (Maier, C. y cols. (2015). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(6), 1756-1762). También se han descrito usos como biocida para la eliminación de nemátodos (US 20050074508), moluscos (US 20070196517) y hongos (Elizondo, E. A. M. y cols. (2010). Agro sur, 38(2), 87-96).

En la revisión de Wang, Y. y cols. (2016), *International journal of molecular sciences*, 17(3), 325, se describe en relación a animales acuáticos que las saponinas pueden modular el sistema inmune de camarones y de peces, a su vez promoviendo el crecimiento de estos últimos; pero que la mayoría de las saponinas son inestables en condiciones acuosas y son muy tóxicas para los peces a altas concentraciones.

Dentro del estado de la técnica relacionado específicamente con la aplicación de extractos de quillay en peces, la solicitud de patente PCT WO2015155293 describe una composición oral o como aditivo alimenticio para el

uso en la prevención y/o tratamiento de infecciones en peces y particularmente describe una composición que comprende saponinas de *Quillaja saponaria* como un tratamiento o profiláctico de copépodos ectoparásitos del género *Caligus* de peces. En la evidencia experimental aportada por este documento no se indican pruebas que permitan determinar un efecto beneficioso contra otros patógenos.

El documento WO2015179840 describe combinaciones o composiciones que comprenden *Yucca schidigera* y *Quillaja saponaria*, y adicionalmente incluyen agentes antimicrobianos, antibióticos y anticoccidiales, para la administración en animales para prevenir enfermedades. Como divulgación general describe que se puede aplicar oralmente a peces.

La solicitud WO0151083 describe una composición adyuvante que contiene una saponina y un oligonucleótido que comprende al menos un dinucleótido de CpG no metilado. Preferentemente, la composición incluye saponinas derivadas de *Quillaja saponaria*, y aún más preferentemente, la saponina está modificada químicamente o integra una saponina sustancialmente pura (QS-7, QS-17, QS-18 o QS-21). No se describe el uso en peces.

La solicitud de patente Chilena CL200402942 divulga un aditivo alimenticio para peces formulado en base al extracto purificado de quillay (*Quillaja saponaria* Molina) que comprende entre 15-25% p/p de saponinas triterpénicas obtenidas a partir de dicho extracto y 75-85% p/p de maltodextrina de papa. Este documento no menciona que este alimento promueva la salud de los peces.

El documento de tesis de doctorado de Fernandes, R. N, (2014) Uso de saponina de quillaia (*Quillaja saponaria* Molina) em juvenis de pacu, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Centro de Aqüicultura, Brasil, describe un estudio en donde se evaluó el efecto de administrar saponinas de quillay en dosis desde 100 a 400 mg/Kg en la dieta a peces pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Luego de 15 días de alimentar a los peces con las saponinas de quillay, 325 peces se inocularon con *Aeromonas hydrophila* y se observaron signos clínicos. Luego de siete días, la sobrevida de los peces pacu frente a la infección experimental fue superior luego del consumo de una dosis de saponinas de quillay de 200 mg/Kg.

Por otra parte, dentro de la literatura científica la publicación de Vinay y cols. (2014), *Veterinary immunology and immunopathology*, 158(1), 73-85, describe una evaluación del efecto de un adyuvante basado en saponinas de *Quillaja* administrado intraperitonealmente en peces de la especie *Paralichthys olivaceus*. En este estudio se observa que las saponinas son un buen inductor de inflamación, pero también son tóxicas para el pez. Las concentraciones de saponinas de 500, 160, 50, 16 y 5 µg/pez produjeron tasas de mortalidad de 95%, 65%, 20% y 5%, respectivamente, con una dosis letal (LD50) de 22,4 mg/Kg. Los resultados determinan que el efecto tóxico de las saponinas depende del nivel de purificación y la fuente del producto. Finalmente, los autores observaron que una concentración de 3,4 mg/Kg de pez es tóxica, y se recomienda utilizar una concentración inferior en *Paralichthys olivaceus*.

Respecto a divulgaciones de saponinas desde otras fuentes diferentes al quillay, la publicación de Krogdahl y cols. (2015), *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3887-3902, describe que las saponinas de soya administradas por vía oral como aditivo del alimento en dosis de 2-10 g/Kg producen inflamación intestinal en el salmón atlántico (*Salmo salar*), cuya severidad es dosis-dependiente.

Este análisis global del estado de la técnica indica que, a pesar de que se han descrito diversos usos y aplicaciones de las saponinas de quillay, éstas no se asocian al tratamiento de patógenos de importancia en peces de interés comercial.

Sumario de la Invención

Un objeto de la presente invención se relaciona al uso de un extracto de *Quillaja saponaria* para fabricar una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad viral en peces. La preparación medicinal se administra a los peces por vía oral en un rango de dosis entre 0,9 – 12 mg/Kg de saponinas por peso vivo. En una modalidad preferida, la administración a los peces se realiza por vía oral en combinación con un alimento. Las enfermedades virales son provocadas por un virus perteneciente a las familias del grupo que comprende Birnaviridae, y Orthomyxoviridae, de los géneros *Aquabirnaviridae* y

Isavirus, respectivamente; y en particular a los virus de la necrosis pancreática y de la anemia infecciosa del salmón, respectivamente.

Preferentemente, los peces en los que se puede implementar el nuevo uso de la presente invención son salmónidos, en donde estos se seleccionan del grupo que consiste de las especies *Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Salmo gairdnerii*, *Oncorhynchus mykiss* u *Oncorhynchus kisutch*.

