(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 2018/018170 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 45/00 (2006.01) *A23L 3/34* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2016/050044

(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 2018/018170 A1

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

(54) Título: USO DE EXTRACTOS DE *QUILLAJA SAPONARIA* PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES BACTERIANAS 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 bacterial disease in fish, which composition is administered orally, preferably combined with food. The invention also relates to the medicinal composition and the food composition which comprise said extracts of Quillaja saponaria, for the prevention and control of a bacterial 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 bacteriana en peces, la que se administra por vía oral preferentemente en combinación con un alimento. Otros objetos de invención se relacionan con la composición medicinal y la composición alimentaria para la prevención y control de una enfermedad bacteriana en peces que comprenden dichos extractos de quillay.

USO DE EXTRACTOS DE *QUILLAJA SAPONARIA* PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES BACTERIANAS 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 bacterianas 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 bacteriano que infectan a los peces y que finalmente afectan considerablemente su producción.

Dentro de las enfermedades bacterianas que afectan a los peces, la piscirickettsiosis o septicemia rickettsial salmonídea (SRS) es causada por la bacteria Gram-negativa *Piscirickettsia salmonis*, un patógeno intracelular facultativo cuya infección es causa de una de las enfermedades más serias de la industria salmonera en Chile. La piscirickettsiosis afecta a los peces durante su ciclo productivo en agua de mar, causando elevadas tasas de mortalidad que alcanzan el 75% y pérdidas económicas en la industria del orden de cientos de millones de dólares (Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P., & Mancilla, M. (2016). *Journal of fish diseases* 39(4) 441-448).

Los síntomas reportados de la infección sistémica causada por *P. salmonis* en peces incluyen la colonización de órganos tales como riñones, hígado, bazo, intestino, cerebro, ovarios y branquias (Rozas, M., & Enríquez, R. (2014). *Journal of fish diseases*, 37(3), 163-188). Para combatir la piscirickettsiosis se han desarrollado diversas estrategias tales como el cultivo temprano de los peces, la utilización de antibióticos y el desarrollo de vacunas. Un factor que dificulta el control de este patógeno es que los tratamientos en base a vacunas poseen una eficacia limitada y por otro lado las elevadas dosis de antibióticos utilizadas en los

cultivos produce resistencia a este tipo de medicamentos (Pulgar, R., Travisany, D., Zuñiga, A., Maass, A., & Cambiazo, V. (2015). *Journal of biotechnology*, 212, 30-31). Además, las medidas preventivas que involucran el uso de vacunas proveen protección a los peces por períodos cortos y no son efectivas en las etapas adultas de los salmones, hacia las fases finales del ciclo productivo (Tobar, J. A., Jerez, S., Caruffo, M., Bravo, C., Contreras, F., Bucarey, S. A., & Harel, M. (2011). Vaccine, 29(12), 2336-2340). Por otra parte, se ha evidenciado la existencia de variantes de *P. salmonis* resistentes a los antibióticos más utilizados tales como flumequina, enrofloxacino, eritromicina, amoxicilina y ácido oxolínico (Mora, S. J. P., Farías, R. C., Gadicke, L. H. P., Rozas, S. M. (2011). Tesis de medicina veterinaria: "Análisis de antibiogramas de cepas de Piscirickettsia salmonis aisladas de salmones y truchas cultivados en las regiones de los Ríos, Los Lagos y Aysén los años 2007 y 2008". Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias). Lo anterior sumado a que la efectividad de los tratamientos y el nivel de protección otorgado depende de diversos factores tales como la inmunobiología de los peces, las condiciones de administración de los tratamientos y de factores ambientales, el control del resultado final se dificulta (Tobar, I. y cols. (2015). *Frontiers in immunology*, (6) 244). A pesar de los esfuerzos realizados, la elevada frecuencia de nuevos eventos epizoóticos causados por *P. salmonis* indican que se requieren nuevas alternativas para prevenir y controlar esta enfermedad.

