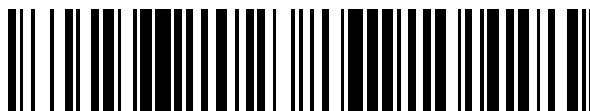


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 038**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A23K 50/30 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2009 E 09156077 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2105129**

54 Título: **Vacunas encapsuladas para la vacunación oral y de refuerzo de peces y otros animales**

30 Prioridad:

24.03.2008 US 38809 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2018

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

HAREL, MOTI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 038 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas encapsuladas para la vacunación oral y de refuerzo de peces y otros animales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende un agente inmunógeno (por ejemplo, una vacuna) y un sistema de administración bioadhesivo, que permite la administración oral y el suministro del principio farmacéuticamente activo esencialmente inalterado a la mucosa intestinal.

10

Antecedentes de la invención

Los principios farmacéuticamente activos administrados por vía oral presentan un problema significativo durante el tránsito a través del estómago de un animal, un órgano cuyos contenidos representan un ambiente digestivo adverso que consiste en un pH bajo y enzimas específicamente diseñadas para desnaturalizar las proteínas. Como consecuencia, las vacunas bacterina o las vacunas de subunidades administradas por vía oral no han demostrado ser eficaces ya que los antígenos generalmente son modificados por el estómago antes de la presentación a las células inmunorreactivas de la mucosa intestinal. Se han probado varios enfoques para proporcionar un vehículo de administración oral que transite por el estómago, pero la mayoría no ha tenido éxito a escala comercial. Un enfoque implica el cambio transitorio del pH del estómago, la neutralización de las enzimas gástricas y la estimulación de la respuesta inmunitaria de la mucosa (véase www.perosbio.com).

15

20

En 2003, aproximadamente 200 millones de peces fueron vacunados en Chile, principalmente contra la yersiniosis, la septicemia rickettsial salmonídea y la necrosis pancreática infecciosa (Bravo, 2007). De las más de 20 vacunas para peces de acuicultura introducidas en el mercado chileno desde 1999 hasta 2003, ninguna fue por vía oral.

25

La septicemia rickettsial salmonídea (SRS) es una patología de peces salmónidos causada por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* y es una enfermedad infecciosa importante en la industria salmonera chilena que da lugar a pérdidas anuales superiores al 20 %. A diferencia de otras enfermedades bacterianas, la vacuna contra la SRS no es tan eficaz para prevenir la enfermedad ni para reducir la necesidad de medicación después de la infección. Esto se debe a una disminución gradual de la inmunogenicidad de la vacuna anti-SRS en los peces vacunados. El refuerzo de la vacuna en una etapa posterior debería permitir la protección continua de los animales durante todo el período comercial de crecimiento. Sin embargo, es extremadamente difícil y económicamente poco práctico proporcionar refuerzos de vacuna parenteral a animales grandes en los corrales de red de engorde.

30

35

Casi todas las vacunas existentes se administran a los animales acuáticos mediante inyección, que es traumática, inconveniente, lenta, costosa, tiene varios efectos secundarios y puede no inducir una respuesta inmunógena apropiada en los tejidos de la mucosa. Por lo tanto, sería ventajoso un método y sistema de administración que evite estas desventajas.

40

Quizás los sistemas de administración de antígenos más conocidos son los derivados de los ésteres poliméricos lineales de ácido láctico y ácido glicólico (es decir, poli DL-láctido-co-glicólido, PLGA, revisado por Wu (Wu, 2004). En tales sistemas, los componentes inmunógenos de la subunidad de la vacuna se han capturado en perlas de poli-acrilato y poliglicólido/láctido o en vesículas similares a liposomas a través de procesos que utilizan disolventes orgánicos volátiles tales como diclorometano o cloroforno. Los disolventes se usan para formar emulsiones de soluciones de polímeros o películas lipídicas secas. La encapsulación de los antígenos en microcápsulas de PLGA proporciona una serie de ventajas que incluyen la rápida degradación por hidrólisis y la posterior penetración de las placas de Peyer (sitios concentrados de tejido linfocítico en la mucosa intestinal de los vertebrados superiores pero no en los peces). Una desventaja importante de las microcápsulas de PLGA es el requisito del uso de disolventes orgánicos. El contacto con disolventes orgánicos puede inactivar o reducir la eficacia de la vacuna al alterar la inmunogenicidad de las proteínas de superficie críticas para la inducción de respuestas inmunitarias humorales o celulares. Además, los procesos de poli-acrilato y poli-glicólido/láctido generalmente dan como resultado microperlas con una eficacia del inmunógeno o de captura del antígeno extremadamente baja.

45

50

55

Se han empleado microesferas de polímero y partículas lamelares (por ejemplo, liposomas) para la administración parenteral y mucosal mejorada de antígenos. Debido a que las propias vacunas pueden no ser reconocidas de manera eficiente y absorbidas por los linfocitos de la mucosa, generalmente necesitan ser coadministradas con potenciadores de la penetración o adyuvantes. Se conocen diferentes clases de mezclas de polímeros para su posible uso como mucoadhesivos (Malik et al., 2007). Estos incluyen polímeros sintéticos tales como poli(ácido acrílico) (PAA), hidroxipropil metilcelulosa y derivados de poli(metilacrilato), así como polímeros naturales tales como ácido hialurónico y quitosano.