Otro objeto de la presente invención es una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad viral en peces, que comprende un extracto de *Quillaja saponaria* y un excipiente apropiado. El extracto de *Quillaja saponaria* se encuentra en una proporción entre 2 al 90% p/p del peso total de la composición.

La presente invención también proporciona una composición alimentaria para la prevención y control de una enfermedad viral en peces que comprende un extracto de *Quillaja saponaria* y un aditivo apropiado. El extracto de *Quillaja saponaria* se encuentra en una proporción inferior al 6% p/p del peso total de la composición.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un perfil cromatográfico de un extracto completo de *Quillaja saponaria* Molina medido por HPLC, donde se señalan las principales saponinas QS7, QS17, QS18 y QS21.

La Figura 2 es una imagen obtenida por microscopía óptica de la línea celular de salmónidos ASK en presencia de diferentes concentraciones de extractos de quillay UD100-Q (Ultra Dry® 100-Q) y QD100 (Quillaja Dry® 100).

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un nuevo uso de extractos de la planta del quillay (*Quillaja saponaria*) para la prevención y control de infecciones virales que afectan a peces. Los inventores han encontrado que diferentes extractos de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina, planta endémica de Chile, poseen un efecto protector frente a infecciones virales que afectan el cultivo de salmónidos. Los inventores han experimentado y llegado a obtener las concentraciones

adecuadas de dosis de los extractos de quillay para ser utilizadas de forma segura en salmones, sin alterar fisiopatológicamente los individuos tratados.

La presente invención se relaciona con el uso de extractos de quillay que tienen un perfil de saponinas específicos. En todos los casos, los perfiles de saponinas de estos extractos son propios y exclusivos del quillay, ya sea en extractos purificados, parcialmente purificados o no purificados.

Los extractos completos o no fraccionados de quillay (*Quillaja saponaria Molina*) presentan un perfil de saponinas característico y propio que contienen sobre 100 tipos de saponinas químicamente diferentes. Las saponinas principales corresponden a QS7, QS17, QS18 y QS21, como se observa en el perfil cromatográfico de la Figura 1. Las concentraciones relativas de estas saponinas dependen del origen de la materia prima. Adicionalmente, los extractos parcialmente purificados (entre 2 a 90% p/p o p/v de saponinas según sea el producto en polvo o líquido) contienen compuestos no-saponínicos que incluyen fundamentalmente una mezcla de polifenoles y, en menor cantidad, otros azúcares.

Los extractos de saponinas de quillay pueden obtenerse de forma industrial como extractos en polvo o líquido, con distintos grados de purificación. A modo de ejemplo, para los efectos de la presente invención se pueden utilizar diversos extractos comerciales de *Quillaja saponaria*, tales como los que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Extractos comerciales (Desert King Chile) de *Quillaja saponaria* útiles para la presente invención.

Nombre del producto	**Descripción**
Ultra Dry® 100-Q	Extracto de *Quillaja saponaria* Molina en polvo. Contiene principalmente saponinas triterpénicas superior al 65% p/p.
Quillaja Dry® 100	Extracto de *Quillaja saponaria* Molina en polvo. Contiene un 25% p/p de saponinas.
Vax Sap ®	Extracto altamente purificado de *Quillaja saponaria* Molina en

	polvo. Contiene principalmente saponinas triterpénicas superior al 90% p/p.
QL 1000 ®	Extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Molina con una concentración de 8% p/v de saponinas.
QL Perm ®	Extracto acuoso de Quillaja saponaria Molina con una concentración de 2% de saponinas.

La presente invención divulga el uso de extractos de *Quillaja saponaria* para elaborar una composición medicinal y una composición alimentaria para la prevención y/o control de condiciones médicas no deseadas relacionadas a enfermedades virales en peces. A través del nuevo uso de extractos de *Quillaja saponaria* de la presente invención se pueden obtener medicamentos cuyo propósito es prevenir, controlar, curar, tratar o aliviar enfermedades virales en peces; y además se pueden obtener productos alimentarios para uso medicinal que poseen propiedades terapéuticas con los mismos fines.

La presente invención abarca el uso de los extractos de Quillay contra virus de cápside no envuelta, tales como IPNv u otros que afecten a peces salmónidos. En particular, la necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad viral altamente contagiosa de los peces de todas las especies de salmones. Las especies más susceptibles son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la trucha café (*Salmo trutta*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), y salmón del Pacífico (*Oncorhynchus spp.*). Las etapas más afectadas por esta enfermedad viral son los alevines, pero también la enfermedad se produce en juveniles o smolts de salmón del Atlántico dentro de las primeras semanas después de la transferencia del agua dulce al agua de mar. Los signos clásicos de brotes de IPN son un aumento repentino y por lo general progresivo de la mortalidad diaria, acompañado de signos clínicos como aumento de pigmentación oscura, abdomen distendido y un movimiento de natación en tirabuzón. El IPNv también causa la enfermedad en otras especies de peces de producción tales como la seriola (*Seriola quinqueradiata*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y el bacalao del

Atlántico (*Gadus morhua*), en las cuales también se pueden utilizar los extractos de *Quillaja saponaria* con fines medicinales, y en general sobre cualquier especie de pez susceptible a la infección por dicho virus.