Una alternativa al desarrollo de vacunas y tratamiento con antibióticos 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 el que 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

La presente invención divulga un nuevo uso de extractos de quillay para la prevención y control de enfermedades bacterianas en peces. Un objeto de invención es un extracto de *Quillaja saponaria* útil para fabricar una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad bacteriana en peces. Dicha preparación medicinal se administra a los peces por vía oral en un rango de dosis entre 0,9 – 12 mg de saponinas por kilogramo de peso vivo de los peces. La administración a los peces se realiza por vía oral en combinación con un alimento. En una modalidad preferida, la enfermedad bacteriana es provocada por una bacteria Gram negativa, en donde dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Piscirickettsia, Aeromonas* y *Vibrio,* y en una modalidad preferida, la bacteria perteneciente al género *Piscirickettsia* es *Piscirickettsia salmonis*.

En otra modalidad preferida, la enfermedad bacteriana es provocada por una bacteria Gram positiva, preferentemente perteneciente al género *Renibacterium*.

El uso de los extractos de quillay se utiliza preferentemente en peces salmónidos, los que se seleccionan del grupo que consiste de las especies *Salmo salar, Salmo trutta, Salmo gairdnerii, Oncorhynchus mykiss y Oncorhynchus kisutch*.

Otro objeto de la presente invención es una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad bacteriana 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 bacteriana 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 bacterianas que afectan a peces. Los inventores han comprobado que diferentes extractos de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina, planta endémica de Chile, poseen un efecto protector frente a infecciones bacterianas que afectan el cultivo de salmónidos. Los inventores han 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 bacterianas 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 bacterianas 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 bacterias que afectan a peces, entre las cuales se incluyen bacterias Gram negativas tales como *Piscirickettsia salmonis, Aeromonas salmonicida* y *Vibrio* sp; y bacterias Gram positivas tales como *Renibacterium salmoninarum*, o cualquier otra bacteria que afecte la salud de peces, ya sea en agua dulce o de mar. Las especies más susceptibles de peces son salmónidos tales como: la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la trucha café (*Salmo trutta*), trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón del Pacífico (*Oncorhynchus spp.*), salmón keta (*Oncorhynchus keta*), salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), entre otros.

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 bacterias en 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: Ensayo *in vitro* sobre el uso de extractos de quillay para la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas de peces.

Eficacia de productos de quillay sobre *Piscirickettsia salmonis in vitro.*

Para evaluar el efecto de extractos de quillay sobre la replicación de la bacteria *Piscirickettsia salmonis* se realizó una infección de prueba en monocapas de la línea celular embrionaria CHSE-214 (*Oncorhynchus tshawytscha*, ATCC Number CRL-1681, American Type Culture Collection) de salmón Chinook. La replicación bacteriana se determinó mediante qPCR, técnica ampliamente conocida que permite cuantificar el número de copias de ADN bacteriano que se obtiene como producto de la infección.

Las células se sembraron en una proporción de 1,2 x 10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron con una confluencia del 60 al 70%. La monocapa celular se infectó con un inóculo bacteriano con un título de 10^5 copias de ADN genómico. Para determinar la eficacia de los extractos, las células se infectaron con el inóculo bacteriano diluido en 1 mL de medio de cultivo (Medio Esencial Mínimo (MEM, Hyclone) suplementado con buffer HEPES (Hyclone,) (10mM), aminoácidos no esenciales (1x) (Hyclone,) y suero fetal bovino 10% (v/v) (SFB, Hyclone), suplementado adicionalmente con los extractos de quillay a la concentración a ensayar, en particular los productos Ultra Dry® 100-Q (UD100Q®, Desert King) (65% p/p saponinas) o Quillaja Dry® 100 (QD100®, Desert King) (25% p/p de saponinas). Luego se comparó la capacidad de infección de *P. salmonis* con respecto al inóculo sin tratar con los extractos.