60

65

El quitosano se ha utilizado para diversas aplicaciones como biomaterial para la ingeniería de tejidos, la cicatrización de heridas y como un excipiente para la administración de fármacos (Chopra et al., 2006; Dang y Leong, 2006). El quitosano se ha probado ocasionalmente como un adyuvante para la aplicación en la mucosa (Kim et al., 2007), pero normalmente se aplica directamente a la superficie de la mucosa, como la aplicación intranasal para obtener una respuesta del tipo IgA en la mucosa nasofaríngea de animales terrestres (Kang et al. al., 2007). Sin embargo, el

5 uso de quitosano en la administración de vacunas sigue siendo muy limitado debido a las características fisicoquímicas deficientes tales como una alta temperatura de transición y energía libre interfacial, lo que da como resultado una interacción subóptima con las superficies de la mucosa y una interpenetración e interdifusión del polímero floja. Este problema se agrava aún más cuando se usa para los vertebrados inferiores poiquilotermos como los peces salmónidos. El quitosano también tiene la desventaja adicional de una baja resistencia mecánica y solubilidad.

10 Siwicki et al., (1994). "Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis". Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 1-2, 125-139 se refiere a preparaciones inmunoestimulantes Macrogard®, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, Evetsel®, Chitosan® o FinnStim® que se mezclaron en dietas semipurificadas y se administraron a grupos de trucha arco iris durante 1 semana.

15 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de sistemas y procesos efectivos para la microencapsulación de sustancias inmunógenas con polímeros que tengan propiedades adhesivas y cohesivas superiores.

Sumario de la invención

20 La presente invención supera los inconvenientes de los sistemas de encapsulación descritos anteriormente, en la que la presente invención divulga una composición diseñada para la administración oral de una vacunación primaria y/o de refuerzo que se puede usar para animales alojados no solo en la incubadora sino también en corrales de engorde. Las propiedades mucoadhesivas excepcionales de las composiciones de la presente invención proporcionan un método exitoso de administración transmucosal de fármacos, especialmente para vertebrados inferiores con un sistema digestivo menos desarrollado y sin placas de Peyer tales como los peces.

25 La presente invención proporciona una composición microparticulada para la administración oral a un animal para la administración intestinal de un principio farmacéuticamente activo, comprendiendo dicha composición:

- a) al menos un polímero bioadhesivo seleccionado del grupo que consiste en quitosano, guar catiónico, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, en el que el polímero bioadhesivo está presente a una concentración de entre 1 y 10 % en peso;
- 30 b) al menos un oligosacárido que tiene propiedades de intensificación de la respuesta inmunógena, seleccionado del grupo que consiste en inulina, fructooligosacárido y dextrina, en el que el oligosacárido está presente a una concentración de entre 1 y 50 % en peso;
- c) al menos un compuesto mediador que tiene propiedades hidrófilas y lipófilas, en el que el compuesto mediador comprende al menos un emulsionante seleccionado del grupo que consiste en monoglicéridos, ésteres de sorbitán, ésteres de propilenglicol, lecitina, polisorbatos y ésteres de sacarosa, y/o al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en glucosa, sacarosa y trehalosa, y en el que el compuesto mediador está presente a una concentración de entre 0,1 % y 50 % en peso; y
- 35 d) el principio farmacéuticamente activo; en el que el principio farmacéuticamente activo es un agente inmunógeno.

40 La invención proporciona además el uso de las composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento para la administración de una vacuna oral a un animal.

45 Adicionalmente, la invención proporciona un método para preparar la composición de la invención, comprendiendo dicho método:

- a) preparar una solución acuosa ácida que comprende al menos un polímero bioadhesivo, en el que el polímero bioadhesivo es quitosano y la solución ácida tiene un pH suficientemente bajo para gelatinizar el quitosano;
- 50 b) combinar inulina en la solución con el quitosano gelatinizado para formar una solución de inulina-quitosano;
- c) combinar un emulsionante con un azúcar, en el que el azúcar y el emulsionante forman un complejo azúcar/emulsionante;
- d) introducir el complejo azúcar/emulsionante en la solución de inulina-quitosano para formar una emulsión uniforme manteniendo el pH ácido de la solución;
- 55 e) añadir agente inmunógeno a la emulsión uniforme; y
- f) precipitar la emulsión uniforme en una solución de reticulación que contiene fosfato.

60 Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona un sistema de administración bioadhesivo que comprende una composición que incluye un polisacárido catiónico, un polisacárido neutro en combinación con un principio farmacéuticamente activo, tal como un agente inmunógeno. Sorprendentemente, el agente inmunógeno cuando se administra con el polisacárido catiónico y el polisacárido neutro da como resultado una inducción inmunológica similar o mejor que la administración parenteral del principio farmacéuticamente activo.