La presente invención también abarca el uso contra virus envueltos, siendo el virus de la anemia infecciosa del salmón el más importante (ISAv). Los peces infectados por este virus manifiestan signos clínicos que pueden incluir letargia, anemia, leucopenia, ascitis, exoftalmia, oscurecimiento de la piel y mortalidad alta. Es posible que se observe anemia grave encontrando las branquias muy pálidas. Los brotes de ISAv ocurren principalmente en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) pero se han descrito infecciones en otras especies como el salmón coho (*Oncorhyncus kisutch*) y experimentalmente en truchas arcoíris (*O. mykiss*). Los reservorios naturales del virus son la trucha de río (*Salmo trutta*), el salmón keta (*O. keta*), el salmón de chinook (*O. tshawytscha*) y la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*). Así también el virus afecta a otras especies no salmonídeas, como el arenque (*Clupea harengus*), el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y el abadejo (*Pollachius virens*), en las cuales también se pueden utilizar los extractos de *Quillaja saponaria* con fines medicinales, y en general sobre cualquier especie de pez susceptible a la infección por dicho virus.

Los extractos de *Quillaja saponaria* en la presente invención se utilizan para la elaboración de un producto medicinal o un producto alimenticio para la prevención o el control post-infección de virus de peces. Dichos productos se administran por vía oral en forma sólida o líquida.

Para el uso de extractos de *Quillaja saponaria* en la elaboración de una composición o preparación medicinal, medicamento o composición veterinaria es posible realizar diferentes formulaciones que contienen a dichos extractos como principio activo. Los extractos de *Quillaja saponaria* se encuentran en una proporción entre el 2% y el 90% p/p del peso total de la composición. La forma farmacéutica puede ser en polvo, suspensión oleosa o como parte de un *pellet* alimenticio. En una realización preferida, la composición medicinal comprende excipientes veterinariamente apropiados para salmónidos para administración oral, tales como lactosa, almidón de maíz, dióxido de silicio, entre otros ampliamente conocidos por cualquier experto en la materia.

Para la utilización de los extractos de *Quillaja saponaria* en la elaboración de un producto o composición alimentaria o suplemento alimenticio, dichos extractos se mezclan con alimento para peces en forma de *pellet*, el cual se mezcla con un aceite equivalente al 2% del peso del *pellet* a impregnar, para adherir el extracto al alimento. Algunos ejemplos de dietas para peces ampliamente conocidas en la industria son producidas por Ewos, BioMar, Salmofood, entre otras. En una modalidad preferida, la composición alimentaria comprende aditivos alimenticios apropiados para salmónidos para administración oral, tales como: harina de pescado, aceite de pescado y/o vegetal, vitaminas, minerales, entre otros ampliamente conocidos por cualquier experto en la materia.

A continuación se presentan ejemplos de realización de la invención, los cuales se han incluido con el objetivo de ilustrar la invención, sus modalidades preferidas y ejemplos comparativos, pero en ningún caso deben considerarse para restringir el alcance de la solicitud de patente, el cual sólo está delimitado por el contenido de las reivindicaciones que aquí se adjuntan.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Evaluación de toxicidad de extractos de quillay *in vitro* e *in vivo.*

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares de salmón.

Se realizaron ensayos de los productos de extractos de quillay sobre monocapas celulares derivadas de salmón con el fin de evaluar la toxicidad. Las líneas utilizadas fueron SHK-1 y ASK. La línea SHK-1, descrita como células tipo macrófagos, (*Salmo salar*; ECACC Number 97111106, European Collection of Cell Culture, Salisbury, Wilts, SP4 0JG, UK) se cultivó a 15 °C en medio de cultivo Leibovitz 15 (L-15, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (Hyclone, Thermo Fischer Scientific, Logan, Utah, USA), 4 mM de L-glutamina (Gibco), 1% v/v de 2-mercaptoetanol (2-ME, Gibco) y 50 µg/mL de gentamicina (US Biological, Swampscott, MA, USA). La línea celular

ASK (Atlantic Salmon Kidney, ATCC® CRL-2747™) se cultivó a 16°C en medio Leibovitz (L-15, Hyclone, Thermo Scientific), suplementado con gentamicina (50 g/mL), L-glutamina (4 mM) (Gibco, Thermo Scientific), 2-mercaptoetanol 1% (v/v) (2-ME, Gibco) y suero fetal bovino 10% (v/v) (SFB, Hyclone).

Todos los productos de extractos de quillay se prepararon en medio MEM o en medio Leibovitz 15 a una concentración de 1 mg/mL, siendo disueltos a 37°C durante 3 horas con agitación suave. Todas las soluciones preparadas de estos extractos se filtraron con una membrana de nitrocelulosa de 0,22 m para evitar contaminación en los cultivos celulares. Las diluciones evaluadas se prepararon mediante diluciones seriadas a partir de la solución patrón.

