

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 918**

21 Número de solicitud: 201931162

51 Int. Cl.:

A61K 36/53 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.12.2019

30 Prioridad:

28.12.2018 CL 201803878

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.06.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE (50.0%)
AV. LIBERTADOR BERNARDO O'HIGGINS 3363
Santiago CL;
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (30.0%) y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN (CITA) (20.0%)**

72 Inventor/es:

**ZUÑIGA NAVARRO, Gustavo Emilio;
VIDAL SOTO, Ruben Rodrigo;
GONZALEZ COLOMA, Azuzena;
ANDRES YEVES, María Fe;
DIAZ HERNANDEZ, Carmen Elisa;
BURRILLO ALQUEZAR, Jesus y
NAVARRO ROCHA, Juliana**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Formulación que comprende extracto de Crynodendron patagua y aceite esencial de Satureja montana para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por Piscirickettsia salmonis en individuos del género Salmo**

57 Resumen:

Formulación que comprende extracto de Crynodendron patagua y aceite esencial de Satureja montana para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por Piscirickettsia salmonis en individuos del género Salmo.

Esta invención se refiere a una formulación que comprende una mezcla de un extracto vegetal de la variedad de planta Crynodendron patagua y de aceite esencial de la variedad de planta Satureja montana y también a su utilización, ya sea directamente o a través de una composición que la comprende, en la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por la bacteria Piscirickettsia salmonis, en individuos del género salmo, y más preferentemente en truchas y salmones.

ES 2 769 918 A1

DESCRIPCIÓN

Formulación que comprende extracto de *Crynodendron patagua* y aceite esencial de *Satureja montana* para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por *Piscirickettsia salmonis* en individuos del género *Salmo*

5

La presente invención se engloba en el sector de la acuicultura y se refiere a una formulación que comprende una mezcla de un extracto vegetal de la variedad de planta *Crynodendron patagua* y de aceite esencial de la variedad de planta *Satureja montana*, que se utiliza en la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* en individuos del género *Salmo*, y más preferentemente, en truchas y salmones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

La acuicultura sigue siendo el sector productor de alimentos para animales de más rápido crecimiento, ya que representa alrededor del 46% del suministro total de pescado para alimentos para satisfacer las necesidades de proteínas de la creciente población mundial. Ha habido un aumento general en todos los continentes en la participación de la acuicultura en la producción total de peces. Se ha informado que China contribuye con más del 60% de la producción acuícola mundial y también de que administra grandes cantidades de antibióticos para garantizar una productividad adecuada y el manejo de enfermedades causadas por microorganismos bacterianos.

20

Los regímenes antimicrobianos se emplean de forma profiláctica y terapéutica para controlar estas enfermedades, así como para mejorar la promoción del crecimiento. En acuicultura, los antibióticos se administran generalmente en alimentos recubiertos en la superficie o en pellets o por otras vías, como la inmersión en agua o la inyección. El uso global de antimicrobianos está aumentando enormemente, se estima en 63.151 toneladas en 2010, y se prevé que aumente en un 67% en 2030. Los antibióticos no siempre se han utilizado de manera responsable en la acuicultura, y el control de su uso no ha proporcionado una garantía adecuada de la prevención de riesgos para los seres humanos. El uso responsable de los antibióticos requiere instrucciones claras por parte de los fabricantes de medicamentos, el manejo y la distribución adecuados por parte de los distribuidores y la supervisión veterinaria de la administración por parte de los acuicultores, respetando los períodos de retiro antes del sacrificio. El uso no regulado de antibióticos en la industria de la

30

35

acuicultura podría plantear problemas de salud y seguridad alimentaria que en gran parte no se abordan en la mayoría de los países en desarrollo del mundo. La presencia de residuos de antibióticos en los productos de la acuicultura podría resultar en el desarrollo de resistencia bacteriana y toxicidad para los consumidores que puede conducir a la morbilidad y/o la muerte.

A modo de ejemplo, reseñar que en Chile (potencia mundial en el campo de la acuicultura) se utilizan dieciséis tipos de antibióticos, en comparación con tres en los Estados Unidos (EE. UU.) y cuatro en Noruega. Volviendo a Chile, los antibióticos se utilizaron principalmente en el cultivo de salmón atlántico en agua de mar, que representó el 80% del uso total de antibióticos utilizados para 2015, seguido del 11% para el salmón coho, el 9% para la trucha arco iris y 0% para salmón Chinook. El consumo de antibióticos en la industria del salmón en Chile ha aumentado un 56% desde 2005 hasta 2015, con un aumento de la producción en esos años del 23,48%. El consumo más alto se registró en 2014, con un uso total de 563,2 toneladas de antibióticos con 955.179 toneladas de salmónidos producidos. En 2016, hubo una disminución del 30,66% en el uso de antibióticos en comparación con 2015, utilizando un total de 382,5 toneladas de antibióticos para producir 727.812 toneladas de pescado. Los antibióticos más utilizados en la industria del salmón en Chile son el florfenicol y la oxitetraciclina. El uso de florfenicol ha aumentado de manera constante desde 2013 y representó el 87% y el 82,50% del total de antibióticos utilizados en 2015 y 2016, respectivamente.

