

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 539**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2012** **E 12176879 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2662074**

54 Título: **Composiciones y métodos para encapsular vacunas para la vacunación y el refuerzo por vía oral de peces y otros animales**

30 Prioridad:

08.05.2012 US 201213466279

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

12.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CARPENTER, BRIAN y
HAREL, MOTI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 693 539 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

Composiciones y métodos para encapsular vacunas para la vacunación y el refuerzo por vía oral de peces y otros animales

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una composición que comprende un agente farmacéuticamente activo como, por ejemplo, pero sin limitarse a él, un agente inmunogénico (p.ej. una vacuna) y un sistema de administración bioadhesivo, que permite la administración oral y la administración del agente farmacéuticamente activo esencialmente inalterado en la mucosa intestinal.

15 **Antecedentes de la técnica relacionada**

Los agentes farmacéuticamente activos administrados por vía oral presentan un importante problema en el tránsito por el estómago del animal, un órgano cuyo contenido representa un entorno digestivo duro que consiste en un pH bajo y enzimas específicamente diseñadas para desnaturalizar proteínas. Como consecuencia, no se ha demostrado que la bacterina ni las vacunas subunitarias administradas por vía oral sean eficaces ya que los antígenos son modificados generalmente en el estómago antes de su presentación a las células inmunosensibles de la mucosa del intestino. Se ha analizado una serie de enfoques para proporcionar un vehículo de administración oral que pueda transitar por el estómago, pero la mayoría de ellos han sido infructuosos a escala comercial. Uno de dichos enfoques implica el cambio transitorio del pH del estómago, la neutralización de enzimas gástricas y la estimulación de la respuesta inmune de la mucosa (véase www.perosbio.com).

En 2003 se vacunaron aproximadamente 200 millones de peces en Chile, principalmente contra Yersiniosis, Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) (Bravo, 2007). De las más de 20 vacunas para peces de acuicultura adquiridas por el mercado chileno desde 1999 hasta 2003, ninguna fue una vacuna de administración por vía oral.

SRS es una patología de los peces salmónidos causada por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* y constituye la principal enfermedad infecciosa en la industria del salmón chileno, con pérdidas anuales por encima del 20 %. A diferencia de otras enfermedades bacterianas, la vacunación contra SRS no es tan eficaz para prevenir la enfermedad o reducir la necesidad de una medicación tras la infección. Esto se debe a la gradual disminución de la inmunogenicidad contra SRS en los peces vacunados. El refuerzo de la titulación de anticuerpos en la sangre mediante vacunación en un estadio posterior debería permitir una protección continua de los animales a lo largo de todo el período de crecimiento comercial. Sin embargo, resulta enormemente difícil y económicamente impracticable proporcionar refuerzos de vacunas parentales a animales grandes en los cercados de mallas de cultivo.

Prácticamente todas las vacunas existentes se administran a los animales acuáticos por inyección, lo cual es traumático, inconveniente y requiere tiempo y gasto, presenta una serie de efectos secundarios y puede fracasar a la hora de inducir una respuesta inmunogénica apropiada en los tejidos de la mucosa. Por lo tanto, sería de gran valor contar con un método y un sistema de administración que elimine estos inconvenientes.

Tal vez los sistemas de administración de antígeno más conocidos sean aquellos que se derivan de los ésteres poliméricos lineales de ácido láctico y ácido glicólico (es decir, poli DL-lactida-co-glicolido, PLGA, revisado por Wu (Wu, 2004). En dichos sistemas, se encapsulan los componentes de vacuna subunitaria inmunogénica en perlas o vesículas de tipo liposoma de poli-acrilato y poli-glicolida/lactida a través de procesos en los que se utilizan disolventes orgánicos volátiles, como diclorometano o cloroformo. Se utilizan los disolventes para formar emulsiones de soluciones de polímero o películas de lípido secas. La encapsulación de antígenos en microcápsulas de PLGA proporciona una serie de ventajas incluyendo una rápida degradación por hidrólisis y la posterior penetración de las placas de Peyer (cúmulos de tejido linfático en la mucosa intestinal de los vertebrados superiores pero no los peces). Una de las principales desventajas de las microcápsulas de PLGA es el uso necesario de disolventes orgánicos. El contacto con disolventes orgánicos puede inactivar o reducir la eficacia de la vacuna alterando la inmunogenicidad de las proteínas de la superficie críticas para inducir las respuestas inmunitarias humorales y celulares. Por otra parte, los procesos con poli-acrilato y poli-glucólido/lactida tienen como resultado normalmente microperlas con una eficiencia de captura de antígeno o inmunógeno extremadamente baja.

Se han empleado microesferas de polímero y las partículas laminares (p.ej., liposomas) para mejorar la administración parenteral y mucosa de antígenos. Dado que es posible que los linfocitos de la mucosa no reconozcan ni absorban eficientemente las propias vacunas, normalmente es necesario administrarlas conjuntamente con potenciadores y adyuvantes de la penetración. Se conocen diferentes clases de mezclas de polímeros para su posible uso como mucoadhesivos (Malik et al., 2007). Entre ellos se incluyen polímeros sintéticos como poli(ácido acrílico) (PAA), hidroxipropil metil celulosa y derivados de poli(acrilato de metilo) así como los polímeros naturales como ácido hialurónico y quitosano.