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos de quillay en líneas celulares de salmónidos se sembraron $5x10^5$ células/pozo en placas de 6 pocillos y se incubaron en 2 mL de medio de cultivo como volumen final durante 72 horas a 15°C. Al cabo de este tiempo se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se verificó la confluencia. Luego de 24 horas, las células se incubaron con los diferentes extractos de quillay, para lo cual se retiró 1 mL de medio de cultivo y se reemplazó con 1 mL del extracto de quillay disuelto en el mismo medio. La evaluación de citotoxicidad se realizó luego de 24 horas de incubación con los extractos de quillay. Para ello las células se lavaron 2 veces con PBS frío y luego se disgregaron usando una solución con tripsina 0,05% y EDTA 0,02%. Las células se analizaron por citometría de flujo (FACS Canto II (Beckton Dickinson) y se determinó la incorporación de Ioduro de Propidio como marcador de células muertas. Se utilizaron células incubadas en medio de cultivo con una solución de etanol como control positivo de muerte celular. Como control negativo se utilizaron células que no fueron incubadas con los extractos de quillay, pero que se sometieron a las mismas condiciones de manejo. Adicionalmente se evaluó la citotoxicidad mediante visualización de las células a través de microscopía óptica.

Los resultados indicaron que la concentración de los extractos que causa el 50% de muerte celular (CC_{50}) varió entre 3,5 y 83,4 µg/mL y la CC_{90} varió entre 4,7 y 92,6 µg/mL dependiendo del producto utilizado, como se indica en la Tabla 2. La Figura 2 muestra resultados representativos con los productos QD 100

(Quillaja Dry® 100) y UD 100Q (Ultra Dry® 100-Q) mediante la visualización de la monocapa celular a través de microscopía óptica.

Tabla 2. Citotoxicidad celular (CC_{50}) medida mediante citometría de flujo (incorporación de yoduro de propidio).

Producto	**CC_{50} en SHK-1 (µg/mL)**	**CC_{90} en SHK-1 (µg/mL)**
Vax Sap ®	20,4	25,3
Ultra Dry® 100-Q	22,1	29,2
Quillaja Dry® 100	83,4	92,6
QL 1000 ®	3,7	6,5
QL Perm ®	3,5	4,7

Ensayo de citotoxicidad oral *in vivo* en peces.

Para determinar la toxicidad vía oral a corto plazo (60 días) en peces se emplearon 550 ejemplares de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) clínicamente sanos de un peso promedio de 9,5 g. Previo al experimento los peces se aclimataron por 8 semanas, período durante el cual se tomaron aleatoriamente 50 peces y se examinaron para chequear su condición sanitaria a través de exámenes de necropsia y microbiológicos, según metodología estándar para comprobar la ausencia de agentes patógenos como virus, bacterias y parásitos (Thoesen J. (1994) Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens, 4th edn. Fish Health Section, *American Fisheries Society*, Bethesda, MD; OIE (Office International des Epizooties) (2000) Diagnostic manual for aquatic animal diseases, 3rd edn. OIE, Paris).

Los peces se mantuvieron en estanques de fibra de vidrio de 1.000 L de capacidad con suministro de agua independiente. El nivel de oxígeno disuelto en el agua fue sobre 10 mg/L. La temperatura del agua, los niveles de oxígeno y de compuestos nitrogenados fueron controlados en forma adecuada.

Se dispuso de una partida de alimento en forma de pellets extruidos (Micro 10, elaborado por Ewos). Con esta partida se prepararon cinco dietas con un contenido de 0, 100, 200, 300 y 600 ppm de saponinas/Kg de alimento. Estas dosis equivalen a 0, 2, 4, 6 y 12 mg de saponinas/Kg de peso vivo de pez, respectivamente. Los peces se repartieron en 10 estanques individuales con 50 peces cada uno (5 grupos con duplicado).

Los peces se alimentaron manualmente dos veces al día con las dietas descritas en cantidad determinada de acuerdo al peso vivo y a la tasa de crecimiento esperada de los peces. Para poder realizar esto se midió el peso de los ejemplares de este ensayo los días 0, 30 y 60 post-inicio del experimento, con el objeto de obtener en cada oportunidad datos acerca de su crecimiento.

Los ejemplares en estudio se observaron diariamente, un mínimo de tres veces al día, registrándose los eventuales signos clínicos y las mortalidades. El experimento tuvo una duración de 60 días. Como resultado se obtuvo que durante el transcurso del ensayo no se produjeron mortalidades ni alteraciones atribuibles al producto administrado en las diferentes dosis. Adicionalmente, no se encontraron alteraciones patológicas macro o microscópicas a nivel hepático e intestinal en ningún grupo tratado en relación al grupo control. En conclusión, se puede afirmar que los extractos de Quillay son seguros en las dosis probadas.

EJEMPLO 2: Uso de extractos de quillay para la prevención y/o tratamiento de infecciones virales de peces *in vitro.*

Actividad antiviral de extractos de quillay contra IPNv.

La actividad antiviral de los extractos se midió a través de ensayos de infección de monocapas de células de la línea derivada de salmón CHSE-214 (*Oncorhynchus tshawytscha*, ATCC Number CRL-1681, American Type Culture Collection). Dicha línea se creció a 16°C en medio de cultivo (MEM, Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Hyclone), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 10 mM de HEPES (Hyclone), 100 UI mL-1/100 g/mL-1 de gentamicina (Gibco). Las células CHSE-214 se incubaron en placas de cultivo de 24 pocillos a una confluencia del 90%. Para determinar la actividad antiviral, el medio de cultivo

se removió y la monocapa se infectó con una suspensión viral de un aislado chileno de IPNv con un título aproximado de 50 unidades formadoras de placas (UFP) y diferentes extractos de quillay. Luego de 1 hora de adsorción viral a 15 º C, se retiró el inóculo y la monocapa celular se cubrió con agarosa de baja temperatura de gelificación al 0,5 % en medio de crecimiento suplementado con los distintos extractos del quillay. Se incubó durante 3 días a 15 ºC y posteriormente las células se fijaron con 1 mL de formaldehído al 37 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de retirar el fijador y la cubierta de agarosa, la monocapa celular se tiñó con una solución de cristal violeta al 0,5 % durante 1 hora. Finalmente se lavó con agua y se realizó un recuento del título viral. La eficiencia de la infección se cuantificó mediante el número de placas de lisis obtenida y se comparó porcentualmente con el control sin tratar. Cada condición se realizó en triplicado.