Adicionalmente al uso de antibióticos para el tratamiento de las patologías o enfermedades más comunes en acuicultura, existen otras alternativas comúnmente utilizadas, como la aplicación de vacunas monovalentes, polivalentes y autovacunas y la aplicación de inmunoestimulantes que se utilizan también como medida profiláctica buscando estimular mecanismos de inmunidad innata.

Especial relevancia presenta la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis*, identificada a fines de los años 80, y que es la causante de la septicemia por *Rickettsias salmónidas* (SRS), también conocida como piscirickettsiosis o septicemia rickettsial salmonídea, que es una enfermedad mortal en los salmónidos. Contra esta enfermedad se han ensayado principalmente estrategias de uso de antibióticos y de vacunas, aunque, sin embargo, la naturaleza intracelular de esta bacteria, la existencia de diferentes cepas de *P. salmonis* y la baja memoria inmunológica en los salmónidos, hace que los tratamientos no sean lo suficientemente efectivos resultando en la muerte de millones de salmónidos de acuicultura

5 todos los años. A modo de ejemplo, desde el aislamiento inicial, *P. salmonis* ha sido la principal causa de mortalidad de la industria en Chile. Durante 1995, más de 10 millones de salmones murieron durante las operaciones de cultivo marino. La mayoría de las pérdidas se atribuyeron a *P. salmonis*, con un impacto económico estimado en 49 millones de dólares.

10 Por otra parte, el uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización humana y, durante mucho tiempo, las principales fuentes de drogas fueron los productos minerales, vegetales y animales. Alrededor del 25% de los medicamentos recetados en todo el mundo provienen de plantas, y actualmente se utilizan 121 de estos compuestos activos. De los 252 medicamentos considerados básicos y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo son medicamentos sintéticos obtenidos de precursores naturales.

15

En relación directa con el tratamiento de la SRS en salmónidos es posible encontrar algún documento de patente que protege el uso de principios activos de origen vegetal, ver por ejemplo:

20 - WO2011/119047A1 que reivindica el uso de una composición que comprende un compuesto de propil-metil-fenol que preferentemente se selecciona entre timol y carvacrol, o una mezcla de ambos, para el uso en el tratamiento y/o en la prevención de la SRS y enfermedades causadas por *P. salmonis*, pero también para el uso en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades causadas por el virus de la anemia del salmón, incluyendo la anemia infecciosa del salmón; o

25

- CL20180000674 que divulga extractos antibacterianos naturales procedentes de plantas de *Crynodendron patagua* y *Aristotelia chilensis* o mezclas de las mismas, que se utilizan como formulación alimenticia para peces y que se usan en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas, en especial, infección por *Piscirickettsia salmonis*, responsable de la septicemia Rickettsial del salmón (SRS).

30

De acuerdo a los anteriores antecedentes, resulta necesario el desarrollo de alternativas biotecnológicas respetuosas con el medio ambiente para combatir de forma eficiente las infecciones bacterianas producidas por *P. salmonis* y específicamente el SRS, y reducir el uso de los antibióticos.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la observación de que una formulación que comprende una combinación de compuestos de origen vegetal, concretamente extracto de planta de biomasa de *C. patagua* y aceite esencial de biomasa de *S. montana*, en adelante formulación de la invención, se muestra efectiva a la hora de inhibir a la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis* en ensayos in vitro (ver Ejemplo 5), y que por lo tanto podría ser de aplicación a poblaciones de trucha y salmón afectadas por SRS, estimándose que podrían llegar a reducir hasta en un 30% su mortalidad.

10

Adicionalmente, la ingesta de la formulación de la invención no debería afectar a las tasas de conversión de alimento, a diferencia de lo que sí sucede cuando se utilizan otros tratamientos convencionales como por ejemplo los antibióticos.

15 En la presente invención por “tasa de conversión de alimento o TCA” se entiende la relación entre cantidad de alimento abastecido y el crecimiento del individuo, o en otras palabras, el peso producido por kg de alimento abastecido. El suministro de antibióticos, adicionalmente a su efecto letal sobre la bacteria patógena, afecta a la flora intestinal del sujeto, en este caso un pez, impactando el estado de salud general y por tanto, revirtiendo en tasas
20 menores de conversión del alimento.

Preferentemente, la formulación de la invención utiliza materiales vegetales y procedimientos controlados que permiten la producción de biomasa de forma estandarizada y que asegura niveles de fitoquímicos estables en los extractos.

25

En un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación que comprende un extracto etanólico de biomasa de *Crynodendron patagua* y aceite esencial de biomasa de *Satureja montana*.

30 En una realización particular, la formulación de la invención consiste en un extracto etanólico de biomasa de *Crynodendron patagua* y aceite esencial de biomasa de *Satureja montana*.