La eficiencia de la infección fue cuantificada mediante qPCR a través de la amplificación del gen 16S ribosomal. Cada condición se realizó en triplicado. Como resultado se obtuvo que los extractos de quillay inhibieron la replicación bacteriana, en donde el producto Ultra Dry® 100-Q logró reducir en un 97,98% la replicación al compararlo con el control sin tratar. El producto Quillaja Dry® 100 logró inhibir en un 64,40% la replicación bacteriana, según se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Resultados del ensayo de inhibición de infección de células CHSE-214 por *Piscirickettsia salmonis*.

Tratamiento	**Ct (dRn)**	**Copias/mL**	**Concentración inhibitoria de saponinas totales (mg/mL)**	**% Inhibición**
Control sin bacterias	15,29	7,94E+7	0	0
UD100Q® (65 % purificación de saponinas)	20,07	1,60E+6	0,00016	97,98
QD100® (25% de purificación de saponinas)	14,73	1,94E+7	0,00053	64,40

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 bacterianas de peces *in vivo.*

Eficacia de productos de quillay sobre *Piscirickettsia salmonis in vivo.*

Se utilizaron 180 salmones del Atlántico (*Salmo salar*), con un peso promedio de 30 g (alevines). Se seleccionaron peces clínicamente sanos y libres de los patógenos ISAv y *P. salmonis*, lo que fue chequeado mediante muestreo y posterior diagnóstico molecular a través de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). Adicionalmente, antes del traslado de los peces a la estación experimental se muestrearon 60 ejemplares 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.

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). A los alimentos se incorporó diariamente una dosis de cada producto de extracto de quillay (Ultra Dry® 100-Q o Quillaja Dry® 100, Desert King) en una dosis de 3,75 mg/Kg de producto.

Se diseñó el experimento con los siguientes grupos experimentales: controles positivos (peces desafiados con la bacteria y alimentados sin productos) y negativos (peces no desafiados con la bacteria y alimentados sin productos), y grupos tratamiento (peces desafiados con la bacteria y alimentados con productos).

El desafío se realizó a través de una infección experimental con *Piscirickettsia salmonis* por inyección intraperitoneal en la línea ventral a razón de 0,1 mL de inóculo por pez, el cual tenía un título de 3 $x10^6$ copias de genoma bacteriano/mL. A los peces del grupo control negativo se les inoculó 0,1 mL de medio de cultivo. Todos los grupos experimentales siguieron el siguiente cronograma, según se indica en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Cronograma del tratamiento para la prevención y/o control de piscirickettsiosis *in vivo* utilizando extractos de quillay.

Día	**-15**	**0**	**1**	**7**	**45**
Aclimatación	Inicio	Término			
Tratamiento con extractos de quillay vía oral Ultra Dry® 100-Q o Quillaja Dry® 100			Inicio		Término
Inoculación con *Piscirickettsia salmonis*				Inicio/ Término	
Seguimiento post infección				Inicio	Término
Seguimiento post tratamiento			Inicio		Término
Duración del ensayo	Inicio				Término

Como resultado se obtuvo que el producto Ultra Dry® 100-Q logró reducir en un 37% la mortalidad asociada a la infección por *Piscirickettsia salmonis* (SRS) al compararlo con el grupo desafiado con la bacteria y alimentado con dieta normal (sin extractos de quillay). El producto Quillaja Dry® 100 logró una reducción de un 18% respecto al mismo control, según se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados ensayo in vivo con dietas funcionales con extractos de quillay.

Grupos experimentales	**Mortalidad promedio (%)**	**Sobrevivencia promedio (%)**	**Nivel de protección respecto al control (%)**
Dieta normal	0	100	-
Dieta normal + infección con *Piscirickettsia salmonis*	45,8	54,2	-
Dieta con extractos de quillay (UD100Q®, 66% pureza de saponinas) + infección con *P. salmonis*	29	71	36,68%
Dieta con extractos de quillay (QD100®, 26% pureza de saponinas) + infección con *P. salmonis*	37,5	62,5	18,12%

Por lo tanto, los resultados obtenidos respecto del uso de extractos de *Quillaja saponaria* para la prevención y/o control de enfermedades bacterianas en peces son altamente efectivos, los que reflejan un efecto protector contra *Piscirickettsia salmonis in vitro* por sobre el 60% de eficacia; mientras que *in vivo* se pudo comprobar el efecto preventivo y/o de control de la enfermedad, evidenciando una disminución de la mortalidad asociada a la bacteria de un 18 a un 36% a una concentración de 3,75 mg/Kg de producto por peso vivo de los extractos naturales de quillay con diferentes grados de pureza de saponinas.