Como resultado se obtuvo que los extractos de quillay pudieron controlar efectivamente la infección frente al virus IPN, lo cual se muestra en la Tabla 3. De los extractos evaluados, VaxSap, UD100Q y QD100 fueron altamente eficaces a dosis de 1,09; 1,46 y 0,73 µg/mL, respectivamente. Además se observó que con una baja concentración de saponinas se obtuvo aproximadamente un 40% de monocapa no infectada (QL Perm1 y QL Perm 2).

Tabla 3. Eficacia (% monocapa sin infección) de concentraciones de extractos de quillay según productos y contenido de saponinas en infecciones *in vitro* con IPNv.

Producto	**Concentración de producto (µg/mL)**	**Concentración de saponina (µg/mL)**	**Monocapa no infectada (%)**
Control positivo	0	0	0^{c}
VaxSap	1,22	1,09	$75+/-3,9^{a}$
UD 100 Q	2,44	1,46	$69,5+/-1,3^{ab}$
QD 100	2,44	0,73	$59,1+/-1,2^{b}$
QL 1000	0,78	0,0078	0^{c}
QL Perm 1	0,78	0,0078	$43,9+/-2,2^{d}$
QL Perm 2	0,78	0,0078	$45,8+/-1,4^{d}$

Nota: ^{a},^{b},^{c} y ^{d} denotan diferencias estadísticas con un nivel de significancia p > 0,05

Actividad antiviral de extractos de quillay contra ISAv.

Para realizar la infección viral se sembraron aproximadamente 1 x 10^6 células de la línea celular derivada de salmón ASK [Atlantic Salmon. Kidney] (ATCC® CRL2747™), la que se creció en una placa de 6 pocillos a una confluencia de 80 al 90%. Las células se cultivaron a 16°C en Medio Leibovitz (L-15, Hyclone, Thermo Scientific), suplementado con gentamicina (50 g/mL), L-glutamina (4 mM) (Gibco, Thermo Scientific), 2-mercaptoetanol 1% (v/v) (2-ME, Gibco), suero fetal bovino 10% (v/v) (SFB, Hyclone). Para determinar la eficacia antiviral, las células se incubaron durante 4 horas con el inóculo viral (aislado chileno con un título viral de 10^6 copias de ARN viral). Posteriormente, el medio de cultivo se retiró y se agregó nuevo medio de cultivo suplementado con antibióticos con los distintos extractos de quillay. La capacidad de infección se cuantificó mediante la técnica de qRT-PCR. Esta técnica permite cuantificar el número de copias de ARN viral que se obtiene como producto de una infección viral. Los resultados se expresaron como una comparación porcentual entre el número de copias obtenidas en la condición sin tratar versus los tratados con extractos del quillay, según la Tabla 4. Cada condición se realizó en triplicado. Se observó que todos los extractos de quillay fueron capaces de controlar la infección *in vitro* por sobre el 95%.

Tabla 4. Eficacia (inhibición de la proliferación viral) de diferentes concentraciones de extractos de quillay según productos y contenido de saponinas en infecciones *in vitro* con ISAv.

Producto	**Concentración de producto (µg/mL)**	**Concentración de saponina (µg/mL)**	**Copias virales/mL (10^4)**	**Inhibición del crecimiento viral (%)**
Control positivo	0	0	870.818+/-15.903	0[a]
VaxSap	0,48	0,43	0,0005+/-0,0003	>99[b]
UD 100 Q	0,48	0,31	44.800+/-24.335	95[b]
QD 100	0,48	0,12	0,010+/-0,007	>99[b]
QL 1000	7,8	0,78	0,006+/-0,003	>99[b]
QL Perm 1	7,8	0,078	0,010+/-0,007	>99[b]

QL Perm 2	7,8	0,078	0,046+/-0,003	>99[b]

Nota: [a] y [b] denotan diferencias estadísticas con un nivel de significancia p > 0,05

EJEMPLO 3: Preparación de alimento impregnado con extractos de quillay.

Los extractos de quillay se mezclaron con aceite de pescado para alcanzar las concentraciones deseadas y luego esta mezcla se impregnó a razón de 4,9:1 (aceite:pellet seco) en el alimento para peces. Esto se realizó utilizando una mezcladora industrial o betonera e incorporando el aceite en el alimento en movimiento por al menos 5 minutos y mezclando por al menos 10 minutos adicionales.

Para la obtención de la composición alimentaria impregnada con extractos de quillay se debe considerar como parámetros importantes la dosis de saponinas por kilogramo de peso vivo de pez que se administrará en el rango de 0,9 a 12 mg de saponinas por kilogramo de peso vivo, el peso de los peces y la cantidad de alimento que consumen. También se debe considerar el porcentaje de saponinas que poseen los productos de extractos de quillay. De esta forma, cualquier experto en la materia puede obtener la proporción de saponinas que debe ser incorporada en el alimento.