Se han utilizado quitosano y diversos derivados de quitosano para diversas aplicaciones como biomaterial para ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas y como excipiente para la administración de fármacos (Chopra et al., 2006; Dang y Leong, 2006). Ocasionalmente, se ha sometido a ensayo quitosano como adyuvante para aplicación mucosa (Kim et al., 2007), pero normalmente se aplica directamente a una superficie mucosa como pueda ser la aplicación intranasal para obtener una respuesta IgA en la mucosa nasofaríngea de animales terrestres (Kang et al., 2007). Sin embargo, el uso de quitosano y diversos derivados de quitosano en la administración de vacunas sigue estando muy limitado debido a sus deficientes características físico-químicas como puedan ser la alta temperatura de transición y la energía libre interfacial, que tienen como resultado una interacción con las superficies mucosas por debajo de la óptima y una escasa interpenetración e interdifusión del polímero. Este problema se agudiza además cuando se emplea para vertebrados inferiores poiquilotermos como los salmones. El quitosano también presenta el inconveniente adicional de una baja resistencia mecánica y solubilidad.

Por tanto, queda pendiente la necesidad de sistemas y procesos eficaces para la microencapsulación de sustancias inmunogénicas con polímeros que tengan propiedades adhesivas y cohesivas superiores.

La patente estadounidense US 2011/293657 se refiere a una composición que comprende un agente farmacéuticamente activo y un sistema de administración bioadhesivo que prevé la administración por vía oral de una vacuna a animales, particularmente animales acuáticos.

Sumario de la invención

La presente invención supera los inconvenientes de los sistemas de encapsulación mencionados, en donde la presente invención divulga una composición diseñada para la administración por vía oral de una vacuna primaria y/o de refuerzo que se puede utilizar para animales alojados no solamente en criaderos, sino también en cercados de mallas de cultivo. Las excepcionales propiedades mucoadhesivas de las composiciones de la presente invención proporcionan un logrado método de administración de fármacos transmucoso, especialmente para vertebrados inferiores con un sistema digestivo menos desarrollado y sin placas de Peyer, como los peces.

La invención proporciona un método para preparar una composición para administración por vía oral de un agente inmunogénico que comprende:

(i) 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 lo suficientemente bajo como para gelatinizar el quitosano;

(ii) combinar un polisacárido de cadena corta u oligosacárido en la solución con el quitosano para formar una solución;

(iii) combinar un agente farmacéuticamente activo que comprende dicho agente inmunogénico con un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en beta-glucano, escualeno y aceite de escualano en una emulsión agua en aceite;

(iv) agregar la emulsión del agente farmacéuticamente activo y adyuvante de la etapa (iii) a la solución formada en la etapa (ii); y

(v) hacer precipitar o extrudir el producto de la etapa (iv) en una solución de reticulación.

La invención proporciona además una composición para la administración por vía oral de un agente inmunogénico que comprende al menos un agente farmacéuticamente activo en una cantidad de 0,05 % a 10 % p/p de la composición, al menos un polímero bioadhesivo en una cantidad de aproximadamente 0,05 % a 10 % p/p de la composición, al menos un polisacárido de cadena corta u oligosacárido en una cantidad de 0,05 % to 30 % p/p de la composición y de 0,1 % a 20 % p/p de un compuesto adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un beta-glucano, escualeno y escualano, en donde la composición se prepara a través de un método de la invención. Por otra parte, la invención proporciona un agente inmunogénico preparado de acuerdo con un método de la invención para su uso en la vacunación o refuerzo oral de un animal contra un patógeno.

Un aspecto de la presente invención proporciona un método de producción de un vehículo de administración bioadhesivo para la vacunación de animales, como por ejemplo animales acuáticos, en donde el vehículo de administración se presenta en forma de micropartículas que comprenden un agente inmunogénico incorporado o impregnado en una matriz compuesta de un quitosano reticulado y al menos un oligosacárido o polisacárido de cadena corta. Es posible utilizar cualquier oligosacárido aplicable o polisacárido de cadena corta en la composición. Entre los polisacáridos de cadena corta comunes se incluyen maltodextrinas y ciclodextrinas. Los oligosacáridos pueden incluir fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS) o inulina. Por otra parte, las micropartículas secas incluyen y se seleccionan del grupo que consiste en beta-glucano, escualeno y escualano.

En una realización, la composición comprende o consiste en al menos un agente farmacéuticamente activo en una cantidad de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 10 % p/p de la composición, al menos un polímero bioadhesivo en una cantidad de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 10 % p/p de la composición, al menos un polisacárido de cadena corta u oligosacárido en una cantidad de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 30 % p/p de la composición y al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un beta-glucano, escualeno y escualano en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % p/p de la composición.

En una realización en particular de la invención, el método comprende producir un vehículo de administración bioadhesivo que contiene una vacuna SRS para su uso en salmones.

Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un régimen de alimentación en donde se alimenta a los animales con un pienso convencional que contiene un vehículo de administración bioadhesivo que comprende un polisacárido catiónico en combinación con un agente farmacéuticamente activo para la vacunación oral de animales. En una realización en particular, el animal vacunado es un pez.