65 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende un polisacárido catiónico, un polisacárido neutro en combinación con un principio farmacéuticamente activo, en el que el polisacárido catiónico es quitosano y el polisacárido neutro es un fructano, y más preferiblemente, una inulina o fragmentos de la misma.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona la administración oral de un principio farmacéuticamente activo, tal como un antígeno, en el que el principio farmacéuticamente activo se libera en el sitio de acción (es decir, el tejido linfoide asociado al intestino; GALT) a lo largo del intestino anterior y posterior del animal. Y lo que es más importante, el vehículo de administración que comprende un polisacárido catiónico, un polisacárido neutro en combinación con el principio farmacéuticamente activo, proporciona además protección del antígeno durante el tránsito a través del estómago del animal y luego proporciona una disolución gradual, correspondiente al tiempo de tránsito del intestino posterior de aproximadamente 2 horas, y permite la liberación reproducible del antígeno en el mismo.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método para producir un vehículo de administración bioadhesivo para la vacunación de animales, tales como animales acuáticos, en el que el vehículo de administración está en forma de micropartículas secas que comprenden un agente inmunógeno incrustado o impregnado en una matriz compuesta de quitosano reticulado, oligosacáridos, sacáridos. Cualquier oligosacárido aplicable puede usarse en la composición. Los oligosacáridos comunes incluyen fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) e inulinas. En una realización preferida de la invención, el método comprende producir un vehículo de administración bioadhesivo que contiene una vacuna contra la SRS para su uso en peces salmónidos.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un régimen de alimentación en el que los animales son alimentados con un vehículo de administración bioadhesivo que comprende un polisacárido catiónico, un polisacárido neutro en combinación con un principio farmacéuticamente activo, para la vacunación oral de animales. En una realización preferida, el animal vacunado es un pez y, en una realización más preferida, los peces son salmónidos y la vacuna oral, o de refuerzo, es para prevenir la enfermedad conocida como SRS.

Otro aspecto más descrito en la presente memoria proporciona una composición para estabilizar y administrar un principio farmacéuticamente activo al intestino, comprendiendo la composición quitosano e inulina en combinación con un complejo emulsionante/azúcar, en el que el complejo emulsionante/azúcar comprende lecitina y está en una cantidad suficiente para mediar en la interacción entre la inulina y los residuos amina hidrófobos del quitosano.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar una composición para administración oral de un ingrediente farmacéuticamente activo que comprende:

- a) preparar una solución acuosa ácida que comprende al menos un polímero bioadhesivo, en el que el polímero bioadhesivo es quitosano y la solución ácida tiene un pH suficientemente bajo para gelatinizar el quitosano;
- b) combinar un oligosacárido, tal como la inulina, en la solución con el quitosano gelatinizado para formar una solución de inulina-quitosano;
- c) combinar un emulsionante con un azúcar, en el que el azúcar y el emulsionante forman un complejo azúcar/emulsionante;
- d) introducir el complejo azúcar/emulsionante en la solución de inulina-quitosano para formar una emulsión uniforme manteniendo el pH ácido de la solución;
- e) añadir un principio farmacéuticamente activo a la emulsión uniforme; y
- f) precipitar la emulsión en una solución de reticulación que contiene fosfato.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para la administración de una vacuna oral a un animal.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente divulgación y de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la descripción de la presente invención se usa la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

Un “principio farmacéuticamente activo” se define como cualquier material biológico que da como resultado la prevención, cura o mitigación de una enfermedad en cualquier animal. Todas las vacunas están destinadas a ser incluidas en esta definición de principios farmacéuticamente activos.

“Microencapsulación” se define como un proceso que produce una composición que contiene un principio farmacéuticamente activo que está en forma de una micropartícula en el intervalo de tamaño de 10 a 1000 µm, o una composición que se puede moler en una micropartícula en el intervalo de tamaño de 10 a 1000 µm.

Un “inmunógeno” o un “agente inmunógeno” se define como una sustancia o una composición química, que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica en un animal.

Los agentes inmunógenos incluirían péptidos y proteínas inmunógenos que incluyen mezclas que comprenden péptidos y/o proteínas inmunógenos (por ejemplo, bacterinas); partículas virales intactas inactivas, atenuadas e infecciosas; procariotas intactos muertos, atenuados e infecciosos; protozoos intactos muertos, atenuados e infecciosos que incluyen cualquier etapa del ciclo de vida del mismo, y patógenos intactos multicelulares muertos, atenuados e infecciosos, vacunas de subunidades recombinantes y vectores recombinantes para administrar y expresar genes que codifican proteínas inmunógenas (por ejemplo, vacunas de ADN).

“Vacunación” se define como un proceso que da como resultado una respuesta inmunitaria específica generada por un animal contra un inmunógeno o un agente inmunógeno.

Un “sistema de administración bioadhesivo” se define como una composición que da como resultado la administración de un inmunógeno o un agente inmunógeno a la ubicación deseada en el tejido linfóide asociado al intestino (GALT) de la mucosa intestinal.