A modo de ejemplo, para preparar una composición alimentaria considerando el producto QL Perm ®, éste debe utilizarse en una proporción del 6% p/p (60 g de producto por kilogramo de alimento).

EJEMPLO 4: Uso de extractos de quillay para la prevención y/o tratamiento de infecciones virales de peces *in vivo.*

Eficacia de productos de quillay sobre IPNv *in vivo*

Se utilizaron 240 peces de la especie *Salmo salar* con un peso promedio de 5 a 6 g (alevines). Se seleccionaron peces que no presentaron antecedentes de enfermedad por ISAv, lo que fue chequeado mediante un muestreo y posterior análisis de diagnóstico molecular por RT-PCR en tiempo real. Adicionalmente, los peces se chequearon para enfermedades bacterianas y virales. Antes del traslado de los peces a la estación experimental se muestrearon

60 peces para realizar el chequeo sanitario, el cual consideró análisis de necropsia, frotis fresco de branquias, intestino y piel, tinción Gram de órganos internos (Bazo, riñón y cerebro), tinción naranja de acridina de branquias, IFAT BKD de riñón, IFAT SRS de riñón, cultivos bacteriológicos y RT-PCR para IPNv. El aspecto general del lote fue aceptable y se mantuvo dentro de lo habitual en la industria y, por tanto, se consideraron peces representativos de la industria chilena. Esto también incluyó la presencia de algunos peces portadores de IPNv en el grupo seleccionado.

Durante el ensayo los peces se alimentaron con una dieta de calibre 15 EWOS micro 15CP® en una proporción diaria de 0,75% de peso corporal (pc/día) impregnado con un extracto de *Quillaja saponaria* en una dosis de 3,75 mg de producto/Kg de peso vivo.

Infección experimental con virus IPN

La infección experimental con IPNv se realizó por inyección intraperitoneal en la línea ventral a razón de 0,1 mL de inóculo por pez, con un título de 1×10^8 copias de genoma viral/mL. Adicionalmente se inoculó con medio de cultivo sin virus a los grupos controles, con el fin de que todos los peces estuvieran sometidos al mismo manejo. Para realizar el procedimiento descrito, los peces se anestesiaron con benzocaína en un reservorio aparte con una dosis de 40 a 60 ppm. Posteriormente los peces se recuperaron en agua fresca sin benzocaína y luego se trasladaron a su estanque de origen, donde permanecieron durante el ensayo.

Tratamiento con extractos de quillay

La administración de los extractos de quillay se realizó por vía oral durante 7 días previos a la infección y luego se prosiguió alimentando con cada uno de los extractos por separado durante todo el periodo de post-infección. Cada día se preparó el alimento con una dosis del producto QD 100: 3,75 mg de producto/Kg peso vivo (PV) (500 mg producto/Kg alimento), y por otra parte con una dosis del producto UD 100: 3,75 mg de producto/Kg PV (500 mg producto/Kg alimento),

adhiriendo el extracto con un 2% de aceite de pescado al pellet. En la Tabla 5 se indica el cronograma del ensayo.

Tabla 5. Cronograma del ensayo *in vivo* de extractos de quillay para la prevención o tratamiento de IPNv.

Día	-10	0	1	7	45
Aclimatación	Inicio	Término			
Tratamiento Extractos vía oral			Inicio		Término
Inoculación con virus IPN				Inicio	
Seguimiento post-infección				Término Inicio	Término
Seguimiento post-tratamiento			Inicio		Término
Duración del ensayo	Inicio				Término

Posteriormente se evaluó la eficacia del tratamiento con extractos de quillay y se registró diariamente la mortalidad de los peces. En la Tabla 6 se muestran los datos de mortalidad acumulada.

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia de peces desafiados con IPNv y alimentados con o sin extractos de quillay.

Acuarios	Peces Totales	Peces Finales	% Mortalidad	% Sobrevivencia	Mortalidad Promedio	Sobrevida Promedio
(1) Dieta normal	20	19	5	95		
(2) Dieta normal	20	20	0	100	2,5	97,5
(7) Dieta normal +IPNv	20	10	50	50		
(8) Dieta normal +IPNv	20	11	45	55	47,5	52,5
(3) Dieta UD100	20	19	5	95		
(4) Dieta UD100	20	19	5	95	5	95
(9) Dieta UD100 +IPNv	20	15	25	75		
(10) Dieta UD100+IPNv	20	18	10	90	17,5	82,5
(5) Dieta QD100	20	20	0	100		
(6) Dieta QD100	20	18	10	90	5	95
(11) Dieta QD100 +IPNv	20	17	15	85		
(12) Dieta QD100 +IPNv	20	16	20	80	17,5	82,5

Los acuarios N° 7, 8, 9, 10, 11 y 12, corresponden a los ensayos realizados con peces inoculados con IPNv. El brote de mortalidad se produjo entre los días 18 y día 24 post-inoculación. La mortalidad se observó en los acuarios que no recibieron la administración oral de los extractos de quillay. En los acuarios tratados con extractos de quillay prácticamente no se desarrolló la enfermedad, con respecto a lo que se observó en los estanques sin tratamiento.

Posteriormente, todos los peces muertos del ensayo fueron sometidos a necropsia. Se observó una signología clínica inespecífica en los peces enfermos, la que se evidenció de la siguiente manera: letargia, coloración oscura y muerte. La aparición de las primeras mortalidades fue seguida del envío de los peces al laboratorio para su necropsia. Los peces muertos analizados manifestaron en general signos inespecíficos tales como hígado pálido y bazo necrótico.