En la presente invención por “extracto etanólico” se entiende el producto obtenido tras la exposición de biomasa con un solvente orgánico de base alcohólica, que preferentemente
35 es etanol y que se caracteriza por comprender un importante contenido en compuestos

fenólicos. El extracto etanólico de la invención puede presentarse en estado líquido pero también en estado sólido, por ejemplo utilizando técnicas de liofilización.

5 En el ámbito de la invención podrían utilizarse otros solventes orgánicos de base alcohólica que tuviesen similar capacidad de extracción de compuestos fenólicos.

10 El extracto etanólico que se utiliza en la invención, utiliza como base biomasa de la variedad *Crinodendron patagua*, o patagua o patahua que es una especie arbórea perenne de la familia de las elaeocarpaceas del género *Crinodendron*, y que es endémica de Chile.

Preferentemente, el extracto etanólico de *C. patagua* se caracteriza por comprender compuestos fenólicos que se seleccionan entre quercetina, ácido gálico y ácido clorogénico.

15 Por "aceite esencial" se entiende el producto obtenido tras el hidrodestilado de biomasa y que tiene un importante contenido en compuestos terpénicos.

20 El aceite esencial que se utiliza en la invención procede de biomasa de la especie *Satureja montana*, que es una especie botánica perenne fanerógama en la familia de las Lamiáceas, nativa de regiones templadas y cálidas del sur de Europa.

Preferentemente, el aceite esencial de *S. Montana* se caracteriza por comprender compuestos terpénicos que se seleccionan entre carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno.

25 En una realización particular, la formulación de la invención se caracteriza por comprender ácido clorogénico y carvacrol.

En otra realización particular, la formulación de la invención comprende quercetina, ácido gálico, ácido clorogénico, carvacrol, p-cimeno y γ -terpineno.

30 Preferentemente, el extracto etanólico de biomasa de *Crinodendron patagua* y aceite esencial de biomasa *Satureja montana* están presentes en la formulación de la invención en una relación 1:1 (en peso o en volumen), aunque también pueden estar presentes en una relación desde 1:2 a 2:1 (en peso o en volumen) o incluso en una relación desde 1:3 a 3:1 (en peso o en volumen).

Tal y como se demuestra en los ejemplos, es la combinación del extracto de *C. patagua* y del aceite esencial de *S. montana*, y por lo tanto de los compuestos que comprenden, la que provocan un efecto sinérgico inesperado que supera el mero efecto aditivo de cada uno de los componentes por separado.

5

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de la formulación de la invención que comprende:

- a) partiendo de biomasa de *C. patagua* obtener un extracto etanólico,
- b) partiendo de biomasa de *S. montana* obtener un aceite esencial por hidroddestilado,
- c) combinar el extracto etanólico de biomasa de *C. patagua* con el aceite esencial de biomasa *S. montana* en una proporción que va desde 1:3 hasta 3:1 (en peso o en volumen).

15 En una realización particular, la biomasa de *C. patagua* consiste en brotes obtenidos por multiplicación *in vitro* partiendo de yemas de *C. patagua*.

En otra realización particular, la biomasa de *S. montana* procede de la variedad Martín, con número de solicitud A201804150 ante el Registro de Protección comunitaria de Variedades Vegetales de la *Community Plant Variety Office* (CPVO) en fecha 19 de diciembre de 2018.

En una realización particular, el extracto etanólico y el aceite esencial se combinan en una proporción de 1:1 en peso o en volumen.

25 En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende a la formulación de la invención, en adelante composición de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica veterinaria que comprende a la formulación de la invención.

30

La composición farmacéutica veterinaria es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse a un individuo con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se

35

considerarán composiciones farmacéuticas veterinarias las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

5 En una realización particular, la composición farmacéutica veterinaria además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica veterinaria de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

15 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica veterinaria en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula, pellet, gránulo o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

35 Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica veterinaria se puede presentar bajo cualquier forma de administración adecuada y en una cantidad terapéuticamente efectiva, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral. La composición farmacéutica veterinaria de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, pellet, gránulo, solución, inyección, gel o microesfera. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, a gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, emulsión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, polvo, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

5

En la presente invención, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición veterinaria farmacéutica que cuando se administra a un pez es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en pez. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la estabilidad metabólica y la duración de la acción de la formulación de la invención; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del pez; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia.

10

Por “pienso medicamentoso” se entienda una combinación de la formulación de la invención, que puede comprender excipientes y/o vehículos, y un pienso convencional para su administración a un pez.

15

El “pienso convencional para la administración a un pez” de forma general estará presente en forma de pellets o gránulos y puede comprender, a título enunciativo, carne de pescado, aceite de pescado, proteínas vegetales, monosacáridos o polisacárido, como por ejemplo mananos, glucanos o alginatos y otros excipientes como pigmentos, vitaminas, minerales, aglutinadores y similares.