Una molécula “mucoadhesiva” es un componente de un sistema de administración bioadhesivo que se une específicamente a los tejidos de la mucosa. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, quitosano, ácido hialurónico, goma Karaya y guar catiónico. La presente invención proporciona una sustancia inmunógena mejorada para administración oral. La invención se basa en el descubrimiento de propiedades sinérgicas inesperadas de una mezcla compleja de quitosano y un fructano.

Los fructanos o fructosanos son oligosacáridos o polisacáridos que comprenden una secuencia de unidades de anhidrofructosa opcionalmente combinadas con uno o más restos de sacáridos diferentes de la fructosa. Los fructanos pueden ser lineales o ramificados. Los fructanos pueden ser productos obtenidos directamente de una fuente vegetal o microbiana o productos con una longitud de cadena que ha sido modificada (aumentada o reducida) por división, síntesis o hidrólisis, en particular de la variedad enzimática. Los fructanos generalmente tienen un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 1.000 y preferiblemente de 3 a aproximadamente 60.

El fructano se usa preferiblemente en una cantidad de entre el 0,01 y el 20 % en peso con respecto al peso total de la composición. Más preferiblemente, esta cantidad está entre 0,05 y 15 % en peso con respecto al peso total de la composición y más preferiblemente entre 1 y 10 % en peso.

Los fructanos preferidos son inulinas. Las inulinas se refieren a un grupo de oligosacáridos que contienen fructosa de origen natural. Debido a que la fibra de inulina es resistente a la digestión en el tracto gastrointestinal superior (es decir, el estómago), alcanza el intestino grueso esencialmente intacta, donde puede ser digerida por bacterias nativas. Las inulinas generalmente consisten en cadenas de polifruktosa en las cuales las unidades de fructosa están conectadas entre sí principalmente o exclusivamente por enlaces β -(2-1). La inulina existe en la naturaleza, en general, como una mezcla polidispersa de cadenas de polifruktosa, la mayoría de las cuales termina en una unidad de glucosilo. Se obtienen de las raíces de la achicoria (*Cichorium intybus*), la dalia y las alcachofas de Jerusalén. Además, la inulina puede obtenerse a partir de síntesis bacterianas o puede prepararse in vitro mediante síntesis enzimática a partir de sacarosa. Se ha demostrado que la inulina estimula la inmunidad de la mucosa y parece mejorar la eficacia de una vacuna contra *Salmonella* en ratones (Benyacoub et al., 2008). Aunque el mecanismo de acción no está claro, varios estudios han propuesto que la inulina puede inducir cambios en el epitelio colónico estimulando la proliferación en las criptas, aumentando la concentración de poliaminas, cambiando el perfil de las mucinas y/o modulando las funciones endocrinas e inmunitarias (Roberfroid, 2005). El grado promedio de polimerización de las inulinas comercializadas como suplementos nutricionales es de 10 a 12. Las inulinas estimulan el crecimiento de especies de *Bifidobacterium* en el intestino grueso.

Los fructooligosacáridos o FOS generalmente se refieren a oligosacáridos de cadena corta compuestos por D-fructosa y D-glucosa, que contienen de tres a cinco unidades de monosacáridos. Los FOS, también llamados neosugar y FOS de cadena corta, se producen a escala comercial a partir de sacarosa usando una enzima fructosiltransferasa fúngica. Los FOS son resistentes a la digestión en el tracto gastrointestinal superior. Actúan estimulando el crecimiento de especies de *Bifidobacterium* en el intestino grueso.

El quitosano es un polisacárido catiónico lineal que está gelificado o reticulado en presencia de aniones, como citrato, fosfato o sulfato. También se ha demostrado que el quitosano posee propiedades útiles tales como la ausencia de toxicidad, la alta biocompatibilidad y la ausencia de antigenicidad. Aunque el quitosano es en sí mismo básicamente insoluble en agua, la solubilidad aumenta considerablemente si el pH se desplaza hacia la condición ácida. Para obtener una concentración de polímero apreciable, es por lo tanto necesario preparar la solución o dispersión con el uso simultáneo de un ácido. Para poder eliminar después más fácilmente este ácido de la composición, resultó que el ácido debería tener un punto de ebullición bajo, es decir, preferiblemente, como máximo 140 °C, en particular como máximo 120 °C, especialmente preferido como máximo 100 °C y lo más preferiblemente como máximo 80 °C, tales como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido fórmico y ácido acético. Otros ácidos adecuados son los que forman un azeótropo binario de punto de ebullición más bajo con agua, tales como el ácido acético o el ácido propiónico.

El quitosano puede obtenerse a través de la desacetilación de la quitina, el compuesto principal de los exoesqueletos en los crustáceos. El quitosano [α -(1-4)-2-amino-2-desoxi- β -D-glucano], un mucopolisacárido estrechamente relacionado con la celulosa, presenta propiedades químicas que están determinadas por el peso molecular, el grado de desacetilación y la viscosidad. El quitosano puede formar micropartículas y nanopartículas que pueden encapsular grandes cantidades de antígenos (van der Lubben et al., 2001; Davis, 2006). En el ambiente

ácido del estómago, el quitosano conserva sus cargas positivas que mantienen unida a la partícula. Se ha demostrado que las micropartículas de quitosano cargadas de ovoalbúmina pueden absorberse en las placas de Peyer del tejido linfoide asociado al intestino de los vertebrados superiores. Además, después de coadministrar quitosano con antígenos en estudios de vacunación nasal, se observó un fuerte aumento tanto de la respuesta inmunitaria mucosal como sistémica en ratones (van der Lubben et al., 2001).