El diagnóstico de IPNv se realizó en los peces infectados muertos, obteniéndose resultados positivos para la detección del virus mediante la amplificación por RT-PCR, lo que corroboró que los peces estaban desarrollando la infección, aunque en algunos casos ésta fue moderada.

Por otra parte, debido al elevado riesgo sanitario que implica la experimentación con el virus ISA *in vivo* y a los protocolos de bioseguridad que deben llevarse a cabo ante condiciones de brotes de este virus para eliminar todos los peces infectados y considerando los resultados equivalentes obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* para IPNv; es que a partir de los resultados obtenidos *in vitro* para el uso de los extractos de quillay en la inhibición del crecimiento viral de ISAv de la Tabla 3, la cual es superior al 99% en la mayoría de los casos, es posible inferir que la administración oral de dichos extractos, ya sea como parte de un alimento o un producto medicinal, también le conferirá protección contra el ISAv a los peces tratados.

Por lo tanto, los resultados obtenidos respecto del uso de extractos de *Quillaja saponaria* para la prevención y/o control de enfermedades virales en peces son altamente efectivos, los que reflejan un efecto protector contra los virus ISAv e IPNv *in vitro* por sobre el 90% de eficacia; mientras que *in vivo* se pudo comprobar el efecto preventivo y/o de control a una concentración de 0,9375 mg/Kg de saponinas totales por peso vivo de los extractos naturales de quillay completos de diferentes grados de pureza de saponinas sobre una infección controlada en salmón del Atlántico. Se evidenció una disminución de la mortalidad asociada a IPNv de al menos 72%.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de *Quillaja saponaria*, CARACTERIZADO porque sirve para fabricar una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad viral en peces.
2. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicha preparación medicinal se administra a los peces por vía oral en un rango de dosis entre 0,9 – 12 mg/Kg de saponinas por peso vivo.
3. El uso según la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque la administración a los peces se realiza por vía oral en combinación con un alimento.
4. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la enfermedad viral es provocada por un virus perteneciente a las familias del grupo que comprende *Birnaviridae*, y *Orthomyxoviridae*.
5. El uso según la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el virus de la familia *Birnaviridae* pertenece al género *Aquabirnaviridae*.
6. El uso según la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el virus es el virus de la necrosis pancreática infecciosa.
7. El uso según la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el virus de la familia *Orthomyxoviridae* pertenece al género *Isavirus.*
8. El uso según la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque el virus es el virus de la anemia infecciosa del salmón.
9. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los peces son salmónidos.
10. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los salmónidos se seleccionan del grupo que consiste de las especies *Salmo salar, Salmo trutta, Salmo gairdnerii, Oncorhynchus mykiss* u *Oncorhynchus kisutch*.

11. Una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad viral en peces, CARACTERIZADA porque comprende un extracto de *Quillaja saponaria* y un excipiente apropiado.

12. La composición según la reivindicación 11, CARACTERIZADA porque el extracto de *Quillaja saponaria* se encuentra en una proporción entre el 2 al 90% p/p del peso total de la composición.

13. Una composición alimentaria para la prevención y control de una enfermedad viral en peces, CARACTERIZADA porque comprende un extracto de *Quillaja saponaria* y un excipiente apropiado.

14. La composición según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el extracto de *Quillaja saponaria* se encuentra en una proporción inferior al 6% p/p del total de la composición.