20

En una realización particular, la composición farmacéutica veterinaria se presenta en una forma adaptada a la administración oral. La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, pellet, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

25

En otra realización particular, la composición farmacéutica veterinaria se presenta en una forma adaptada a la aplicación mediante un baño medicinal, en el cual el pez es situado en un contenedor que la comprende, y mantenido durante un período de tiempo (desde minutos a varias horas).

5

En otra realización particular, la composición farmacéutica veterinaria se presenta en una forma adaptada a la aplicación por vía parenteral, por ejemplo por inyección. Las formulaciones inyectables pueden ser también en forma de polvo, pellet o gránulos que pueden ser reconstituidos en un solvente adecuado antes de su uso, o también como

10 soluciones preparadas para su uso.

En otra realización particular, la composición farmacéutica veterinaria se presenta en una forma adaptada a su combinación con el pienso convencional para peces.

15 En una realización particular el pienso medicamentoso está especialmente adaptado para administración oral en forma líquida, de gránulo o pellet, de forma que el pienso convencional sea capaz de absorber o ser combinado con la formulación de la invención.

La formulación de la invención se puede incorporar al pienso antes de la peletización.

20 Alternativamente los pellets o gránulos pueden ser revestidos con la formulación de la invención. Por ejemplo, pellets o gránulos comerciales podrían ser recubiertos con la formulación de la invención y uno o más excipientes como almidón, fumed silica (Aerosil®), celulosa microcristalina, lactosa o similares.

25 Sin embargo, la formulación de la invención se puede encapsular utilizando por ejemplo metodologías de secado por liofilización utilizando materiales encapsulantes.

En una realización particular, la formulación de la invención es encapsulada, utilizando materiales que se seleccionan entre goma arábica (GA) o maltodextrina (MD) que

30 posteriormente pueden ser liofilizadas y dotadas de las dimensiones más convenientes.

Adicionalmente, el pienso medicamentoso o el material encapsulado pueden incluir un agente preservante.

35 La cantidad de formulación en el pienso medicamentoso, preferentemente no superará el 20% en peso del peso total del producto.

Alternativamente a la composición farmacéutica veterinaria, la composición de la invención también puede ser una composición nutritiva.

5 El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear
10 como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición nutritiva que comprende a la formulación de la invención.

15

En una realización particular, la composición nutritiva es un alimento, un suplemento o un nutracéutico.

El término “suplemento”, sinónimo de cualquiera de los términos “suplemento dietético”,
20 “suplemento nutricional”; o “suplemento alimenticio” es un “ingrediente alimenticio” destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la
25 dieta alimenticia sino como complemento de la dieta.

El término “nutracéutico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

30

En una realización particular, el alimento es el “pienso convencional para la administración a un pez” tal y como se define más arriba.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica veterinaria para
35 su uso como medicamento veterinario.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica veterinaria para su uso como medicamento veterinario en el tratamiento y/o prevención de la septicemia rickettsial salmonídea (SRS) en individuos del género salmo.

- 5 En el ámbito de esta invención también se incluye el uso del medicamento veterinario como coadyuvante para potenciar el uso de otro medicamento.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica veterinaria para su uso como coadyuvante con otros medicamentos en el tratamiento y/o prevención de la septicemia rickettsial salmonídea (SRS) en individuos del género *Salmo*.

En una realización particular, la formulación de la invención se usa como coadyuvante de un antibiótico que se selecciona de entre florfenicol, oxitetraciclina, flumequina, ácido oxolínico, eritromicina, amoxicilina.

15

En la presente invención, el término “tratamiento” se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto, preferiblemente un pez, que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 20 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

En la presente invención, el término “prevención” se refiere a evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto, preferiblemente un pez.

En el ámbito de la presente invención, los individuos del género *Salmo* se seleccionan entre trucha y salmón, y preferentemente entre salmón atlántico, trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho salman (*Oncorhynchus kisutch*) y el salvelino (*Salvelinus alpinus*).

En la presente invención, por *Piscirickettsia salmonis* se entiende el agente bacteriano causante de la piscirickettsiosis o síndrome rickettsial salmonídeo o septicemia rickettsial salmonídea (SRS) y que es uno de los principales patógenos, responsable de más del 50% de mortalidad en mar.

35

La formulación de la invención y la composición de la invención pueden ser usadas de forma efectiva en cualquiera de los estadios de desarrollo de los individuos del género *Salmo*.

5 En un noveno aspecto, la invención se relaciona con un tratamiento desinfectante para eliminar la presencia de la bacteria *Piscirickettsia salmonis* en superficies o dispositivos utilizados normalmente en instalaciones de acuicultura y que comprende aplicar la formulación de la invención en una dosis efectiva para eliminar a la bacteria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

Figura 1. Compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto de *C. patagua*.

Figura 2. Compuestos terpénicos mayoritarios presentes en el aceite de *S. montana*.