Preparación del sistema de administración bioadhesivo específico de la mucosa intestinal: una solución o suspensión acuosa de un principio farmacéuticamente activo (por ejemplo, un agente inmunógeno, que incluye, pero no se limita a, vacunas) y, si se desea, un adyuvante que incluye, pero no se limita a, betaglucano, lipopolisacárido, sales de aluminio, escualeno y/o virosomas, se disuelve o suspende en una solución acuosa de un polímero mucoadhesivo adecuado tal como, pero no se limitan a, quitosano y un oligosacárido adecuado tal como, pero no se limitan a, inulina. La solución/suspensión resultante se dispersa a continuación directamente o por atomización en una solución acuosa de reticulación que contiene sales de fosfato solubles en agua. Tras el contacto, tiene lugar una reacción de intercambio de sal (reticulación), que da como resultado la formación de perlas o cápsulas en las que se retiene el principio farmacéuticamente activo. La suspensión resultante de micropartículas que contienen el principio farmacéuticamente activo revestido se recoge a continuación, se seca y se muele si es necesario para formar partículas que tienen un intervalo de tamaño de 10-1.000 micrómetros. Los detalles de la preparación se exponen en la serie de etapas que se describen a continuación:

Etapa (a): Preparación de hidrogel mucoadhesivo complejo.

Un polímero mucoadhesivo tal como quitosano, a una concentración de 1 a 10 % (p/p), se dispersa en una solución de ácido acético 1-5 N en un intervalo de temperatura de 20 a 65 °C hasta que todos los gránulos de polímero se disuelvan completamente. Preferiblemente, el quitosano está desacetilado al menos en un 85 %. Adicionalmente, se prefiere que el pH de la solución acuosa ácida sea de aproximadamente 2 a aproximadamente 4. Se requiere la gelatinización de los gránulos de polímero para preparar una micropartícula que posea la propiedad inmunógena.

En realizaciones de la invención, también se añaden componentes de oligosacáridos de cadena corta indigeribles a una concentración de aproximadamente 1 a 30 % (p/p) para aumentar la protección del antígeno de la acidez estomacal, ácidos biliares y proteasas y aumentar la adsorción intestinal del antígeno. Los ejemplos de materiales aplicables incluyen, pero no se limitan a, oligosacárido de quitosano (COS), inulina, fructooligosacáridos (FOS) y dextrina. Estos componentes que aumentan la absorción se pueden disolver más fácilmente en los jugos intestinales que otros materiales de la matriz. En consecuencia, se puede aumentar la permeabilidad y la biodegradabilidad del polímero de matriz, dando como resultado una liberación mejorada del principio farmacéuticamente activo en la ubicación deseada en el GALT de la mucosa intestinal.

Etapa (b): Formación de un complejo entre el material mucoadhesivo y un oligosacárido de cadena corta.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que los procesos descritos en la presente memoria dan como resultado una nueva composición en forma de complejo mediada por un complejo emulsionante/azúcar y que comprende polisacáridos y oligosacáridos en forma de una matriz compleja que tiene una naturaleza de micropartículas insolubles. El emulsionante y las moléculas de azúcar median la interacción entre los residuos de hidroxilo del oligosacárido de cadena corta y los residuos amina hidrófobos del polisacárido catiónico. Generalmente, los emulsionantes pueden ser, pero sin limitarse a, monoglicéridos, ésteres de sorbitán, ésteres de propilenglicol, lecitina, polisorbatos y ésteres de sacarosa de ácidos grasos saturados de cadena media y larga, y los azúcares serán cualquier mono o disacárido tal como, pero sin limitarse a, glucosa, fructosa o sacarosa. Se añade una solución que comprende una mezcla mediadora de emulsionante/azúcar (que contiene de 0,5 a 12,5 % p/p de emulsionante y 5-30 % p/p de azúcar) al polisacárido mucoadhesivo gelatinizado y una solución de oligosacáridos de cadena corta en un intervalo de temperatura de 20 a 65 °C y pH 3-5 hasta que se haya formado una emulsión uniforme y estable. Esta emulsión se estabiliza mediante la interacción entre la carga positiva del polisacárido catiónico, el emulsionante y los grupos hidroxilo de los hidrocarburos de cadena corta. La mayor hidrofobicidad y elasticidad del polisacárido y emulsionante mucoadhesivo ayuda a retrasar o prevenir la penetración de agua o jugos gástricos en la matriz una vez formada en micropartículas. La acidez de la suspensión de producto se aumenta gradualmente a pH 6,2 mediante la adición de una base tal como, pero sin limitarse a, hidróxido de sodio.

Etapa (c): Adición de una sustancia inmunógena y reacción de reticulación.