Se describe asimismo en el presente documento un método para preparar una composición para la administración por vía oral de un agente farmacéuticamente activo que comprende:

- a. preparar una solución ácida acuosa que comprende al menos un polímero bioadhesivo, en donde el polímero bioadhesivo es quitosano y la solución ácida tiene un pH lo suficientemente bajo como para solubilizar el quitosano.
- b. combinar un oligosacárido/polisacárido de cadena corta seleccionado del grupo que consiste en inulina, maltodextrina y ciclodextrina en la solución con el quitosano solubilizado para formar una solución de oligosacárido/polisacárido de cadena corta- quitosano;
- c. introducir un complejo de azúcar/emulsionante en la solución de oligosacárido/polisacárido de cadena corta- quitosano para formar una emulsión suave al mismo tiempo que se mantiene el pH de la solución ácido;
- d. combinar o emulsionar el agente farmacéuticamente activo con un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en beta-glucano, aceite de hígado de tiburón y escualano en una solución;
- e. agregar la solución del agente farmacéuticamente activo y el adyuvante a la emulsión bioadhesiva suave;
- f. formar micropartículas, perlas o hidrogel haciendo precipitar la emulsión en una solución de reticulación; y
- g. secar las micropartículas, perlas o hidrogel a través de medios convencionales.

Las micropartículas secadas pueden molerse además para obtener un tamaño de partícula inferior a 500 micrómetros.

Preferentemente, la solución de reticulación comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de aniones fosfato o carbonato. La solución de reticulación puede comprender además de aproximadamente 1 % a 30 % de un azúcar y/o un alcohol.

Otros aspectos y ventajas de la invención se harán evidentes de forma más completa a partir de la siguiente divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta el porcentaje de material seco que se recuperó de diversas formulaciones de oligosacáridos tras la reticulación y la deshidratación.

La Figura 2 presenta la detección por transferencia de Western de antígeno SRS en suspensión espesa de quitosano y después del liofilizado y la molienda. Calle 1: 4 ng SRS en suspensión espesa de quitosano; Calle 2: 2 ng SRS en suspensión espesa de quitosano; Calle 3: 1 ng SRS en suspensión espesa de quitosano; Calles 4, 5, 6 son las cantidades de SRS correspondiente en la matriz de quitosano liofilizada y molida.

La Figura 3 presenta el análisis de transferencia de Western en el que se presenta la recuperación del antígeno en el pienso de los peces. Las calles 1-5 son varias diluciones de antígeno en tampón. Las calles 6-9 son las correspondientes diluciones o pienso para peces que contienen una cantidad similar de antígeno.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Al describir la presente invención, se utiliza la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación.

Un "agente farmacéuticamente activo" se define como un material biológico que tiene como resultado la prevención, cura o alivio de una enfermedad en cualquier animal. Se pretende que todas las vacunas queden incluidas en esta

definición de agentes farmacéuticamente activos.

Un "inmunógeno" o un "agente inmunogénico" se define como una sustancia o una composición de materia que es capaz de aumentar una respuesta inmunitaria específica en un animal. Entre los agentes inmunogénicos se incluyen péptidos y proteínas inmunogénicos incluyendo mezclas que comprenden péptidos y/o proteínas inmunogénicos; partículas virales inactivas intactas, atenuadas e infecciosas; procariotas matados intactos, atenuados e infecciosos (p.ej., bacterinas), protozoos matados intactos, atenuados e infecciosos incluyendo cualquier estadio del ciclo vital de los mismos y patógenos multicelulares matados intactos, atenuados e infecciosos, vacunas subunitarias recombinantes y vectores recombinantes para suministrar y expresar genes que codifican las proteínas inmunogénicas (p.ej., vacunas de ADN).

"Vacunación" se define como un proceso que tiene como resultado una respuesta inmuno específica generada por un animal contra un inmunógeno o un agente inmunogénico.

Un "sistema de administración bioadhesivo" se define como una composición que tiene como resultado la administración de un inmunógeno o un agente inmunogénico en el emplazamiento deseado del tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) de la mucosa intestinal.

Una molécula "mucoadhesiva" es un componente de un sistema de administración bioadhesivo que se une específicamente a tejidos mucosos. Dichas moléculas incluyen, pero sin limitarse a ellas, quitosano, ácido hialurónico, goma karaya y guar catiónico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una sustancia inmunogénica mejorada para administración por vía oral. La invención se basa en el descubrimiento de propiedades sinérgicas inesperadas de una mezcla compleja de quitosano y polisacáridos de cadena corta, como fructo-oligosacárido.

Los fructanos o fructosanos son oligosacáridos o polisacáridos de cadena corta que comprenden una secuencia de unidades de anhidrofructosa combinadas opcionalmente con uno o más restos sacáridos diferentes de la fructosa. Los fructanos pueden ser lineales o ramificados. Los fructanos pueden ser productos obtenidos directamente de una planta o una fuente microbiana u otros productos con una cadena larga que ha sido modificada (aumentada o reducida) por división, síntesis o hidrólisis, en particular de la variedad enzimática. Los fructanos tienen generalmente un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 1000, preferentemente de 3 a aproximadamente 60.

El polisacárido de cadena corta u oligosacárido se utiliza preferentemente en una cantidad comprendida entre 0,01 y 30 % en peso con respecto al peso total de la composición. Más preferentemente, esta cantidad oscila entre 0,05 y 15 % en peso con respecto al peso total de la composición y, más preferentemente, entre 1 y 10 % en peso.