Figura 3. Microcápsulas de la mezcla extracto etanólico de *C. patagua* : aceite esencial de *S. montana* (1:1 en peso) en goma arábica.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
20 siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1: Obtención del material vegetal**

Las plantas de *C. patagua* (patagua) fueron cultivadas *in vitro* partiendo de yemas de plantas adultas en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con las siguientes vitaminas y hormonas: biotina (1 mg/L), cinetina (0,2 mg/L), tiamina (2 mg/L), ácido naftalenacético (0,2 mg/L) y benziladenina (0,3 mg/L). Se almacenaron por 30 días a 23°C ±
30 2°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Los brotes generados fueron retirados del medio de cultivo para ser secados a 37°C ± 2°C, hasta peso constante. Posteriormente, el tejido de los brotes fue molido y mantenido en desecador hasta su utilización.

35

Para *S. montana* se usaron partes aéreas de una variedad domesticada, concretamente de la variedad Martin. El material vegetal se secó a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Se trata de una variedad domesticada que se aclimató en 2 áreas geográficas diferentes en España: en la provincia de Almería (sureste) y en Ejea de los Caballeros (Zaragoza, noreste) y sobre
5 la que se ha solicitado protección como obtención vegetal con número de solicitud A201804150 ante el Registro de Protección comunitaria de Variedades Vegetales de la *Community Plant Variety Office* (CPVO) en fecha 19 de diciembre de 2018.

10 **Ejemplo 2: Obtención del extracto etanólico de *C. patagua* y del aceite esencial de *S. montana***

Para la preparación de los extractos de *C. patagua* se mezcló 1 gramo del material vegetal desecado tal y como se indica en el Ejemplo 1, con 100 mL de etanol al 85% V/V. La solución fue sonicada a una frecuencia de 50 Hz, a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por dos
15 horas (Contreras, R. A., Köhler, H., Pizarro, M. y Zúñiga, G. E. (2015). *In vitro* cultivars of *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) are a source of antioxidant phenolics. *Antioxidants*, 4, 281-292). La solución fue esterilizada a través de filtración, con un filtro con tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$ y los extractos fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

20 Las plantas secas de *S. montana*, se extrajeron mediante hidrodestilación a escala de laboratorio (Clevenger, EO) para obtener aceites esenciales de todas las muestras de acuerdo con el método recomendado por la *European Pharmacopoeia* (6th edition, 2008), obteniéndose, por decantación, el aceite esencial o utilizando una planta a gran escala (semi-industrial, PEO) extracción por arrastre de vapor en la planta piloto de destilado de
25 acero inoxidable equipada con una cámara de destilado de 100 Kg y un vaso de 500 L, utilizando un rango de presión de entre 0.5-1.0 bar, y obteniéndose, por decantación, el aceite esencial (PEO).

30 **Ejemplo 3. Análisis de compuestos en el extracto etanólico de *C. patagua* y en el aceite esencial de *S. montana*.**

Con el fin de determinar el perfil de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico, se empleó un equipo LC-MS (Agilent LC-MS/MS 6410, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los análisis se realizaron inyectando un volumen de $20 \mu\text{L}$ de extracto, mediante
35 una válvula Reodyne y se utilizó un flujo de elusión de $0,3 \text{ mL/min}$, en gradiente de acetonitrilo y ácido fórmico 0,1% V/V, con una presión de 75 bar al inicio del programa a

temperatura ambiente, como fase estacionaria se utilizó una columna empacada de rápida resolución Xorbax RP-C18 (150x4,6mm, 5 µm, XDB-C18, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) con un poro de 1,8 µm y una longitud de 5 cm. El detector de masas de tricuatrupolo se empleó con las siguientes condiciones: ionización por electrospray (ESI) en modo negativo a una temperatura del N₂ de 330 °C, el flujo de N₂ de 9 L/min, presión de nebulización de 45 psi, el voltaje del capilar de 4000 V, en modo de operación de barrido, ión negativo y el rango de masas entre 50 y 1000.

Los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de *C. patagua* fueron; quercetina (28%), ácido gálico (8%) y ácido clorogénico (5,5%) (Fig.1).

Por su parte, el aceite esencial de *S. montana* se analizó mediante cromatografía de gases en un equipo Agilent 7890 A interconectado con un espectrómetro de masas Agilent 5975C con ionización de impacto electrónico (70 eV). Se utilizó una columna capilar de sílice HP-5MS (30 m 250 mm id), recubierta con fenilmetil silox al 5% (espesor de fase de 0,25 mm). La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 60 °C durante 8 min, aumentando a 180 °C a 3C / min, 180-250 °C a 20C / min, luego a 250 °C durante 10 min. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 °C y 280 °C, respectivamente. Las muestras se inyectaron en modo dividido con una proporción de división de 1:55. Se inyectaron 0,2 ml de cada muestra. El gas portador fue helio con un caudal de 1 ml / min y una temperatura de interfaz de 250 °C. El rango de masa analizado fue entre 40-450 m/z. Los componentes de los índices de retención lineal de los extractos volátiles calculados a partir de sus tiempos de retención y series homólogas de n-alcános C8-C20 (Fluka Analytical) se utilizaron para la identificación en comparación con los de los estándares puros. También se compararon los patrones de fragmentación de los componentes del espectro de masas con los almacenados en la biblioteca GC-MS.