Una solución que comprende un principio farmacéuticamente activo, tal como, pero sin limitarse a, un inmunógeno o antígeno inmunógeno se disuelve en la suspensión espesa descrita en la Etapa (b) anterior, y la composición se puede secar para producir un polvo mediante una serie de métodos reconocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a: secado por pulverización a baja temperatura, secado por banda, secado por congelación, secado en cinta o secado instantáneo. En una realización preferida, la dispersión se pasa a través de un tubo o aguja que varía de 10 µm a 1.000 µm de diámetro para caer gota a gota o en una corriente continua en una solución reticulada que contiene 1-10 % de trifosfato de sodio en agua. En otra alternativa, la suspensión puede atomizarse por pulverización en una solución acuosa que contiene 1-10 % de trifosfato de sodio. Las partículas húmedas pueden recogerse del baño de reticulación por cualquier medio adecuado bien conocido en la técnica (por ejemplo, filtración,

centrifugación, etc.) y mezclarse con cualquier agente espesante aceptable tal como metilcelulosa, pectina, alginato, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, y similares, y pulverizarse sobre gránulos de pienso (es decir, recubiertos en la parte superior). En otra alternativa, las partículas húmedas pueden secarse usando procesos convencionales bien conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, secado al vacío, secado por pulverización y secado en túnel, molturados en la clase de tamaño apropiada si es necesario, y luego mezclados con aceite de pescado u otros aceites comestibles antes de la aplicación a un alimento estándar comercializado por recubrimiento superior usando métodos conocidos en la técnica.

Estrategia de alimentación para la vacunación oral: los peces juveniles que tienen un sistema inmunitario maduro (para el salmón atlántico, generalmente con aproximadamente 0,5 g) están listos para ser vacunados por vía oral. Sin embargo, la presente invención proporciona una estrategia flexible que también permite la vacunación o el refuerzo de la respuesta inmunógena de peces más grandes y otros animales. Para inducir eficazmente la respuesta inmunógena, los peces u otros animales deben alimentarse por vía oral en un solo momento a una dosis similar o mayor de inmunógeno que la que generalmente se proporciona mediante inyección. Para maximizar la inmunogenicidad del pez y dependiendo del tipo de inmunógeno, el tamaño del pez y la capacidad de respuesta, este único momento de alimentación puede repetirse (por ejemplo, cada tres días durante hasta diez momentos de alimentación).

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de micropartículas bioadhesivas

Se disolvió quitosano (Sigma, St. Louis, MO) (1 gramo) en ácido acético 0,5 N a 50 °C en quitosano 0,5 N. Se añadieron inulina instantánea (Cargil, Minneapolis, MN), sacarosa y lecitina de soja (Archer-Daniels-Midland Co., Decatur, IL) a la suspensión ácida y se dejaron formar complejos con el quitosano durante 30 min. La cantidad de cada compuesto añadido a la solución ácida se muestra en la Tabla 1, tal como se expone a continuación. El pH de la suspensión de complejo ácido se ajustó entonces a 6,2 con hidróxido sódico y la suspensión espesa se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión se pulverizó a continuación en un baño de trifosfato sódico al 5 % p/p y cloruro sódico al 1 % p/p para formar micropartículas en un intervalo de tamaño entre 10 µm y 100 µm. Las micropartículas se lavaron con agua del grifo en un tamiz de malla fina, se sumergieron en una solución de sacarosa al 30 % y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su uso. La composición de las micropartículas se proporciona en la Tabla 1.

Tabla 1 Composición de micropartículas (g de peso/100 g de solución)

Quitosano	1 g
Lecitina de soja	3 g
Inulina	30 g
Sacarosa	16 g
Agua	50 g

Ejemplo 2. Producción de partículas bioadhesivas que contienen la vacuna contra la septicemia rickettsial salmónida (SRS)

Se preparó una suspensión de complejo a pH 6,2 como se describe en el Ejemplo 1. Una solución que contenía vacuna SRS atenuada (5×10^{11} /ml de bacteria causante de la SRS) sin adyuvante (comercializada por Centrovét, Santiago, Chile) se mezcló en la suspensión (3 % v/v). A continuación, la suspensión se atomizó por pulverización en 5 % p/v de trifosfato de sodio y 1 % p/v de baño de cloruro de sodio para formar micropartículas en un intervalo de tamaño entre 10 µm y 100 µm. Las micropartículas se dejaron endurecer durante 1 hora y luego se lavaron con agua estéril en un tamiz de malla fina, y se sumergieron en una solución de sacarosa al 30 % (p/v). Las partículas húmedas se liofilizaron durante la noche y el polvo seco se refrigeró a 4 °C hasta su uso. La composición de las micropartículas se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 2 Composición de micropartículas (g de peso/100 g de solución)

Quitosano	1 g
Lecitina de soja	3 g
Inulina	30 g
Vacuna contra la SRS	3 ml
Sacarosa	16 g
Agua	47 g

Ejemplo 3. Producción de alimento para salmón del Atlántico que contiene micropartículas inmunógenas contra la SRS

Se mezclaron quince gramos de micropartículas inmunógenas contra la SRS secas preparadas como en el Ejemplo 2 con 30 g de aceite de pescado. La mezcla oleosa se pulverizó sobre 1 kg de alimento comercial estándar para juveniles de salmón del Atlántico (Ewos, Km 20 Coronel, Concepción, Chile) y el alimento de vacunación oral se

almacenó a 4 °C durante su uso.