Los polisacáridos de cadena corta preferentes son inulinas, maltodextrinas o ciclodextrinas. Las inulinas se refieren a un grupo de oligosacáridos que contienen fructosa de origen natural. Dado que la fibra de inulina es resistente a la digestión en el tracto gastrointestinal superior (es decir, el estómago), llega al intestino grueso esencialmente intacto, en el que puede ser digerido por bacterias indígenas. Las inulinas consisten generalmente en cadenas de polifrufructosa en las que las unidades de fructosa están conectadas entre sí sobre todo o exclusivamente por uniones β -(2-1). La inulina se da en la naturaleza en general como una mezcla polidispersa de cadenas de polifrufructosa, la mayoría de las cuales terminan en una unidad glucosilo. Se derivan de las raíces de la achicoria común (*Cichoriumintybus*), la dalia y la alcachofa de Jerusalén. Por otra parte, se puede obtener inulina de síntesis bacteriana o puede prepararse *in vitro* por síntesis enzimática a partir de sacarosa. Se ha demostrado que la inulina estimula la inmunidad mucosa y parece ser que mejora la eficacia de una vacuna de Salmonella en ratones (Benyacoub et al., 2008). Aunque no está claro el mecanismo de acción, varios estudios han propuesto que la inulina puede inducir cambios en el epitelio del colon estimulando la proliferación de criptas que aumentan la concentración de poliaminas, cambiando el perfil de las mucinas y/o modulando las funciones tanto endocrinas como inmunitarias (Roberfroid, 2005). Las inulinas también estimulan el crecimiento de especies de Bifidobacterium en el intestino grueso. El grado de polimerización promedio de las inulinas distribuidas en el comercio como suplementos nutricionales es de 10 a 12.

Maltodextrina se refiere a un grupo de hidratos de carbono (complejos) polisacáridos de cadena corta que se definen como una unidad de repetición de un azúcar simple (como glucosa o dextrosa). La maltodextrina se deriva de un almidón natural por exposición a un ácido o a enzimas para digerir parcialmente y descomponer el almidón en polímeros más pequeños.

Las ciclodextrinas (CD) se refieren a una familia de oligosacáridos cíclicos. Las CD derivan su sistema de nomenclatura del número de restos de glucosa en su estructura, de manera que el hexámero de glucosa se denomina α -CD, el heptámero β -CD y el octómero χ -CD.

Estos polisacáridos de cadena corta funcionan en la composición de la presente invención como vehículos de fármaco multifuncionales, a través de la formación de un complejo de inclusión o la formación del conjugado hidrato de carbono/vacuna y potenciando así posiblemente la biodisponibilidad de la vacuna.

5 Quitosano es un polisacárido catiónico lineal que se gelifica o se reticula en presencia de aniones, como citrato, fosfato o sulfato. Se ha demostrado que quitosano posee útiles propiedades como pueda ser la ausencia de toxicidad, una alta biocompatibilidad y la falta de antigenicidad. Si bien el quitosano en sí es insoluble en agua en gran medida, la solubilidad aumenta notablemente si se desplaza el pH hacia un estado ácido. Para obtener una concentración de polímero apreciable es necesario pues preparar la solución o dispersión con el uso simultáneo de un ácido. Para poder eliminar con mayor facilidad el ácido de la composición después, se llegó a la conclusión de que el ácido debía tener un punto de ebullición bajo, concretamente de forma preferente y como máximo 140 °C, en particular, como máximo 120 °C, siendo especialmente preferente como máximo 100 °C y siendo preferente sobre todo como máximo 80 °C, como por ejemplo cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido fórmico y ácido acético. Otros ácidos adecuados tienen la capacidad de formar un azeótropo binario con un punto de ebullición más bajo con agua, como ácido acético o ácido propiónico.

El quitosano puede obtenerse a través de la desacetilación de quitina, el compuesto principal de los exoesqueletos de los crustáceos. El quitosano [α -(1~4)-2-amino-2-desoxi- β -D-glucano], un mucopolisacárido íntimamente relacionado con la celulosa, presenta propiedades químicas que se determinan según 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 entorno ácido del estómago, el quitosano retiene sus cargas positivas que mantienen las partículas unidas. Se ha demostrado que micropartículas de quitosano cargadas con ovoalbúmina pueden ser absorbidas por las placas de Peyer del tejido linfoide asociado al intestino de vertebrados superiores. Por otra parte, tras la co-administración de quitosano con antígenos en estudios de vacunación nasal, se observó una fuerte potenciación de las respuestas inmunitarias tanto mucosa como sistémicas en ratones (van der Lubben et al., 2001).

A continuación, se explica un método general para preparar las composiciones para suministrarlos a la mucosa del intestino. Generalmente, una solución acuosa, suspensión o emulsión de un agente farmacéuticamente activo (p.ej., un agente inmunogénico, incluyendo, pero sin limitarse a ellos vacunas) y, si se desea, incluyendo pero sin limitarse a ellos beta-glucano, lipopolisacárido, sales de aluminio, virosomas y/o escualeno. El escualeno o su forma saturada – escualano- es un aceite natural de hidrocarburo o producido principalmente a partir del aceite de hígado de tiburón o un aceite vegetal como aceite de oliva. En el organismo del animal, el escualeno desempeña un papel vital en la síntesis de colesterol, hormonas esteroideas y vitamina D. Los β -glucanos (beta-glucanos) son polisacáridos de monómeros de D-glucosa unidos mediante enlaces β -glucosídicos. Los β -glucanos son un grupo diverso de moléculas que pueden variar con respecto a la masa molecular, la solubilidad y la viscosidad y la configuración tridimensional. Se dan sobre todo de forma común como celulosa en las plantas, el salvado de los granos de cereal y la pared celular de las levaduras de panadero, ciertos hongos, setas y bacterias.