Los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *S. montana*, fueron Carvacrol (40%), p-cimeno (16%) y gamma terpineno (15%). (Fig. 2)

30

Ejemplo 4: Preparación de la formulación de extracto etanólico de *C. patagua* y aceite esencial de *S. montana*. y del antibiótico:

Se realizaron mezclas del extracto etanólico de *C. patagua* y del aceite esencial de *S. montana* en diferentes proporciones, desde 1:3 a 3:1 (en peso). La mezcla extracto

35

etanólico/aceite esencial fue diluida en etanol 85% para llegar a concentraciones de 10, 8, 6 y 3% de la formulación.

Paralelamente se preparó un control del antibiótico florfenicol utilizando como solvente etanol 95% y diluido en agua destilada estéril. Se utilizó como punto de partida una solución stock de 5120 µg/ml, para preparar diluciones seriadas en base 2 hasta la dilución 1/64.

Ejemplo 5. Efecto de la formulación que comprende el extracto de *C. patagua* y el aceite esencial de *S. montana* en la bacteria *Piscirickettsia salmonis*

10

Preparación del inóculo de *Piscirickettsia salmonis*:

El inóculo de *P. salmonis* utilizado correspondió a un aislado de terreno obtenido a partir de un brote en *Salmo salar*. Se ajustó un inóculo a una concentración aproximada a un Macfarlane 0,5, para obtener una concentración bacteriana cercana a 1×10^8 bacterias/ml. La pureza del inóculo fue evaluada mediante tinción Gram, IFAT y PCR.

15

Cultivo:

Tanto en los pasajes de mantenimiento, como en los antibiogramas, *P. salmonis* fue cultivada en un medio Agar sangre con las siguientes características: Caldo infusión corazón 1,5%, Glucosa 1%, Cisteína 0,1%, Agar 1,5%, Hemoglobina 0,2%, Sangre de Cordero 5%, SFB 3% y a una temperatura de incubación de 18°C.

20

25 Prueba de difusión en agar en pocillo:

0,1 ml de la suspensión bacteriana *P. salmonis* fue esparcida uniformemente en la superficie de agar sangre, procurando que el agua fuese absorbida completamente por este. Posteriormente se realizaron perforaciones de aproximadamente 5 mm de diámetro en el agar mediante un sacabocados, para depositar 120 µl de cada extracto y sus diluciones en cada pocillo formado. Uno de los pocillos fue llenado sólo con solvente, para evaluar el efecto de éste sobre el crecimiento de la bacteria. Como control positivo se utilizaron pocillos con florfenicol concentrado y diluciones de florfenicol solubilizado en etanol 95% y diluido en agua, así como aceite esencial de *S. montana* al 100% y extracto etanólico de *C. patagua* al 100%. Posteriormente todas las placas fueron incubadas durante cuatro días a 20°C.

30

35

Finalmente se midió el diámetro medio del halo de inhibición formado alrededor de cada pocillo.

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 1.

5

Tabla 1. Efecto antibiótico de la formulación que comprende extracto etanólico de *C. patagua* y aceite esencial de *S. montana* contra la bacteria *P. salmonis* y de otros compuestos utilizados como control

	Diámetro medio del halo de inhibición en mm (DT*)
antibiótico (florfenicol) 100%	41,6 (\pm 2,6)
antibiótico (florfenicol) diluido al 10%	18 (\pm 2)
mezcla de extracto etanólico de <i>C. patagua</i> y aceite esencial de <i>S. montana</i> (relación 1:1 en peso)	36,3 (\pm 0,8)
combinación de antibiótico (florfenicol) (10%) y de la mezcla de extracto etanólico de <i>C. patagua</i> y aceite esencial de <i>S. montana</i> (90%);	38,4 (\pm 1,2)
aceite esencial de <i>S. montana</i>	25 (\pm 2,5)
extracto etanólico de <i>C. patagua</i>	23 (\pm 1,5)

10 *DT: desviación típica

Además de la evidente actividad antibiótica de la formulación que comprende la combinación del extracto de *C. patagua* y del aceite esencial de *S. montana*, se visualiza también que la combinación del extracto y del aceite esencial provocan un efecto sinérgico que mejora la adición de los efectos de cada uno por separado. Adicionalmente, también se puede comprobar como la combinación de la formulación con extracto y aceite esencial con una pequeña proporción de antibiótico consigue resultados muy similares a los obtenidos con el antibiótico.