Ejemplo 4. Vacunación oral del salmón del Atlántico usando micropartículas inmunógenas de la presente invención

5 Se stocked alojan juveniles de salmón del Atlántico de aproximadamente 10 g de tamaño en 30 kg por m³ de agua dulce y a una temperatura de 12 °C. La calidad del agua se mantiene mediante el intercambio rápido del agua del tanque a través de sistemas mecánicos y de biofiltración. Los peces son alimentados 4 veces al día con una ración total del 2 % del peso corporal de un alimento comercial. Cada 3 días, la dieta se reemplaza con una dieta con recubrimiento de vacuna al 2 % como se describe en el Ejemplo 3 durante un período de hasta 30 días. Los animales desarrollarán anticuerpos contra la vacuna administrada por vía oral durante los dos meses siguientes.

Ejemplo 5. Producción de partículas bioadhesivas que contienen vacuna contra la gripe porcina

15 Se preparó una suspensión espesa de complejo a pH 6,2 como se describe en el Ejemplo 1. Se mezcló una solución que contenía FluSure™ (Pfizer Animal Health), una vacuna contra el virus A de la gripe porcina, subtipos H1N1 y H3N2, en la suspensión (3 % v/v) . La suspensión se introdujo luego en un baño que contenía 5 % p/v de trifosfato de sodio y 1 % p/v de cloruro de sodio a través de una aguja de 500 micrómetros para formar fideos largos. Los fideos se dejaron reticular durante 1 hora y luego se lavaron con agua estéril en un tamiz de malla fina, se sumergieron en una solución de sacarosa al 30 % (p/v), se liofilizaron y luego se molieron hasta un tamaño de partícula de 200 micrómetros. La composición de las partículas se proporciona en la Tabla 3.

Tabla 3 Composición de fideos (g de peso seco/100 g de solución)

Quitosano	1 g
Lecitina de soja	3 g
Inulina	30 g
Vacuna FluSure™	3 ml
Sacarosa	16 g
Agua	47 g

25 **Ejemplo 6.** Vacunación oral de los cerdos contra la gripe porcina usando las micropartículas inmunógenas de la presente invención

Se mezclaron quince gramos de micropartículas inmunógenas FluSure secas preparadas como en el Ejemplo 5 con 30 g de aceite de soja. La mezcla oleosa se pulverizó sobre 1 kg de alimento comercial estándar para cerdos (Cargill Corp) y la alimentación de vacunación oral se almacenó a 4 °C antes de su uso.

30 Los cerdos jóvenes son alimentados con el alimento de vacunación oral cada 3 días durante un período de 21 días después de que los anticuerpos derivados de la madre hayan disminuido. Los animales desarrollarán anticuerpos contra la vacuna administrada por vía oral durante los dos meses posteriores.

35 **Ejemplo 7.** Producción de partículas bioadhesivas que contienen vacuna contra *Salmonella* para aves de corral

40 Se preparó una suspensión de complejo a pH 6,2 como se describe en el Ejemplo 1. Una solución que contiene Nobilix Salenvac™ (Intervet Corp), una vacuna contra *Salmonella* inactivada para la eliminación de *S. enteritidis* tanto en la carne de ave como en los huevos se mezcló en la suspensión (3 % v/v). La suspensión se introdujo gota a gota en un baño que contenía 5 % p/v de trifosfato de sodio y 1 % p/v de cloruro de sodio a través de una aguja de 500 micrómetros para formar gotitas de aproximadamente 2-3 mm de diámetro. Las microesferas se dejaron reticular durante 1 hora y luego se lavaron con agua estéril en un tamiz de malla fina, se sumergieron en una solución de sacarosa al 30 % (p/v), se liofilizaron, y luego se molieron hasta un tamaño de partícula de 200 micrómetros. La composición de las partículas se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4 Composición de fideos (g de peso/100 g de solución)

Quitosano	1 g
Lecitina de soja	3 g
Inulina	30 g
Vacuna Nobilix Salenvac™	3 ml
Sacarosa	16 g
Agua	47 g

50 **Ejemplo 8.** Vacunación oral de aves de corral contra *Salmonella* usando las micropartículas inmunógenas de la presente invención

Se mezclaron quince gramos de micropartículas inmunógenas Nobilix Salenvac™ secas preparadas como en el Ejemplo 7 con 30 g de aceite de soja. La mezcla oleosa se pulverizó sobre 1 kg de alimento comercial estándar para gallinas ponedoras (Cargill Corp) y la alimentación de vacunación oral se almacenó a 4 °C antes de su uso.

Los pollos con 10-12 semanas de edad se alimentan con una dosis única del alimento de vacunación oral y se administra un refuerzo entre las 14-18 semanas de edad a intervalos de cada 3 días durante un período de 21 días.

Referencias

5 Benyacoub, B., Rochat, F., K.Y, S., Rochat, I., Antille, N., Cherbut, C., von der Weid, T., Schiffrin., E.J., Blum, S., 2008. Feeding a Diet Containing a Fructooligosaccharide Mix Can Enhance Salmonella Vaccine Efficacy in Mice. *J. Nutr.* 138, 123-129.

10 Chopra, S., Mahdi, S., Kau, r.J., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., F.J, A., 2006. Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 58(8), 1021-1032.

15 Dang, J.M., Leong, K.W., 2006. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(4), 487-499.

Davis, S.S., 2006. The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral and mucosal delivery. *Vaccine* 24(2), 7-10.

20 Kang, M.L., Jiang, H.L., Kang, S.G., Guo, D.D., Lee, D.Y., Cho, C.S., Yoo, H.S., 2007. Pluronic F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of Bordetella bronchiseptica antigens containing dermonecrototoxin. *Vaccine* 25(23), 4602-4610.

25 Kim, T.J., Kim, K.H., Lee, J.I., 2007. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of Actinobacillus pleuropneumoniae with chitosan after tracheal administration in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* 69(5), 535-539.

30 Malik, D.K., Baboota, S., Ahuja, A., Hasan, S., Ali, J., 2007. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems.. *Curr. Drug Deliv.* 4(2), 141-151.

Roberfroid, M.B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr.* 93, 13-25.

35 van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Borchard, G., Junginger, H.E., 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52 (2), 139-144.

van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., van Aelst, A.C., Borchard, G., Junginger, H.E., 2001. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22(7), 687-694.

40 Wu, X.S., 2004. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol* 32(4), 575-591.

45 S. Bravo and PJ Midtlyng (2007) The Use of Fish Vaccines in the Chilean Salmon Industry 1999-2003. *Aquaculture* 270: 36-42

REIVINDICACIONES

1. Una composición microparticulada para la administración oral a un animal para el suministro intestinal de un principio farmacéuticamente activo, comprendiendo dicha composición:
- 5 a) al menos un polímero bioadhesivo seleccionado del grupo que consiste en quitosano, guar catiónico, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, en el que el polímero bioadhesivo está presente a una concentración de entre el 1 y el 10 % en peso;
- 10 b) al menos un oligosacárido que tiene propiedades de intensificación de la respuesta inmunógena, seleccionado del grupo que consiste en inulina, fructooligosacárido y dextrina, en donde el oligosacárido está presente a una concentración de entre el 1 y el 50 % en peso;
- 15 c) al menos un compuesto mediador que tiene propiedades hidrófilas y lipófilas, en donde el compuesto mediador comprende al menos un emulsionante seleccionado del grupo que consiste en monoglicéridos, ésteres de sorbitán, ésteres de propilenglicol, lecitina, polisorbatos y ésteres de sacarosa, y/o al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en glucosa, sacarosa y trehalosa, y en donde el compuesto mediador está presente a una concentración de entre el 0,1 % y el 50 % en peso; y
- d) el principio farmacéuticamente activo; en donde el principio farmacéuticamente activo es un agente inmunógeno.
- 20 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente inmunógeno se selecciona de péptidos y proteínas inmunógenos; vectores recombinantes que expresan genes que codifican proteínas inmunógenas; partículas virales intactas inactivas, atenuadas e infecciosas; procariotas intactos muertos, atenuados e infecciosos; protozoos intactos muertos, atenuados e infecciosos; y patógenos multicelulares intactos muertos, atenuados e infecciosos.
- 25 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente inmunógeno es una vacuna contra la septicemia rickettsial salmonídea (SRS).
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el emulsionante es lecitina y el azúcar es sacarosa y en la que el al menos un polímero bioadhesivo es quitosano y el al menos un oligosacárido es inulina.
- 30 5. Uso de las composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la fabricación de un medicamento para la administración de una vacuna oral a un animal.
- 35 6. El uso de la reivindicación 5, en el que el animal vacunado es un pez.
7. El uso de la reivindicación 5, en el que la vacuna oral comprende una vacuna contra la septicemia rickettsial salmonídea (SRS).
- 40 8. Un método para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho método:
- a) preparar una solución acuosa ácida que comprende al menos un polímero bioadhesivo, en donde el polímero bioadhesivo es quitosano y la solución ácida tiene un pH suficientemente bajo para gelatinizar el quitosano;
- 45 b) combinar inulina en la solución con el quitosano gelatinizado para formar una solución de inulina-quitosano;
- c) combinar un emulsionante con un azúcar, en donde el azúcar y el emulsionante forman un complejo azúcar/emulsionante;
- d) introducir el complejo azúcar/emulsionante en la solución de inulina-quitosano para formar una emulsión uniforme manteniendo el pH ácido de la solución;
- 50 e) añadir agente inmunógeno a la emulsión uniforme; y
- f) precipitar la emulsión uniforme en una solución de reticulación que contiene fosfato.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente inmunógeno es una vacuna bacterina.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la vacuna bacterina es una vacuna contra la septicemia rickettsial salmonídea (SRS).
- 55