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 bacteriana 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 bacteriana es provocada por una bacteria Gram negativa.
5. El uso según la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque la bacteria Gram negativa se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Piscirickettsia*, *Aeromonas* y *Vibrio*.
6. El uso según la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque la bacteria perteneciente al género *Piscirickettsia* es *Piscirickettsia salmonis.*
7. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la enfermedad bacteriana es provocada por una bacteria Gram positiva.
8. El uso según la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque la bacteria Gram positiva pertenece al género *Renibacterium*.
9. El uso según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los peces son salmónidos.
10. El uso según la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque los salmónidos se seleccionan del grupo que consiste de las especies *Salmo salar, Salmo trutta, Salmo gairdnerii, Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*.
11. Una composición medicinal para la prevención y control de una enfermedad bacteriana 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% y el 90% p/p del peso total de la composición.

13. Una composición alimentaria para la prevención y control de una enfermedad bacteriana en peces, CARACTERIZADA porque comprende un extracto de *Quillaja saponaria* y un aditivo 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 peso total de la composición.

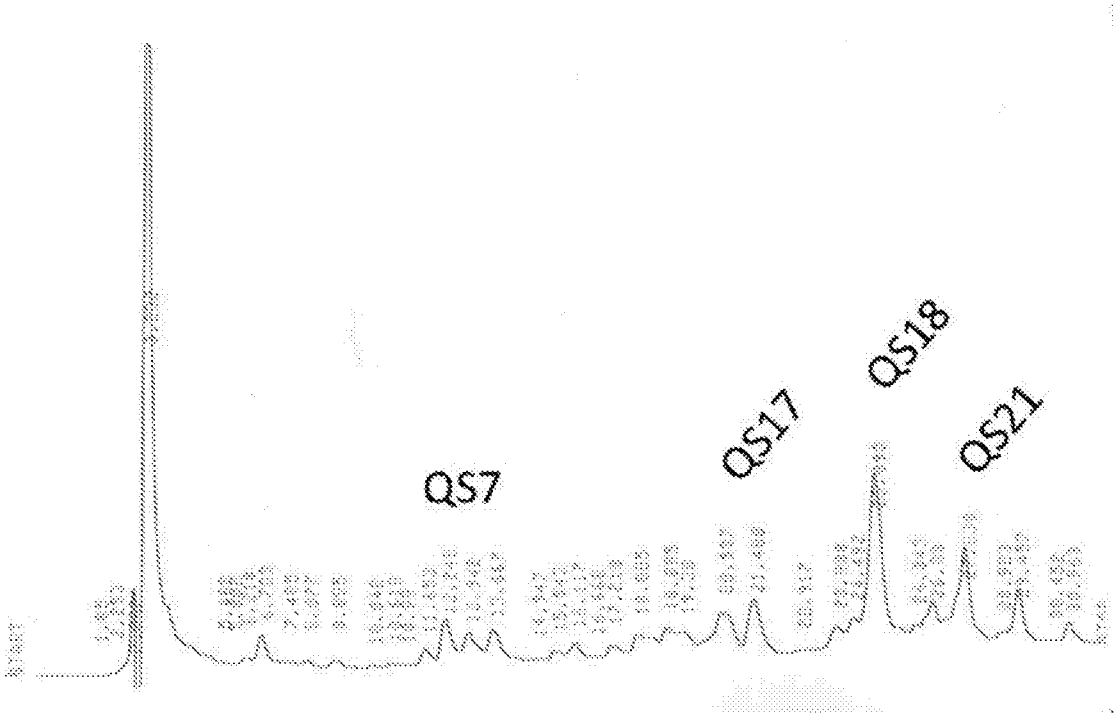


FIGURA 1

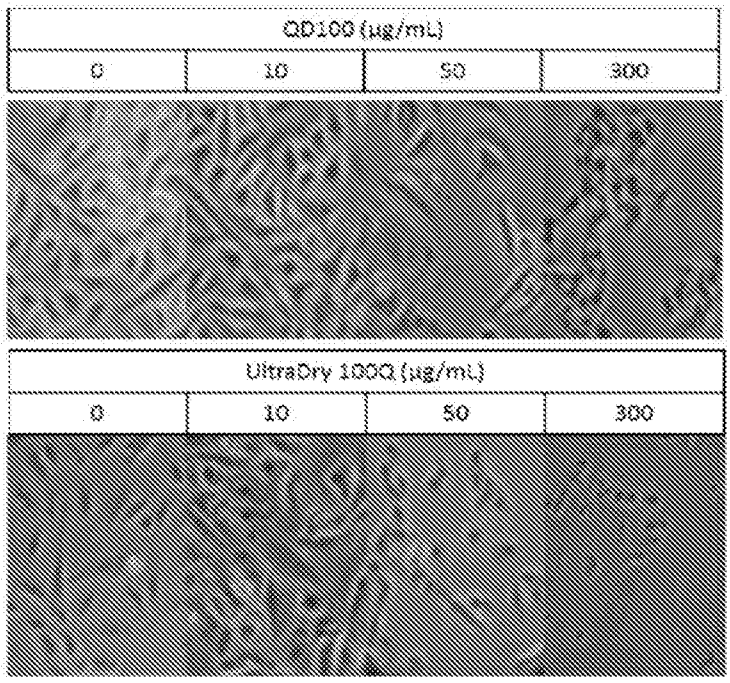


FIGURA 2

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CL 16/50044

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 45/00, A23L 3/34 (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, A23L 3/34 (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, 426/532

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, bacter$, antibact$, Piscirickettsia, Renibacterdiet, feed, food, fishery, fisheries

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X ------ Y	US 2006/0287263 A1 (DAVIS et al.) 21 Deciembre 2006 (21.12.2006) para [0007]; [0008]; [0056]-[0058]; [0166]; [0167]; [0215]-[0217].	1, 4, 5, 7-11 ------ 2, 3
X	US 2008/0226682 A1 (BRAKE et al.) 18 Septiembre 2008 (18.09.2008) para [0008]; [0015]- [0019]; [0116]; [0272]; [0354]; [0394]-[0398]. WO 2014/052378 A2 (Zoetis Canada Inc.) 03 Abril 2014 (03.04.2014) p. 4-6; p. 10; p. 19-20; p.27.	1, 4-6, 13, 14
X	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. documento entero, especialmente resument.	11, 12
Y		2, 3

☐ 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 ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 N° de fax	Funcionario autorizado Lee W. Young N° de teléfono

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL 16/50044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 45/00, A23L 3/34 (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, A23L 3/34 (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, 426/532

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, bacter$, antibact$, Piscirickettsia, Renibacterdiet, feed, food, fishery, fisheries

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ------ Y	US 2006/0287263 A1 (DAVIS et al.) 21 December 2006 (21.12.2006) para [0007]; [0008]; [0056]-[0058]; [0166]; [0167]; [0215]-[0217].	1, 4, 5, 7-11 ------ 2, 3
X	US 2008/0226682 A1 (BRAKE et al.) 18 September 2008 (18.09.2008) para [0008]; [0015]-[0019]; [0116]; [0272]; [0354]; [0394]-[0398].	1, 4-6, 13, 14
X	WO 2014/052378 A2 (Zoetis Canada Inc.) 03 April 2014 (03.04.2014) p. 4-6; p. 10; p. 19-20; p. 27.	11, 12
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, 3

☐ 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	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774