20 **Ejemplo 6: Microencapsulación de la formulación.**

Se mezcló el material encapsulante, goma arábica (GA) o maltodextrina (MD) al 20% P/V con la formulación que comprende la combinación del extracto de *C. patagua* y del aceite esencial de *S. montana* en diferentes cantidades y se homogenizó. Las muestras fueron congeladas a -20°C , y posteriormente liofilizadas (Christ, Alpha 1-2). La muestra liofilizada

25

fue molida y tamizada (tamaño de poro 500 micrones). El polvo obtenido fue almacenado en desecador hasta su utilización. La figura 4, muestra un ejemplo de las microcápsulas obtenidas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n que comprende una mezcla de extracto etan3lico de biomasa de *Crynodendron patagua* y de aceite esencial de biomasa de *Satureja montana*.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1 que consiste en una mezcla de extracto etan3lico de biomasa de *C. patagua* y de aceite esencial de biomasa de *S. montana*.
- 10 3. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el extracto etan3lico de biomasa de *C. patagua* y el aceite esencial de biomasa de *S. montana* se combinan en una relaci3n desde 1:3 a 3:1 (en peso o volumen).
- 15 4. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 3, donde la relaci3n en la que se combinan el extracto etan3lico de biomasa de *C. patagua* y el aceite esencial de biomasa de *S. montana* es 1:1 (en peso o volumen).
5. Procedimiento para la producci3n de la formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las siguientes etapas:
- 20 a) partiendo de biomasa de *C. patagua* obtener un extracto etan3lico,
b) partiendo de biomasa de *S. montana* obtener un aceite esencial por hidrodestilado,
c) combinar el extracto etan3lico de biomasa de *C. patagua* con el aceite esencial de biomasa *S. montana* en una relaci3n desde 1:3 hasta 3:1 (en
- 25 peso o volumen).
6. Procedimiento seg3n la reivindicaci3n 5, donde el extracto etan3lico de biomasa de *C. patagua* y el aceite esencial de biomasa de *S. montana* se combinan en una proporci3n 1:1 (en peso o volumen).
- 30 7. Procedimiento seg3n cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde la biomasa de *C. patagua* se obtiene de brotes obtenidos por multiplicaci3n *in vitro* partiendo de yemas de *C. patagua*.
- 35 8. Procedimiento seg3n cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la biomasa de *S. montana* procede de la variedad Martin.

9. Composición que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Composición según la reivindicación 9 en donde dicha composición es una composición nutritiva.
11. Composición según la reivindicación 10, donde la composición nutritiva es un alimento, un suplemento o un nutracéutico,
12. Composición según la reivindicación 9, en donde dicha composición es una composición farmacéutica veterinaria.
13. Composición según la reivindicación 12, en donde dicha composición comprende al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, para su uso como medicamento veterinario.
15. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la septicemia rickettsial en individuos del género *Salmo* o como coadyuvante en el tratamiento y/o prevención la septicemia rickettsial en individuos del género *Salmo*.
16. Formulación para su uso según la reivindicación 15, o composición para su uso según la reivindicación 15, donde los individuos del género *Salmo* se seleccionan de entre salmón y trucha.
17. Formulación para su uso según la reivindicaciones 16, o composición para su uso según la reivindicación 16, donde el salmón se selecciona entre salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
18. Uso de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como desinfectante contra la bacteria *P. salmonis*.