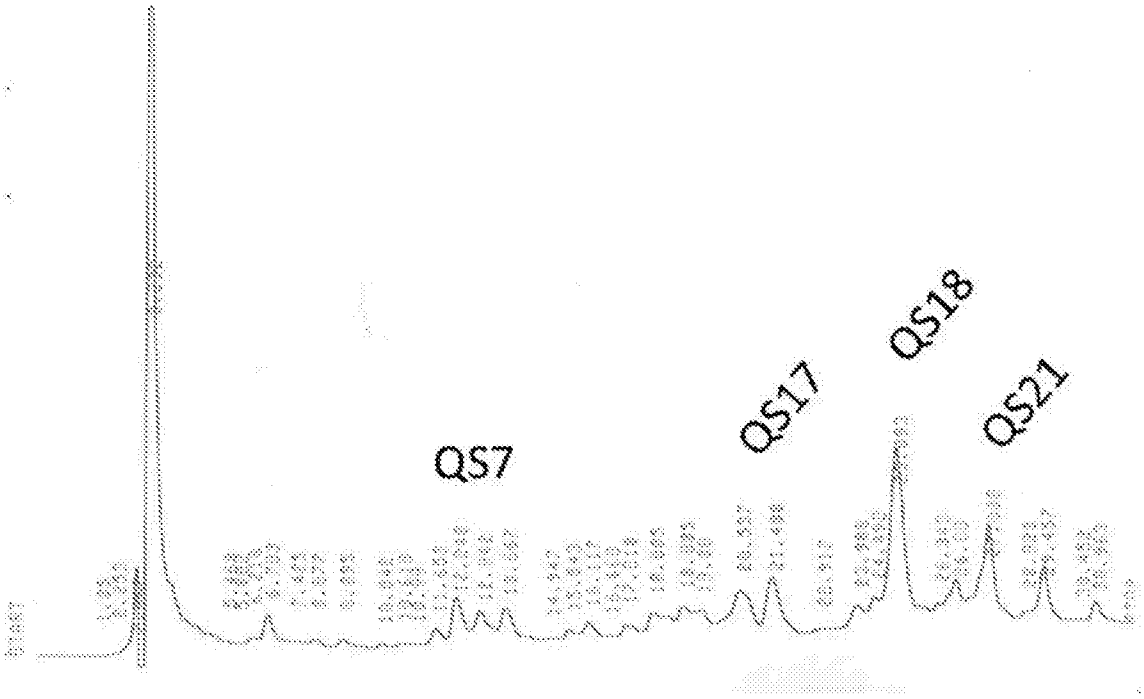


FIGURA 1

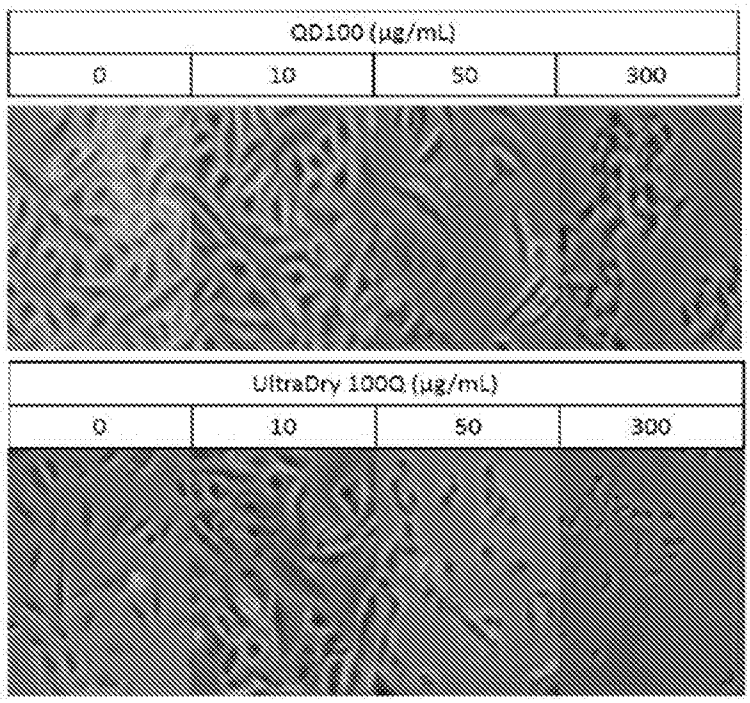


FIGURA 2

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CL 16/50045

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
IPC(8) - A61K 45/00, A61K 36/00 (2016.01)
CPC - A61K 39/39, A61K 36/185
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
IPC(8) - A61K 45/00, A61K 36/00 (2016.01)
CPC - A61K 39/39, A61K 36/185

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda
USPC - 424/278.1, 424/725

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
pubWEST; PatBase; Google Scholar
search terms - Quillaja, Quil A, saponin, saponaria, aquaculture, salmon, tuna, tilapia, salmo, salmonid, salminoid, viral, antiviral, isa virus, salmon anemia, Aquabirnavirus, isavirus, pancreatic necrosis, salmon anemia, diet, feed, food, fishery or fisheries

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 2014/052378 A2 (Zoetis Canada Inc.) 03 Abril 2014 (03.04.2014) p. 4-6; p. 10; p. 19-20; p 27.	1, 4, 7, 8, 11, 12
X --- Y	US 2008/0226682 A1 (BRAKE et al.) 18 Septiembre 2008 (18.09.2008) para [0008]; [0015]-[0019]; [0116]; [0272]; [0354]; [0394]-[0398],	1, 3-6, 9, 10, 13, 14 --- 2
Y	FRANCIS et al. "Effects of long term feeding of Quillaja saponins on sex ratio, muscle and serum cholesterol and LH levels in Nile tilapia (Oreochromis niloticus (L.))." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 133.4 (2002): 593-603. Todo el document, resumo.	2

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
01 deciembre 2016	27 DEC 2016
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 N° de fax	Funcionario autorizado Lee W. Young N° de teléfono

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL 16/50045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 45/00, A61K 36/00 (2016.01)
CPC - A61K 39/39, A61K 36/185
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 45/00, A61K 36/00 (2016.01)
CPC - A61K 39/39, A61K 36/185

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/278.1, 424/725

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
pubWEST; PatBase; Google Scholar
search terms - Quillaja, Quil A, saponin, saponaria, aquaculture, salmon, tuna, tilapia, salmo, salmonid, salminoid, viral, antiviral, isa virus, salmon anemia, Aquabirnavirus, isavirus, pancreatic necrosis, salmon anemia, diet, feed, food, fishery or fisheries

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/052378 A2 (Zoetis Canada Inc.) 03 April 2014 (03.04.2014) p. 4-6; p. 10; p. 19-20; p. 27.	1, 4, 7, 8, 11, 12
X ------ Y	US 2008/0226682 A1 (BRAKE et al.) 18 September 2008 (18.09.2008) para [0008]; [0015]-[0019]; [0116]; [0272]; [0354]; [0394]-[0398].	1, 3-6, 9, 10, 13, 14 ------ 2
Y	FRANCIS et al. "Effects of long term feeding of Quillaja saponins on sex ratio, muscle and serum cholesterol and LH levels in Nile tilapia (Oreochromis niloticus (L.))." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 133.4 (2002): 593-603. entire document, especially abstract.	2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 December 2016	27 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774