Se disuelve o suspende el complejo de vacuna/adyuvante en una solución acuosa de un polímero mucoadhesivo adecuado como por ejemplo, pero sin limitarse solo a ellos, quitosano y un polisacárido de cadena corta u oligosacárido adecuado, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, inulina, maltodextrina y ciclodextrina. A continuación, se dispersa la solución/suspensión resultante directamente por atomización en una solución de reticulación acuosa que contiene sales de fosfato hidrosolubles. Tras el contacto, tiene lugar una reacción de intercambio salino (reticulación) que tiene como resultado la formación de perlas o cápsulas en las que queda retenido el agente farmacéuticamente activo. A continuación, se recoge la suspensión resultante de micropartículas o perlas que contiene el agente farmacéuticamente activo encapsulado, se seca y se muele si es necesario para formar partículas que tienen un tamaño comprendido en el intervalo de 10 a 1000 micrómetros. Los detalles acerca de su preparación se exponen en la serie de etapas que se expone a continuación:

50 Etapa (a): Preparación de hidrogel mucoadhesivo complejo: Se dispersa un polímero mucoadhesivo como quitosano, a una concentración de 1 a 10 % (p/p) (en una solución de ácido acético 0,1-5 N, a una temperatura en el intervalo de 20 a 65 °C hasta que todo el granulado de polímero queda totalmente disuelto. Preferentemente, el quitosano está desacetilado en al menos un 85 %. Por otra parte, preferentemente el pH de la solución acuosa ácida es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. La gelatinización del granulado de polímero es necesaria para preparar una micropartícula que posee las propiedades inmunogénicas.

En realizaciones de la invención, se añaden asimismo componentes de polisacárido de cadena corta a una concentración de aproximadamente 1 a 30 % (p/p) para mejorar la protección del antígeno contra la acidez del estómago, los ácidos biliares y las proteasas y aumentar la adsorción intestinal y la biodisponibilidad del antígeno. Entre los ejemplos de materiales que se pueden aplicar se incluyen, sin limitarse a ellos, oligosacárido de quitosano (COS), inulina, fruto-oligosacáridos (FOS) y diversas dextrinas, como maltodextrinas y ciclodextrinas. Estos componentes para aumentar la absorción pueden disolverse más fácilmente en los jugos intestinales que en otros materiales de matriz. En consecuencia, es posible aumentar la permeabilidad y biodegradabilidad del polímero de matriz con el resultado de una mejor liberación del agente farmacéuticamente activo en una localización deseada del TLAI de la mucosa intestinal.

Etapa (b): Formación de complejo del material mucoadhesivo y un polisacárido de cadena corta u oligosacárido. Sin pretender vincularse a teoría alguna, se cree que el proceso descrito en el presente documento produce una nueva composición compleja mediada por un complejo emulsionante/azúcar y que comprende polisacáridos y oligosacáridos en forma de una matriz compleja que tiene un carácter de micropartícula insoluble. Generalmente, los emulsionantes pueden ser, pero sin limitarse a ellos, cualquiera entre monoglicéridos, ésteres de sorbitano, ésteres de propileno glicol, lecitina, polisorbatos y ésteres de sacarosa de ácidos grasos saturados de cadena media y larga, y los azúcares serán cualquier mono- o disacárido, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, glucosa, fructosa o sacarosa. Se añade una solución que comprende una mezcla de mediación emulsionante/azúcar (que contiene de 0,5 a 12,5 % p/p de emulsionante y de 5 a 30 % p/p de azúcar) al polisacárido mucoadhesivo y la solución de polisacárido de cadena corta u oligosacárido a un intervalo de temperatura de 20 a 65 °C y pH 3-5 hasta que se forma una emulsión suave y estable. Se estabiliza esta emulsión por interacción entre la carga positiva del polisacárido catiónico, el emulsionante y los grupos hidroxilo de los polisacáridos de cadena corta u oligosacáridos. La mayor hidrofobia y elasticidad del polisacárido mucoadhesivo y el emulsionante ayuda a retrasar o impedir la penetración de agua o jugos gástricos en la matriz una vez formada en micropartículas.

Etapa (c): Adición de sustancia inmunogénica. Se mezcla una solución que comprende un agente farmacéuticamente activo, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, un inmunógeno o un antígeno inmunogénico con un adyuvante como beta-glucano o se emulsiona con aceite de escualeno en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a 10 % (p/p) en peso de la composición y, más preferentemente de aproximadamente 1 % a 4 % y después se mezcla en la solución mucoadhesiva descrita en la Etapa (b) anterior.

Etapa (d) Reacción de reticulación. Se puede secar la suspensión espesa para producir un polvo a través de una serie de métodos conocidos dentro de la especialidad entre los que se incluyen, sin limitarse a ellos, secado por pulverización a baja temperatura, secado en cinta, liofilización, secado en tambor o secado instantáneo. En una realización preferente, se extruye la suspensión espesa a través de un tubo o una aguja que oscila entre 10 µm y 1,000 µm de diámetro para caer gota a gota o en una corriente continua en una solución reticulada que contiene 1-15 % de trifosfato de sodio (TPP) en 1-30 % alcohol en solución acuosa. Alternativamente, se puede atomizar por pulverizado la suspensión espesa en una solución de alcohol/acuosa que contiene 1-10 % de trifosfato sódico. Se pueden recoger las partículas húmedas del baño de reticulación en cualquier medio adecuado conocido en la especialidad (p.ej., filtración, centrifugación, etc.) y mezclarse con cualquier agente espesante aceptable como metil celulosa, pectina, alginato, goma de xantana, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa y similares y pulverizarse en aglomerados de pienso (es decir, revestir en su superficie). Alternativamente, se pueden secar las partículas húmedas utilizando procesos convencionales conocidos en la especialidad como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, secado al vacío, liofilización, secado por pulverización y secado en túnel, molerse hasta la clase de tamaño apropiada si es necesario y a continuación, mezclarse con aceite de pescado u otro pescado comestible antes de su aplicación al pienso disponible en el mercado por revestimiento en su superficie aplicando los métodos conocidos en la técnica.

En una realización, se mezcla la suspensión espesa con sacarosa antes del proceso de secado y/o el proceso de extrusión y se reticula en 1-15 % p/p TPP + 1-30 % p/p azúcar en 1-30 % p/p de alcohol en solución acuosa seguido de secado.

Estrategia de alimentación para vacunación oral: Los peces que tienen un sistema inmunitario maduro (para el Salmón Atlántico generalmente a aproximadamente 0,5 g) están preparados para su vacunación oral. No obstante, la presente invención proporciona una estrategia flexible que permite también la vacunación o un refuerzo de la respuesta inmunogénica de peces más grandes y otros animales. Para inducir eficazmente la respuesta inmunogénica, deberá alimentarse a los peces u otros animales por vía oral en un solo episodio a una dosis similar o mayor de inmunógeno que la proporcionada habitualmente por inyección o inmersión. Para aumentar al máximo la inmunogenicidad del pez y dependiendo del tipo de inmunógeno, el tamaño del pez y la capacidad de respuesta, se puede repetir este único episodio de alimentación (p.ej., cada tres días durante hasta diez episodios de alimentación).

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de un sistema de administración bioadhesivo que contiene antígeno de ovoalbúmina de huevo. Se disolvió quitosano DE superior (>80 %, Sigma, St. Louis, Mo.), (3 gramos) en 100 ml de ácido acético 0,5 N a 50 °C. Se agregaron veinte (20) gramos de inulina instantánea (Cargil, Minneapolis, Minn.) o veinte (20) gramos de maltodextrina DE1 o veinte (20) gramos de ciclodextrina para preparar una suspensión espesa ácida. Se agregaron tres (3) gramos de lecitina de soja (Archer-Daniels-Midland Co., Decatur, Ill.) a la suspensión espesa ácida y se dejó formar el complejo con mezclado continuo con la solución de quitosano durante 30 minutos. A continuación, se ajustó el pH de la suspensión espesa compleja ácida a 5,8 con hidróxido sódico y se dejó enfriar la suspensión espesa hasta la temperatura ambiente. Se incorporó una solución de 10 ml que contenía 100 mg de ovoalbúmina de huevo y 100 mg de beta-glucano (Sigma) en la suspensión espesa y se extruyó la suspensión espesa a través de una aguja de 21 G en una solución de 50 ml que contenía 10 % p/p de trifosfato sódico, 40 % p/p de sacarosa y

20 % de isopropanol para formar tiras de hidrogel. Al cabo de aproximadamente 2 horas de endurecimiento en la solución de reticulación, se recogieron las tiras de hidrogel firmes, se liofilizaron durante toda la noche y se molieron a un tamaño de partícula por debajo de 200 micrómetros. En la Figura 1 se muestra el porcentaje de material seco que se recuperó tras la reticulación y el secado de diferentes formulaciones de polisacárido de cadena corta u oligosacáridos. Se demuestra que la ciclodextrina quedó capturada sobre todo (94 %) dentro de los polímeros de quitosano reticulados en comparación con la inulina (66 %) o maltodextrina DE1 (84 %).

Ejemplo 2

Producción de partículas bioadhesivas que contienen vacuna contra la septicemia Rickettsial salmonidea (SRS). Se preparó una suspensión espesa compleja a un pH 5,8 (100 ml) tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se mezclaron diez (10) ml de solución que contenía la vacuna SRS atenuada (5×10^{11} /ml bacterias SRS matadas) sin adyuvante (disponible en el mercado distribuido por el fabricante de la vacuna) con 100 mg de beta-glucano y se mezcló en la solución de quitosano). A continuación, se extruyó la suspensión espesa en 50 ml de solución de reticulación tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se dejaron endurecer las tiras de hidrogel durante 3 horas y después se recogieron desde la solución y se liofilizaron durante toda la noche y se molieron a un tamaño de partícula por debajo de 200 micrómetros. En la Figura 2 se representa el análisis de cromatografía de gel de transferencia de Western que presenta la recuperación de varias cantidades de antígeno SRS desde el polvo de quitosano liofilizado en relación con su cantidad en la suspensión espesa de quitosano antes de la liofilización. El análisis demuestra que el antígeno retuvo su inmunogenicidad y actividad dentro de la matriz de quitosano y no quedó afectada por el proceso de encapsulación.

Ejemplo 3

Pienso para animales que contiene micropartículas inmunogénicas para administración por vía oral. Se mezclaron quince (15) gramos de micropartículas inmunogénicas secadas preparadas como en los Ejemplos 1 y 2 con 30 g de aceite de pescado. Se pulverizó la mezcla oleosa sobre 1 kg de pienso comercial convencional para animales incluyendo peces, ganado y pollos o animales de compañía. En la Figura 3 se representa un análisis de cromatografía de gel de transferencia de Western en el que se presenta la recuperación del antígeno desde el pienso para peces en relación con una cantidad similar en tampón PBS. El análisis demuestra que el antígeno retuvo su inmunogenicidad y actividad a lo largo del proceso de encapsulación y el revestimiento del pienso para peces.

Ejemplo 4

Vacunación oral de salmón atlántico utilizando las micropartículas inmunogénicas de la presente invención. Se reservan crías de salmón atlántico de aproximadamente 10 g de tamaño en 30 kg/m³ de agua fresca y a una temperatura de 12 °C. Se mantiene la calidad del agua intercambiando rápidamente el agua del tanque a través de sistemas mecánicos y de biofiltración. Se alimenta a los peces 4 veces diarias con una ración total de 2 % su peso en un pienso comercial. Cada 3 días, se reemplazan las dietas con una dieta revestida en su superficie con la vacuna al 2 % tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 durante un período de hasta 30 días. Se mide la titulación de anticuerpos elevada contra la vacuna suministrada oralmente en el suero sanguíneo de los peces durante los siguientes cuatro meses.

Ejemplo 5

Producción de partículas bioadhesivas que contienen vacuna contra la anemia infecciosa de salmón (ISA). La anemia infecciosa del salmón (ISA) es una enfermedad ortomixovírica que ha producido unos efectos devastadores en las piscifactorías de salmón del atlántico. Se produjo pienso para peces que contiene micropartículas inmunogénicas contra ISA tal como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3. Se preparó una suspensión espesa completa a un pH 5,8 (100 ml) que contenía ciclodextrina (polisacárido de cadena corta u oligosacárido) tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se emulsionaron ocho (8) ml de solución que contenía vacuna contra ISAV recombinante (disponible en el mercado distribuida por el fabricante de la vacuna) con 10 ml de escualeno y 2 ml de Span-80 utilizando una homogeneizadora Ultra-Torax a 15.000 rpm y se mezcló la emulsión en la solución de quitosano utilizando una mezcladora manual de baja velocidad a 1000 rpm). A continuación, se extruyó la suspensión espesa en 50 ml de una solución de reticulación tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se dejó endurecer las tiras de hidrogel durante 3 horas y después se recogieron de la solución y se liofilizaron durante toda la noche y se molieron a un tamaño de partícula por debajo de 200 micrómetros.

Ejemplo 6

Se desarrollan vacunas orales bivalentes para salmón atlántico contra SRS e ISAV utilizando el pienso revestido en su superficie con micropartículas inmunogénicas de la presente invención. Se crían crías de salmón atlántico de aproximadamente 10 g de tamaño tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se alimenta a los peces 4 veces diariamente con una ración total de 2 % de peso corporal de un pienso comercial. Cada tres (3) días durante un período de hasta 30 días, se reemplaza la dieta con un pienso revestido en su superficie que contiene 2 % de

vacuna SRS y 2 % de vacuna ISAV tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 y 5, respectivamente. Se miden las titulaciones elevadas de anticuerpos contra las vacunas bivalentes administradas oralmente en el suero sanguíneo del pez durante los siguientes cuatro meses.

5 Referencias

- 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.
- Chopra, S., Mahdi, S., Kau, r.J., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., F.J, A., 2006. Advances y potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 58(8), 1021-1032.
- Dang, J.M., Leong, K.W., 2006. Natural polymers for gene delivery y tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(4), 487-499.
- Davis, S.S., 2006. The use of soluble polymers y polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral y mucosal delivery. *Vaccine* 24(2), 7-10
- 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 Bordetellabronchiseptica antigens containing dermonecrotxin. *Vaccine* 25(23), 4602-4610.
- Kim, T.J., Kim, K.H., Lee, J.I., 2007. Stimulation of mucosal y systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of *Actinobacilluspleuropneumoniae* with chitosan after tracheal administration in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* 69(5), 535-539.
- Malik, D.K., Baboota, S., Ahuja, A., Hasan, S., Ali, J., 2007. Recent advances in protein y 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.
- 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 y preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22(7), 687-694.
- Wu, X.S., 2004. Synthesis, characterization, biodegradation y drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol* 32(4), 575-591.
- S. Bravo y PJ Midtlyng (2007) The Use of Fish Vaccines in the Chilean Salmon Industry 1999-2003. *Aquaculture* 270: 36-42.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición para la administración por vía oral de un agente inmunogénico, que comprende:
- 5 (i) 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 lo suficientemente bajo para gelatinizar el quitosano;
- (ii) combinar un polisacárido o un oligosacárido de cadena corta en la solución con el quitosano para formar una solución;
- 10 (iii) combinar un agente farmacéuticamente activo que comprende dicho agente inmunogénico con un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en beta-glucano, escualeno y aceite de escualano en una emulsión de agua en aceite;
- (iv) agregar la emulsión de agente farmacéuticamente activo y adyuvante de la etapa (iii) a la solución formada en la etapa (ii); y
- 15 (v) hacer precipitar o extrudir el producto de la etapa (iv) en una solución de reticulación.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el polisacárido o el oligosacárido de cadena corta se seleccionan entre inulina, maltodextrinas o ciclodextrinas.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende del 0,1 % al 10 % del compuesto adyuvante.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto adyuvante se selecciona entre beta glucanos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en donde en el agente farmacéutico se emulsiona en el aceite para formar una emulsión estable de agua en aceite.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el agente de reticulación comprende del 1 % al 20 % de aniones fosfato o carbonato.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en donde la solución de reticulación comprende además del 1 % al 30 % de un azúcar.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la solución de reticulación comprende además del 1 % al 30 % de un alcohol.
- 35 9. Una composición para la administración por vía oral de un agente inmunogénico que comprende al menos un agente farmacéuticamente activo en una cantidad del 0,05 % al 10 % p/p de la composición, al menos un polímero bio-adhesivo en una cantidad de aproximadamente el 0,05 % al 10 % p/p de la composición, al menos un polisacárido o un oligosacárido de cadena corta en una cantidad del 0,05 % al 30 % p/p de la composición y del 0,1 % al 20 % p/p de un compuesto adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un beta-glucano, un escualeno y un escualano, en donde la composición se prepara a través del método de la reivindicación 1.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9, en donde dicho agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en péptidos inmunogénicos, proteínas inmunogénicas; partículas virales inactivas intactas, partículas virales atenuadas, partículas virales infecciosas; procariotas matados intactos, procariotas atenuados, procariotas infecciosos, protozoos matados intactos, protozoos atenuados, protozoos infecciosos, patógenos multicelulares matados intactos, patógenos multicelulares atenuados, patógenos multicelulares infecciosos, vacunas subunitarias recombinantes, vectores recombinantes que codifican proteínas inmunogénicas y una mezcla de los mismos, en donde dicho agente inmunogénico es una mezcla o una emulsión de un agente farmacéuticamente activo y un compuesto adyuvante.
- 50 11. La composición de la reivindicación 9, en donde dicho polímero bioadhesivo se selecciona del grupo que consiste en quitosano, dimetil quitosano, trimetil quitosano, carboximetil quitosano, guar catiónica y una mezcla de los mismos.
- 55 12. La composición de la reivindicación 9, en donde dichos polisacárido u oligosacárido de cadena corta se seleccionan del grupo que consiste en fructanos, maltodextrinas, ciclodextrinas y una mezcla de los mismos.
- 60 13. Un agente inmunogénico preparado de acuerdo con el método de la reivindicación 1 para su uso en la vacunación o el refuerzo por vía oral de un animal contra un patógeno.
14. Un agente inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 13 cuando se mezcla con un vehículo líquido para dispersión o pulverización sobre el pienso animal.
- 65

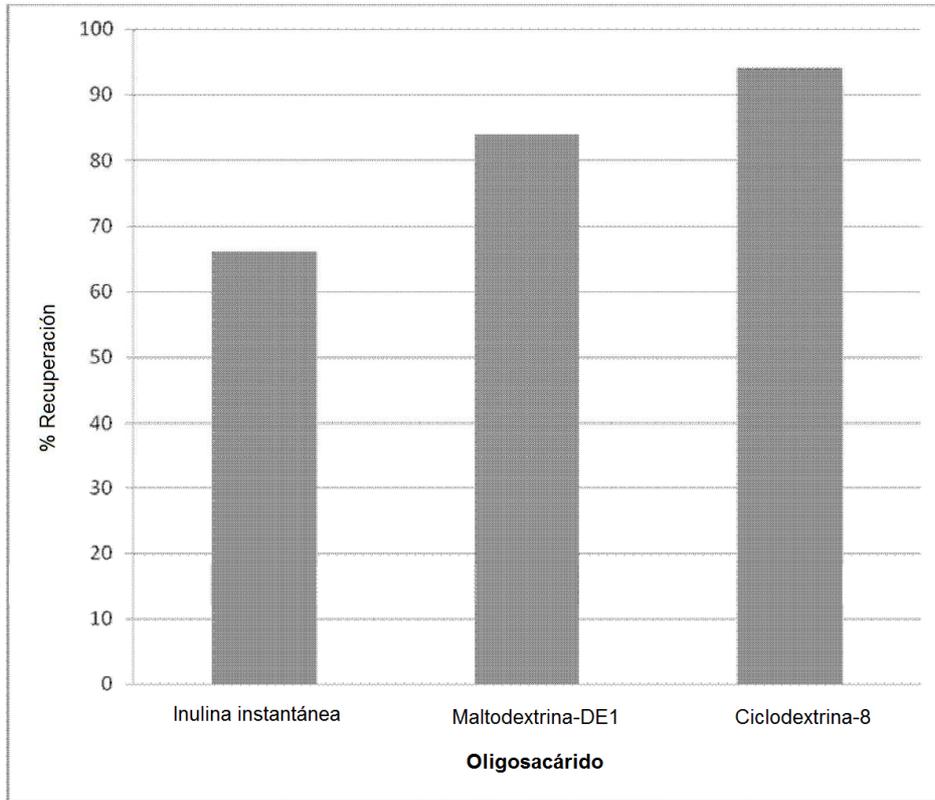


Figura 1

ES 2 693 539 T3

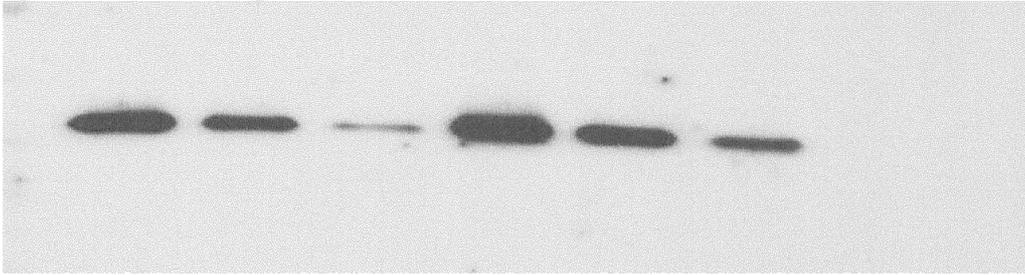


Figura 2

ES 2 693 539 T3



Figura 3