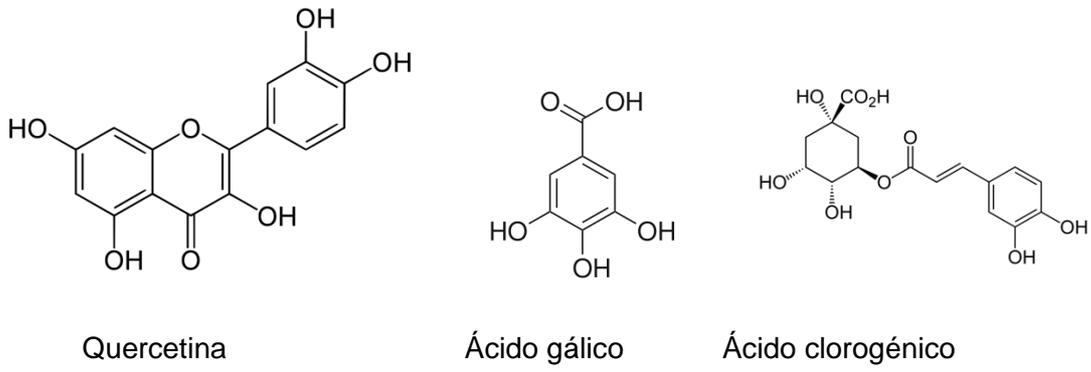


FIG 1

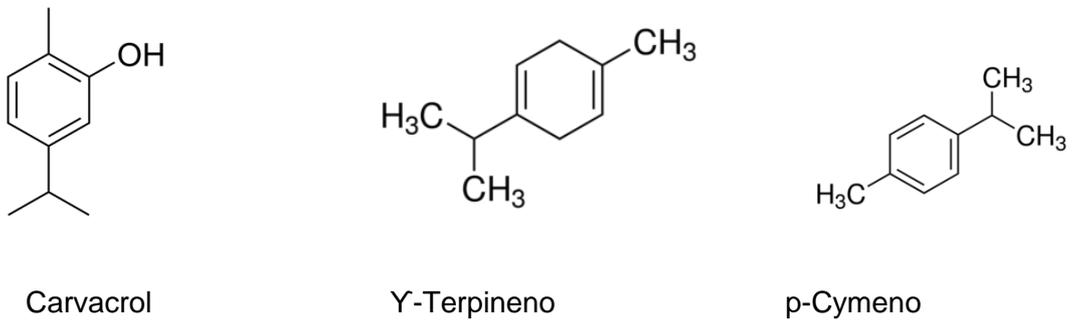


FIG 2

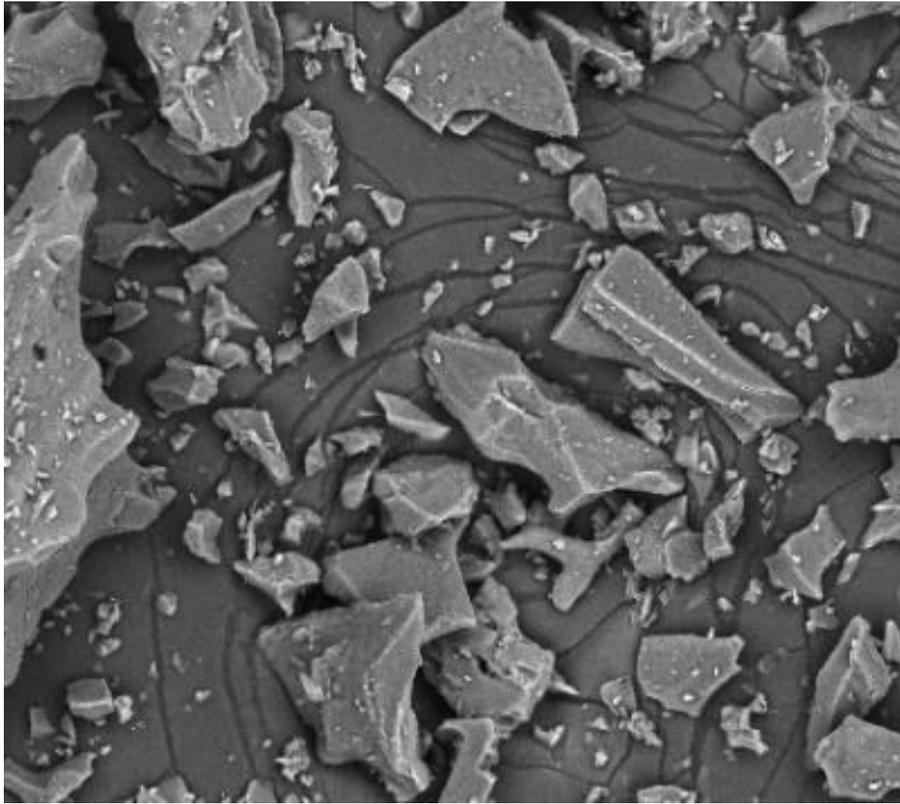


FIG 3



- ②① N.º solicitud: 201931162
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.12.2019
③② Fecha de prioridad: **28-12-2018**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CL 2018000674 A1 (UNIV SANTIAGO CHILE) 08/06/2018, Todo el documento.	1-3, 5, 7-18
Y	WO 2013100774 A1 (UNIV BELGRADE et al.) 04/07/2013, Reivindicación 1, página 4, líneas 5-14, página 9, línea 21-página 10, línea 20.	1-3, 5, 7-18
Y	JAFARI FERESHTEH et al. A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular <i>Satureja</i> Species. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2016, Vol. 9, Páginas 118 - 127, ISSN 2005-2901, DOI:10.1016/j.jams.2016.04.003 apartado 3.1.	1-3, 5, 7-18
Y	MIHAJLOV-KRSTEV TATJANA et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of <i>Satureja montana</i> L. ssp <i>montana</i> essential oil. Central European Journal of Biology, Vol. 9, Páginas 668-677, ISSN 1895-104X(print) ISSN 1644-3632(electronic), DOI:10.2478/s11535-014-0298-x tablas.	1-3, 5, 7-18
A	WO 2011119047 A1 (EWOS INNOVATION AS et al.) 29/09/2011, Ejemplos; reivindicaciones.	1-18
A	TAMPIERI M P et al. Effect of selected essential oils and pure compounds on <i>Saprolegnia parasitica</i> . Pharmaceutical Biology, 2003, Vol. 41, Páginas 584 - 591, ISSN 1388-0209 (print), DOI:10.1080/13880200390501839	1-18
A	US 2018289759 A1 (CAMPOS PAULA MIRANDA et al.) 11/10/2018, Todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.06.2020

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K36/53 (2006.01)

A61K36/185 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET